



**METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O ESTUDO DA  
INTERAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO COM ALGUNS  
AMINOÁCIDOS PRESENTES EM SOLUÇÕES DE NUTRIÇÃO  
PARENTERAL**

**TESE DE DOUTORADO**

**Marieli da Silva Marques**

**PPGQ**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2005**

**METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O ESTUDO DA  
INTERAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO COM ALGUNS  
AMINOÁCIDOS PRESENTES EM SOLUÇÕES DE NUTRIÇÃO  
PARENTERAL**

**por**

**Marieli da Silva Marques**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado 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

**Doutor em Química**

**PPGQ**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2005**

Dedico esta Tese  
as pessoas que me apoiaram de  
todas as formas, principalmente  
minha mãe Vera, minha irmã  
Mariclei e meu cunhado Cristiano  
que me acompanharam e me deram  
forças durante todo o período de  
realização deste trabalho. Aos  
maravilhosos e fiéis amigos que  
Deus me concedeu.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento pela orientação neste trabalho, pela oportunidade, pelo auxílio e principalmente pelo exemplo como profissional e pessoa humana.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Denise Bohrer do Nascimento, pela co-orientação neste trabalho e pelos esclarecimentos de dúvidas e o apoio demonstrado ao longo deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho, obrigada pelo auxílio.

Aos colegas Adrian Gustavo Ramirez, Maurício Hilgemann, Cristiane Jost, Vânia Polli, Sandra Maria Ribeiro, Jean Karlo Acosta Mendonça, Emilene Mendes Becker, Claudia Carvalho, Ana Lúcia Becker Rohlfes, Denise Bertagnolli, Joselito Trevisan, Eduardo Jorge Pilau, Zilda Baratto, Luciana Del Fabro, Mareni Pauletto e Sabrina Schirmer pela amizade, apoio e momentos de descontração vividos ao longo deste período em que trabalhamos juntos.

A todos os funcionários e professores que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade oferecida de realizar o curso de graduação, mestrado e doutorado.

A instituição CNPq pelo financiamento deste projeto.

A Deus por tudo que Ele me concede, especialmente a saúde, força e fé. Obrigada meu Deus e Senhor!

## SUMÁRIO

Lista de figuras .....	x
Lista de tabelas .....	xii
Lista de siglas e abreviações .....	xv
Resumo .....	xvii
Abstract .....	xx
<b>1 Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>3</b>
2.1 Nutrição parenteral .....	3
2.2 Aplicação das soluções de nutrição parenteral .....	4
2.3 Classificação das soluções de nutrição parenteral .....	5
2.4 Contaminação das soluções de nutrição parenteral.....	5
2.5 Aminoácidos.....	6
2.5.1 Teoria HSAB (ácidos e bases/duros e moles).....	8
2.5.2 Interações metais-aminoácidos .....	11
2.5.3 Constante de estabilidade ( $\beta$ ) .....	12
2.6 Cádmio e chumbo.....	15
2.6.1 A interação entre metais essenciais e metais tóxicos .....	18
2.7 Determinação de metais por Voltametria.....	21
2.7.1 Voltametria de redissolução anódica .....	22
2.8 Pré-tratamentos.....	24
2.8.1 Separação e pré-concentração .....	25
2.8.2 Digestão por via úmida .....	26
2.8.3 Digestão por irradiação de microondas.....	27
2.8.4 Digestão por irradiação com luz ultravioleta .....	29

2.8.4.1 Oxidantes formados sob influência da radiação UV.....	31
2.8.4.2 Aplicação da digestão UV na determinação de metais.....	33
2.9 Determinação de aminoácidos por cromatografia líquida.....	34
2.9.1 Métodos de derivação dos aminoácidos.....	36
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>38</b>
3.1 Instrumentação.....	38
3.2 Cuidados com a contaminação.....	40
3.3 Reagentes e Soluções.....	40
3.3.1 Preparo das soluções.....	41
3.3.2 Soluções de nutrição parenteral.....	42
3.4 Determinação voltamétrica de zinco, cádmio, chumbo e cobre ...	42
3.5 Pré-tratamento das amostras.....	43
3.5.1 Separação e pré-concentração dos metais das soluções de NP..	43
3.5.1.1 Confeção das colunas de PE.....	43
3.5.1.2 Separação e pré-concentração dos metais em colunas de PE- PAN.....	44
3.5.2 Digestão por via úmida.....	45
3.5.3 Irradiação por microondas.....	45
3.5.4 Irradiação ultravioleta (UV).....	48
3.5.4.1 Estudo do efeito da concentração da amostra e do tempo de irradiação UV.....	48
3.5.4.2 Estudo do tipo de ácido mineral e da concentração de peróxido .....	48
3.6 Purificação do peróxido de hidrogênio.....	49
3.7 Sistema cromatográfico.....	50
3.8 Quantificação dos aminoácidos.....	51
3.9 Aplicação do método cromatográfico no estudo da interação de cádmio e chumbo com os aminoácidos.....	52

3.9.1 A luminescência dos aminoácidos e dos aminoácidos na presença de cádmio e chumbo.....	52
3.9.2 O espectro de absorção molecular dos aminoácidos e dos aminoácidos na presença de cádmio e chumbo .....	53
3.9.3 Interação do metal numa mistura dos aminoácidos .....	53
3.9.4 Efeito do pH na interação do cádmio e chumbo com os aminoácidos.....	56
3.9.5 Influência do tempo na interação de cádmio e chumbo com aminoácidos .....	57
3.10 Determinação da fração livre e da fração combinada de cádmio e chumbo .....	57
3.10.1 Determinação de cádmio e chumbo por espectrometria de absorção atômica .....	59
3.10.2 Determinação de cádmio e chumbo por voltametria .....	59
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>60</b>
4.1 Determinação da contaminação das soluções de NP com zinco, cádmio, chumbo e cobre.....	60
4.2 Pré-tratamentos.....	61
4.2.1 Separação e pré-concentração dos metais das soluções de NP... ..	62
4.2.2 Digestão por via úmida .....	67
4.2.3 Irradiação com microondas .....	70
4.2.4 Irradiação com luz Ultravioleta.....	74
4.2.4.1 Efeito da concentração da amostra e do tempo de irradiação UV .....	75
4.2.4.2 Influência da adição de ácidos e peróxido .....	77
4.2.4.3 Digestão UV sob as condições otimizadas .....	78
4.3 Comparação entre os pré-tratamentos.....	81
4.4 Aplicação .....	85
4.5 Interação metal-aminoácido .....	88

4.6 Determinação dos aminoácidos por cromatografia líquida .....	89
4.6.1 Sistema cromatográfico.....	90
4.6.2 Derivação dos aminoácidos.....	92
4.7 Quantificação dos aminoácidos .....	93
4.8 Aplicação do método cromatográfico no estudo da interação de cádmio e chumbo com os aminoácidos.....	98
4.8.1 A luminescência de soluções dos aminoácidos e soluções dos aminoácidos e metal .....	100
4.8.2 Espectro de absorção molecular dos aminoácidos e dos aminoácidos na presença de cádmio ou chumbo .....	101
4.8.3 Interação do metal numa mistura dos aminoácidos .....	103
4.8.4 Influência do pH das amostras na intensidade do sinal cromatográfico .....	107
4.8.5 Influência do pH na interação do metal com os aminoácidos .....	108
4.9 Influência do tempo na interação de cádmio e chumbo com os aminoácidos .....	109
4.10 Determinação da fração livre e da fração combinada de cádmio e chumbo .....	117
4.10.1 Determinação de cádmio e chumbo por espectrometria de absorção atômica .....	118
4.10.2 Determinação de cádmio e chumbo por voltametria .....	120
4.11 Aplicação em amostras comerciais de NP .....	123
4.12 Interação do metal com os aminoácidos em amostras de NP ...	125
<b>5. Considerações finais e conclusões .....</b>	<b>130</b>
<b>6. Referências bibliográficas .....</b>	<b>133</b>
APÊNDICE A – Nome comercial, fabricante e composição das soluções de NP .....	148
APÊNDICE B – Parâmetros experimentais das medidas voltamétricas .....	150

APÊNDICE C - Condições de operação do AAS e programas de temperatura empregados na análise de zinco, cádmio, chumbo e cobre .....	152
APÊNDICE D - Diagrama da composição fracionária dos aminoácidos em diferentes valores de pH.....	155
APÊNDICE E - Diagrama de solubilidade das espécies em uma solução de cádmio e em uma solução de chumbo .....	162
APÊNDICE F - Parâmetros utilizados na cromatografia líquida – eluição por gradiente .....	169

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Classes de compostos que sofrem decomposição pela radiação UV .....	30
<b>Figura 2:</b> Sistema de HPLC usado para a determinação dos aminoácidos, onde EI: 0,4 mol L <sup>-1</sup> NaCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> /0,001 mol L <sup>-1</sup> NaOH em 2% CH <sub>3</sub> OH e EII: 0,023 mol L <sup>-1</sup> NaOH/ 0,007 mol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .....	50
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática das soluções empregadas no estudo da interação do cádmio em uma mistura dos aminoácidos.....	54
<b>Figura 4:</b> Representação gráfica do cálculo, onde: X corresponde a solução contendo 10 μ mol L <sup>-1</sup> de cada aminoácido e 10 μ mol L <sup>-1</sup> do metal; F1 corresponde ao aminoácido livre e F2 ao aminoácido combinado com o metal .....	55
<b>Figura 5:</b> Soluções dos aminoácidos em diferentes valores de pH .....	56
<b>Figura 6:</b> Voltamograma de uma amostra de NP de grande volume sem pré-tratamento .....	66
<b>Figura 7:</b> Determinação de Zn, Cd, Pb e Cu por ASV em amostra de NP após irradiação UV sob as condições otimizadas: (a) amostra; (b) amostra + 100 μg L <sup>-1</sup> Zn, 1 μg L <sup>-1</sup> Cd, 5 μg L <sup>-1</sup> Pb e 25 μg L <sup>-1</sup> Cu; (c) amostra + 200 μg L <sup>-1</sup> Zn, 2 μg L <sup>-1</sup> Cd, 10 μg L <sup>-1</sup> Pb e 50 μg L <sup>-1</sup> Cu .....	84
<b>Figura 8:</b> Programa de eluição da FM, onde EI: 0,4 mol L <sup>-1</sup> NaCH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> /0,001 mol L <sup>-1</sup> NaOH em 2% CH <sub>3</sub> OH e EII: 0,023 mol L <sup>-1</sup> NaOH/ 0,007 mol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .....	92
<b>Figura 9:</b> Reações da derivação dos aminoácidos .....	93

- Figura 10:** Cromatogramas das soluções padrões: 3,0; 6,0 e 12,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; onde (1) ala, (2) gli, (3) ser, (4) met, (5) treo, (6) hist, (7) fen, (8) asp, (9) glu ..... 97
- Figura 11:** Cromatogramas das soluções contendo 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cada aminoácido e em (a) sem adição de metal; (b) na presença 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cádmio; (c) na presença 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de chumbo. (1) ala, (2) gli, (3) ser, (4) met, (5) treo, (6) hist, (7) fen, (8) glu, (9) asp. .... 99
- Figura 12:** Redução da intensidade de luminescência dos aminoácidos com a adição do metal..... 100
- Figura 13:** Tendência de interação aminoácido-metal apresentada pelas amostras..... 101
- Figura 14:** Espectro de uma solução ácido glutâmico-OPA-SH, espectro de uma solução ácido glutâmico-Cd-OPA-SH e espectro de uma solução ácido glutâmico-Pb-OPA-SH em razão molar 1:1..... 102
- Figura 15:** Porcentagem dos aminoácidos complexados com cádmio, nas amostras que contém 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cada aminoácido e adições de 10,0 (a); 20,0 (b) e 30,0 (c)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cádmio..... 104
- Figura 16:** Porcentagem dos aminoácidos complexados com chumbo, nas amostras que contém 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cada aminoácido e adições de 10,0 (a); 20,0 (b) e 30,0 (c)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de chumbo..... 106
- Figura 17:** Variação do sinal cromatográfico dos aminoácidos em diferentes valores de pH..... 108

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Classificação dos ácidos e bases de Lewis usando o critério duros e moles.....	9
<b>Tabela 2:</b> Constantes de estabilidades dos aminoácidos com cádmio e chumbo [29] .....	15
<b>Tabela 3:</b> Programa de MW para abertura das amostras [101].....	46
<b>Tabela 4:</b> Composição das soluções injetadas no sistema de HPLC .....	58
<b>Tabela 5:</b> Metais contaminantes do eluato de 10 amostras de NP, medidos por ASV.....	63
<b>Tabela 6:</b> Metais contaminantes no eluato das amostras e sua recuperação em amostras fortificadas com $5\mu\text{gL}^{-1}$ de cada metal, medidos por ASV ..	64
<b>Tabela 7:</b> Comparação entre os resultados obtidos por ASV e AAS na análise de amostras de NP de pequeno volume .....	65
<b>Tabela 8:</b> Contaminação dos brancos, medida por ASV .....	69
<b>Tabela 9:</b> Metais medidos por ASV, após a digestão com irradiação de MW, ( $n = 3$ ) .....	72
<b>Tabela 10:</b> Determinação dos metais adicionados às amostras ( $n = 3$ ), após a digestão com irradiação de MW.....	73
<b>Tabela 11:</b> Determinação dos metais por ASV, após a digestão com irradiação UV, ( $n = 3$ ).....	79
<b>Tabela 12:</b> Determinação dos metais em amostras fortificadas, após a digestão com irradiação UV.....	80
<b>Tabela 13:</b> Comparação entre os valores de branco para os diferentes pré-tratamentos estudados .....	83

<b>Tabela 14:</b> Comparação das condições otimizadas para a digestão de amostras de NP por irradiação de MW e UV.....	85
<b>Tabela 15</b> Determinação dos metais por ASV em 7 amostras comerciais de NP após a digestão com irradiação por MW ou irradiação UV .....	86
<b>Tabela 16:</b> Tempo de retenção dos aminoácidos após separação cromatográfica.....	91
<b>Tabela 17:</b> Sinais cromatográficos, em $\mu\text{A}$ , das soluções padrões dos aminoácidos.....	94
<b>Tabela 18:</b> Parâmetros das curvas analíticas das soluções padrões dos aminoácidos.....	95
<b>Tabela 19:</b> Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) dos aminoácidos.....	96
<b>Tabela 20:</b> Porcentagem de complexo aminoácido – cádmio formado numa solução contendo $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada aminoácido e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cádmio em relação ao tempo.....	110
<b>Tabela 21:</b> Porcentagem de complexo aminoácido – cádmio formado numa solução contendo $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada aminoácido e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cádmio em relação ao tempo.....	111
<b>Tabela 22:</b> Porcentagem de complexo aminoácido – cádmio formado numa solução contendo $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada aminoácido e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cádmio em relação ao tempo.....	112
<b>Tabela 23:</b> Porcentagem de complexo aminoácido – chumbo formado numa solução contendo $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada aminoácido e $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de chumbo em relação ao tempo.....	113
<b>Tabela 24:</b> Porcentagem de complexo aminoácido – chumbo formado numa solução contendo $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada aminoácido e $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ de chumbo em relação ao tempo.....	114

<b>Tabela 25:</b> Porcentagem de complexo aminoácido – chumbo formado numa solução contendo $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de cada aminoácido e $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ de chumbo em relação ao tempo.....	115
<b>Tabela 26:</b> Concentração de aminoácidos combinado com metal determinado por HPLC. ....	118
<b>Tabela 27:</b> Valores encontrados na determinação de Cd e Pb por AAS	119
<b>Tabela 28:</b> Concentrações encontradas de Cd e Pb, medidos por ASV, nas alíquotas recolhidas do processo cromatográfico .....	121
<b>Tabela 29:</b> Comparação dos resultados obtidos por HPLC e AAS-ASV	122
<b>Tabela 30:</b> Quantificação dos aminoácidos em soluções de NP comerciais por HPLC .....	124
<b>Tabela 31:</b> Fração livre dos aminoácidos em amostras de NP contendo $30 \mu\text{M}$ de cádmio ( $n = 3$ ) .....	126
<b>Tabela 32:</b> Fração livre dos aminoácidos estudados em amostras de NP contendo $30 \mu\text{M}$ de chumbo ( $n = 3$ ) .....	127
<b>Tabela 33:</b> Porcentagem de interação do cádmio e chumbo com alguns aminoácidos presentes em amostras de NP.....	128

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

NP – Nutrição Parenteral

AAS - Espectrometria de Absorção Atômica

ASV - Voltametria de redissolução anódica

LPV – *Large Parenteral Volume*

SPV – *Small Parenteral Volume*

pH – potencial de hidrogênio

HSBA – *Hard and Soft Bases and Acids*

M – metal

L – ligante

$\beta$  - constante de estabilidade

K – constante de equilíbrio

DPV - *Differential Pulse Voltammetry*

NPV - *Normal Pulse Voltammetry*

RPV - *Reverse Pulse Voltammetry*

SWV - *Square Wave Voltammetry*

SPE – *Solid Phase Extraction*

PE – polietileno

PAN - 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol

AdSV - Voltametria adsortiva de redissolução

CSV - Voltametria de redissolução catódica

CV - Voltametria cíclica

HMDE - Eletrodo de mercúrio de gota pendente

SMDE - Eletrodo de gota esttica de mercúrio

DME - Eletrodo gotejante de mercúrio  
SCE - Eletrodo calomelano saturado  
ICP-MS - Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado  
ICP-OES - Espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado  
GC-MS - Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas  
MW - Microondas  
LD - Limite de detecção  
LQ - Limite de Quantificação  
RSD - Desvio padrão relativo  
UV/VIS - Espectrofotometria de absorção molecular  
UV - Ultravioleta  
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
SEC – Cromatografia por exclusão  
IEC – Cromatografia por exclusão iônica  
RP – Fase reversa  
ODS – Octadecilssilano  
OPA – o-ftaldialdeído  
PITC – Fenilisotiocianato  
Dansyl – Cloreto de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonil  
FMOC – 9-metilfluorenil clorofórmio  
FDNB – 1-fluor-2,4-dinitrobenzeno  
FDNDEA – N,N-dietil-2,4-dinitro-5-fluoranilina  
FDNPAA - 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina  
FAAS – Espectroscopia de Absorção Atômica com Atomização em Chama  
OPA-SH – o-ftaldialdeído + mercaptoetanol  
ETAAS – Espectroscopia de Absorção Atômica com Atomização em Forno de Grafite  
FM – fase móvel

## **RESUMO**

# **METODOLOGIA ANALÍTICA PARA O ESTUDO DA INTERAÇÃO DE CÁDMIO E CHUMBO COM ALGUNS AMINOÁCIDOS PRESENTES EM SOLUÇÕES DE NUTRIÇÃO PARENTERAL**

Autora: Marieli da Silva Marques

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

A saúde de pacientes sob tratamento de Nutrição Parenteral (NP) está diretamente associada à qualidade das soluções utilizadas durante os procedimentos e, assim, um controle de qualidade rigoroso se faz necessário. Dentre os possíveis contaminantes, estão metais tóxicos como cádmio e chumbo, constituintes dos recipientes e tampas ou presentes na matéria-prima dos produtos farmacêuticos. Desta forma, o desenvolvimento de metodologias adequadas à quantificação destes metais é de grande importância. As soluções de NP são divididas em dois grupos de acordo com o volume, soluções de NP de pequeno volume e de grande volume.

Neste trabalho objetivou-se:

- Verificar a presença de contaminantes metálicos em soluções de NP através de determinações voltamétricas, com o desenvolvimento de pré-tratamentos das amostras.

- Investigar a interação do Cd e Pb com alguns aminoácidos em soluções aquosas e soluções de NP comerciais.

A metodologia estudada foi dividida em três partes. Na primeira, foram investigados diferentes tipos de pré-tratamentos das amostras de NP, a fim de tornar possível a determinação voltamétrica.

Na segunda, estudou-se a interação do Cd e Pb com alguns aminoácidos em soluções aquosas, bem como da utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção por fluorescência.

Na terceira etapa, aplicou-se o sistema HPLC da etapa 2 em amostras de NP.

Para a determinação voltamétrica de zinco, cádmio, chumbo e cobre em amostras de NP de pequeno volume, foi utilizada a extração em fase sólida com colunas de polietileno. O uso deste pré-tratamento permitiu a separação e pré-concentração dos metais com bons fatores de pré-concentração, limites de detecção da ordem de  $\text{ng L}^{-1}$ , recuperações próximas a 100% e desvios padrões em torno de 8%.

Para as soluções de NP de grande volume, a determinação de zinco, cádmio, chumbo e cobre por ASV foi possível após o pré-tratamento com irradiação ultravioleta (UV) ou microondas (MW) sob condições otimizadas. As concentrações determinadas por ASV, após a otimização dos procedimentos com irradiação UV ou MW foram de: 16,9 a 260  $\mu\text{g L}^{-1}$  para zinco; 0,68 a 4,44  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cádmio; 0,53 a 16,8  $\mu\text{g L}^{-1}$  para chumbo e 0,95 a 40,8  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cobre e os desvios padrões de 0, 5-10%.

O sistema de HPLC com eluição por gradiente, derivação pós-coluna e detecção por fluorescência mostrou-se adequado na separação e quantificação dos aminoácidos alanina, glicina, serina, metionina, treonina, histidina, fenilalanina, ácido glutâmico e ácido aspártico em soluções aquosas e em soluções de NP. Além disso, a interação de cádmio e chumbo com os aminoácidos foi investigada através da redução de seus sinais cromatográficos na presença dos referidos metais.

Para as soluções aquosas, a ordem de interação metal – aminoácido concordou com as constantes de formação de complexos. Já para as soluções de NP, os resultados foram diferentes dos obtidos em soluções aquosas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Autora: Marieli da Silva Marques

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

Título: Metodologia analítica para o estudo da interação de cádmio e  
chumbo com alguns aminoácidos presentes em soluções de  
Nutrição Parenteral

Tese de Doutorado em Química

Santa Maria, 14 de dezembro de 2005.

## **ABSTRACT**

### **ANALYTICAL METHODOLOGY FOR THE STUDY OF THE INTERACTION OF CADMIUM AND LEAD WITH SOME PRESENT AMINO ACIDS IN SOLUTIONS OF PARENTERAL NUTRITION**

Author: Marieli da Silva Marques

Adviser: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

The patients' health under treatment by Parenteral Nutrition (PN) is directly associated to the quality of the solutions used during the procedures and thus, a rigorous quality control is necessary. Among possible contaminants, toxic metals like cadmium and lead, found in constituents of containers, raw materials and manufacturing procedures of the pharmaceutical products may contaminate PN solutions. The development of appropriate methodologies to the quantification of these metals is of great importance. The PN solutions are shared according the volume in two groups, Small Parenteral Volume (SPV) constituted basically by saline solutions and Large Parenteral Volume (LPV) constituted by amino acids solutions.

The targets in this work were:

- To verify the presence of metallic contaminants in the solutions of PN through voltammetric determinations, after sample pretreatment.

- To investigate the interaction of cadmium and lead with some amino acids in aqueous solutions and commercial solutions of PN.

The study was divided in three parts. In the first, different types of samples pretreatments of PN solutions were investigated to enable voltammetric determinations.

In the second, the interaction of cadmium and lead with some amino acids in aqueous solutions was studied by using high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorimetric detection.

In the third, the HPLC methodology was applied to PN samples.

Voltammetric determination of zinc, cadmium, lead and copper in SPV solutions, was also investigated by solid phase extraction in columns filled with polyethylene powder. This pretreatment allowed the separation and preconcentration of the metals with good preconcentration factors, limits of detection by  $\text{ng L}^{-1}$ , recoveries around 100% and relative standard deviations up to 8%.

For LPV solutions, the determination of zinc, cadmium, lead and copper by anodic stripping voltammetry (ASV) was possible after sample pretreatment with ultraviolet (UV) or microwave (MW) irradiations. The concentrations determined by ASV, after UV or MW irradiations ranged from 16,9 to 260  $\mu\text{g L}^{-1}$  for zinc; 0,68 to 4,44  $\mu\text{g L}^{-1}$  for cadmium; 0,53 to 16,8  $\mu\text{g L}^{-1}$  for lead and 0,95 to 40,8  $\mu\text{g L}^{-1}$  for copper. Relative standard deviation ranged from 0, 5-10%.

The HPLC system with gradient elution, post-column derivatization and fluorimetric detection was appropriated for the separation and quantification of the amino acids alanine, glycine, serine, methionine, threonine, histidine, phenylalanine, glutamic acid and aspartic acid in aqueous solutions and in PN solutions. Additionally, the interaction of cadmium and lead with the amino acids was also investigated through the chromatographic signals with and without the metals.

For the aqueous solutions, the order of interaction metal - amino acid agreed with the complex constants of formation. On the other hand, for PN samples the results were different from the obtained in aqueous solutions.

FEDERAL UNIVERSITY OF SANTA MARIA

POST-GRADUATION IN CHEMISTRY

Author: Marieli da Silva Marques

Adviser: Prof. Dr. Paulo Cícero do Nascimento

Title: Analytical methodology for the study of the interaction of  
cadmium and lead with some present amino acids in solutions  
of Parenteral Nutrition

Doctoral in chemistry

Santa Maria, December 14<sup>th</sup>, 2005.

## 1. INTRODUÇÃO

A Nutrição Parenteral (NP) pode ser definida como a administração intravenosa de nutrientes [1]. Pode ser classificada em dois grandes grupos: NP como tratamento de apoio e NP como terapia primária.

A NP como medida de apoio é utilizada em pacientes portadores de diversas doenças complexas, pacientes cirúrgicos, tanto no pré como no pós-operatório e pacientes pediátricos. Quando a ingestão normal por via oral é impossibilitada, utiliza-se a NP como terapia primária, como nos casos de fístula enterocutânea, enteropatia inflamatória, insuficiência renal aguda e crônica, insuficiência cardíaca e insuficiência hepática.

As soluções NP são preparadas de acordo com as necessidades nutricionais de cada paciente. Dentre os tipos de soluções disponíveis estão os hidrolisados protéicos, soluções cristalinas de aminoácidos e emulsões lipídicas.

Embora sejam tomadas todas as medidas de higiene e assepsia, a NP não está totalmente isenta de riscos, pois há o risco de contaminação microbiológica (no momento da administração) e química. Estudos por espectrometria de absorção atômica (AAS) demonstram uma significativa contaminação das soluções de NP por metais pesados como cromo, chumbo, arsênio, bário, germânio, alumínio, manganês. Esta contaminação pode levar a deposição nos órgãos e conseqüentes anormalidades histológicas, entre outros danos [2,3].

No caso da NP, podem ocorrer interações entre os metais tóxicos e os outros nutrientes, modificando a biodisponibilidade destes e a distribuição daqueles. Assim, tem crescido o interesse em relação a estas interações devido

os distúrbios causados pelos metais induzidos por situações especiais de doença como, por exemplo, a deficiência renal em fase terminal [4].

Embora o conhecimento da concentração total do metal numa dada amostra seja útil, é insuficiente para a compreensão do metabolismo, a elucidação dos mecanismos de toxicidade, o entendimento do modo de distribuição do elemento no organismo, ou os estudos das interações dos diferentes metais em relação à ligação com proteínas e deposição nos tecidos.

Uma revisão da literatura evidencia a preferência por estudos em águas naturais, seguida de matrizes biológicas como sangue, urina e leite. No entanto, há poucos estudos empregando amostras de NP considerando a possibilidade de interações entre metais e aminoácidos. Sabe-se que em soluções de NP, os aminoácidos estão presentes na faixa de concentração de  $\text{mg L}^{-1}$  e, devido a sua estrutura, são hábeis em atuar como ligantes para íons metálicos, assim o transporte destes íons no organismo pode ser facilitada.

Este trabalho dividiu-se em duas partes. Inicialmente, investigou-se um pré-tratamento das amostras de NP que permitisse a determinação e quantificação simultânea de zinco, cádmio, chumbo e cobre por voltametria de redissolução anódica (ASV). Comprovada a contaminação das amostras de NP por metais tóxicos, investigou-se a interação de cádmio e chumbo com os aminoácidos alanina, glicina, serina, metionina, treonina, histidina, fenilalanina, ácido glutâmico e ácido aspártico. A escolha dos aminoácidos envolvidos neste estudo baseou-se em três critérios: 1º os aminoácidos que estão em maior quantidade nas formulações de NP; 2º aqueles que apresentam as maiores constantes de formação de complexos com os metais estudados; 3º apresentam constante de formação de complexos com cádmio e chumbo.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Nutrição parenteral**

A NP é a administração intravascular, parcial ou total, de nutrientes imprescindíveis à vida [1]. Esta inclui a administração de micro e macro nutrientes, 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 a 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 [1,5].

A administração intravenosa fornece uma rota de dispersão rápida de grandes quantidades de fluidos e medicamentos a todas as partes do corpo, alcançando o efeito terapêutico rápido. A velocidade de infusão pode ser controlada para estabelecer e manter níveis desejados.

## 2.2 Aplicação das soluções de nutrição parenteral

Em geral, a NP é necessária nos casos em que a alimentação oral normal não é possível, quando a absorção de nutrientes é incompleta e, principalmente, quando as condições mencionadas estão associadas ao estado de desnutrição. Atualmente, as soluções de NP 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.

Na NP 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 NP é um procedimento que deve ser adaptado às necessidades individuais de cada paciente [5]. Pela infusão de aminoácidos, as necessidades de proteínas nas soluções de NP 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 tem sido de interesse dos pediatras, pois estes representam 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 gastrointestinal. A NP total encontra indicação precisa em pacientes com distúrbios pediátricos como anomalias graves do tubo gastrointestinal, que geralmente acarretam ressecção ampla do intestino delgado, diarreia crônica intratável e em recém-nascidos de baixo peso (menos de 1200 g) [1].

### **2.3 Classificação das soluções de nutrição parenteral**

As soluções de NP, segundo o volume, são divididas em dois grupos: soluções parenterais de grande volume (LVP) e soluções parenterais de pequeno volume (SVP). Pertencem ao primeiro grupo estão as soluções com volume igual ou superior a 100 mL e ao segundo, as soluções com volume inferior a 100 mL.

Nas soluções de grande volume, estão as formulações de aminoácidos que fornecem suporte nutricional, emulsões lipídicas para fornecer calorias e lipídios essenciais, entre outras soluções específicas para o suporte renal, hepático e para recém-nascidos.

Soluções salinas como NaCl 0,9% e 10%, KCl 7,5% e 10%, glicose 10% e 50% e albumina 20% são alguns exemplos de soluções de pequeno volume. Também nesta classificação estão  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , todos na concentração 10% e água para injeção.

As soluções utilizadas neste trabalho foram as formulações de aminoácidos e as soluções de pequeno volume.

### **2.4 Contaminação das soluções de nutrição parenteral**

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 podem ter uma vida média de aproximadamente três meses, se estocadas a 4 °C.

Contudo, estudos por AAS demonstram uma significativa contaminação das soluções de NP por metais pesados como cromo, chumbo, arsênio, bário, germânio, alumínio [6] e manganês. Esta contaminação pode levar a deposição nos órgãos e conseqüentes anormalidades histológicas, entre outros danos [2,3].

A origem desta contaminação pode ser atribuída a diversos fatores, como embalagem (frasco e/ou tampa), o processo de esterilização (que favorece a liberação dos metais constituintes das embalagens) e os componentes das soluções [7,8]. O tempo e a temperatura de armazenagem também contribuem para a contaminação das mesmas [9].

Mesmo que a presença dos referidos contaminantes seja em nível de traços, quando são administrados a pacientes debilitados e com problemas de saúde, oferece risco potencial de acumulação e toxicidade.

## **2.5 Aminoácidos**

Os aminoácidos são substâncias que apresentam um grupo amino e um carboxílico ligados ao mesmo carbono. Os aminoácidos de importância biológica têm estes grupos ligados ao carbono  $\alpha$ . As espécies de aminoácidos diferem uma das outras por possuírem diferentes cadeias laterais ligadas ao carbono  $\alpha$ , assim a cadeia lateral dá a cada aminoácido a sua identidade [10].

A cadeia lateral dos aminoácidos confere diversas propriedades químicas como polaridade, acidez e alcalinidade. Os aminoácidos podem se apresentar na forma carregada ou neutra, dependendo do pH do meio no qual se encontram.

São em número de 20 os principais aminoácidos encontrados em alimentos e utilizados em NP: alanina, arginina, asparagina, ácido glutâmico, ácido aspártico, cisteína, tirosina, leucina, isoleucina, fenilalanina, treonina,

histidina, metionina, valina, glicina, serina, lisina, triptofano, prolina e glutamina [5]. E, o valor nutritivo de uma proteína está estritamente relacionado à proporção de aminoácidos que a compõem. Os chamados aminoácidos essenciais, entre os quais estão incluídos a alanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina, são fornecidos somente por meio de dieta aos organismos adultos, aos jovens em crescimento ou a ambos, uma vez que o organismo não tem capacidade de sintetizá-los [5].

Os aminoácidos abordados no presente estudo são a alanina, treonina, serina, metionina, ácido glutâmico, ácido aspártico, fenilalanina, histidina e glicina.

Aminoácidos são biomoléculas que podem estar envolvidas no entendimento das ações biológicas e fisiológicas dos metais tóxicos como chumbo e cádmio, bem como seu processo de transporte nos sistemas vivos. Estas pequenas biomoléculas são de importância biológica ou podem imitar biomoléculas maiores.

Em amostras biológicas, a maior parte dos metais está ligada a proteínas [11] e uma pequena proporção a compostos de baixo peso molecular como aminoácidos, biofosfatos, carboxilatos ou hidróxi-carboxilatos. Já o metal na forma livre encontra-se em concentrações extremamente baixas.

Estudos demonstram que os metais ligados a compostos de baixo peso molecular (ou pequenos ligantes) desempenham papéis importantes em muitos processos biológicos, tal como absorção intestinal, absorção celular, transporte e excreção renal [12-14].

### 2.5.1 Teoria HSAB (ácidos e bases/duros e moles)

Em 1963, Pearson usou termos duro e mole para descrever interações entre íons metálicos (ácidos de Lewis) e ligantes (bases de Lewis). De acordo com a teoria de Pearson, uma base mole pode ser definida como aquela cujo átomo doador tem polarizabilidade elevada e baixa eletronegatividade, é facilmente oxidada, bem como associada com orbitais vacantes baixos. Estes termos descrevem, por diferentes modos, uma base cujos elétrons do átomo doador não estão fortemente presos, mas são facilmente distorcidos e removíveis. Bases duras têm propriedades opostas a estas, ou seja, o átomo doador tem baixa polarizabilidade e alta eletronegatividade, é difícil de reduzir e está relacionado com orbitais vacantes de alta energia que são inacessíveis [15].

Pearson [15] 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 compartilhamento 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 compartilhamento destas, 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 seu trabalho que certos íons e ligantes dispõem de uma classificação intermediária sendo, por isso, capazes de interagir reacionalmente bem com ambas as espécies, moles e duras.

Na prática, a teoria de Pearson indica apenas possíveis combinações favoráveis entre íons metálicos e ligantes.

A seletividade, segundo a teoria HSAB, entre íons metálicos e ligantes no meio biológico depende não somente da natureza dos dois, mas também de vários outros fatores como, por exemplo, estados de oxidação, geometria de coordenação, tamanho do íon e pH do meio [16,17].

Na Tabela 1 estão classificados exemplos específicos de ácidos e bases duros, intermediários e moles [17].

**Tabela 1:** Classificação dos ácidos e bases de Lewis usando o critério duros e moles.

	Ácidos	Bases
(A) Duros	$H^+$ , $Li^+$ , $Na^+$ , $K^+$ $Mg^{2+}$ , $Ca^{2+}$ , $Mn^{2+}$ , $Al^{3+}$ $Ln^{3+}$ , $Cr^{3+}$ , $Co^{3+}$ , $Fe^{3+}$ $VO^{2+}$ , $MoO^{3+}$	$H_2O$ , ROH, $NH_3$ , $RNH_2$ $RCO_2^-$ , $Cl^-$ , $F^-$ , $PO_4^{3-}$ $HPO_4^{2-}$ , $H_2PO_4^-$ , $SO_4^{2-}$
Intermediários	$Fe^{2+}$ , $Co^{2+}$ , $Ni^{2+}$ , $Cu^{2+}$ $Zn^{2+}$ , $Pb^{2+}$ , $Sn^{2+}$ , $SO_2$ $NO^+$ , $Ru^{2+}$	Imidazol, piridina
(B) Moles	$Cu^+$ , $Ag^+$ , $Au^+$ , $Tl^+$ $Hg^+$ , $Cd^{2+}$ , $Pd^{2+}$ , $Pt^{2+}$ , $Hg^{2+}$	$RSH$ , $R_2S$ , $CN^-$ , $I^-$ , $S_2O_3^{2-}$

R representa uma cadeia lateral orgânica.

Desta forma, vê-se que os aceitadores da classe A preferem ligar-se a bases duras, com átomos doadores, como N, O e F, enquanto que os aceitadores da classe B preferem ligar-se a bases moles, como átomos doadores P, As, S, Se, Cl, Br, I. Um exame dos aceitadores da classe A, mostra que eles têm as seguintes características importantes: tamanho pequeno, estado de oxidação positivo elevado e ausência de elétrons mais externos que sejam facilmente excitáveis a estados mais elevados. Todos estes fatores levam a baixa polarizabilidade, e tais aceitadores são chamados ácidos duros. Os aceitadores classe B, no entanto, tem uma ou mais das seguintes propriedades: estado de oxidação positivo baixo ou zero, tamanho grande e muitos elétrons externos facilmente excitáveis (no caso dos metais estes são elétrons d). Todas estas propriedades conduzem à polarizabilidade elevada, e assim os ácidos classe B podem ser chamados de ácidos moles [15].

De um modo geral, pode-se correlacionar a capacidade de complexação dos metais pelo enunciado: “Os ácidos duros preferem se associar com bases duras e os ácidos moles com as bases moles.” Este princípio não deve ser encarado como exclusivo, isto é, sob condições adequadas, ácidos moles podem complexar com bases duras e ácidos duros, com bases moles. Entretanto, neste caso, são formados complexos de baixa estabilidade, uma vez que ambos os componentes são incompatíveis [15,17].

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  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Tl}^{2+}$  [18].

## 2.5.2 Interações metais-aminoácidos

Sabe-se que há uma pequena fração de metal que está livre em matrizes orgânicas. Esta fração livre, entretanto, não é realmente livre, mas apresenta-se ligada a pequenos ligantes (ou compostos de baixo peso molecular), também presentes na matriz. Dependendo da afinidade do metal pelo ligante, o transporte da fração livre do metal é feito através de sua distribuição entre estes ligantes.

No organismo, o cádmio, por exemplo, apresenta afinidade muito forte por estruturas biológicas contendo grupos sulfidrílicos, como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. O chumbo, por outro lado, é transportado no sangue ligado, principalmente, aos eritrócitos, além de albumina e algumas globulinas; é desconhecido, entretanto, se estas formas ligadas constituem a fração ativa para a distribuição do chumbo em tecidos e células.

Embora a fração de complexos de baixo peso molecular- íons metálicos seja pequena em comparação com a fração metal- proteína, é de grande significância devido ao importante papel destes complexos em muitos processos fisiológicos e bioquímicos vitais. Acredita-se que os complexos de baixo peso molecular estejam envolvidos: (1) como intermediários quando íons metálicos são inseridos ou removidos de certas metaloenzimas ou proteínas transportadoras, (2) na transferência de certos íons através de membranas, (3) na preservação de metais essenciais em solução, e (4) alterando o potencial redox de certos pares. O conhecimento acerca da distribuição destes íons metálicos entre estes ligantes pequenos, em fluidos biológicos, pode auxiliar a explicar a absorção, distribuição e excreção de um metal no corpo humano [19,20].

A capacidade dos aminoácidos de formarem complexos metálicos está relacionada não só à presença dos grupos amino e carboxílico, mas também ao grupo funcional constituinte da cadeia lateral. Entretanto, como os grupos são

diferentes em sua natureza, a capacidade dos aminoácidos se ligarem a metais também é diferente. Por exemplo, os grupos R-OH, R-NH<sub>2</sub>, RCO<sub>2</sub> podem ser classificados como ligantes duros, enquanto que os grupos R-SH, R<sub>2</sub>S 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 [16].

Quando o aminoácido possui em sua cadeia lateral outro centro reativo, além do grupamento aminoácido, ele atua como um ligante bidentado de três formas diferentes ou como um ligante tridentado. 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 [21-23].

### 2.5.3 Constante de estabilidade ( $\beta$ )

A reação de formação do complexo pode ser expressa como:



“Constante geral de estabilidade” ( $\beta$ ) é meramente a constante de equilíbrio para formação de um complexo em particular, a partir dos componentes apropriados M e L [3], podendo ser representada por:

$$\beta = \frac{[M(H_2O)_{n-1}L]}{[M(H_2O)_n] [L]}$$

sendo, no equilíbrio:  $M(H_2O)_{n-1}L$  = concentração do complexo formado

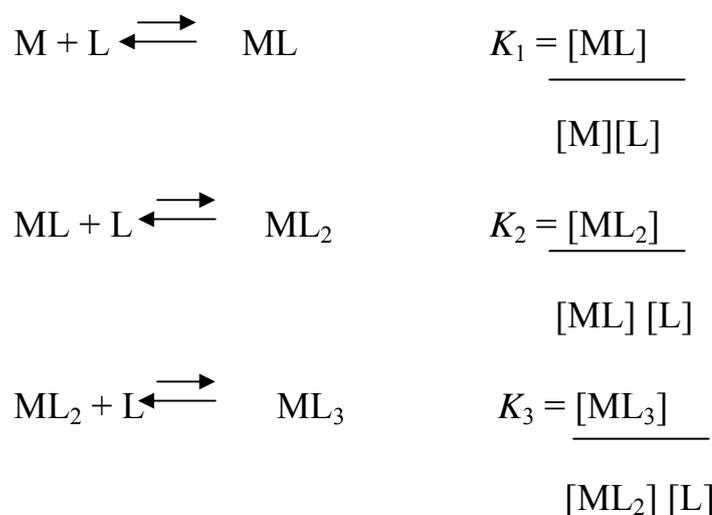
$M(H_2O)_n$  = concentração do íon metálico

$L$  = concentração do ligante

Medidas da variação da concentração livre de somente uma espécie comparadas com a composição geral da solução, podem em princípio, levar a valores da constante de estabilidade [24].

Variação de propriedades adequadas com a composição da solução podem, entretanto, ser exploradas para dar informação sobre os complexos que são formados. Por exemplo, medidas potenciométricas podem ser designadas de maneira que sua f.e.m. forneça uma medida da concentração do íon metálico não complexado [24].

Na formação sucessiva de complexos de índice de coordenação superior a unidade, tem-se as seguintes reações e constantes:



As constantes  $K_1$ ,  $K_2$  e  $K_3$  são denominadas constantes sucessivas de formação dos distintos complexos. O subíndice indica de forma clara a etapa de

complexação, bem como o número de ligantes unidos ao metal no complexo [25].

O primeiro complexo preparado entre um metal e um aminoácido foi obtido em 1854 por Gossmann, através da reação do cobre com a leucina, seguido pela complexação de cobre com a glicina [26].

Li e Doody através de medidas polarográficas, condutométricas e espectrofotométricas estudaram a formação de complexos de prolina, alanina, leucina, metionina, glicilglicina com cobre e zinco [27].

Albert, usando a titulação potenciométrica, determinou as constantes de estabilidade de complexos formados entre os metais cobre e níquel, com os aminoácidos ornitina, glicina, ácido diaminobutírico e ácido diaminopropanóico [28].

Diversos aminoácidos formam complexos com cádmio e chumbo. As constantes de estabilidade entre estes metais e os aminoácidos investigados neste estudo estão expressas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Constantes de estabilidades de alguns aminoácidos com cádmio e chumbo [29].

Aminoácido	Cádmio ( $\log K$ )	Chumbo ( $\log K$ )
Histidina	5,66	5,94
Metionina	3,68	4,39
Fenilalanina	3,62	4,63 <sup>3</sup>
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

T = 25 °C; força iônica ( $\mu$ ) = 0,1 mol L<sup>-1</sup>; espécie 1:1 (ML).

O estudo das interações entre metais tóxicos e aminoácidos pode auxiliar na compreensão dos efeitos destes metais em sistemas biológicos, bem como modificar a biodisponibilidade e a absorção dos nutrientes.

Neste sentido, soluções de NP servem como bons modelos, pois a formulação destas misturas está sujeita a numerosas interações químicas, físicas e nutricionais, especialmente entre metais tóxicos e aminoácidos.

## 2.6 Cádmio e chumbo

A exposição humana a metais tóxicos presentes no meio ambiente tem aumentado muito durante os últimos 50 anos. O excesso de metais como

mercúrio, chumbo, cádmio, alumínio, arsênio entre outros, que vão se acumulando no organismo por exposição crônica, podem causar uma enorme variedade de alterações, podendo ter uma influência direta em alterações do comportamento por diminuição das funções cerebrais, influenciando na produção e utilização dos neurotransmissores e alterando processos metabólicos. Além disso, os sistemas gastrintestinal, neurológico, cardiovascular e renal, também são suscetíveis.

Sabe-se que quantidades diminutas de determinados metais tóxicos causam efeitos deletérios, porém, estes efeitos variam com o modo, a quantidade e grau da exposição, com o estado nutricional, o metabolismo individual e a capacidade de detoxificação. Os mecanismos de toxicidade são múltiplos e incluem a inibição de enzimas e/ou co-fatores, interferência na permeabilidade das membranas celulares e outros processos de transporte, decréscimo na função neuronal ou dos processos de condução nervosa, interferência na estrutura e função de proteínas e ácidos nucléicos e aumento da formação de radicais livres [30].

Cádmio e chumbo são elementos tóxicos ao homem e seus são bem conhecidos. Estes elementos têm em comum o modo como atingem seus órgãos alvos percorrendo o corpo no sistema circulatório, sendo transportados por proteínas específicas ou por proteínas responsáveis pelo transporte não específico, como a albumina [31].

O cádmio é um elemento de vida biológica longa (10 a 30 anos) e de lenta excreção pelo organismo humano. O órgão alvo primário na exposição ocupacional ao cádmio a longo prazo é o rim. Os efeitos tóxicos provocados por ele compreendem principalmente distúrbios gastrintestinais, após a ingestão de altas concentrações. A inalação de doses elevadas produz intoxicação aguda, caracterizada por pneumonite e edema pulmonar [32]. Está associado com frequência à lesão renal, hipertensão, litíase renal, cardiomegalia, aterosclerose,

imunodepressão em fumantes, dores osteoarticulares, disfunção pulmonar, enfisema, anemia moderada, lesões nos testículos e infertilidade masculina. Há transmissão materno-fetal nos casos de mães intoxicadas. Quantidades adequadas no organismo de zinco, cálcio, magnésio e cobre inibem a absorção e retenção do cádmio [30, 31,33].

O chumbo é o metal pesado mais disseminado no meio ambiente. Vários estudos já demonstraram que a intoxicação por chumbo está associada com deficiência de funcionamento do sistema nervoso central. Níveis aumentados de chumbo e cádmio no cabelo são correlacionados com níveis reduzidos de inteligência, diminuição no rendimento escolar e alterações no comportamento.

A intoxicação por chumbo pode levar a distúrbios de aprendizagem em crianças, cefaléia intensa, vertigem, tremores, dores articulares, anemia, irritabilidade, agressividade, distúrbios mentais, hiperatividade, anorexia, lesões musculares e dores abdominais. Induz, também, alterações na produção de hormônios como tiroxina, hipofisários e catecolaminas. Níveis adequados de cálcio, ferro, zinco, fosfatos, vitamina C e proteínas inibem a absorção de chumbo pelo organismo [30].

A intoxicação por chumbo pode ocorrer de forma crônica ou aguda, sendo esta última de difícil ocorrência, já que para tal é necessária a ingestão de 10 a 40g do metal. A intoxicação crônica, denominada saturnismo, pode acontecer a partir da absorção diária de 1 a 2 mg de chumbo, durante uma semana [34].

O chumbo mostra efeitos danosos nas crianças, tanto no crescimento quanto no desenvolvimento. Os metais tóxicos podem prejudicar processos enzimáticos e neurológicos gradualmente e progressivamente. Vários estudos já demonstraram que a contaminação de chumbo não tratada predispõe o indivíduo ao insucesso, desde a infância até a vida adulta [30].

### 2.6.1 A interação entre metais essenciais e metais tóxicos

Alguns pesquisadores sugerem que interações biologicamente importantes podem ocorrer entre metais essenciais e metais tóxicos com propriedades físicas e químicas semelhantes [35]. Estas características comuns possibilitam a interação entre os mesmos no organismo em nível de absorção, transporte, captação pelos tecidos, metabolismo intracelular e excreção. Além disso, explicam porque metais nutricionalmente essenciais podem modular os riscos provocados pela exposição a metais tóxicos.

Em geral, um estado nutricional deficiente em relação a metais essenciais é um fator que potencializa a toxicidade de metais pesados.

O cobre é um elemento essencial e cerca de 4 a 5 miligramas são necessários na dieta diária sendo seus níveis regulados homeostaticamente em torno de  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  no plasma. Embora em pequenas quantidades seja essencial, em quantidades maiores é tóxico. O cobre está ligado nas proteínas do organismo, como metaloproteínas, ou como enzimas. Importante componente para a síntese de hemoglobina, mioglobina, citocromos e alguns peptídeos hormonais. É necessário para própria utilização do ferro e proteção contra danos oxidativos às células, é também o cofator de proteínas envolvidas em processos redox, como a citocromo mitocondrial oxidase. A ceruloplasmina, uma proteína transportadora de cobre, é também uma oxido-redutase. Cobre e ferro são interdependentes no intestino, onde o cobre permite a assimilação de ferro e em ceruloplasmina, onde catalisa a transformação de íons ferrosos em férricos. Alguma deficiência de cobre pode conduzir a uma deficiência de ferro (anemia). O cobre contribui para a síntese da elastina e colágeno e para a restauração da cartilagem em artroses e estrutura óssea [36].

A doença de Wilson é uma deficiência hereditária de ceruloplasmina, que provoca acúmulo de cobre no fígado, rins e cérebro.

O zinco exerce um importante papel nos sistemas enzimáticos de animais e plantas. O organismo de uma pessoa adulta contém cerca de 2 gramas de zinco. Trata-se do segundo elemento de transição mais abundante. A disponibilidade sistêmica de zinco em tecidos é altamente influenciada pelo balanço dos processos anabólico e catabólico, reguladores dos tecidos renováveis e do tecido esquelético. A maior parte do conteúdo de zinco do corpo está presente nos músculos (60%) e ossos (30%). Não tem sido identificado nenhum hormônio que esteja envolvido única e especificamente no metabolismo do zinco. No entanto, hormônios reguladores de cálcio e magnésio podem afetar o metabolismo do zinco direta ou indiretamente. O zinco está associado com mais de 200 sistemas enzimáticos. Está envolvido na síntese de ácidos nucleicos e de proteínas, crescimento das síndromes inflamatórias, secreção de testosterona e função cerebral [37].

As interações com metais essenciais melhor compreendidas e clinicamente mais importantes são as que envolvem os metais tóxicos cádmio, mercúrio e chumbo [38].

O cádmio interage principalmente com o metabolismo de cálcio, zinco e ferro em nível intestinal, ósseo e/ou renal. Inibe a absorção intestinal de cálcio, interfere na calcificação e remodelagem óssea e reduz a reabsorção deste nos túbulos renais, provocando hipercalcúria. A interação entre cádmio e zinco ocorre por competição na absorção intestinal e no metabolismo celular, através da indução da metalotioneína (proteína de baixo peso molecular rica em resíduos sulfidríla) que participa no controle da homeostase de zinco e na detoxificação do cádmio. A deficiência de ferro favorece a absorção intestinal de cádmio e o efeito prejudicial do cádmio no metabolismo do ferro deve-se a

ligação deste à transferrina (proteína de transporte) e ferritina (proteína de armazenamento).

De forma semelhante ao cádmio, o chumbo interage principalmente com ferro, zinco e cálcio. O chumbo compete com o ferro e zinco por sítios de ligação em proteínas de captação intestinal e de armazenamento intracelular. O chumbo inibe a atividade da delta- amino- levulínico- desidratase (zinco-dependente) e da ferro- quelatase (ferro- dependente), enzimas chaves na biossíntese do grupamento heme. As deficiências de ferro e zinco favorecem a absorção intestinal de chumbo e acentuam seus efeitos prejudiciais na hematopoiese [39].

A interação entre chumbo e cálcio, possivelmente a interação mais estudada entre um elemento tóxico e um nutriente, ocorre pela capacidade do chumbo de substituir ou “imitar” o cálcio nos processos fisiológicos. O chumbo inibe a liberação de neurotransmissores mediada por cálcio, bloqueia o transporte de cálcio por canais de membranas, e substitui o cálcio na ação da cálcio- ATPase, na captação pelas mitocôndrias, na ligação à calmodulina e proteína quinase C (proteínas envolvidas na ação do cálcio como segundo mensageiro) e na estrutura da hidroxiapatita do osso. A deficiência de cálcio na dieta favorece a absorção intestinal do chumbo e a sua retenção em tecidos não ósseos.

A interação que existe entre metais essenciais e metais tóxicos também ajuda a explicar a presença destes em soluções de NP.

## 2.7 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 e, 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 [40]. O uso do eletrodo de mercúrio de gota pendente (HMDE), como eletrodo de trabalho, apresenta como vantagem o fato de que cada nova gota pode ser facilmente formada e este processo de renovação remove problemas que possam ser causados por contaminação de uma análise prévia.

A voltametria ocupa uma importante posição entre os métodos eletroquímicos para a investigação de compostos orgânicos. Muitos grupos funcionais podem ser oxidados ou reduzidos no eletrodo de trabalho, o que torna possível a determinação de uma grande variedade de compostos [41].

A voltametria oferece potencialidades para investigar e estudar a especiação de metais pesados dissolvidos em águas naturais [42]. 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 os metais acessíveis de se determinar por voltametria.

Há diversas técnicas voltamétricas: voltametria de pulso normal (NPV), voltametria de pulso diferencial (DPV), voltametria de pulso inverso (RPV) e

voltametria de onda quadrada (SWV). A escolha de uma delas depende do analito e da concentração do mesmo, entre outros fatores.

Neste trabalho utilizou-se a DPV para a quantificação dos metais nas amostras de NP 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 combinada com alta confiabilidade, devido a boa exatidão nas medidas, tem feito da voltametria uma melhor alternativa quando comparada a AAS para análise de traços de metais pesados em diversas matrizes ambientais. Associado a isto, tem-se ainda o baixo custo analítico, rapidez de detecção, alto potencial de automatização e possibilidade de determinação simultânea de diversos metais [43].

### **2.7.1 Voltametria de redissolução anódica**

Diversos métodos analíticos são utilizados para a determinação quantitativa de traços de metais pesados em amostras ambientais, alimentícias e farmacêuticas tais como os métodos espectroscópicos e eletroquímicos. Dentre os métodos eletroquímicos, a voltametria de redissolução anódica (ASV) é muito utilizada para a determinação de cádmio e chumbo, entre outros metais [44].

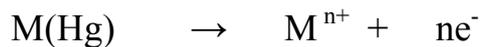
Na determinação de metais pesados por ASV, empregando eletrodo de mercúrio, estes devem ser solúveis no mercúrio, pois durante a etapa de pré-

concentração formam uma amálgama com o mercúrio (Hg), ou seja, o metal se reduz no mercúrio. A equação abaixo representa a redução.



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

Após o período de deposição do metal na gota de mercúrio, ocorre a redissolução do metal, ou seja, ocorre a oxidação dos metais para a solução [44,45]. A redissolução é representada na equação abaixo.



A ASV pode ser vantajosa para quantificar traços de metais em amostras de NP considerando-se os seguintes aspectos: i) possibilidade de determinações simultâneas, ii) alta sensibilidade obtida com os métodos de redissolução e iii) baixo custo analítico em comparação as medidas por outros métodos, como, por exemplo, os métodos espectroscópicos [46,47].

No entanto, nas determinações voltamétricas, a matéria orgânica pode interferir de diversas formas: 1) pela formação de fortes complexos com metais, os quais não são detectados durante a análise, 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; 3) a própria matéria orgânica pode sofrer redução ou oxidação eletroquímica, aumentando a corrente residual ao ponto de impedir a execução da análise [48].

A escolha de um procedimento adequado de pré-tratamento da amostra deve levar em consideração o tempo necessário para a sua realização,

simplicidade, a quantidade de reagentes envolvidos, aplicação a diversos tipos de matrizes, possibilidade de medida de vários analitos e produção de resultados acurados e precisos.

## 2.8 Pré-tratamentos

Com a expressão pré-tratamento de amostra se indica o conjunto dos procedimentos necessários para converter física e quimicamente uma amostra em uma forma que permita efetuar, dentre as limitações impostas pela natureza e a morfologia da mesma, a determinação do(s) analito(s) e realizar sua quantificação o quanto mais precisa e exata [49].

O objetivo da etapa de pré-tratamento das amostras é i) dissolver a amostra; ii) destruir os interferentes da matriz e iii) separar o analito dos componentes da matriz [50]. A exigência da eliminação de interferentes impõe-se com muita freqüência, dependendo de muitos fatores, mas mais particularmente, do tipo de técnica de detecção [49]. A preparação de amostras deve contemplar a obtenção do melhor resultado, no menor tempo, com mínima contaminação, baixo consumo de reagentes e geração de poucos resíduos e efluentes. O conveniente seria o uso da amostra sem pré-tratamento, porém apenas algumas técnicas analíticas permitem esta possibilidade, quais sejam: raios X, métodos nucleares, termo-análise e espectrométricos com fontes de arco e centelha e ablação com laser. As demais técnicas disponíveis para análise: métodos clássicos, espectrométricos, eletroanalíticos e cromatográficos, necessitam de solubilização completa da amostra ou separação dos analitos de interesse da matriz e, em alguns casos, também pré-concentração [51].

### 2.8.1 Separação e pré-concentração

Atualmente, um grande número de artigos publicados ainda remete ao uso, preferencial, de procedimentos de extração em fase sólida (SPE), no pré-tratamento de diversas matrizes. A partir desta técnica, os analitos são simultaneamente extraídos ou separados e pré-concentrados durante a passagem da amostra por uma pré-coluna, contendo material adsorvente apropriado. Após, os analitos são quantitativamente eluídos com um pequeno volume de solvente adequado e levados à quantificação [52]. A SPE é uma técnica de separação e pré-concentração, realizada principalmente com uso de pré-coluna, muito utilizada na determinação de traços metálicos [53-55]. É uma técnica atrativa por ser bastante simples, facilmente automatizada e possibilita a pré-concentração dos analitos [55].

A separação e pré-concentração de traços metálicos inclui o emprego de materiais que possam retê-los, como por exemplo, resinas trocadoras de íons e sorventes. Entre os sorventes destaca-se o carvão e a sílica e, entre resinas trocadoras estão as sílica géis modificadas com vários reagentes e agentes quelantes imobilizados sobre diferentes suportes [56].

Naghmush e colaboradores [53] desenvolveram um método para a determinação em fluxo de chumbo em água por AAS com pré-concentração, usando celulose com fase sólida para extração. Na SPE de espécies de chumbo, interações baseadas na formação de quelatos são usadas. O ligante apropriado é imobilizado em um suporte estacionário ou é dissolvido na fase móvel e a adsorção de quelatos, formados em adsorventes não polares, é utilizada para a pré-concentração.

A utilização de polietileno (PE) na separação de metais é empregada, uma vez que agentes complexantes são fortemente adsorvidos por ele. Além disso, o processo de dessorção/ eluição é facilmente alcançado com um pequeno volume de solvente orgânico polar [57, 58].

Bohrer e colaboradores [58] desenvolveram um método de separação e pré-concentração de zinco, cádmio, chumbo e cobre de matrizes salinas e a subsequente determinação por AAS, empregando uma microcoluna recheada com PE impregnado com um agente complexante.

### **2.8.2 Digestão por via úmida**

O pré-tratamento de digestão por via úmida é um método clássico, empregado há muitos anos utiliza agentes oxidantes para destruir a matéria orgânica.

Em geral, a decomposição de materiais orgânicos e biológicos por via úmida implica em aquecimento da amostra na presença de um ácido mineral oxidante concentrado, de mistura de ácidos oxidantes, ou a 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 a análise, se os ácidos forem suficientemente oxidantes, e se o aquecimento for feito a temperaturas elevadas durante um período de tempo adequado.

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 ou combinados uns

com os outros. São também comuns as combinações de  $\text{HNO}_3$  ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com  $\text{H}_2\text{O}_2$  [59].

A decomposição por via úmida pode ser realizada em sistemas fechados ou abertos. As principais vantagens de utilizar um sistema fechado quando comparado com uso de um sistema aberto são: i) não há perdas por volatilização dos elementos; ii) não há contaminação de fontes externas; iii) podem ser empregados tempos de reação relativamente curtos e trabalhar em temperaturas acima do ponto de ebulição do reagente empregado e iv) as quantidades requeridas de reagentes são menores [59].

A digestão por via úmida é utilizada como pré-tratamento de diferentes amostras para análise de metais, como: tecidos de animais para a determinação de platina por ICP-MS e CSV [60]; tecidos de peixe para a determinação de selênio por CSV [61]; amostras biológicas, como soro sanguíneo, urina, para determinação de selênio por CG-MS [62]; efluentes domésticos e efluentes sintéticos para a determinação de metais, como zinco, cádmio, chumbo, cobre, cobalto, níquel, por voltametria [63]; entre outros exemplos.

### **2.8.3 Digestão por irradiação de microondas**

A utilização de fornos de microondas como fonte de aquecimento para reações químicas e físicas vem ocorrendo há mais de 40 anos [64]. O desenvolvimento de estratégias para utilização de fornos de microondas para digestão da amostra, teve seu grande avanço a partir da década de 80 [65].

A digestão por irradiação de microondas (MW) é um método térmico, onde se utiliza o calor para a ruptura das ligações químicas nos substratos a serem decompostos. Ao usar as MW, não há necessidade de aquecer o forno em

si, pois o incremento de temperatura se dá, de modo rápido, eficaz, uniforme e reproduzível, pela migração de íons e rotação de dipolos (permanentes ou induzidos) no meio reacional. Ou seja, na irradiação por energia de MW, moléculas polares e íons são energizados por meio do mecanismo de rotação de dipolos e condutância iônica, respectivamente, causando um rápido aquecimento da fase aquosa.

Contudo, a energia de MW não somente afeta o meio de digestão (geralmente uma mistura de ácidos minerais), mas também é absorvida pelas moléculas da amostra. Isto aumenta a energia cinética da matriz e causa aquecimento interno e polarização diferenciada, que expande, agita e rompe as ligações da amostra. Este efeito pode ser altamente significativo, produzindo velocidades de decomposição, as quais são maiores que as previstas pelas temperaturas dos ácidos sozinhos [49 -51].

Os ácidos normalmente empregados para solubilização de amostras assistidas por MW são HCl, HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e HF, devendo as propriedades como força do ácido, ponto de ebulição, poder oxidante, poder complexante, solubilidade dos sais e segurança na manipulação serem consideradas na elaboração do programa de aquecimento. Em alguns casos, deve-se fazer uso de oxidantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e de sais para auxílio na solubilização das amostras [51]. Vários são os modelos de fornos de MW disponíveis no mercado e planejados exclusivamente para uso em laboratório, apesar disto, fornos domésticos têm sido adaptados [66] ou simplesmente usados sem nenhuma adaptação, com resultados plenamente satisfatórios e um custo bem inferior (10 a 20 vezes mais baratos que os fornos de laboratório).

A digestão por irradiação de MW oferece muitas vantagens, entre as quais pode-se citar: controle preciso sobre o aquecimento e o tempo de aquecimento; além de redução do consumo de reagentes; risco de contaminação menor, tempo de digestão menor; e ainda possibilidade de automação [62,67].

O pré-tratamento de digestão por irradiação de MW é uma alternativa atraente e consolidada, a qual é utilizada para diferentes amostras na determinação de metais, como por exemplo, em amostras alimentícias ricas em gordura para determinar zinco, níquel, cobre, ferro, selênio e mercúrio por AAS [50]; em amostras de pó para determinar cádmio e chumbo por ASV e AAS; em amostras de tecidos de animais para a determinação de platina por ICP-MS e CSV [60]; em amostras biológicas, como soro sanguíneo, urina, para determinação de selênio por CG-MS [62]; entre outros.

#### **2.8.4 Digestão por irradiação com luz ultravioleta**

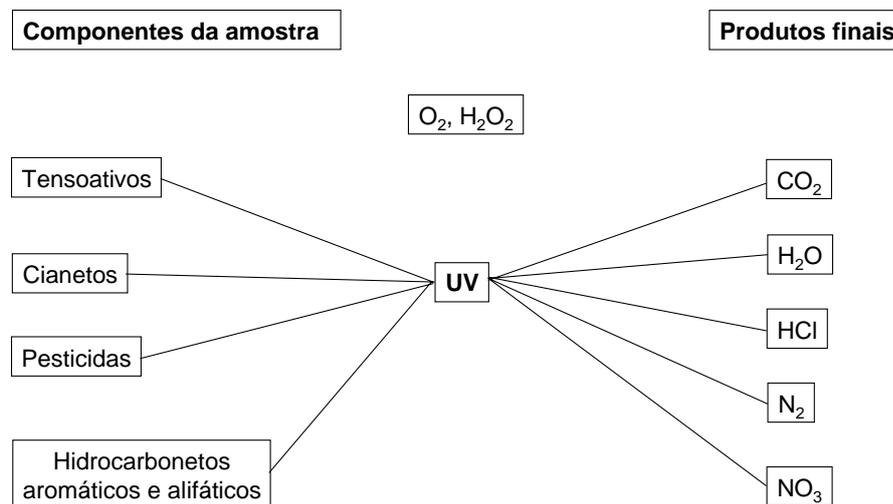
A destruição da matéria orgânica pela radiação ultravioleta (UV) é bem conhecida. Água e ar são comumente desinfetados usando lâmpadas de mercúrio, que vêm sendo empregadas na esterilização de vários objetos, água em indústrias de cosméticos, indústrias eletrônicas, piscinas, etc.

O mecanismo de decomposição da matéria orgânica por radiação UV tem sido descrito para muitos compostos orgânicos, como o DDT (1,1(4,4'-diclorofenil) 2,2,2-tricloroetano), HCB (hexaclorobenzeno), PCP (pentaclorofenol) e outros que se decompõem após a absorção de radiação na faixa de 180-250 nm.

Processos de fotooxidação UV, similares ao que ocorre na natureza, também são usados na decomposição industrial de substâncias tóxicas, em tratamentos de águas residuais urbanas e industriais e na produção de água ultrapura para análise de traços.

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 com ácidos carboxílicos e estruturas aromáticas são abundantes nos compostos húmicos, que absorvem fortemente a luz ultravioleta e podem atuar como fotossensibilizadores [68]. Os fotossensibilizadores são moléculas que quando excitadas transferem sua energia de excitação para outras moléculas presentes em solução, podendo formar espécies altamente reativas como radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), íon superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e elétron hidratado ( $e^-_{\text{hid}}$ ). Estas novas espécies podem fotooxidar os próprios fotossensibilizadores, como também outros compostos orgânicos presentes em solução. Portanto, na presença de uma fonte contínua e intensa de radiação ultravioleta a fotodegradação da matéria orgânica pode ser bastante rápida e eficiente [69]. A Figura 1 abaixo ilustra algumas classes que podem ser decompostas pela ação da luz UV e seus produtos de decomposição finais em solução.



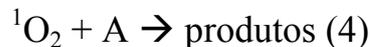
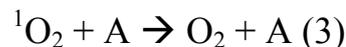
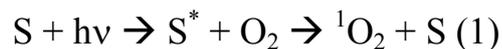
**Figura 1:** Classes de compostos que sofrem decomposição pela radiação UV.

### 2.8.4.1 Oxidantes formados sob influência da radiação UV

#### Oxigênio singlete

A ação da radiação UV sobre moléculas de oxigênio muda seu estado de energia do estado fundamental O<sub>2</sub> (triplete) para o estado excitado <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (singlete), que é gerado possivelmente a comprimentos de onda (λ) igual a 366 nm. Este processo ocorre na presença de fotossensibilizadores.

Kutsky [70] foi o primeiro a propor um mecanismo de oxidação no ambiente natural: a energia da luz solar absorvida pelos fotossensibilizadores, é transferida para as moléculas de O<sub>2</sub> e as moléculas mudam seu estado de energia para <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Os átomos de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> formados reagem com a água e as substâncias orgânicas presentes formando peróxidos e radicais. Haag e Holgne [71] 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. A reação (1) mostra como os fotossensibilizadores participam no processo, a reação (2) mostra a extinção física de moléculas de oxigênio excitado pela água, e a reação (3) mostra a extinção física de moléculas de oxigênio por um aceptor orgânico, por exemplo, furfuril álcool sendo que a reação (4) mostra a reação química com A.

O  $^1\text{O}_2$  é altamente reativo; seu tempo de meia vida é de cerca de 2  $\mu\text{s}$  e seu estado regular de concentração  $[^1\text{O}_2]$  é cerca de  $10^{-12}$  mol  $\text{L}^{-1}$ . Merkel e colaborador [72] 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  $^1\text{O}_2$ .

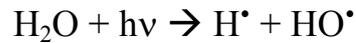
### Radicais superóxidos e radicais alquilperóxidos

O primeiro produto da redução de uma molécula de  $\text{O}_2$  é um íon superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), que é instável em soluções aquosas e rapidamente se decompõe a  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  [73]. Alguns autores sugerem um possível mecanismo para a formação deste íon. É conhecido que ácidos húmicos contêm quinonas e semi-quinonas, que se tornam excitadas quando absorvem radiação UV. Estas então reagem com moléculas de  $\text{O}_2$  a íons  $\text{O}_2^-$ . Estes íons podem participar na decomposição de alguns poluentes, por exemplo, na de cloração fotoquímica do metóxi-cloro.

O radical alquilperóxido  $\text{RO}_2^\bullet$  representa um tipo de radical formado em solução aquosa contendo matéria orgânica durante a irradiação ultravioleta.

### Radicais hidroxilas e peróxidos

A formação de radicais  $^\bullet\text{OH}$  e sua subsequente reação com a matéria orgânica é uma das formas naturais de biodegradação. Os processos de mineralização usados em laboratórios também têm feito uso de radical hidroxila de alta reatividade, que foram gerados durante a irradiação UV a partir de  $\text{H}_2\text{O}$  e do  $\text{H}_2\text{O}_2$  adicionados à solução da amostra [74].



Os radicais  $\text{HO}^\bullet$  formados, possuem um alto potencial de oxidação (+2,8V) e podem com isso provocar a oxidação de um grande número de moléculas orgânicas. Esta reação pode ocorrer através 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 [75].

A influência da adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre a eficiência da digestão UV de muitos compostos orgânicos em solução foram estudados. Um método de decomposição freqüentemente usado consiste em acidificar (pH 2) amostras mineralizadas contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  para posterior fotooxidação. Inicialmente, este método foi usado para a determinação de carbono orgânico dissolvido onde o  $\text{CO}_2$  formado foi medido por Espectroscopia de Infravermelho (IR). O resultado demonstrou que a decomposição de substâncias orgânicas é quantitativa.

#### **2.8.4.2 Aplicação da digestão UV na determinação de metais**

O uso da irradiação ultravioleta para a decomposição de matrizes orgânicas surgiu entre a década de 1960 e 1970. As condições de digestão por luz ultravioleta dependem de qual elemento se quer determinar; o método de determinação que vai ser utilizado; e o tipo de amostra [49, 76].

Muitos metais são determinados em várias matrizes diferentes. A voltametria e a espectrometria de absorção atômica são amplamente utilizadas como técnicas de determinação de metais. Para ambos os métodos de

determinação, a amostra tem de estar homogênea; para a voltametria também deve estar completamente mineralizada, enquanto que para a técnica de AAS a amostra pode estar parcialmente mineralizada [76].

A decomposição por UV realizou uma associação muito profícua com as técnicas voltamétricas, porém em aplicações restritas ao pré-tratamento de amostras de água, o renovado interesse registrado na última década fez com que fosse levada em conta como técnica de abertura de uma gama mais ampla de amostras e para detectores não eletroquímicos [49]. São exemplos da digestão por irradiação por luz ultravioleta, como método de pré-tratamento, com posterior determinação voltamétrica de metais; como Zn, Cd, Pb, Cu, Co e Ni em amostras de águas de origem ambiental, bem como em efluentes de indústria galvânica [77]; cobre em amostras de águas naturais [campos]; Zn, Cd, Pb e Cu em amostras de água e sangue [78].

Outros exemplos utilizando a digestão por irradiação por luz ultravioleta, como método de pré-tratamento, utilizando outras técnicas de determinação de metais; como cobalto em amostra de vitamina B<sub>12</sub> por eletroforese capilar e AdSV [79]; cobre em amostras de água usando injeção em fluxo com detecção por quimiluminescência [80]; paládio, platina, irídio e ouro em amostras de sangue utilizando ICP-MS [81].

## **2.9 Determinação de aminoácidos por cromatografia líquida**

A determinação cromatográfica de aminoácidos é muito estudada devido a importância biológica dos mesmos. A separação cromatográfica de aminoácidos baseia-se, em princípio, na carga ou hidrofobicidade dos aminoácidos. Devido

ao elevado número de aminoácidos e diferentes aplicações, as técnicas podem ser muito variadas [82].

Considerando a natureza dos aminoácidos, existem basicamente dois modos de conduzir a separação. Um envolve o uso de resinas iônicas (normalmente catiônicas), com eluição através de um gradiente de tampões que alteram gradativamente a carga dos aminoácidos devido aos seus diferentes pontos isoelétricos. O outro modo faz uso de sistemas de fase reversa com derivação pré ou pós-coluna. Nos dois casos a detecção pode ser, tanto espectrofotométrica (ninidrina, 2,1,3-oxadiazol e fenil isotiocianato), quanto fluorimétrica (*o*-ftalaldeido ou dansil).

Baffi e colaboradores [83] realizaram o estudo da utilização da fase-reversa C<sub>18</sub>-sílica em cromatografia para a determinação de aminoácidos livres dissolvidos e complexos de aminoácidos-cobre II em matrizes marinhas. Georgi e colaboradores [84] analisaram aminoácidos em proteínas hidrolisadas e em plasma usando uma pré-coluna de derivação com *o*-ftaldialdeido (OPA), combinado com 2-mercaptoetanol. A separação foi realizada com coluna RP-18.

Em um estudo baseado na comparação de métodos de derivação de aminoácidos realizado por Fermo e colaboradores [85], foi usada coluna ODS para a separação. A eluição foi realizada por gradiente entre os eluentes A e B onde (A) 72% água, 20% tampão de propionato de sódio, 8% acetonitrila e (B) 45% água, 30% acetonitrila, 25% metanol. O fluxo usado foi de 1,4 mL min<sup>-1</sup> e os gradientes utilizados para a separação dos aminoácidos foram diferentes para cada método de derivação.

### 2.9.1 Métodos de derivação dos aminoácidos

De um modo geral, o método de IEC baseia-se no uso de uma resina catiônica e uma derivação pós-coluna com ninidrina [84] ou OPA [85]. No caso da análise por fase reversa, a derivação pré-coluna pode ser feita com OPA [88], fenilisotiocianato (PITC) [89], cloreto de 5-dimetilamino-1-naftalenosulfonil (dansil) [90], 9-metilfluorenil clorofórmio (FMOC) [91], 1-fluor-2,4-dinitrobenzeno (FDNB) [92], 1-fluor-2,4-dinitrofenil-5-L-alanina (FDNPAA) [93] e N,N-dietil-2,4-dinitro-5-fluoranilina (FDNDEA) [85].

As desvantagens do uso da dansil, FDNB, FDNPAA e FDNDEA são a formação de interferentes no produto depois da derivação e a necessidade de remoção de reagentes por secagem. O FMOC apresenta como desvantagem o uso excessivo de solvente (pentano) para extrair manualmente o produto da derivação, evitando a sua hidrólise. Devido a estas dificuldades, somente o OPA e PITC são largamente utilizados como reagentes de derivação.

Fürst e colaboradores [94] compararam quatro métodos de derivação pré-coluna, com OPA, PITC, FMOC e dansil, para determinação de aminoácidos em materiais biológicos por HPLC. O método de FMOC foi recomendado somente para a determinação de aminoácidos secundários, e o dansil para a análise de cistina. A derivação com OPA apresentou as vantagens de uma preparação da amostra mais simples, derivação mais rápida, e a possibilidade de automação aliadas a uma alta sensibilidade para análise de aminoácidos primários em fluidos biológicos. Entretanto, a maior desvantagem deste método é a não detecção da cistina e os aminoácidos secundários, além de apresentar derivados instáveis.

McClung e colaboradores [95] compararam cinco métodos de derivação em pré-coluna em termos de limites de detecção, precisão e estabilidade. Eles

concluíram que o método de derivação com PITC apresenta maior estabilidade. No entanto, a derivação com OPA foi mais adequada considerando-se o limite de quantificação e a derivação com dansil como a de maior precisão.

Fermo e colaboradores [85] compararam os derivatizantes OPA e FDNDEA para a análise de aminoácidos em soro sanguíneo por HPLC. Concluíram que se a quantidade de aminoácidos presentes é bastante pequena o método preferido é o do OPA devido a alta sensibilidade e o do FDNDEA para a análise de aminoácidos secundários.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Instrumentação

-Polarógrafo:

Processador 646 VA (Metrohm, Heriseau, Suíça) com trocador de amostras 675 VA (Metrohm, Heriseau, Suíça);

Eletrodo de referência – Ag/AgCl/KCl 3 mol L<sup>-1</sup>;

Contra eletrodo- Platina;

Eletrodo de trabalho – HMDE.

- Espectrômetro:

Espectrômetro de absorção atômica (Varian SPECTRA AA200, Melbourne, Austrália) com atomizador eletrotérmico (Varian GTA 100) em forno de grafite pirolítico sem plataforma de L'vov e amostrador automático;

-Cromatógrafo:

Cromatógrafo a Líquido DX-300 com sistema de cromatografia por gradiente (Dionex, Sunnyvale, Estados Unidos);

Bomba cromatográfica LC-10AS (Shimadzu, Kyoto, Japão);

Integrador C-R6A (Shimadzu, Kyoto, Japão);

Detector por fluorescência HP-1100 (Hewlett Packard, Waldbronn, Alemanha);

- Espectrofotômetro:

Espectrofotômetro HP-8453 (Hewlett Packard, Waldbronn, Alemanha) com arranjo de diodos;

- Outros:

Potenciômetro digital (Digimed DM 20, São Paulo, Brasil) com eletrodo de vidro combinado;

Balança analítica (Sartorius) com quatro casas decimais de precisão;

Ultrassom (Thornton) Potência 200W;

Bomba peristáltica (IPC Ismatec, Glattbrugg – Zürich, Suíça);

Forno de Microondas doméstico (Philco) - 1100 – 1600 W;

Chapa de aquecimento - IKAMAG<sup>®</sup> RET-GS;

Destilador de ácidos Berghof, modelo BSP;

Digestor UV 705 com lâmpada de Hg 500W (Metrohm, Heriseau, Suíça) e tubos de quartzo;

Sistema de ultrafiltração Ultrasart Cell 10 (Sartorius, Goettingen, Alemanha);

### 3.2 Descontaminação do material

O material plástico (polietileno, polipropileno) utilizado foi colocado, por pelo menos 24 horas, em solução de HNO<sub>3</sub> 10% em etanol (v/v). Posteriormente, o material foi lavado com água ultrapura em abundância.

### 3.3 Reagentes e soluções

Utilizou-se água destilada, deionizada e purificada em sistema Milli-Q (resistividade de 18,2 MΩ cm<sup>-1</sup>) no preparo das soluções.

Todos os reagentes empregados foram produtos de grau analítico.

Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Cd (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O e Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 5H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt);

HNO<sub>3</sub> destilado, HClO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CCl<sub>3</sub>COOH e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt);

NH<sub>4</sub>OH, NH<sub>4</sub>Cl, KCl, NaOH, CH<sub>3</sub>OH, NaCH<sub>3</sub>COO p. a. (Merck, Darmstadt);

1-(2-pyridilazo)- 2- naphthol (PAN) (Merck, Darmstadt);

Resina Dowex 50 x 4 (50 – 100 mesh) (Fluka);

Polietileno 40-60 mesh (Merck, Darmstadt);

Triton - X 100 (Merck, Darmstadt);

Alanina, glicina, serina, metionina, treonina, histidina, fenilalanina, ácido aspártico e ácido glutâmico (Sigma);

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{NaCH}_3\text{COO}$  p. a. (Merck, Darmstadt);

*o*-ftaldialdeído reagente derivatizante (Across) e etanotiol (Merck, Darmstadt).

### 3.3.1 Preparo das soluções

As soluções padrão estoque individuais de Pb (II), Cd (II), Zn (II) e Cu (II) de concentração  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  foram preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  em água ultrapura. As soluções utilizadas nos ensaios foram preparadas por diluição das soluções estoque.

A solução de 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) foi preparada da seguinte forma:  $4 \times 10^{-5} \text{ mol}$  de PAN em 5 mL de triton- X 100 e 50 mL água sob agitação até a dissolução total do reagente. Após a dissolução, completou-se o volume final a 100 mL com água.

A solução tampão de  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$  pH 10 foi preparada a partir de uma solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e uma solução de  $\text{NH}_4\text{Cl}$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , o pH foi ajustado com  $\text{NaOH}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

A solução tampão de  $\text{KCl}/\text{NaCH}_3\text{COO}$  pH 4,6 foi preparada a partir de uma solução de  $\text{KCl}$   $1,5 \text{ mol L}^{-1}$  e uma solução de  $\text{NaCH}_3\text{COO}$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ .

As soluções padrão estoque  $6,0 \text{ mmol L}^{-1}$  dos aminoácidos foram preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas de seus sais em água ultrapura e armazenadas sob refrigeração. As soluções utilizadas nos ensaios foram preparadas por diluição das soluções estoque.

A Fase Móvel (FM) utilizada nas análises cromatográficas constituiu-se de 2 eluentes. O eluente 1: solução 0,4 mol L<sup>-1</sup> acetato de sódio e 0,001 mol L<sup>-1</sup> hidróxido de sódio em 2% de metanol; eluente 2: solução 0,023 mol L<sup>-1</sup> hidróxido de sódio e 0,007 mol L<sup>-1</sup> tetraborato de sódio.

A solução de derivação foi preparada em um frasco contendo aproximadamente 800 mL de água e 50 mL de metanol (sob agitação magnética), onde adicionou-se 2,5 g de *o*-ftaldialdeído (OPA) e 20,12 g tetraborato de sódio não hidratado. Completou-se o volume a 1 litro com água, filtrou-se a vácuo. Para a filtração, empregou-se filtro de acetato de celulose com porosidade de 0,2 µm. Após a filtração, adicionou-se 2,5 mL de etanotiol. O composto de derivação é representado por OPA-SH [122].

### **3.3.2 Soluções de nutrição parenteral**

A composição das soluções de NP encontra-se descrita no apêndice A.

### **3.4 Determinação voltamétrica de zinco, cádmio, chumbo e cobre**

A determinação de zinco, cádmio, chumbo e cobre em água pura e em amostras comerciais foi realizada pelo método da adição padrão ( $n=3$ ) e os parâmetros experimentais das medidas voltamétricas estão descritos no apêndice B.

### **3.5 Pré-tratamento das amostras**

#### **3.5.1 Separação e pré-concentração dos metais das soluções de NP**

A separação e pré-concentração dos metais presentes nas soluções de NP são necessárias para viabilizar a determinação voltamétrica dos mesmos.

Com o intuito de promover a separação e pré-concentração de zinco, cádmio, chumbo e cobre das soluções de NP, foram testadas colunas recheadas de PE (material adsorvente) impregnado com PAN (complexante de metais).

##### **3.5.1.1 Confeção das colunas de PE**

Colunas recheadas com polietileno (PE) foram testadas como fase estacionária para a separação e pré-concentração dos metais a partir das soluções de NP.

Primeiramente, lavou-se o PE (40-60 mesh) com  $\text{HNO}_3$  0,01% (v/v) e depois com água ultrapura em abundância a fim de eliminar ou minimizar a contaminação do polímero. Após a descontaminação, o PE foi mantido sob agitação numa solução de PAN em metanol 1% (m/v) por 24h.

Para a confeção das colunas foram utilizadas ponteiras descartáveis de pipetas Eppendorf de 1000  $\mu\text{L}$ . As extremidades das colunas foram preenchidas com lã de vidro a fim de evitar perdas do PE. O preenchimento foi feito a partir da suspensão do polímero em uma solução metanólica (1%) de PAN, que ao passar pela coluna aberta, com vácuo na extremidade inferior, promovia a

drenagem da solução e a conseqüente retenção do material de preenchimento na coluna. Através deste procedimento, conseguiu-se garantir uniformidade na compactação. Após o preparo, as colunas foram lavadas com solução água/etanol (1:1).

### **3.5.1.2 Separação e pré-concentração dos metais em colunas de PE-PAN**

Em 40 mL de amostra, adicionou-se 1,2 mL de etanol e 400 $\mu$ L de tampão  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 10). A seguir, a amostra foi carregada através da coluna, com auxílio da bomba peristáltica, com velocidade de fluxo de 0,3 mL  $\text{min}^{-1}$ .

Os metais foram desorvidos da coluna com 1,5 mL de  $\text{HClO}_4$  1% (v/v), com vazão de 0,3 mL  $\text{min}^{-1}$  e posteriormente, fez-se a determinação voltamétrica nas condições descritas no apêndice B.

Adicionalmente, foram realizados ensaios de recuperação com amostras de NP fortificadas com 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  dos metais. Estas amostras foram submetidas à etapa de separação e pré-concentração e, posteriormente, a determinação voltamétrica nas condições descritas no apêndice B.

Para a determinação dos metais por AAS as amostras foram submetidas ao mesmo procedimento de separação e pré-concentração. Porém, neste caso, utilizou-se 1,5 mL de uma solução etanólica de  $\text{HNO}_3$  (2:3, respectivamente) para a desorção dos metais da coluna. As condições de operação do espectrômetro e os programas de temperatura utilizados na determinação dos metais estão descritos no apêndice C.

A comparação dos resultados obtidos por voltametria e por AAS foi realizada para verificar a eficiência da separação e pré-concentração dos metais presentes nas amostras de NP em colunas de PE-PAN.

### **3.5.2 Digestão por via úmida**

Para o pré-tratamento das amostras de NP, foram testados 2 procedimentos de digestão por via úmida, empregados para a determinação de chumbo e mercúrio em sangue e urina [81, 82].

Procedimento 1: adicionou-se 7,5 mL de ácido nítrico concentrado destilado e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado a 1 mL de amostra de solução de NP. Deixou-se em repouso por 24 horas a 60 °C. Após, aqueceu-se a mistura até a ebulição por, aproximadamente, 3 horas e a cada hora, adicionou-se 200 µL de peróxido de hidrogênio 30% (v/v).

Procedimento 2: adicionou-se 1 mL de ácido nítrico concentrado destilado e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado a 1 mL de amostra de solução de NP. Deixou-se em repouso por 24 horas a 60 °C.

Os brancos dos procedimentos 1 e 2 foram obtidos utilizando água ultrapura no lugar de amostra.

### **3.5.3 Irradiação por microondas**

Dois programas foram testados utilizando o forno de microondas.

Os dois programas foram desenvolvidos para promover uma ação gradual das MW sobre a amostra, evitando aquecimento e pressão interna exagerados, que acarretaria em perdas de amostra. As etapas do primeiro programa ( $P_1$ ) testado estão descritas na Tabela 3. Entre cada etapa do programa, a amostra foi resfriada num banho de gelo.

**Tabela 3:** Programa de MW para abertura das amostras.[103]

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

As amostras foram submetidas individualmente à irradiação de MW.

O mesmo programa de MW ( $P_1$ ) foi testado utilizando dois procedimentos diferentes.

Procedimento 3: 1 mL de ácido 10% (m/v) ou peróxido de hidrogênio foi adicionado a 9 mL da amostra de solução de NP.

Procedimento 4: 1 mL de ácido 10% (m/v) ou peróxido de hidrogênio foi adicionado a 1 mL da amostra de solução de NP e 8 mL de água.

Os ácidos testados nos procedimentos 3 e 4 foram: ácido nítrico, sulfúrico, perclórico e tricloroacético.

Outro Programa (P<sub>2</sub>) empregou sempre a potência máxima de irradiação em intervalos regulares de 20 segundos durante 10 minutos. O seguinte procedimento foi utilizado com este programa:

Procedimento 5: 25 µL de ácido sulfúrico concentrado e 50 µL de ácido nítrico concentrado foram irradiados por 20 segundos. A seguir, adicionou-se 100 µL da amostra de solução de NP e irradiou-se por mais 20 segundos. Esta operação foi repetida (10 vezes) até completar o volume de 1 mL de amostra. A partir daí, completou-se o tempo de irradiação da amostra. Para evitar perdas por superaquecimento e aumento exagerado da pressão interna, a cada 20 segundos de irradiação, resfriou-se a amostra em um banho de gelo e abriu-se a tampa do frasco para reduzir a pressão interna.

As amostras foram diluídas a 10 mL para determinação voltamétrica.

Parâmetros como a diluição prévia da amostra seguida de sua adição em alíquotas de 100 µL e o aumento do tempo de irradiação para 15 minutos foram avaliados.

### **3.5.4 Irradiação ultravioleta (UV)**

A eficiência da irradiação UV para decompor as amostras de NP foi investigada usando diferentes condições experimentais. Os seguintes parâmetros experimentais foram avaliados na etapa de otimização: fator de diluição da amostra, tempo de irradiação UV, tipo de ácido mineral e quantidade de peróxido empregado. Todas as condições investigadas foram para um volume final de 10 mL e a temperatura das amostras foi mantida a  $86 \pm 3$  °C durante o processo de irradiação.

#### **3.5.4.1 Estudo do efeito da concentração da amostra e do tempo de irradiação UV**

Para investigar o efeito da concentração da amostra na eficiência do pré-tratamento, as amostras de NP foram diluídas em água nas proporções 1:1; 1:5; 1:10 e 1:20; e uma mistura de 280 µL HClO<sub>4</sub> concentrado e 200 µL HNO<sub>3</sub> concentrado foi adicionada às amostras no início da irradiação. As amostras foram irradiadas durante 2, 4, 6, 7, 8, 10 e 12 horas.

#### **3.5.4.2 Estudo do tipo de ácido mineral e da concentração de peróxido**

Para a escolha do tipo de ácido ideal testou-se a adição de 50 e 100 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HNO<sub>3</sub> ou HClO<sub>4</sub>, individualmente e combinados às amostras antes do início da irradiação.

A influência da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi investigada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (v/v) somente antes do início da irradiação. Testou-se, ainda adições subseqüentes de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a cada 60 minutos de irradiação.

A influência de ácidos, na digestão final, sem adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bem como a influência de  $\text{H}_2\text{O}_2$  sem adição de ácidos minerais também foi investigada para os diferentes fatores de diluição e tempos de irradiação.

### **3.6 Purificação do peróxido de hidrogênio**

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  “p.a” apresenta uma elevada contaminação dos metais investigados, especialmente o chumbo. Assim, fez-se necessário a purificação do peróxido empregando-se uma resina catiônica na forma  $\text{Na}^+$ .

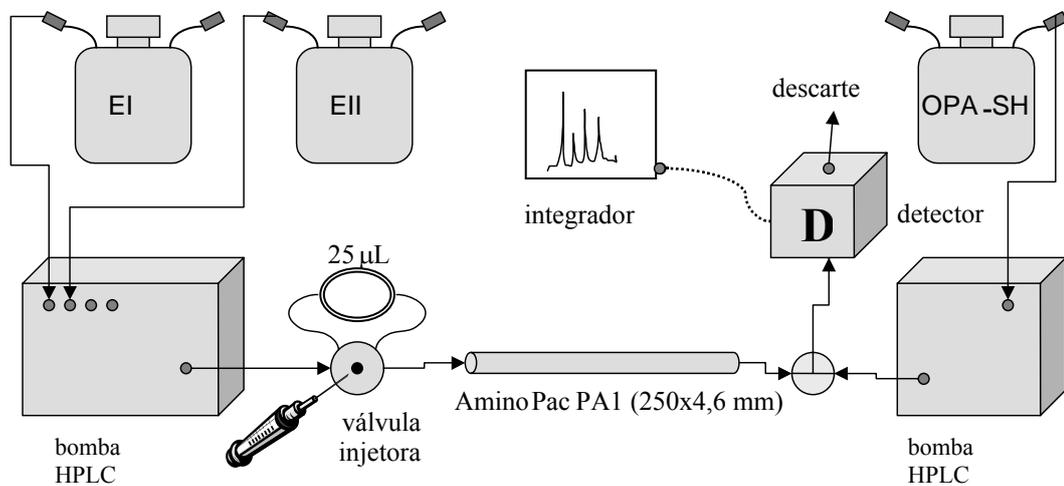
Antes do preparo da resina, a mesma foi descontaminada com solução alcoólica de  $\text{HNO}_3$  10% (v/v), conforme descrito no item 3.3.

Resina catiônica na forma  $\text{Na}^+$ : 5g da resina descontaminada foi acondicionada, em coluna de vidro, com 300 mL de solução de cloreto de sódio  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , numa vazão de  $2 \text{ mL min}^{-1}$ , a fim de fazer-se a substituição do  $\text{H}^+$  por  $\text{Na}^+$ . O pH em torno de 5,5 da solução eluída da coluna indicou o término da troca iônica.

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

### 3.7 Sistema cromatográfico

O sistema de HPLC utilizado para a separação e quantificação dos aminoácidos está ilustrado na Figura 2. Para a separação empregou-se uma coluna aniônica (Amino Pac PA1) e a detecção dos analitos foi feita por fluorescência.



**Figura 2:** Sistema de HPLC usado para a determinação dos aminoácidos, onde EI:  $0,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCH}_3\text{CO}_2/0,001 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$  em 2%  $\text{CH}_3\text{OH}$  e EII:  $0,023 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}/0,007 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ .

Como mostra a Figura 2, uma alíquota de  $25 \mu\text{L}$  da amostra foi injetada no sistema e após a separação dos analitos na coluna, estes foram carreados, a vazão de  $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ , até a célula misturadora. Na célula misturadora, entraram em contato com a solução de derivação (OPA-SH), a vazão de  $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ , formando um composto fluorescente que apresenta um comprimento de onda máximo de excitação em  $330 \text{ nm}$  e um comprimento de onda máximo de

emissão de 455 nm. Então, o composto fluorescente foi carregado até o detector e o sinal cromatográfico foi registrado pelo integrador.

Os aminoácidos foram determinados em conjunto usando um programa com gradiente de eluição. O programa de eluição por gradiente foi composto por dois eluentes.

O gradiente de eluição inicia com 100% do eluente I, após três minutos o eluente II é introduzido e torna-se 30% da FM no quarto minuto. O sistema mantém esta razão até o sexto minuto. Nos próximos onze minutos esta razão vai variando de forma que no décimo sétimo minuto a FM é constituída de 70% do eluente II e 30% do eluente I. Durante o próximo minuto o sistema muda para 100% do eluente II e mantém esta FM pelos próximos cinco minutos. Após, o eluente I é introduzido novamente e a FM torna-se 100% do eluente I após um minuto. Mantido assim, a linha base estabiliza após aproximadamente sete minutos. Portanto, o programa de eluição por gradiente da FM consome um tempo total de 30 minutos para cada injeção incluindo o tempo para recondicionar a coluna.

### **3.8 Quantificação dos aminoácidos**

Para verificar a eficiência de separação e quantificação do método cromatográfico, construiu-se uma curva analítica para cada aminoácido. Para isso, injetou-se três soluções analíticas da mistura dos aminoácidos nas concentrações de 3,0; 6,0; e 12,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cada aminoácido. Estas soluções foram preparadas pela diluição de alíquotas das soluções estoque dos aminoácidos.

Os sinais cromatográficos registrados na forma de picos de emissão da radiação eletromagnética foram plotados em gráficos, do tipo altura do sinal ( $\mu\text{A}$ ) vs concentração ( $\mu\text{L}^{-1}$ ). Os parâmetros de integração estão descritos no apêndice F.

Com os valores de altura do sinal, confeccionou-se as curvas analíticas para cada aminoácido.

### **3.9 Aplicação do método cromatográfico no estudo da interação de cádmio e chumbo com os aminoácidos**

O objetivo deste estudo foi investigar a interação de cádmio e chumbo com os aminoácidos alanina, glicina, serina, metionina, treonina, histidina, fenilalanina, ácido glutâmico e ácido aspártico. Assim, realizaram-se alguns ensaios para verificar se os sinais cromatográficos seriam alterados de acordo com a porção dos aminoácidos complexados com o metal.

#### **3.9.1 A luminescência dos aminoácidos e dos aminoácidos na presença de cádmio e chumbo**

Comparou-se a intensidade de luminescência das soluções dos aminoácidos com soluções dos aminoácidos e o metal.

O primeiro grupo composto pelas soluções individuais dos aminoácidos na concentração de  $3,0\ \mu\text{mol L}^{-1}$  e no segundo grupo aminoácido ( $3,0\ \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e cádmio ( $3,0\ \mu\text{mol L}^{-1}$ ).

As amostras foram injetadas nos sistema cromatográfico e a partir dos resultados construiu-se um gráfico da intensidade de luminescência vs amostras.

Repetiu-se o ensaio substituindo a solução de cádmio ( $3,0 \mu \text{ mol L}^{-1}$ ) por uma solução de chumbo ( $3,0 \mu \text{ mol L}^{-1}$ ).

### **3.9.2 O espectro de absorção molecular dos aminoácidos e dos aminoácidos na presença de cádmio e chumbo**

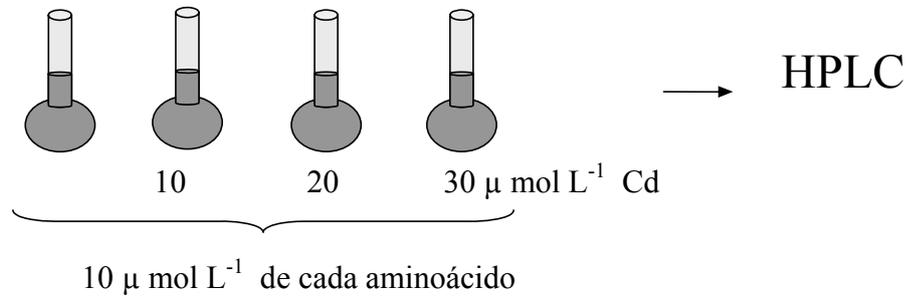
Investigou-se o perfil do espectro de absorção molecular de amostras de aminoácidos divididas em dois grupos. No primeiro grupo as amostras foram preparadas pela mistura de 1 mL da solução do aminoácido  $6,0 \mu \text{ mol L}^{-1}$ , 1 mL da solução de derivação e 1 mL de água. No segundo grupo, as amostras foram preparadas pela mistura de 1 mL da solução do aminoácido  $6,0 \mu \text{ mol L}^{-1}$ , 1 mL da solução de cádmio  $6,0 \mu \text{ mol L}^{-1}$  e 1 mL da solução de derivação. O branco foi preparado pela mistura de 1 mL da solução de derivação e 2 mL de água.

Coletou-se os espectros das amostras na faixa de 200 a 700 nm. O mesmo ensaio foi realizado para o chumbo.

### **3.9.3 Interação do metal numa mistura dos aminoácidos**

Para avaliar a interação do cádmio numa mistura dos aminoácidos, preparou-se quatro soluções analíticas, na concentração de  $10 \mu \text{ mol L}^{-1}$  de cada aminoácido. A estas soluções adicionou-se as seguintes concentrações de

cádmio: 0, 10, 20 e 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A representação esquemática do conjunto de soluções analíticas analisadas está ilustrada na Figura 3.

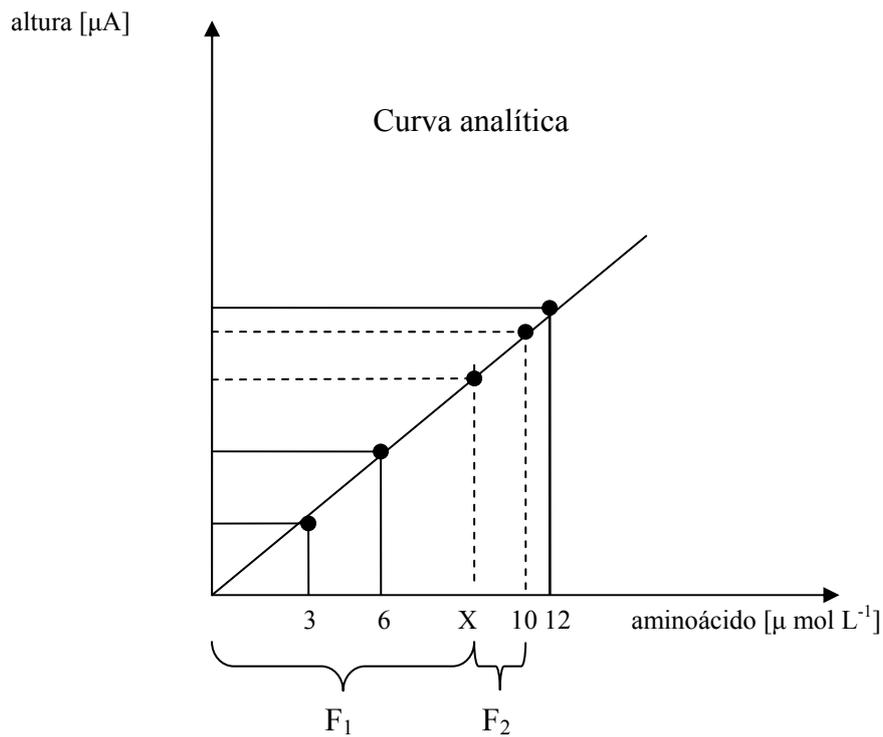


**Figura 3:** Representação esquemática das soluções empregadas no estudo da interação do cádmio em uma mistura de aminoácidos.

Estas soluções foram injetadas no sistema de HPLC e os aminoácidos foram quantificados, utilizando-se a equação da reta obtida através da curva analítica, descrita no item 3.8 (quantificação).

A porcentagem de cada aminoácido que complexou com o cádmio, foi observada através da redução do seu sinal cromatográfico. Concomitantemente, avaliou-se a velocidade de formação dos complexos aminoácido-cádmio.

A Figura 4 mostra como se calculou a porcentagem de cada aminoácido que complexou com o cádmio.



**Figura 4:** Representação gráfica do cálculo, onde: X corresponde a solução contendo  $10 \mu \text{ mol L}^{-1}$  de cada aminoácido e  $10 \mu \text{ mol L}^{-1}$  do metal;  $F_1$  corresponde ao aminoácido livre e  $F_2$  ao aminoácido combinado com o metal.

Fez-se a subtração dos sinais da solução contendo a mistura dos aminoácidos ( $10 \mu \text{ mol L}^{-1}$ ) e os sinais da solução contendo a mistura dos aminoácidos e metal (X). A diferença entre estes dois valores corresponde à fração do aminoácido que complexou com o metal ( $F_2$ ).

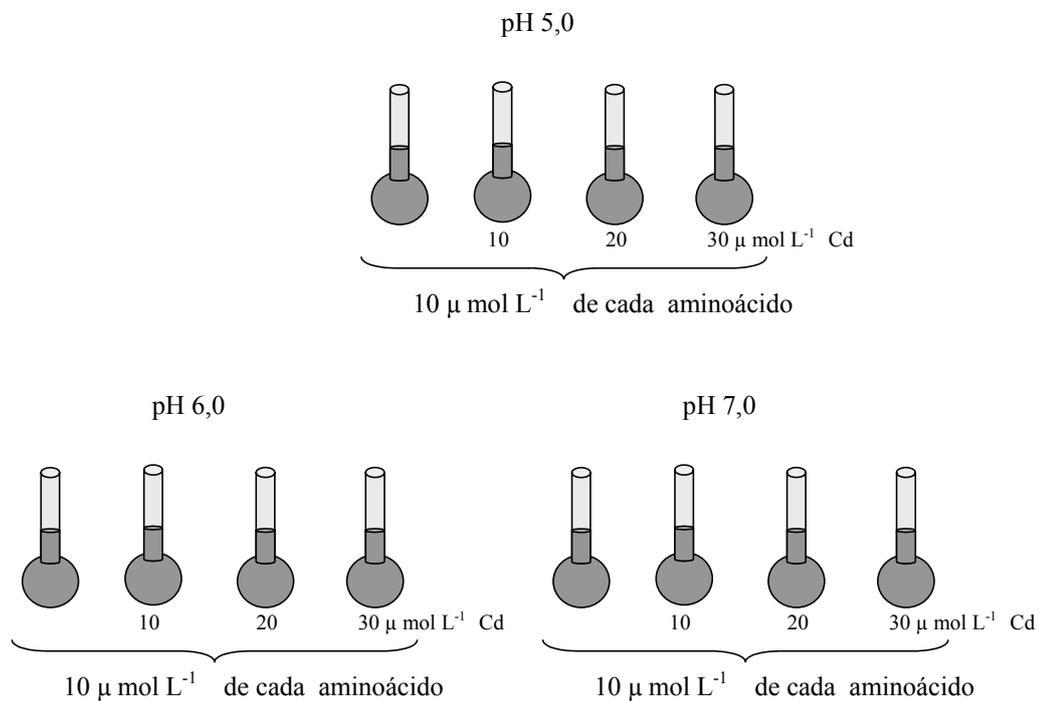
Para o estudo da interação do chumbo com os aminoácidos de interesse, repetiu-se o mesmo ensaio substituindo as soluções de Cd por Pb.

### 3.9.4 Efeito do pH na interação do cádmio e chumbo com os aminoácidos

Estudou-se a influência do pH do meio na interação do cádmio e chumbo com os aminoácidos para três valores de pH.

Para tanto, soluções analíticas da mistura dos aminoácidos, na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  para cada aminoácido, adicionou-se as seguintes concentrações de cádmio: 0, 10, 20 e  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  e os valores de pH foram corrigidos para 5,0; 6,0 e 7,0 com  $\text{HNO}_3$  ou  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ . A Figura 5 ilustra as soluções que foram analisadas.

Estas soluções foram injetadas no sistema de HPLC e a variação dos sinais cromatográficos dos aminoácidos foi avaliada em função do pH.



**Figura 5:** Soluções dos aminoácidos em diferentes valores de pH.

Repetiu-se o ensaio para verificar a influência do pH do meio na interação dos aminoácidos com chumbo.

### **3.9.5 Influência do tempo na interação de cádmio e chumbo com aminoácidos**

Fez-se o monitoramento de soluções contendo a mistura dos aminoácidos (10  $\mu\text{M}$  de cada aminoácido) e quantidades crescentes de metal (10, 20 e 30  $\mu\text{M}$ ) durante 5 dias.

As soluções foram mantidas sob refrigeração (4 °C) e foram analisadas diariamente, a fim de avaliar a variação na quantidade de complexos aminoácidos-metal em função do tempo.

### **3.10 Determinação da fração livre e da fração combinada de cádmio e chumbo**

Realizou-se ensaios para a determinação tanto da fração livre quanto da fração combinada, metal-aminoácido, em soluções de mistura de aminoácidos. Para isto, preparou-se soluções da mistura dos aminoácidos e dos metais. A Tabela 4 mostra a composição das soluções analisadas.

**Tabela 4:** Composição das soluções injetadas no sistema de HPLC.

Amostras	aminoácidos ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Cd ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
1	5	--	--
2	5	5	--
3	5	10	--
4	5	--	5
5	5	--	10
6	10	--	--
7	10	5	--
8	10	10	--
9	10	--	5
10	10	--	10
11	15	--	--
12	15	5	--
13	15	10	--
14	15	--	5
15	15	--	10
16	--	--	--

A amostra 16, apenas água, constitui-se o branco da análise e permite quantificar a possível contaminação apresentada pela FM.

As amostras foram injetadas no sistema cromatográfico e o efluente foi coletado na saída da coluna. O efluente foi recolhido até o início da eluição do primeiro analito.

A concentração de cádmio e chumbo nas frações coletadas foi determinada por ETAAS e também por ASV.

### **3.10.1 Determinação de cádmio e chumbo por espectrometria de absorção atômica**

Na ETAAS faz-se a determinação do metal total, ou seja, a fração livre e a fração combinada (metal-aminoácido).

As condições do instrumento e o programa do forno de grafite estão no Apêndice C.

### **3.10.2 Determinação de cádmio e chumbo por voltametria**

Na ASV determina-se apenas o metal livre, isto é, a fração do metal que não combinou com algum componente da matriz.

Os parâmetros do método voltamétrico estão descritos no Apêndice B e para a quantificação do metal utilizou-se o método da adição do padrão.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Determinação da contaminação das soluções de NP por zinco, cádmio, chumbo e cobre

A investigação da contaminação de produtos farmacêuticos por metais tóxicos é um assunto de grande relevância devido os riscos que eles representam, principalmente em casos de administração intravenosa.

Estudos têm mostrado que soluções comerciais de aminoácidos para NP podem conter algumas espécies metálicas indesejadas [2, 3, 96], liberadas dos recipientes [7, 97] ou existentes como contaminantes do material da tampa [98] ou ainda, como contaminantes da própria matéria-prima. A habilidade dos aminoácidos em complexar espécies metálicas pode promover sua distribuição e acumulação nos órgãos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de anormalidades histopatológicas nos pacientes sob tratamento de nutrição parenteral [99-101].

A determinação direta da concentração de traços de metais pesados em soluções de NP é mais difícil devido aos componentes da matriz que podem causar a supressão ou mascarar o sinal obtido por vários métodos analíticos. A espectrometria de absorção atômica (AAS) é amplamente usada para quantificar metais traços em soluções de NP devido à alta sensibilidade das medidas, embora as interferências observadas para estas amostras sejam apreciáveis. As interferências estão associadas ao espalhamento da luz e ao *background* de absorção molecular [102, 103].

A voltametria de redissolução anódica (ASV) também pode ser atrativa para quantificar traços de metais pesados em soluções de NP considerando três aspectos principais: i) a possibilidade de determinações simultâneas; ii) a alta sensibilidade obtida com métodos de redissolução e iii) o baixo custo do equipamento em comparação as medidas por AAS [104-110].

Entretanto, a complexidade da matriz presente em soluções de NP também pode interferir com o método eletroquímico. Ao contrário das medidas utilizando AAS, através da ASV apenas a fração dissociada pode ser detectada sob as condições de eletrólise; assim, o pré-tratamento da amostra precisa liberar a fração não lábil do metal da matriz e os produtos da digestão não podem interferir com a reação do eletrodo. As interferências surgem de certos compostos orgânicos de atividade superficial os quais mesmo em baixas concentrações podem diminuir o pico de redissolução por impedir a deposição do metal devido à formação de um filme sobre a superfície do eletrodo ou ainda deixar o analito indisponível na solução [69,111]. Deste modo, faz-se necessário uma etapa de pré-tratamento das amostras de NP antes da determinação de metais presentes como contaminantes.

## **4.2 Pré-tratamentos**

Neste trabalho, foram avaliados quatro métodos de pré-tratamento das amostras de NP para a determinação voltamétrica dos metais.

Os pré-tratamentos avaliados foram: separação e pré-concentração dos metais em colunas de PE, digestão por via úmida, digestão por radiação de MW e digestão por radiação UV.

Para as amostras de NP de pequeno volume, o problema não é propriamente a matriz que se constitui, basicamente, de soluções salinas. Contudo, a análise direta de amostras de NP de pequeno volume é difícil porque os metais, presentes como contaminantes, estão próximos dos limites de detecção das técnicas analíticas. A fim de contornar este problema buscou-se uma forma de separar e pré-concentrar os analitos.

Na digestão por via úmida testou-se dois procedimentos que diferem pelo volume adicionado da mistura ácida nítrico-sulfúrico. Na digestão por radiação de MW utilizou-se três procedimentos que diferem pelo volume de ácido e amostra adicionados, e também se testou dois programas diferentes quanto à temperatura, tempo e potência. Na digestão por radiação UV foram testados parâmetros experimentais como diluição da amostra, adição de ácidos e peróxido de hidrogênio e tempo de irradiação.

#### **4.2.1 Separação e pré-concentração dos metais das soluções de NP**

Baseado em trabalhos anteriores [58] investigou-se a separação e pré-concentração de zinco, cádmio, chumbo e cobre das soluções de NP utilizando colunas de polietileno impregnado com um reagente complexante dos metais, o 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN).

A adição de etanol a amostra favorece o contato entre esta e o polietileno, uma vez que a água não molha o polietileno. Já o tampão (pH 10) foi adicionado para que o pH adequado à formação do complexo dos metais com o PAN seja atingido.

Ao passar as amostras pela coluna de PE-PAN, os metais contidos nestas foram complexados pelo PAN, ficando retidos na coluna. A seguir, fez-se a

eluição dos metais com uma solução de  $\text{HClO}_4$  1% (v/v) e a determinação dos mesmos no eluato por ASV. Na Tabela 5 estão as concentrações dos metais contaminantes medidos por ASV no eluato de 10 amostras diferentes de NP.

**Tabela 5:** Metais contaminantes do eluato de 10 amostras de NP, medidos por ASV.

Amostra	Zn ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cd ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Água injetável	18,0	5,80	n.d.	14,5
Água injetável	20,0	3,42	8,67	13,7
NaCl	64,8	7,50	4,00	7,54
NaCl	72,6	9,04	57,8	286
KCl	46,6	8,40	15,4	32,9
KCl	54,4	22,3	n.d.	29,3
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	120	1,35	16,7	33,3
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	n.d.	3,77	4,60	n.d.
Glicose	617	47,1	51,6	147
Glicose	380	17,3	n.d.	57,6

RSD ( $n=3$ ): 0,5- 8,2%; n.d. = não detectado

Outras amostras de NP fortificadas com  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  dos metais foram submetidas ao mesmo procedimento de separação e pré-concentração antes da determinação voltamétrica. Os resultados da determinação por ASV no eluato,

bem como as recuperações dos metais adicionados às amostras estão expressos na Tabela 6.

**Tabela 6:** Metais contaminantes no eluato das amostras e sua recuperação em amostras fortificadas com  $5\mu\text{gL}^{-1}$  de cada metal, medidos por ASV.

Amostra	metal	referência ( $\mu\text{gL}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	fortificada ( $\mu\text{gL}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	recuperação (%)
Água injetável	Zn	26,2	30,5	$97,8 \pm 5,7$
	Cd	5,75	11,5	$107 \pm 3,1$
	Pb	20,6	26,1	$102 \pm 5,7$
	Cu	9,85	13,2	$88,9 \pm 5,6$
Glicose	Zn	432	455	$104 \pm 5,7$
	Cd	10,9	15,7	$98,7 \pm 1,2$
	Pb	73,1	76,9	$98,5 \pm 3,4$
	Cu	41,1	46,6	$101 \pm 4,4$
KCl	Zn	49,1	56,3	$104 \pm 3,7$
	Cd	8,02	13,8	$106 \pm 2,3$
	Pb	29,1	34,1	$99,8 \pm 4,1$
	Cu	31,1	32,5	$89,9 \pm 3,3$

<sup>a,b</sup>RSD ( $n=3$ ): 0,2- 8,2%

A Tabela 7 mostra a comparação entre os resultados obtidos por ASV e AAS na determinação dos metais contidos nas amostras de NP de pequeno

volume. Não há diferenças significativas entre os resultados para um nível de confiança de 95% (teste *t* de Student).

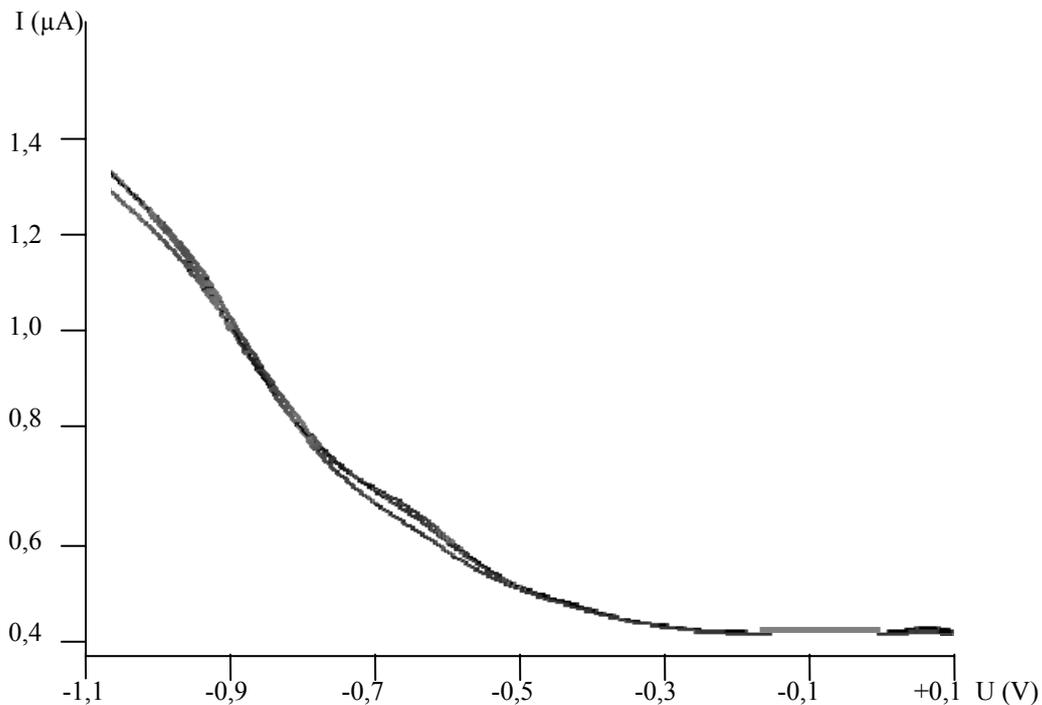
**Tabela 7:** Comparação entre os resultados obtidos por ASV e AAS na análise de amostras de NP de pequeno volume.

Amostra	metal	ASV ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	AAS ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	desvio (%)
Água	Zn	$13,6 \pm 3,2$	$12,5 \pm 1,3$	-8,90
	Cd	$3,76 \pm 0,3$	$4,01 \pm 0,4$	+6,23
	Pb	$2,82 \pm 3,0$	$2,87 \pm 1,3$	+1,74
	Cu	$4,13 \pm 0,7$	$3,89 \pm 0,5$	-6,17
Glicose	Zn	$501 \pm 4,2$	$519 \pm 3,3$	+3,45
	Cd	$38,7 \pm 0,3$	$37,5 \pm 0,2$	-3,33
	Pb	$63,5 \pm 0,7$	$61,8 \pm 0,5$	-2,70
	Cu	$46,6 \pm 3,0$	$45,3 \pm 2,3$	-2,73
KCl	Zn	$56,3 \pm 1,8$	$66,1 \pm 1,3$	+14,9
	Cd	$13,8 \pm 0,8$	$15,41 \pm 0,5$	+10,4
	Pb	$34,1 \pm 0,9$	$34,0 \pm 0,35$	
	Cu	$32,5 \pm 0,4$	$31,5 \pm 0,5$	-3,11

Se os valores obtidos por AAS forem tomados como os valores de referência, observa-se que aqueles obtidos por ASV apresentam desvios muito

pequenos. Isso significa que a separação e pré-concentração dos metais em colunas de PE-PAN, seguida da determinação por ASV, podem ser aplicadas satisfatoriamente em amostras de NP de pequeno volume.

Já a separação e pré-concentração dos metais em amostras de NP de grande volume em colunas de PE-PAN apresentou porcentagens de recuperação inferiores a 40% o que indica que o procedimento não é eficiente para estas amostras. Provavelmente, isso ocorre devido a maior complexidade da matriz da amostra, que contém aminoácidos em sua composição.



**Figura 6:** Voltamograma de uma amostra de NP de grande volume sem pré-tratamento.

Como se observa na Figura 6, na medida voltamétrica direta (sem pré-tratamento) das amostras de NP de grande volume, a corrente resultante fica acima de 400 nA. Esta corrente deve-se à adsorção dos compostos orgânicos na

superfície do eletrodo e, deste modo, pelo aumento da corrente capacitiva impede a determinação dos metais.

Desta maneira, a aplicação de alguns pré-tratamentos foi investigada. A diluição da amostra visando acelerar os pré-tratamentos sem afetar a sensibilidade requerida para as medidas, também foi testada.

#### **4.2.2 Digestão por 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 com peróxido de hidrogênio. Torna-se possível oxidar completamente a maioria das amostras, deixando os elementos a serem determinados 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.

Os ácidos com propriedades oxidantes usados na decomposição por via úmida de amostras orgânicas ou biológicas são o nítrico, o sulfúrico (o ácido concentrado aquecido é que apresenta propriedades oxidantes) e o perclórico. Estes ácidos podem ser usados individualmente ou combinados. São também comuns as combinações de  $\text{HNO}_3$  ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$  com  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

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

O ácido nítrico é um ácido forte e um agente oxidante bastante poderoso, com concentração de 65% e ponto de ebulição de aproximadamente 121 °C.

Este baixo ponto de ebulição limita sua eficiência oxidativa porque temperaturas mais elevadas são necessárias para aumentar a eficiência nas quebras das ligações nos compostos orgânicos. A eficiência da digestão pode ser aumentada pela adição de ácido sulfúrico, pois este possui o ponto de ebulição mais alto (339 °C) dentre os ácidos minerais concentrados mais comuns.

O ácido sulfúrico é um ácido forte e, quando aquecido, é capaz de oxidar um grande número de metais. Possui também propriedade desidratante.

Por este motivo, as misturas de ácido nítrico e sulfúrico foram escolhidas para avaliar as melhores condições de pré-tratamento das amostras de NP com a finalidade de torná-las adequadas para a medida voltamétrica.

No entanto, o emprego de elevados volumes de ácidos apresenta algumas desvantagens, principalmente para a determinação de pequenas concentrações de contaminantes como cádmio e chumbo nas amostras.

Os procedimentos 1 e 2 diferem pelo volume de ácido utilizado. No procedimento 1 empregou-se 10 mL da mistura nítrico-sulfúrico (3:1) e no procedimento 2 empregou-se 2 mL da mistura nítrico-sulfúrico (1:1), ambos utilizam 1 mL de amostra. A solução resultante destes procedimentos tem um pH próximo a zero. Neste meio extremamente ácido, as medidas voltamétricas não são bem definidas. Por este motivo, foi necessária a diluição (100 µL de amostra à célula voltamétrica contendo 10 mL de solução tampão de acetato) ou neutralização da solução da amostra, com solução de hidróxido de sódio 25%, para uma melhor visualização dos sinais voltamétricos dos metais.

Contudo, os valores de recuperação encontrados foram baixos (< 50%), possivelmente devido à formação de subprodutos que interagiram com os metais ou devido à digestão parcial da amostra.

Ácidos minerais como os ácidos nítrico e sulfúrico apresentam sempre uma contaminação por metais pesados em níveis razoáveis. Na própria descrição dos produtos pelo fabricante, a contaminação é identificada. No caso dos produtos Merck, por exemplo, a contaminação dos ácidos nítrico e sulfúrico por metais pesados situa-se na faixa de 0,0001% (cerca 1 mg L<sup>-1</sup>) para produtos “p.a.” e na faixa de 0,001 mg L<sup>-1</sup> para produtos “suprapur”. Para o hidróxido de sódio a contaminação por metais pesados situa-se na faixa de 0,0005% (cerca de 5 mg L<sup>-1</sup>) e 0,0002% (cerca de 2 mg L<sup>-1</sup>) para produtos “p.a” e “puríssimo”, respectivamente. Comparando estes valores com a faixa de concentração investigada para cádmio e chumbo, neste trabalho, observa-se que a contribuição dos reagentes para o branco elevado é importante. Este aspecto é uma desvantagem do pré-tratamento de digestão por via úmida, e já foi observado em outros trabalhos [58, 63], onde procedimentos de purificação dos reagentes são necessários para diminuir a contribuição do branco no resultado final. A contribuição dos reagentes utilizados, neste trabalho, para a digestão das amostras por via úmida, foi determinada por ASV e está expressa na Tabela 8.

**Tabela 8:** Contaminação dos brancos, medida por ASV.

Procedimento	Zn (µg L <sup>-1</sup> )	Cd (µg L <sup>-1</sup> )	Pb (µg L <sup>-1</sup> )	Cu (µg L <sup>-1</sup> )
Via úmida 1	164,2	0,064	10,92	1,185
Via úmida 2	46,69	0,038	8,81	n.d.

n.d.= não detectado

O comportamento voltamétrico de cádmio e chumbo na ausência da amostra de NP e utilizando as condições voltamétricas já descritas, mostra

correntes de pico da ordem de 5 a 10 nA para concentrações de 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cádmio e chumbo na célula voltamétrica. Os valores teóricos de branco encontrados com as descrições no rótulo do fabricante, seriam para o Procedimento 1 de 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de metais pesados, já para o Procedimento 2 o valor seria de 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de metais pesados. Estes valores estão de acordo com aqueles obtidos, visto que, deve-se considerar a contribuição da solução de NaOH 25% empregada na neutralização. Assim, a aplicação deste pré-tratamento praticamente impede uma determinação voltamétrica efetiva de metais pesados contaminantes em concentrações mais baixas do que 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### **4.2.3 Irradiação com microondas**

Uma fonte de energia para procedimentos de digestão por via úmida é a irradiação por MW [112, 65], uma vez que o aquecimento da mistura de digestão por MW é mais eficiente que os procedimentos convencionais de aquecimento [113, 114].

Foram testados os ácidos perclórico e tricloroacético nos Procedimentos 3 e 4. Estes ácidos foram utilizados com sucesso na desproteíntização de soro sanguíneo com radiação por MW, para a determinação de metais, como alumínio, níquel, manganês, zinco, cobre, e também para a determinação de etilenotiuréia [103, 115, 116].

A utilização do Programa 1 de radiação por MW associado com ácidos, não alcançou a eficiência necessária, tanto com o Procedimento 3 quanto com o Procedimento 4. Durante as determinações voltamétricas das amostras submetidas a estes procedimentos, ocorreu a formação de espuma, resultando altas correntes de linha base ( $> 200$  nA) indicando a destruição incompleta dos

compostos orgânicos [65]. Este alto valor de corrente de linha base, possivelmente devido à adsorção destes subprodutos no eletrodo de Hg, encobre o sinal voltamétrico do cádmio e do chumbo adicionados, que teria um valor de corrente de 5 a 10 nA.

Os procedimentos 3 e 4 diferem na concentração da amostra. Enquanto no procedimento 3 utilizou-se 9 mL de amostra (dos 10 mL de volume total), no procedimento 4 utilizou-se 1 mL de amostra.

A concentração da amostra pode influenciar a eficiência do pré-tratamento, ou seja, concentrações diferentes da mesma amostra submetidas às mesmas condições, podem não apresentar a mesma eficiência. No caso de amostras de NP, por exemplo, espera-se que em amostras diluídas a digestão seja mais eficiente porque o conteúdo orgânico é menor. Entretanto, a diluição não produziu o efeito esperado, pois as determinações voltamétricas continuaram apresentando altos valores de corrente ( $> 100$  nA). Talvez, o curto tempo de aplicação da radiação juntamente com o aquecimento gradual (aumento da potência) não sejam os mais adequados para a digestão dos compostos orgânicos presentes na amostra.

Então, testou-se um outro programa de MW ( $P_2$ ) utilizando a potência máxima (749 W) do forno e associado a um tempo mais longo de irradiação (10 minutos) para a destruição do conteúdo orgânico das amostras. Adotou-se ainda, volumes menores da mistura ácida para minimizar a contaminação introduzida pelos reagentes, geralmente em concentração superior a existente nas amostras, especialmente para o chumbo.

Neste procedimento (5), as amostras foram adicionadas gradualmente, em pequenas porções, ao recipiente de irradiação.

A adição gradual da amostra a um pequeno volume de mistura ácida concentrada aquecida por MW mostrou ser mais eficiente na decomposição da

amostra, uma vez que cada alíquota de amostra é digerida parcialmente antes de adicionar a próxima [65]. Além disso, foram obtidos baixos valores de branco, boa sensibilidade, bem como baixos fatores de diluição da amostra digerida foram necessários.

A Tabela 9 mostra a determinação dos metais por ASV após a digestão das amostras aplicando o procedimento 5.

**Tabela 9:** Metais medidos por ASV, após a digestão com irradiação de MW, ( $n = 3$ ).

Amostra <sup>a</sup>	Zn ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cd ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
A	133 $\pm$ 9,3	0,34 $\pm$ 2,1	5,08 $\pm$ 2,7	n.d.
B	91,6 $\pm$ 3,2	4,44 $\pm$ 3,6	16,7 $\pm$ 4,9	7,09 $\pm$ 6,2
C	n.d.	0,68 $\pm$ 2,2	4,39 $\pm$ 5,6	40,8 $\pm$ 5,3

<sup>a</sup> Amostras de NP cuja composição está descrita no Apêndice A.

A fim de comparar a eficiência do procedimento 5, estas mesmas amostras de NP foram fortificadas com zinco, cádmio, chumbo e cobre e submetidas ao pré-tratamento com irradiação de MW. Os valores de recuperação descritos na Tabela 10 para os metais adicionados às soluções de NP mostram a eficiência deste procedimento de digestão.

**Tabela 10:** Determinação dos metais adicionados às amostras ( $n = 3$ ), após a digestão com irradiação de MW.

Amostra	metal	adicionado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	encontrado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	recuperação (%)
Água	Zn	100	95,9	95,9
	Cd	1,00	0,98	98,3
	Pb	5,00	5,13	103
	Cu	25,0	23,3	93,0
A	Zn	100	184	78,5
	Cd	1,00	1,29	96,3
	Pb	5,00	10,5	104
	Cu	25,0	21,9	87,6
B	Zn	100	170	89,1
	Cd	1,00	5,58	103
	Pb	5,00	21,4	98,6
	Cu	25,0	29,1	90,7
C	Zn	100	108	108
	Cd	1,00	1,57	93,4
	Pb	5,00	9,33	99,4
	Cu	25,0	51,6	78,4

A combinação do programa de MW (P<sub>2</sub>), potência máxima por um tempo maior, com a adição gradual da amostra a um pequeno volume de mistura ácida concentrada aquecida permitiu a determinação voltamétrica dos metais.

A observação dos valores expressos na Tabela 10 mostra que as recuperações para cádmio e chumbo (93,3 a 104%) foram sempre melhores do que para zinco e cobre (78,4 a 108%).

#### **4.2.4 Irradiação com luz Ultravioleta**

A fotodecomposição UV de amostras ocorre através da reação de radicais livres. Não é a irradiação UV diretamente, mas os radicais  $\bullet\text{OH}$  formados durante a irradiação que atacam as moléculas orgânicas. Quanto maior o número de radicais  $\bullet\text{OH}$  formados por unidade de tempo, mais rápido o processo de irradiação. Os radicais  $\bullet\text{OH}$  são gerados do peróxido de hidrogênio ou da água pela ação de radiação de UV [69, 76, 77]. De modo a aumentar a concentração de radicais de  $\bullet\text{OH}$ , podem ser usadas adições repetitivas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante o processo de irradiação. Além disso, a degradação indireta de substâncias orgânicas por um mecanismo radicalar é muito acelerada se é realizado a 90 °C. Apenas nestas temperaturas forma-se uma concentração suficientemente alta de radicais  $\bullet\text{OH}$  no meio [111].

O uso da irradiação UV foi investigado como uma alternativa à irradiação de MW no pré-tratamento de amostras de NP. Os parâmetros experimentais avaliados na verificação da eficiência do método foram a diluição da amostra, tempo de irradiação e adição de ácidos e peróxido de hidrogênio.

É importante, salientar que todas as condições investigadas foram para um volume final de 10 mL e a temperatura das amostras foi mantida a  $86 \pm 3$  °C durante o processo de irradiação.

#### **4.2.4.1 Efeito da concentração da amostra e do tempo de irradiação UV**

A digestão completa de amostras concentradas por irradiação UV não foi atingida mesmo com a adição de ácidos e/ou  $H_2O_2$ . A evidência experimental deste fato foi a formação de uma grande quantidade de espuma, durante o borbulhamento de  $N_2$  antes da medida voltamétrica das amostras, impedindo a execução da análise. Segundo Golimowski [76], a formação de espuma é um indício da presença de compostos orgânicos.

A concentração da amostra pode influenciar a eficiência do pré-tratamento por radiação UV, pois concentrações diferentes da mesma amostra em condições iguais, não terão a mesma eficiência [63].

A determinação voltamétrica nas amostras diluídas na proporção 1:1 e 1:5 não pôde ser realizada, porque a linha base obtida durante a medida foi maior que 100 nA, impedindo assim a determinação das concentrações dos metais utilizadas neste trabalho. A presença de uma quantidade maior de compostos orgânicos, possivelmente levou à digestão parcial ou formação de subprodutos que possivelmente adsorveram-se no mercúrio, elevando a linha base, e impedindo a determinação voltamétrica do cádmio e do chumbo [61].

Já uma diluição da amostra de 1:10 em água permitiu a determinação dos metais por ASV.

O esperado seria que com o aumento da diluição da amostra houvesse uma melhora nos resultados de recuperação, devido a menor quantidade de conteúdo orgânico. Porém, os resultados obtidos, para a menor diluição (1:20), foram mais baixos que para a diluição 1:10, possivelmente devido a concentração dos metais, cádmio e chumbo, na diluição 1:20 serem baixas ( $1\mu\text{g L}^{-1}$ ) para determinação voltamétrica.

A influência do tempo é um parâmetro importante na digestão por radiação UV, pois dependendo da matriz da amostra, esta requer tempos maiores de irradiação para sua completa degradação [63, 77].

A irradiação por luz UV por 2, 4, 6, 7 e 8 horas e a diluição 1:10 não foi suficiente para decompor totalmente as amostras de NP. Embora a determinação dos metais por ASV fosse possível de ser executada, os resultados obtidos para as replicatas das medidas foram muito discrepantes, desvios  $\geq 40\%$  para cádmio e chumbo. Além disso, em algumas amostras a determinação de zinco e cobre não pôde ser realizada, devido ao alto valor de corrente ( $\mu\text{A}$ ) nos potenciais de determinação destes metais. Estes resultados indicam a digestão incompleta das amostras ou formação de subprodutos que interferem na análise voltamétrica. Observou-se ainda, que os valores de recuperação dos metais foram baixos, variando de 40 a 80% para a maioria das amostras.

Aumentando o tempo de irradiação para 10 e 12 horas, a determinação por ASV obteve uma melhora nos resultados. No entanto, os desvios das replicatas das medidas foram próximos a 30% para zinco e cobre. Estes resultados evidenciam a digestão incompleta das amostras ou a presença de subprodutos que interferem nas medidas. Com estes resultados, constatou-se que pouco resolve simplesmente aumentar o tempo de irradiação. Outros fatores, como adição de oxidantes pode representar uma alternativa para resolver o problema.

#### 4.2.4.2 Influência da adição de ácidos e peróxido

A adição de peróxido de hidrogênio aumenta a eficiência da digestão por radiação UV devido à formação de radicais  $\bullet\text{OH}$  em maior concentração e sua subsequente reação de degradação com a matéria orgânica. Além disso, a acidificação (pH 2) de amostras contendo  $\text{H}_2\text{O}_2$  também melhora a eficiência, pois dissocia os complexos orgânicos lábeis de metais [69, 76, 77].

Assim, testou-se a adição de 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio sem a adição de ácidos, na obtenção de uma melhor eficiência na digestão UV.

Os valores de recuperação dos metais após a digestão utilizando somente peróxido foram menores que 40% para todas as amostras. Estes valores demonstram a ineficiência da decomposição com o uso de peróxido sem a adição de ácidos.

Então, aumentou-se a quantidade de peróxido adicionado para 150  $\mu\text{L}$  e acidificou-se as amostras, a fim de aumentar ou acelerar a decomposição das mesmas.

Observou-se um aumento nos valores de recuperação. Porém, estes ainda foram baixos (< 50%). Golimowski e Golimowiska [76] fazem referência a um estudo onde o aumento na concentração de peróxido não aumentou a eficiência da digestão por radiação UV em amostra de água.

No que diz respeito ao tipo de ácido empregado, amostras de NP acidificadas com  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HClO}_4$  mostraram recuperações menores que 50% mesmo após a adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o que indica digestão incompleta. Utilizando uma única adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no início do processo de irradiação, somente o cádmio pode ser determinado com taxas de recuperação acima de 85%, para um tempo de irradiação de 8 horas com diluição 1:10. Por outro lado, as

recuperações para chumbo e zinco não melhoraram com a adição de  $H_2O_2$ . Mesmo com adições sucessivas de  $H_2O_2$  às amostras a cada 60 minutos de irradiação, chumbo e zinco apresentaram valores de recuperação abaixo de 70%.

No entanto, utilizando  $H_2SO_4$  em conjunto com  $H_2O_2$  observou-se um aumento nos valores de recuperação com teores superiores a 75%. Essa melhora pode ser explicada pela ação do ácido permonossulfúrico que contribui para a degradação rápida dos compostos orgânicos na amostra. Oxidações com peróxido de hidrogênio em misturas ácidas contendo ácido sulfúrico são baseadas também na produção *in situ* de ácido permonossulfúrico [60].

#### **4.2.4.3 Digestão UV sob as condições otimizadas**

A investigação sobre o efeito dos fatores descritos anteriormente no pré-tratamento com irradiação UV, possibilitou a determinação das condições ótimas para a digestão de amostras de NP. Destes resultados, a irradiação UV de amostras diluídas (1:10) durante 10 horas com adição de 50  $\mu$ L de  $H_2SO_4$  concentrado e 50  $\mu$ L de  $H_2O_2$  30% (v/v) no início do processo, seguido por adições consecutivas da mesma quantidade de  $H_2O_2$  a cada 60 minutos, foi escolhida como a melhor condição para a digestão completa da amostra.

As amostras submetidas à digestão UV utilizando as condições descritas acima, apresentaram baixos valores de branco (Tabela 13) e boa reprodutibilidade com desvios (% RSD) entre 0,1 e 9,3%. A Tabela 11 mostra a determinação dos metais por ASV após a digestão das amostras aplicando a digestão UV otimizada.

**Tabela 11:** Determinação dos metais por ASV, após a digestão com irradiação UV, ( $n = 3$ ).

Amostra <sup>a</sup>	Zn ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cd ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
A	131,2 $\pm$ 1,5	0,35 $\pm$ 0,68	4,99 $\pm$ 1,8	2,96 $\pm$ 9,3
B	88,9 $\pm$ 3,9	4,37 $\pm$ 1,5	16,8 $\pm$ 2,7	6,66 $\pm$ 3,1
C	1,39 $\pm$ 0,12	0,71 $\pm$ 0,57	4,39 $\pm$ 2,3	39,0 $\pm$ 4,8

<sup>a</sup> Amostras de NP cuja composição está descrita no Apêndice A.

Para avaliar a eficiência do pré-tratamento com irradiação UV, estas mesmas amostras de NP foram fortificadas com zinco, cádmio, chumbo e cobre e submetidas a ele. A Tabela 12 mostra a determinação dos metais por ASV após a digestão com irradiação UV.

**Tabela 12:** Determinação dos metais em amostras fortificadas, após a digestão com irradiação de UV.

Amostra	metal	adicionado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	encontrado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	recuperação (%)
Água	Zn	100	94,3	94,3
	Cd	1,00	0,99	99,4
	Pb	5,00	4,82	96,5
	Cu	25,0	26,6	106
A	Zn	100	208	90,2
	Cd	1,00	1,26	93,3
	Pb	5,00	9,81	98,2
	Cu	25,0	27,2	97,3
B	Zn	100	205	108
	Cd	1,00	5,22	97,2
	Pb	5,00	21,5	98,6
	Cu	25,0	29,9	94,4
C	Zn	100	96,5	95,2
	Cd	1,00	1,71	100
	Pb	5,00	9,48	101
	Cu	25,0	68,5	107

( $n = 3$ )

As recuperações exibidas na Tabela 12 para os metais adicionados mostram a eficiência da digestão UV para eliminar a interferência da matriz assim como liberar os metais para a determinação por ASV.

Observou-se que as recuperações obtidas aplicando-se o pré-tratamento com UV (90,2 a 108%) foram melhores do que aquelas obtidas pelo pré-tratamento com MW (Tabela 10), inclusive para o zinco e o cobre.

### **4.3 Comparação entre os pré-tratamentos**

O pré-tratamento de digestão por via úmida e irradiação por MW são chamados de métodos térmicos, pois o que difere é o modo de aquecimento da amostra para a ruptura das ligações químicas dos substratos a serem decompostos. Ambos os métodos utilizam ácidos ou misturas de ácidos oxidantes para auxiliar na decomposição da amostra, porém o aquecimento do MW é mais rápido e efetivo [49, 59, 65].

O método de digestão por via úmida mostrou-se pouco adequado visto que utiliza volumes elevados de 10 e 2 mL da mistura ácida nítrico-sulfúrico nos procedimentos 1 e 2, respectivamente, ou apresentando desvantagens como altos valores de branco provenientes da contaminação dos ácidos e também a dificuldade da determinação voltamétrica pela antecipação da descarga de hidrogênio no Hg do eletrodo, devido ao meio extremamente ácido [49, 60, 65].

Na digestão por irradiação por MW, utilizou-se volumes menores de ácidos. Porém, a determinação voltamétrica, empregando os procedimentos 3 e 4 do programa 1, não foi possível devido aos altos valores obtidos de correntes da linha base que encobriram o sinal voltamétrico dos metais adicionados às amostras. A elevação da linha base pode estar associada à adsorção de

compostos, provenientes da digestão parcial, no eletrodo de Hg. A ineficiência destes procedimentos pode estar em parte, relacionada ao programa, pois este aplica todas as potências do aparelho de MW em curtos intervalos de tempos e é possível que o tempo de aquecimento seja insuficiente para decompor as amostras. O programa 2 da digestão por MW utilizou um volume menor (75 µL) da mistura dos ácidos nítrico e sulfúrico concentrados. Os resultados obtidos foram melhores que os resultados da digestão por via úmida e por irradiação por MW utilizando o programa 1. A melhora nos resultados pode ser justificada pelo uso da potência máxima do aparelho de MW e maior tempo de aquecimento, bem como o volume menor de ácidos utilizados que não acarretou em altos valores de branco.

Na digestão por radiação UV, o uso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de luz ultravioleta promove a formação de radicais  $\bullet$ OH que possuem um alto potencial de oxidação (+2,8 V) e reagem com os compostos orgânicos da amostra através de reações radicalares, decompondo-os [48, 76, 77].

Os melhores resultados foram aqueles cujos pré-tratamentos utilizaram irradiação de MW ou irradiação UV. A utilização destes pré-tratamentos permitiu a decomposição das amostras de NP e a determinação de zinco, cádmio, chumbo e cobre por ASV com baixos valores de branco e recuperações acima de 78,5%.

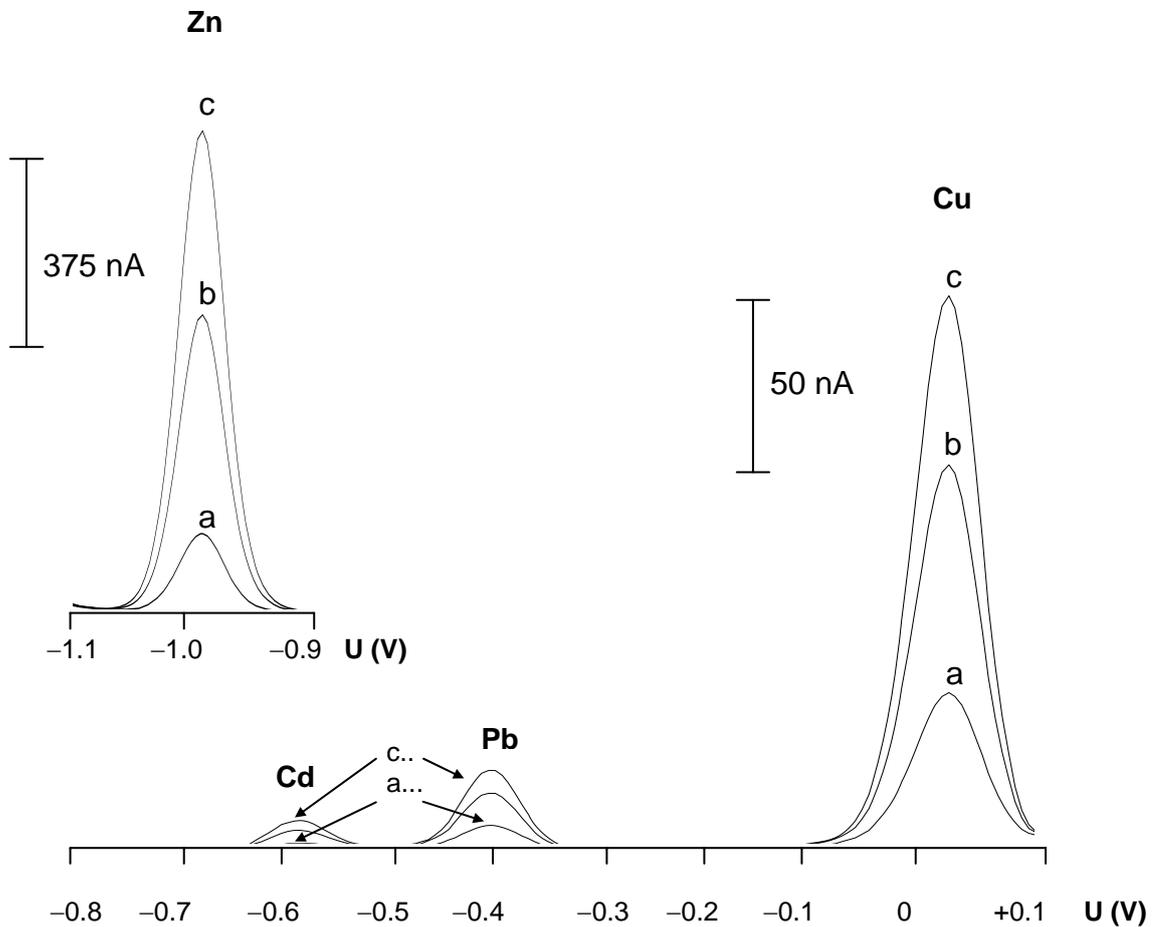
Para avaliar a contribuição dos reagentes na contaminação das amostras, água (branco) foi submetida aos mesmos procedimentos que as amostras de NP. A Tabela 13 apresenta um comparativo da contaminação introduzida só pelos reagentes utilizados nos pré-tratamentos estudados.

**Tabela 13:** Comparação entre os valores de branco para os diferentes pré-tratamentos estudados.

Pré-tratamento	Zn ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cd ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Via úmida 1	164	0,06	10,9	1,18
Via úmida 2	46,7	0,04	8,81	n.d.
Irradiação MW	0,43	0,02	0,06	0,90
Irradiação UV	0,88	0,07	0,16	0,60

Como se observa, a contaminação dos pré-tratamentos de digestão por via úmida é muito maior que aquelas apresentadas pelos pré-tratamentos com irradiação MW e UV.

A Figura 7 mostra um voltamograma típico para a determinação simultânea de zinco, cádmio, chumbo e cobre por ASV em amostras de NP após digestão UV sob as condições otimizadas. Diferentemente do voltamograma apresentado na Figura 6, aqui os sinais são bem definidos e a corrente da linha base é mínima em toda a faixa de potenciais analisada.



**Figura 7:** Determinação de Zn, Cd, Pb e Cu por ASV em amostra de NP após irradiação UV sob as condições otimizadas: (a) amostra; (b) amostra +  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  Zn,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  Cd,  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  Pb e  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  Cu; (c) amostra +  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  Zn,  $2 \mu\text{g L}^{-1}$  Cd,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  Pb e  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  Cu.

Voltamogramas similares também foram obtidos para amostras de NP digeridas por MW sob condições otimizadas descritas no item 4.4.2

A Tabela 14 resume as condições otimizadas para a digestão de amostras de NP utilizando os procedimentos de irradiação por MW e UV.

**Tabela 14:** Comparação das condições otimizadas para a digestão de amostras de NP por irradiação de MW e UV.

Pré-tratamento	diluição	ácido	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	tempo/ n° amostra
MW*	1:10	25µL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> / 50µL HNO <sub>3</sub>	--	~0,8 h/ 1
UV	1:10	50µL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	50µL/ h	10 h/12

\*forno doméstico.

Como pode ser visto o consumo de ácido em ambos os procedimentos foi mínimo em relação àqueles da digestão por via úmida. Além disso, na irradiação por MW não foi preciso adicionar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Embora o procedimento de digestão por MW seja mais rápido que o UV, o dispositivo de irradiação UV empregado neste trabalho permitiu a manipulação simultânea de 12 amostras. Se as mesmas 12 amostras tivessem sido digeridas pelo procedimento de irradiação por MW, seria necessário aproximadamente 9 horas. Isso porque, neste procedimento utilizou-se um forno de MW doméstico, exigindo a manipulação individual das amostras. Além disso, junto ao tempo de irradiação (10 minutos) deve ser somado o tempo de resfriamento da amostra (cerca de 23 segundos) após cada 20 segundos de irradiação.

#### 4.4 Aplicação

Como os procedimentos de digestão envolvendo a irradiação por MW e UV apresentaram os melhores resultados, estes foram aplicados em diferentes amostras de NP. Após a digestão, fez-se a determinação voltamétrica dos metais.

Os resultados na Tabela 15 mostram a concentração dos metais, determinada por ASV, em sete amostras comerciais diferentes.

**Tabela 15:** Determinação dos metais por ASV em 7 amostras comerciais de NP após a digestão com irradiação por MW ou irradiação UV.

Irradiação	Amostra <sup>a</sup>	Zn ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cd ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cu ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
MW	B	91,6	4,44	16,7	7,09
UV	B	88,9	4,37	16,8	6,66
MW	C	n.d.	0,68	4,39	40,8
UV	C	1,39	0,71	4,39	39,0
MW	D	243	0,94	5,40	9,28
UV	D	260	0,99	6,88	10,0
MW	E	36,0	2,40	3,88	15,8
UV	E	36,8	2,25	4,78	10,8
MW	F	17,2	0,95	0,53	3,50
UV	F	16,9	0,98	0,76	5,96
MW	G	20,2	1,32	0,69	1,35
UV	G	23,1	1,24	0,64	0,95
MW	H	234	0,84	10,1	17,5
UV	H	231	0,85	11,0	20,0

<sup>a</sup> Amostras de NP cuja composição está descrita no Apêndice A; RSD: 0,5- 10%;(n=3).

Não foram observadas diferenças significativas, para nível de confiança de 95% (teste  $-t$  de Student), entre as concentrações de cádmio e chumbo para uma mesma amostra digerida por métodos diferentes. Porém, as concentrações de zinco e cobre foram sistematicamente maiores para as amostras submetidas à digestão com uso de irradiação UV do que a que emprega irradiação por MW.

A partir dos resultados descritos na Tabela 15, foi possível comprovar a contaminação das soluções de NP por zinco, cádmio, chumbo e cobre com níveis elevados, em certas amostras. Considerando que em muitos casos a administração destas soluções é intravenosa, estes níveis representam sérios riscos aos pacientes.

As Figuras dos voltamogramas resultantes destas determinações não foram mostradas porque seu aspecto ou formato é o mesmo apresentado na Figura 7. Adicionalmente, é oportuno esclarecer que, embora cobre e zinco não façam parte do objetivo proposto, eles foram incluídos nesta primeira etapa. Este fato justifica-se pelas seguintes considerações. Primeiramente, devido às interações entre metais tóxicos (como cádmio e chumbo) e metais essenciais (como zinco e cobre) com propriedades físicas e químicas semelhantes. Por exemplo, há muitas similaridades entre cádmio e zinco. Cádmio é comumente encontrado em minérios de zinco, que são a principal fonte comercial de cádmio. Portanto, a presença de uma elevada concentração de zinco na amostra, inevitavelmente, implica numa contaminação com cádmio. Segundo, a determinação voltamétrica de cobre e zinco não implica em nenhum procedimento extra e é uma informação a mais sobre a qualidade das amostras.

Com estes resultados, encerrou-se a primeira etapa deste trabalho, visto que os objetivos propostos foram alcançados: verificar a ocorrência da contaminação por zinco, cádmio, chumbo e cobre em formulações comerciais de NP e estudar a utilização de um pré-tratamento da amostra que, posteriormente, permita a aplicação da voltametria na determinação destes contaminantes.

#### 4.5 Interação metal-aminoácido

Cádmio e chumbo são conhecidos por serem agentes tóxicos quando se acumulam no organismo. Os resultados obtidos na primeira parte deste trabalho evidenciam que estes metais se encontram em praticamente todos os produtos para NP, inclusive nas formulações de aminoácidos. Estes resultados confirmam relatos da literatura [2-4]. Os aminoácidos podem ser classificados como ligantes de baixo peso molecular porque possuem no mínimo um grupo amina e um grupo carboxil e são encontradas na literatura várias constantes de estabilidade de complexos de aminoácidos com metais [25].

Por outro lado, o conhecimento do conteúdo total do metal é útil, mas insuficiente para a compreensão do metabolismo, a elucidação dos mecanismos de toxicidade e o entendimento do modo de distribuição do elemento no organismo. Em soluções de NP, os aminoácidos estão presentes em concentrações na ordem de  $\text{mg L}^{-1}$  e, devido a sua estrutura, são hábeis em atuar como ligantes para íons metálicos. Assim, o transporte destes íons no organismo pode ter a contribuição deles.

O desenvolvimento de anormalidades histopatológicas pelos pacientes sob o tratamento NP [99-101] pode estar relacionado à habilidade dos aminoácidos em complexar espécies metálicas que desta forma, se distribuem e se acumulam nos órgãos. Assim, a segunda parte do trabalho estudou a interação de cádmio e chumbo com alguns dos aminoácidos que compõem as soluções de NP.

A escolha dos aminoácidos envolvidos neste estudo baseou-se nos seguintes critérios: primeiro, os aminoácidos que estão em maior quantidade nas formulações de NP; segundo, aqueles que apresentam constantes de formação de complexos, estabelecidas na literatura, com cádmio e chumbo; terceiro, aqueles que apresentam as maiores constantes de formação de complexos com os metais

estudados. Estes critérios foram adotados a fim de restringir um pouco o escopo do estudo, visto que este permite uma infinidade de investigações.

Dessa forma, alanina, glicina, serina, metionina, treonina, histidina, fenilalanina, ácido glutâmico e ácido aspártico foram os aminoácidos escolhidos para investigar interações com cádmio e chumbo.

#### **4.6 Determinação dos aminoácidos por cromatografia líquida**

Dentre as técnicas disponíveis para a determinação simultânea dos aminoácidos, como a cromatografia e a eletroforese capilar, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a que oferece o maior número de opções instrumentais [117]. Diferentes fases estacionárias como fase reversa e troca iônica podem ser empregadas e misturas complexas de aminoácidos podem ser separadas, satisfatoriamente, em torno de uma hora.

A HPLC permite também o uso de diferentes sistemas de detecção. Dependendo dos aminoácidos, detectores UV e eletroquímicos podem ser usados diretamente. Ainda, praticamente todos os aminoácidos podem ser determinados simultaneamente, empregando reagentes de derivação como a ninidrina com detecção fotométrica ou OPA e dansil com detecção fluorimétrica [118].

Neste trabalho, foi empregado um sistema cromatográfico baseado na separação por troca-iônica e detecção fluorimétrica após a derivação com OPA para o estudo da interação da alanina, glicina, serina, metionina, treonina, histidina, fenilalanina, ácido glutâmico e ácido aspártico com cádmio e chumbo. O objetivo foi avaliar a interação metal-aminoácido, através da redução dos sinais cromatográficos dos aminoácidos na presença dos metais.

#### 4.6.1 Sistema cromatográfico

O sistema cromatográfico mostrou-se eficiente na separação e determinação simultânea dos aminoácidos alanina, glicina, serina, metionina, treonina, histidina, fenilalanina, ácido glutâmico e ácido aspártico.

Uma coluna aniônica (Dionex) Amino Pac PA1 (250x4 mm; 9  $\mu\text{m}$ ) foi usada para a separação dos aminoácidos que estão como espécies aniônicas devido o pH alcalino dos eluentes (pH 10) utilizados como FM. Assim, a separação é efetuada pelas diferenças relativas nas constantes de dissociação dos grupos amino, carboxílico e grupos substituintes (R) da cadeia de cada aminoácido.

Alguns aminoácidos são separados principalmente como ânions monovalentes e outros como ânions divalentes.

Outro modo de separação é baseado na natureza hidrofílica ou hidrofóbica relativa aos grupos R associados aos aminoácidos.

Os aminoácidos mais básicos, como a histidina, geralmente eluem antes de aminoácidos mais ácidos, tais como ácido glutâmico e aspártico. Os aminoácidos hidrofílicos, como a serina, eluem antes da fenilalanina, que é mais hidrofóbica.

O sistema cromatográfico permitiu a detecção dos nove aminoácidos em aproximadamente 30 minutos. Em vista de suas naturezas diferentes a combinação de dois eluentes num gradiente de eluição promoveu a formação de sinais bem resolvidos.

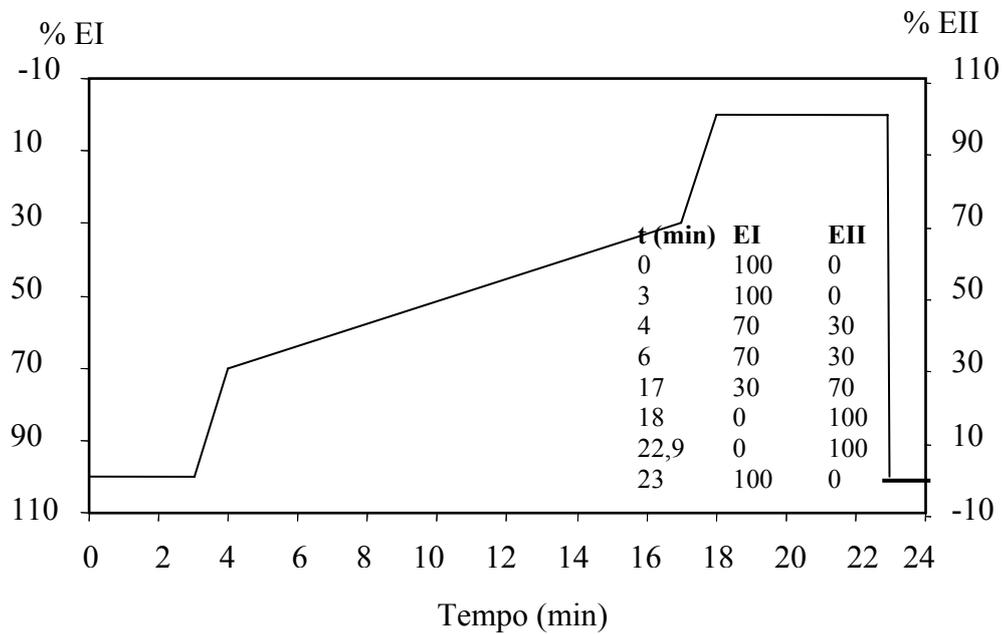
A Tabela 16 mostra os tempos de retenção que cada aminoácido apresentou.

**Tabela 16:** Tempo de retenção dos aminoácidos após separação cromatográfica.

Aminoácidos	tempo de retenção (minutos)
Alanina	5,69
Glicina	6,24
Serina	6,64
Metionina	7,47
Treonina	8,25
Histidina	8,76
Fenilalanina	12,4
Glutâmico	14,8
Aspártico	15,7

A seleção do gradiente de eluição depende dos analitos a serem separados. O programa de eluição por gradiente empregado aqui resultou uma boa relação entre resolução e tempo de corrida para os nove aminoácidos estudados.

A variação na proporção dos eluentes que compõem a FM está descrita na Figura 8.

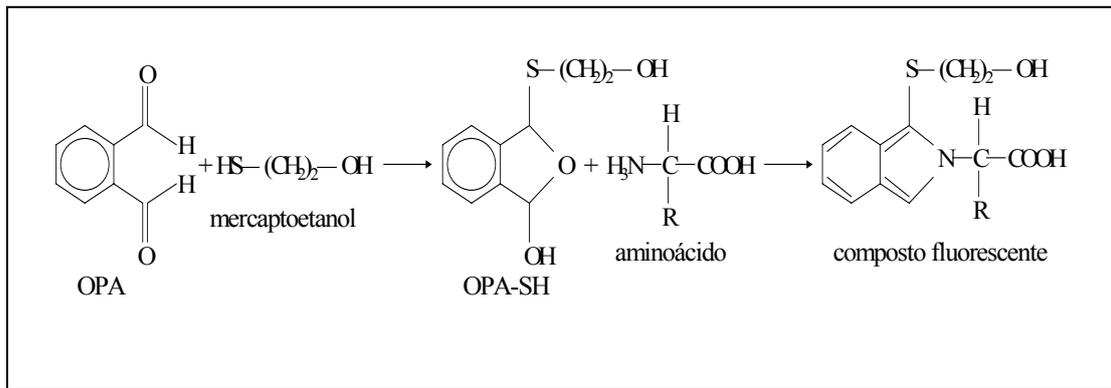


**Figura 8:** Programa de eluição da FM, onde EI:  $0,4 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCH}_3\text{CO}_2/0,001 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$  em 2%  $\text{CH}_3\text{OH}$  e EII:  $0,023 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}/0,007 \text{ mol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ .

#### 4.6.2 Derivação dos aminoácidos

A derivação pós-coluna com OPA-SH pode ser considerada uma das melhores opções para a determinação dos aminoácidos [118] porque o reagente é estável à temperatura ambiente e a reação procede rapidamente dispensando aquecimento. A reação é aproximadamente 10 vezes mais rápida que com ninidrina.

A formação da solução de derivação OPA-SH e a reação de derivação que resulta no composto fluorescente podem ser observadas na Figura 9.



**Figura 9:** Reações da derivação dos aminoácidos.

#### 4.7 Quantificação dos aminoácidos

Para a confecção das curvas analíticas, fizeram-se injeções das soluções padrões contendo a mistura dos nove aminoácidos, nas concentrações de 3,0  $\mu$  mol L<sup>-1</sup>; 6,0  $\mu$  mol L<sup>-1</sup> e 12,0  $\mu$  mol L<sup>-1</sup> respectivamente. Os parâmetros de integração estão descritos no apêndice F.

As concentrações dos aminoácidos e o valor de seus respectivos sinais cromatográficos expressos em unidades de corrente ( $\mu$ A) estão expressos na Tabela 17.

**Tabela 17:** Sinais cromatográficos, em  $\mu\text{A}$ , das soluções padrões dos aminoácidos.

Aminoácido	Concentração ( $\mu\text{ mol L}^{-1}$ )		
	3,0	6,0	12,0
Alanina	79452	163134	326331
Glicina	22950	48990	93450
Serina	22011	46607	97878
Metionina	76159	148856	311559
Treonina	49396	110708	231870
Histidina	18360	39192	74760
Fenilalanina	76158	138470	233866
Aspártico	67902	135137	283993
Glutâmico	103981	204372	387846

As curvas analíticas obtidas com as soluções padrões, apresentaram os parâmetros descritos na Tabela 18.

**Tabela 18:** Parâmetros das curvas analíticas das soluções padrões dos aminoácidos.

Aminoácidos	$y = ax + b$		
	a	b	r
Alanina	27398	-2146	0,9999
Glicina	7773	720	0,9992
Serina	8446	3624	0,9999
Metionina	26293	-5192	0,9996
Treonina	20358	-1218	0,9999
Histidina	6218	576	0,9992
Fenilalanina	17291	2846	0,9997
Aspártico	24124	-6526	0,9997
Glutâmico	31403	12244	0,9997

(a) valores de inclinação da curva, (b) intersecção no eixo y de cada curva analítica e (r) coeficientes de correlação.

A quantificação dos aminoácidos apresentou bons coeficientes de correlação. Os picos cromatográficos foram interpretados pelos seus valores de altura (fornecidos em  $\mu\text{A}$ ), uma vez que a variação dos tempos de retenção dos aminoácidos foi menor que 1,5 % (% RSD para  $n=3$ ).

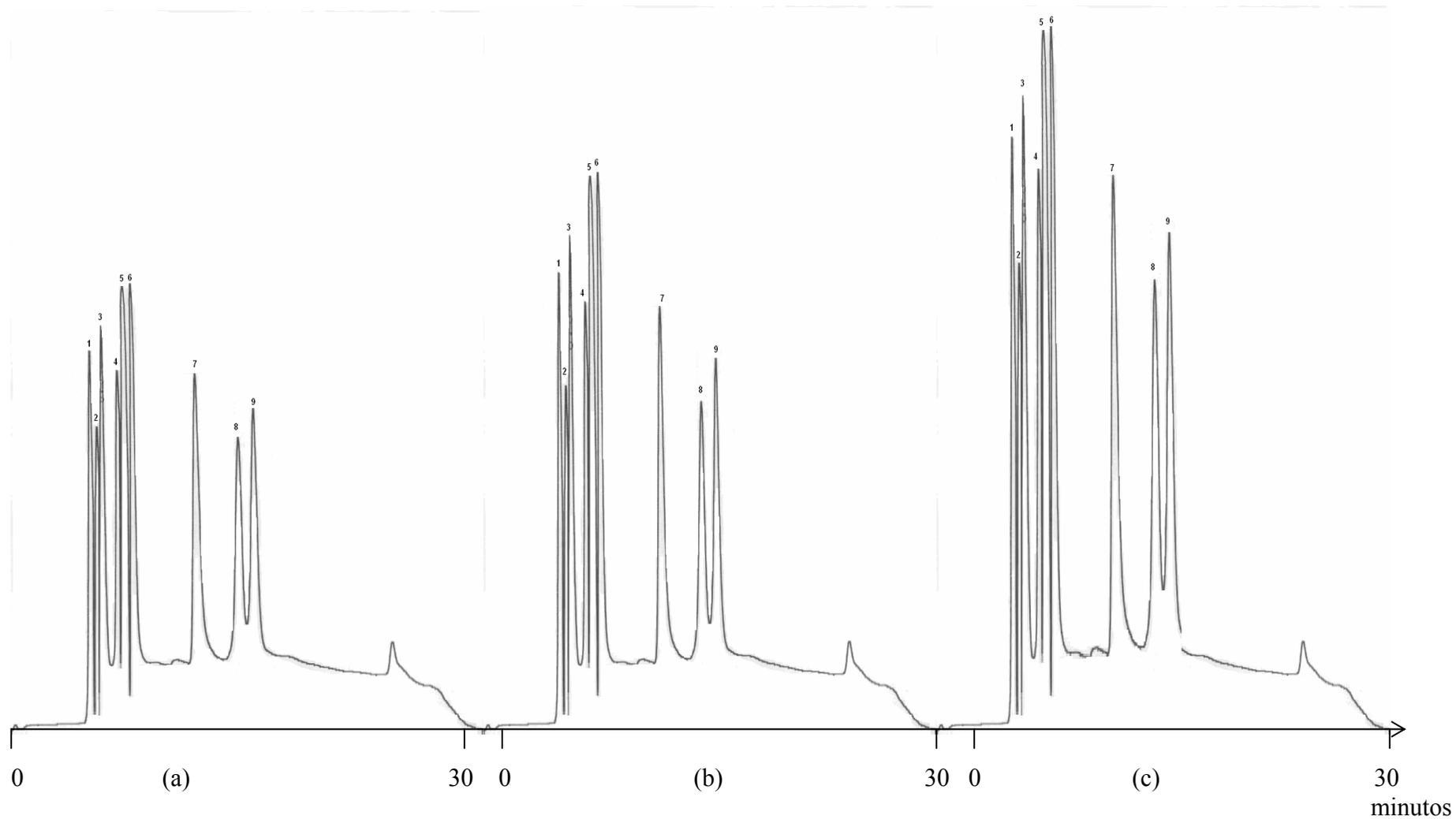
Os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) dos aminoácidos foram calculados a partir do valor da linha base do sistema que foi 4592  $\mu\text{A}$ . Os valores de LD e LQ estão descritos na Tabela 19.

**Tabela 19:** Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) dos aminoácidos.

Aminoácidos	LD ( $\mu \text{ mol L}^{-1}$ )	LQ ( $\mu \text{ mol L}^{-1}$ )
Alanina	$6,10 \times 10^{-5}$	$3,66 \times 10^{-4}$
Glicina	$8,62 \times 10^{-3}$	$5,17 \times 10^{-2}$
Serina	$2,69 \times 10^{-3}$	$1,62 \times 10^{-2}$
Metionina	$2,63 \times 10^{-1}$	1,58
Treonina	$4,97 \times 10^{-1}$	2,98
Histidina	$2,29 \times 10^{-1}$	1,24
Fenilalanina	$3,44 \times 10^{-1}$	2,06
Aspártico	$3,14 \times 10^{-1}$	1,88
Glutâmico	$7,34 \times 10^{-6}$	$4,40 \times 10^{-5}$

Para o limite de detecção considerou-se a concentração calculada pela equação da curva analítica de um pico três vezes maior que a linha base e para o limite de quantificação a concentração predita pela equação da curva analítica, de um pico seis vezes maior que a linha base [119].

A Figura 10 apresenta os cromatogramas (a), (b) e (c) das soluções padrões da mistura dos aminoácidos em concentrações de 3,0; 6,0 e 12,0  $\mu \text{mol L}^{-1}$ , respectivamente, utilizadas na construção das curvas analíticas.



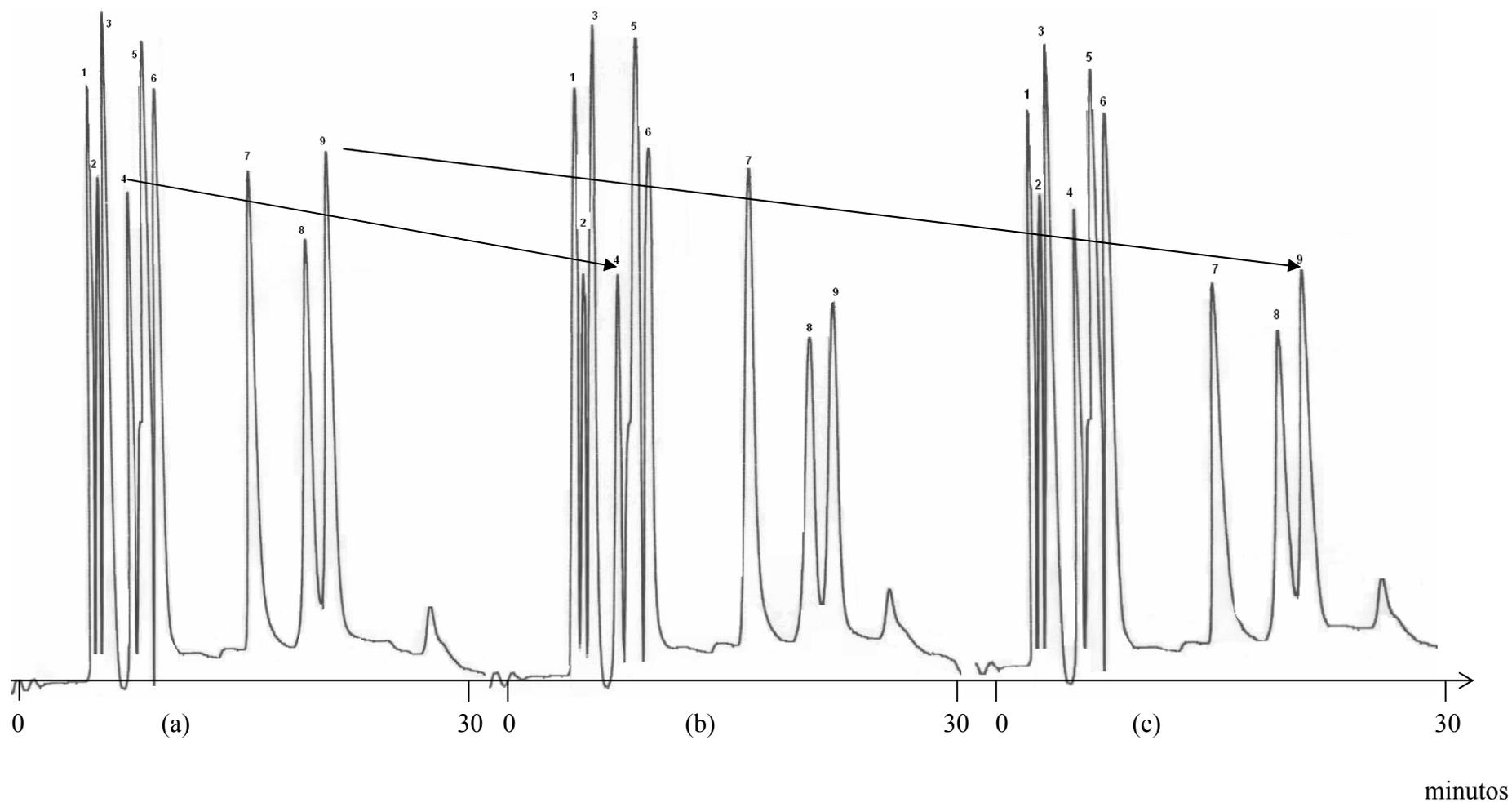
**Figura 10:** Cromatogramas das soluções padrões: (a) 3,0; (b) 6,0 e (c) 12,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; onde (1) ala, (2) gli, (3) ser, (4) met, (5) treo, (6) hist, (7) fen, (8) asp, (9) glu.

#### **4.8 Aplicação do método cromatográfico no estudo da interação de cádmio e chumbo com os aminoácidos**

A determinação cromatográfica com derivação pós-coluna e detecção por fluorescência demonstrou uma redução do sinal dos aminoácidos na presença do metal. A Figura 11 apresenta os cromatogramas de soluções contendo a mistura dos aminoácidos com e sem a presença de metal.

Este comportamento implicou numa investigação sobre a competição entre o metal (cádmio ou chumbo) e o OPA-SH pelas moléculas de aminoácidos.

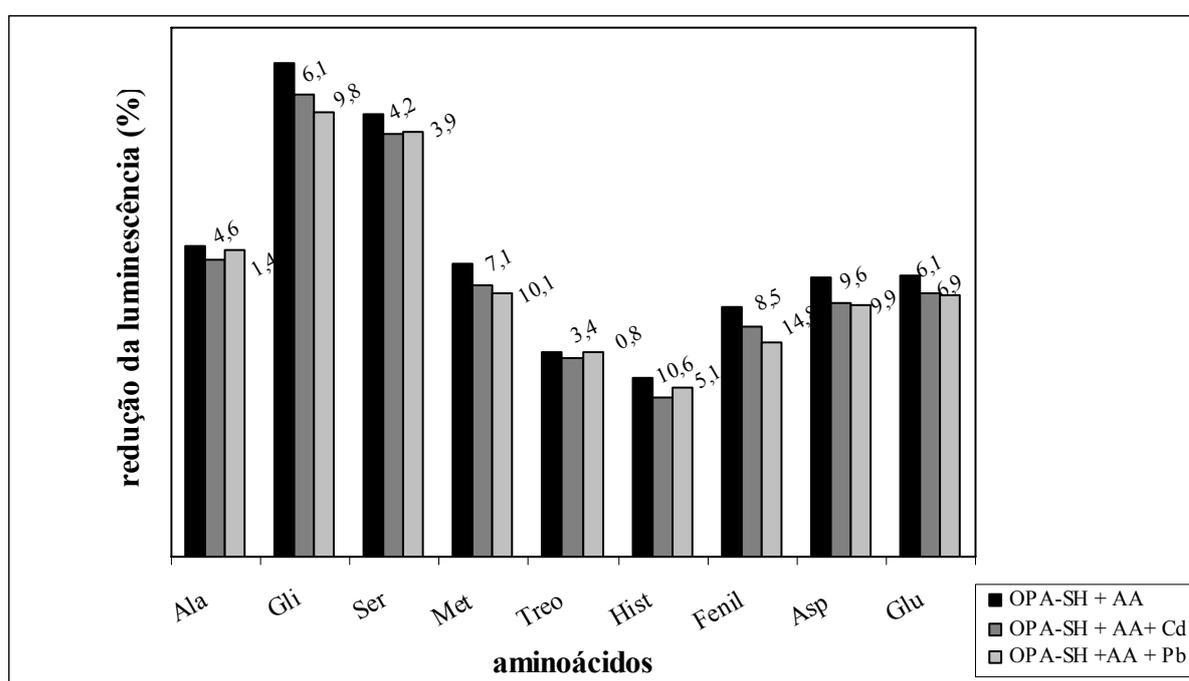
O primeiro grupo de experimentos incluiu a mistura dos aminoácidos e o metal (Cd ou Pb) e a comparação da luminescência destas soluções com aquelas dos aminoácidos sem metal.



**Figura 11:** Cromatogramas das soluções contendo  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cada aminoácido e em (a) sem adição de metal; (b) na presença  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cádmio; (c) na presença  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de chumbo. (1) ala, (2) gli, (3) ser, (4) met, (5) treo, (6) hist, (7) fen, (8) glu, (9) asp.

#### 4.8.1 A luminescência de soluções dos aminoácidos e soluções dos aminoácidos e metal

A variação da luminescência entre a solução do aminoácido com aquela do aminoácido-metal (1:1) pode ser observada na Figura 12.



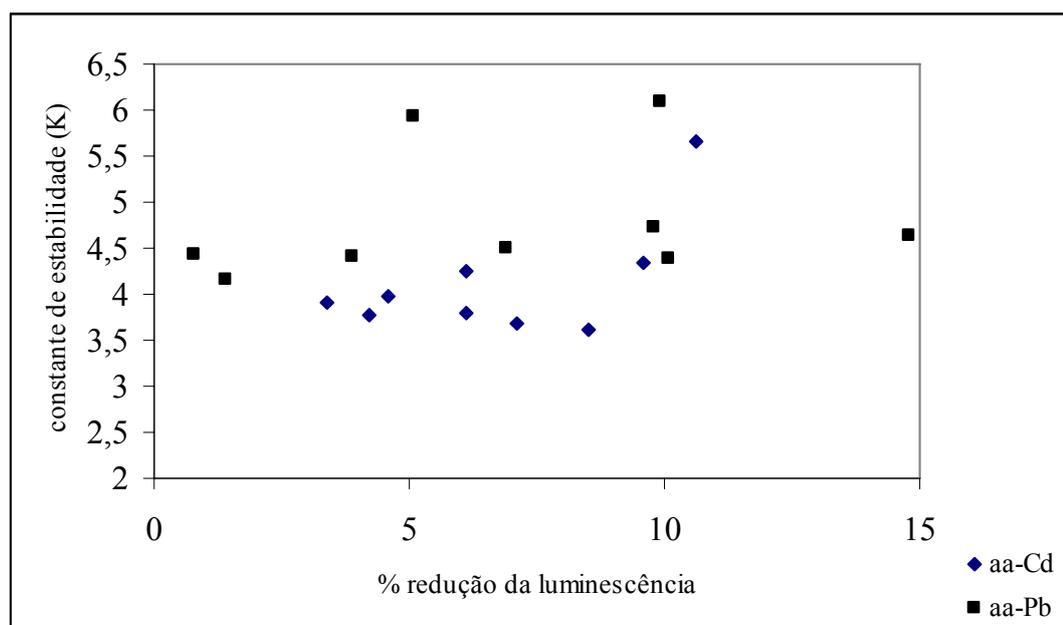
**Figura 12:** Redução da intensidade de luminescência dos aminoácidos com a adição do metal.

Como se observa, todas as soluções aminoácido-metal apresentaram uma redução da intensidade de luminescência, embora mínima em alguns casos.

A porcentagem de diminuição da luminescência variou de 3,4 a 10,6% para as soluções contendo cádmio e de 0,8 a 14,8% para as soluções contendo chumbo.

As amostras foram medidas duas vezes durante sessenta minutos e, neste intervalo o valor de luminescência permaneceu o mesmo.

A figura 13 relaciona a porcentagem de redução de luminescência das soluções com as constantes de estabilidades dos aminoácidos e os metais.



**Figura 13:** Tendência de interação aminoácido-metal apresentada pelas amostras.

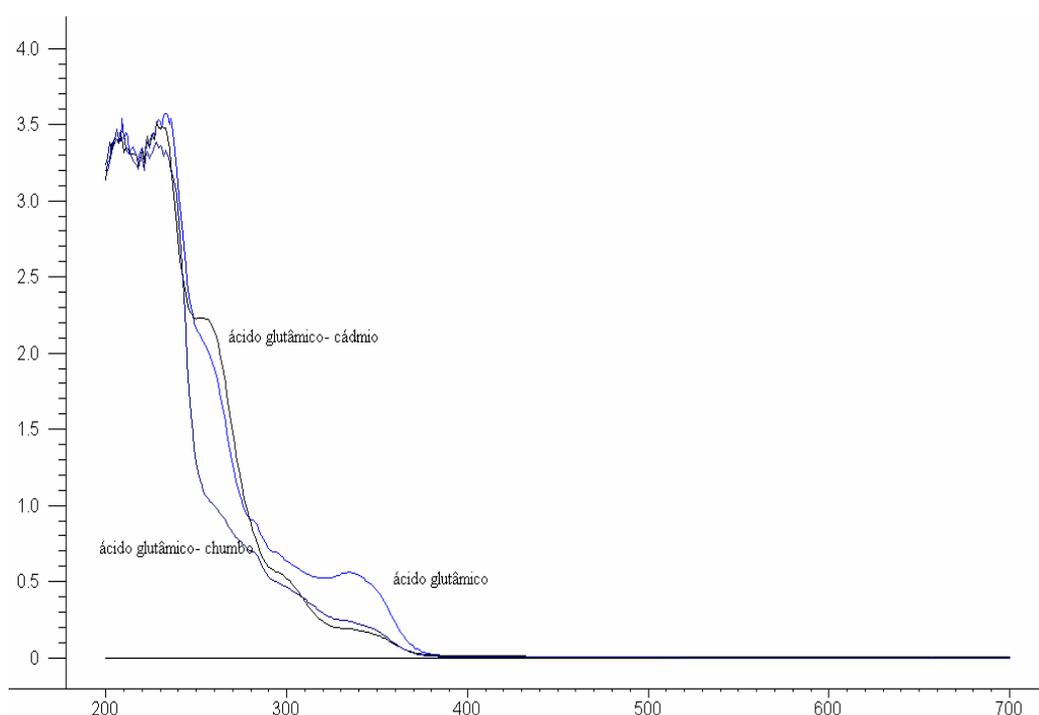
Observando a figura 13, verifica-se que a tendência é que os aminoácidos que apresentam maiores constantes de estabilidade com os metais, tenham uma maior redução de luminescência. Contudo, verificam-se algumas exceções.

#### 4.8.2 Espectro de absorção molecular dos aminoácidos e dos aminoácidos na presença de cádmio ou chumbo

Os ensaios realizados no item 4.8.1 mostraram a redução do sinal cromatográfico dos aminoácidos em amostras contendo o metal. Estes resultados

sugerem que a redução da luminescência corresponde a fração do aminoácido que se combinou com o metal, não estando livre para reagir com OPA-SH. Contudo, caso a redução ocorra por conta de alguma mudança no máximo de absorção ou emissão, devido a presença do metal, a interpretação estaria errada.

Por isso, coletou-se o espectro de absorção molecular de aminoácido-solução de derivação e aminoácido-solução de derivação-metal a fim de compará-los. Os espectros das soluções do ácido glutâmico são mostrados na Figura 14.



**Figura 14:** Espectro da solução ácido glutâmico-OPA-SH, espectro da solução ácido glutâmico-Cd-OPA-SH e espectro da solução ácido glutâmico-Pb-OPA-SH em razão molar 1:1.

É possível observar que há um decréscimo no espectro de absorção quando a solução contém o metal. Contudo, a presença do metal não muda o

perfil do espectro. Este ensaio foi repetido com todos os aminoácidos que apresentaram o mesmo comportamento.

Destes resultados, pode-se inferir que há uma fração do aminoácido combinada ao metal e a adição de OPA-SH à solução não altera o equilíbrio aminoácido-metal, ao menos no período de tempo em que o ensaio foi executado.

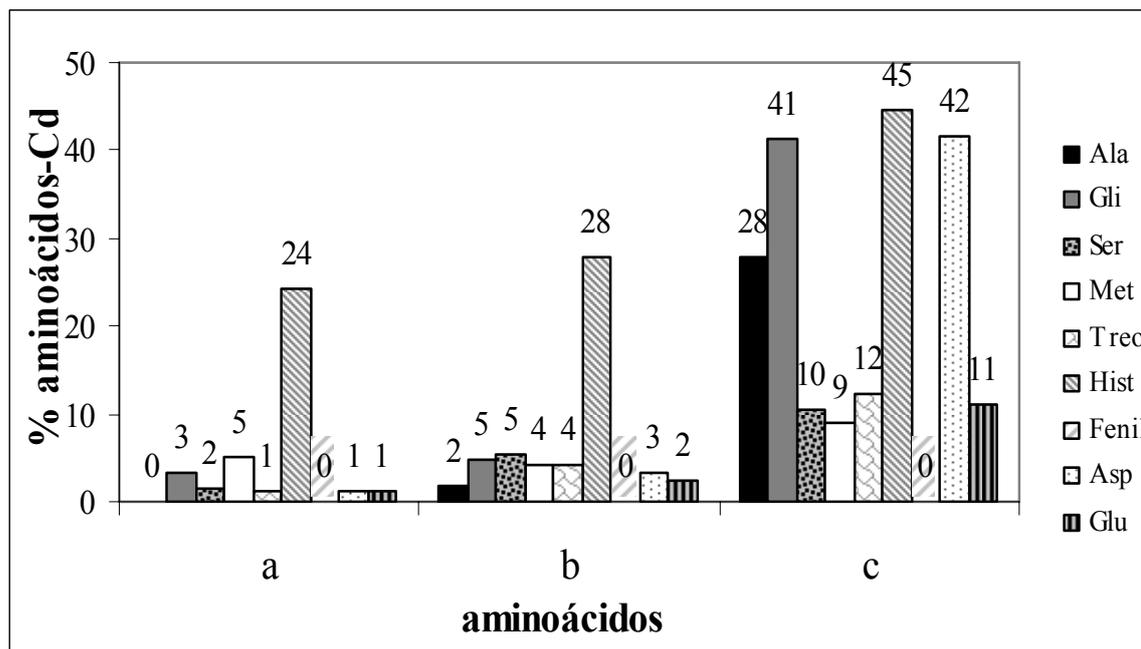
### **4.8.3 Interação do metal numa mistura dos aminoácidos**

Os ensaios descritos nos itens 4.8.1 e 4.8.2 mostraram que a solução de aminoácido contendo metal apresenta uma redução de luminescência, o que permite inferir que esta diminuição corresponde à fração do aminoácido combinada ao metal. Estes resultados foram obtidos para soluções individuais dos aminoácidos onde se verificou que o método pode ser utilizado para avaliar a extensão de aminoácido combinado ao metal.

Neste ensaio, o objetivo foi observar quanto de cada aminoácido complexou com o metal e também a velocidade de formação destes complexos, numa solução contendo a mistura dos aminoácidos.

Para estudar a interação do cádmio e os aminoácidos, injetou-se soluções contendo a mistura dos aminoácidos e concentrações crescentes de cádmio (conforme o item 3.9.3).

Para a construção da Figura 15, fez-se a subtração dos sinais da solução contendo a mistura dos aminoácidos e os sinais da solução contendo a mistura dos aminoácidos-cádmio. A diferença entre estes dois valores corresponde à fração do aminoácido que complexou com cádmio.



**Figura 15:** Porcentagem dos aminoácidos complexados com cádmio, em amostras com 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cada aminoácido e adições de 10,0 (a); 20,0 (b) e 30,0 (c)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cádmio.

Todas as amostras apresentam uma razão molar metal – ligante desfavorecida em relação ao metal, a fim de promover uma concorrência entre os ligantes pelo metal. Esta situação assemelha-se ao que acontece nas amostras de NP onde os aminoácidos (ligantes) estão em grandes quantidades enquanto que o metal (contaminante da amostra) está em pequenas quantidades.

Na amostra (a), os resultados mostram que o cádmio adicionado à amostra complexou em maior quantidade histidina seguido de metionina, glicina, serina, treonina, ácido aspártico e ácido glutâmico. Assim, de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cádmio adicionado à amostra 3,7  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foi complexado pelos aminoácidos, um total de 37%. Já a alanina e a fenilalanina não apresentaram redução de seus sinais.

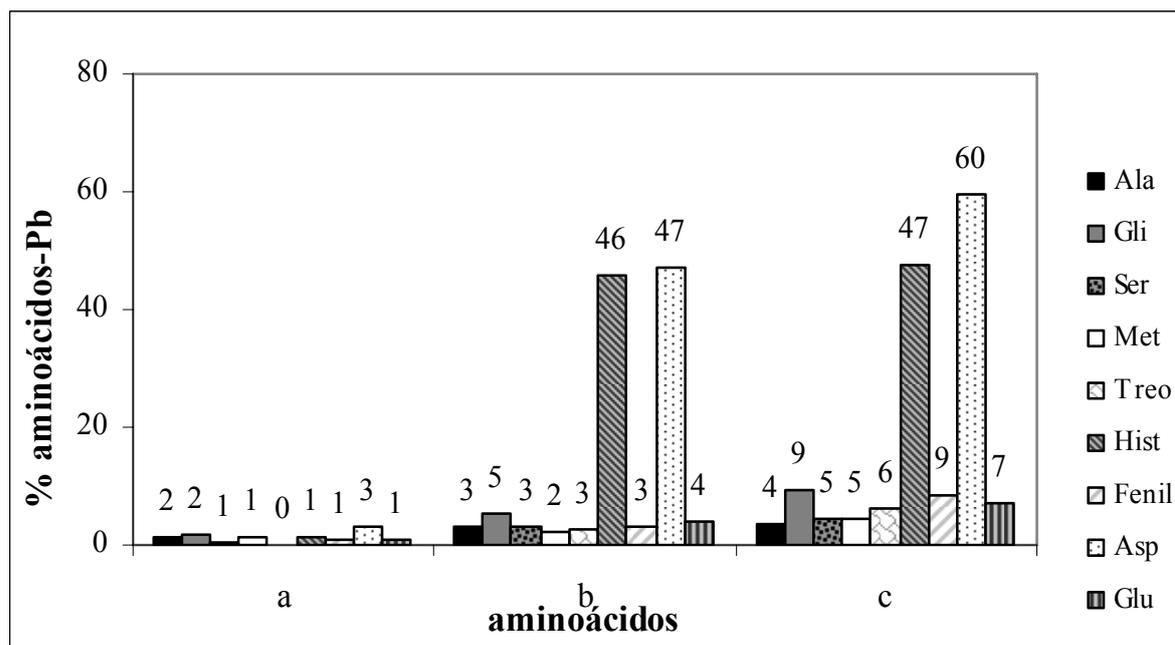
Na segunda amostra (b), o cádmio complexou uma fração maior de histidina seguido de serina, glicina, treonina, metionina, ácido aspártico e ácido

glutâmico. Fenilalanina não apresentou formação de complexo e a alanina teve uma pequena fração complexada com o cádmio adicionado. Para esta amostra  $5,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cádmio de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  adicionado foi complexado.

A terceira amostra (c) possui uma razão molar metal-ligante, com uma proporção maior do metal. Nestas condições, todos os aminoácidos apresentaram um aumento da fração complexada, exceto fenilalanina que não apresentou formação de complexo. A ordem de complexação dos aminoácidos nesta amostra foi a seguinte: histidina > glicina > ácido aspártico > alanina > treonina > ácido glutâmico > serina > metionina > fenilalanina. Este resultado está de acordo com os valores das constantes de formação de complexo destes aminoácidos com o cádmio (Tabela 2). Dos  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cádmio adicionado à amostra,  $19,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi complexado pelos aminoácidos.

Para estudar a afinidade do chumbo pelos aminoácidos, injetou-se soluções contendo a mistura dos aminoácidos e soluções com a mistura dos aminoácidos e adições crescentes de chumbo (conforme o item 3.9.3).

A Figura 16 corresponde à fração do aminoácido que complexou com chumbo. Os valores utilizados para construção desta Figura foram obtidos pela diferença entre os sinais da solução contendo a mistura dos aminoácidos e os sinais da solução contendo a mistura dos aminoácidos-chumbo.



**Figura 16:** Porcentagem dos aminoácidos complexados com chumbo, em amostras com 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cada aminoácido e adições de 10,0 (a); 20,0 (b) e 30,0 (c)  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de chumbo.

Na amostra (a), o chumbo adicionado à amostra complexou em maior quantidade o ácido aspártico seguido de glicina, alanina, histidina, metionina, serina, fenilalanina e ácido glutâmico. Já a treonina não apresentou redução de seu sinal, indicando a não formação imediata de complexo.

Na segunda amostra (b) o chumbo complexou uma fração maior de ácido aspártico seguido de histidina, glicina, ácido glutâmico, fenilalanina, alanina, serina. A treonina apresentou formação de complexo e a metionina teve uma pequena fração complexada com o chumbo adicionado.

Na terceira amostra (c), todos os aminoácidos tiveram uma fração complexada pelo chumbo. A ordem crescente de formação de complexos dos aminoácidos com chumbo foi a seguinte: ácido aspártico > histidina > glicina > fenilalanina > ácido glutâmico > treonina > metionina > serina > alanina. Esta

ordem de formação de complexo destes aminoácidos com o chumbo é compatível com os valores das constantes dos mesmos (Tabela 2).

As frações de chumbo complexadas pelos aminoácidos nas amostras a, b e c foram 1,2; 11,6 e 15,2  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

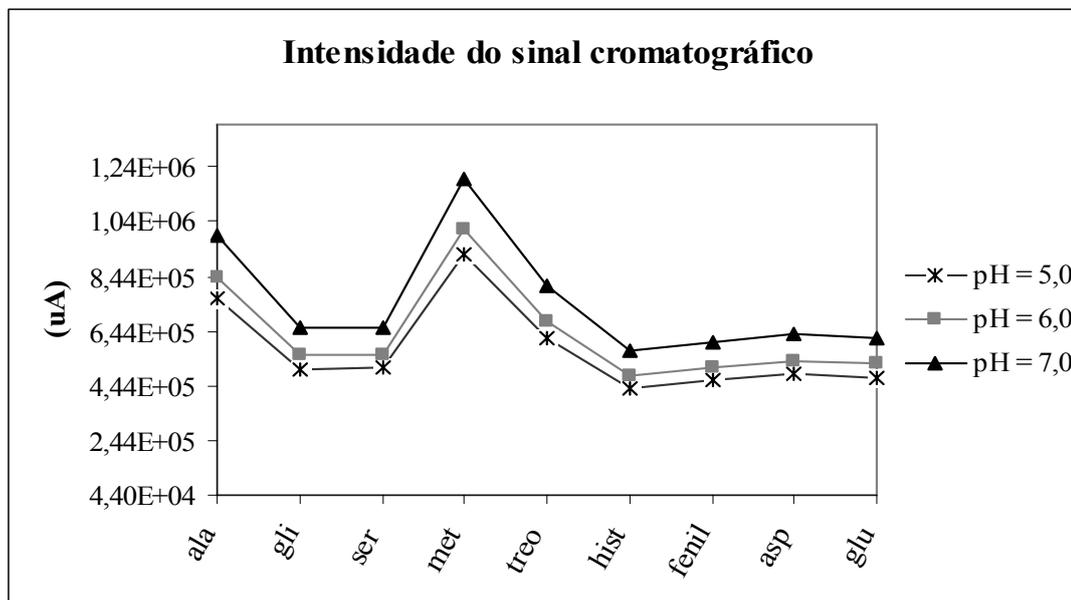
A partir das constantes de estabilidades dos aminoácidos e cádmio ou chumbo pode-se supor que aqueles que apresentarem os maiores valores, formarão mais complexos e, conseqüentemente, apresentarão uma maior redução do sinal cromatográfico. Contudo, observou-se que na prática esta suposição só é verdadeira para as amostras onde a proporção molar metal – ligante não estava tão desfavorecida. Este comportamento pode ser atribuído ao fato de que os valores das constantes estabilidades que são obtidos quando o equilíbrio é atingido. Ademais, são constantes condicionais ao tempo necessário para que ocorra a reação de formação do complexo (o equilíbrio é atingido) e ao pH da amostra que pode alterar a concentração das espécies em equilíbrio.

Desta forma, a influência do pH das amostras e o tempo devem ser considerados na interação entre os aminoácidos e os metais estudados.

#### **4.8.4 Influência do pH das amostras na intensidade do sinal cromatográfico**

Para verificar a influência do pH da amostra na intensidade do sinal cromatográfico dos aminoácidos, realizou-se um experimento com soluções contendo a mistura dos aminoácidos em diferentes valores de pH.

A escolha deste pequeno intervalo - 5,0; 6,0; e 7,0 - foi devido ao pH em que se encontram as soluções de NP. A Figura 17 mostra a variação do sinal cromatográfico dos aminoácidos de amostras de mesma composição, mas em diferentes valores de pH.



**Figura 17:** Variação do sinal cromatográfico dos aminoácidos em diferentes valores de pH.

Como mostra a Figura 17, na faixa de pH estudada, o aumento de pH promove um aumento na intensidade do sinal cromatográfico dos aminoácidos. No entanto, não ocorre nenhuma variação brusca para nenhum dos aminoácidos estudados, isto é, a intensidade dos sinais dos aminoácidos variou proporcionalmente.

#### 4.8.5 Influência do pH na interação do metal com os aminoácidos

Para verificar a influência do pH na interação dos aminoácidos com cádmio e chumbo, soluções contendo a mistura dos aminoácidos e quantidades crescentes de cádmio (ou chumbo), nos valores de pH 5,0; 6,0; e 7,0 foram avaliadas.

Não se observou nenhuma alteração na ordem de formação e tampouco um aumento expressivo na quantidade de complexos dos aminoácidos com metal em função do pH. Este resultado pode ser atribuído ao fato de que a faixa de pH investigada foi muito restrita. A análise dos diagramas da composição fracionária das espécies de metal (APÊNDICE E) e dos aminoácidos (APÊNDICE D) em diferentes valores de pH comprovam que não ocorre uma alteração expressiva da concentração das espécies em equilíbrio para a faixa de pH estudada.

Embora as amostras no pH mais alto (7,0) apresentassem uma maior intensidade no sinal cromatográfico dos aminoácidos, na seqüência dos ensaios, optou-se por não alterar o pH das amostras. Assim, se assegura que as condições sejam as mais próximas, quanto possível, das amostras reais.

#### **4.9 Influência do tempo na interação de cádmio e chumbo com os aminoácidos**

Investigou-se também a interação do cádmio e chumbo com os aminoácidos ao longo do tempo. Para isso, analisou-se as mesmas soluções do item 4.8.3 por um período de cinco dias.

As Tabelas 20, 21 e 22 mostram a variação percentual dos aminoácidos com diferentes concentrações de cádmio por um período de cinco dias.

**Tabela 20:** Porcentagem de complexo aminoácido – cádmio formado numa solução contendo  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cada aminoácido e  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cádmio em relação ao tempo.

Aminoácido	Tempo (dias)				
	1	2	3	4	5
Alanina	0	0	1	2	2
Glicina	3	3	3	5	5
Serina	2	2	2	2,5	2,5
Metionina	5	7	8	8	8
Treonina	1	1	1	2	2
Histidina	24	24	25	24	25
Fenilalanina	0	1	1,2	1,2	1,2
Aspártico	1	3	3	3,4	3,5
Glutâmico	1	1,1	1,1	1,2	1,2

Se considerarmos que a fração de complexo formado no primeiro dia de análise foi de  $3,7 \mu\text{mol L}^{-1}$  e a fração no quinto dia de  $5,4 \mu\text{mol L}^{-1}$  esta variação é muito relevante.

A metionina foi o aminoácido que apresentou a maior variação de seu sinal, ou seja, foi o aminoácido que interagiu mais prontamente formando complexo com cádmio no decorrer dos cinco dias de análise cromatográfica. Por outro lado, o ácido glutâmico foi o aminoácido que apresentou a menor variação de seu sinal cromatográfico, o que quer dizer que interage mais lentamente para a formação do complexo.

**Tabela 21:** Porcentagem de complexo aminoácido – cádmio formado numa solução contendo  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cada aminoácido e  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cádmio em relação ao tempo.

Aminoácido	Tempo (dias)				
	1	2	3	4	5
Alanina	2	2	2	3	3
Glicina	5	5	5,7	5,4	5,4
Serina	5	5,7	5,7	6	6
Metionina	4	6	6	7,6	7,6
Treonina	4	3,9	3,8	4	4
Histidina	28	29	28	30	30
Fenilalanina	0	1,4	1,4	1,5	1,5
Aspártico	3	5	5	5,6	5,7
Glutâmico	2	3,5	3,6	4	4

Novamente, metionina foi o aminoácido que apresentou a maior variação e a treonina apresentou a menor variação do sinal cromatográfico, isto é, interage mais lentamente na formação de complexo.

A fração de complexo formado no primeiro dia de análise foi  $5,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  e no quinto dia  $6,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

**Tabela 22:** Porcentagem de complexo aminoácido – cádmio formado numa solução contendo  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cada aminoácido e  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cádmio em relação ao tempo.

Aminoácido	Tempo (dias)				
	1	2	3	4	5
Alanina	28	28	29	30	30
Glicina	41	41,2	41,2	41,2	41,2
Serina	10	9	9	10,9	10,9
Metionina	9	9,8	11	11	11
Treonina	12	12	12	14	14
Histidina	45	45	45	45,7	45,7
Fenilalanina	0	2	2	2	2
Aspártico	42	43	42	42	43,4
Glutâmico	11	12	11	11	12

Nesta amostra, a fração de complexo formado no primeiro dia de análise foi  $19,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  e a fração no quinto dia  $21,02 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

O aumento na quantidade de complexos formados foi de 1,7; 1,4 e  $1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ , para as Tabelas 20, 21 e 22 respectivamente.

A variação nas quantidades de complexos aminoácidos-chumbo, por um período de cinco dias, estão descritas nas Tabelas 23, 24 e 25.

**Tabela 23:** Porcentagem de complexo aminoácido – chumbo formado numa solução contendo  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cada aminoácido e  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de chumbo em relação ao tempo.

Aminoácido	Tempo (dias)				
	1	2	3	4	5
Alanina	2	2	5	5	5
Glicina	2	3	3	6	6
Serina	1	1,6	1,5	2,4	2,4
Metionina	1	1,9	1,8	1,8	2
Treonina	0	1,5	1,7	2	2
Histidina	1	2	2,7	2,8	3
Fenilalanina	1	1,7	1,6	1,7	1,9
Aspártico	3	3,3	3,8	5	5
Glutâmico	1	1,7	2	2	2

A glicina apresentou a maior variação e fenilalanina apresentou a menor variação do sinal cromatográfico.

Se observarmos a fração de complexo formado no primeiro dia de análise  $1,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  e a fração no quinto dia  $2,9 \mu\text{mol L}^{-1}$  esta variação é muito relevante, pois teve um aumento de quase 2,5 vezes.

**Tabela 24:** Porcentagem de complexo aminoácido – chumbo formado numa solução contendo  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cada aminoácido e  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de chumbo em relação ao tempo.

Aminoácido	Tempo (dias)				
	1	2	3	4	5
Alanina	3	3,2	3,2	3,6	3,6
Glicina	5	5,8	6	6,8	6,8
Serina	3	4	4	4	4
Metionina	2	3	3	2,8	3
Treonina	3	3,9	5	5	5
Histidina	46	47	46	47	47
Fenilalanina	3	3,2	3,5	4	4
Aspártico	47	48	48	48	48
Glutâmico	4	4,5	4,6	4,6	4,6

A treonina foi o aminoácido que apresentou a maior variação de seu sinal e a alanina e o ácido glutâmico os aminoácidos que tiveram a menor variação de seus sinais cromatográficos.

**Tabela 25:** Porcentagem de complexo aminoácido – chumbo formado numa solução contendo  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cada aminoácido e  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  de chumbo em relação ao tempo.

Aminoácido	Tempo (dias)				
	1	2	3	4	5
Alanina	4	4,1	4,1	4,1	4,1
Glicina	9	13,2	14,3	15	15
Serina	5	7	7	8,5	8,5
Metionina	5	7	8	8	8
Treonina	6	7	8	9	9
Histidina	47	47,5	47,5	48,7	48,7
Fenilalanina	9	9,7	10	11,2	12
Aspártico	60	61	61	61	61
Glutâmico	7	8	10,9	11	11

Em comparação com as outras amostras a variação dos sinais cromatográficos dos aminoácidos foi maior. O aminoácido que teve a maior variação foi a glicina e o aminoácido que teve a menor variação foi a alanina.

A fração de complexo formado no primeiro dia foi  $15,2 \mu\text{mol L}^{-1}$  e a fração no quinto dia  $17,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

O aumento na quantidade de complexos foi de 1,7; 1 e 2,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para as Tabelas 23, 24 e 25 respectivamente, notando-se que na terceira amostra foi bastante expressivo.

O monitoramento das soluções contendo a mistura dos aminoácidos e cádmio ou chumbo mostrou que, no período de cinco dias, houve variação nas quantidades de complexos formados. Embora a porcentagem de variação não tenha sido tão pronunciada, ela foi contínua e crescente nos dias em que foram analisadas. Isto significa que durante este período continuou ocorrendo a formação de complexos.

A variação na formação de complexo aminoácido – cádmio nas amostras, no período de cinco dias, foi de 0,2 a 3%; 0 a 3,6% e 0,2 a 2%, respectivamente às Tabelas 20, 21 e 22. Já para o chumbo a variação nas amostras ficou entre 0,9 e 4%; 0,6 e 2% e 0,1 e 6%, respectivamente às Tabelas 23, 24 e 25.

Estes resultados confirmam que além das constantes de estabilidade, os aspectos cinéticos, que não são considerados pelos valores das constantes, são importantes no estudo da interação dos aminoácidos e os metais estudados.

Todas as amostras foram mantidas a aproximadamente 4 °C durante os cinco dias de análise. Em geral, as constantes de estabilidades são determinadas em sistemas à temperatura de 25 °C e, certamente a temperatura teve um efeito negativo na reação de formação dos complexos. A escolha desta temperatura deve-se ao fato de que é a mesma em que as amostras de NP são armazenadas.

#### **4.10 Determinação da fração livre e da fração combinada de cádmio e chumbo**

Mendonça [120] observou que o metal presente na amostra sai logo no início do processo cromatográfico, não interagindo com a coluna. Baseado nestes resultados buscou-se a determinação da fração livre e da fração combinada do metal através da associação HPLC-AAS-ASV.

Para isso, injetou-se soluções contendo a mistura dos aminoácidos e metal (Tabela 4) e coletou-se o efluente na saída da coluna até o início da eluição do primeiro analito.

AAS mede a concentração de metal total presente na amostra e a medida por ASV a fração livre. A diferença entre as duas medidas fornece a fração combinada que pode ser comparada com os resultados obtidos por cromatografia.

Na Tabela 26 está descrito a concentração de aminoácidos combinado com metal. Estes resultados foram obtidos pela diferença entre a concentração adicionada às amostras e aquela determinada por HPLC (fração livre de aminoácidos).

**Tabela 26:** Concentração de aminoácidos combinado com metal determinado por HPLC.

Amostras	aminoácido combinado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
2	2,7
3	3,4
4	2,5
5	6,3
7	3,2
8	4,0
9	2,8
10	6,9
12	4,4
13	5,7
14	5,1
15	8,6

Os desvios (%RSD) foram de 0,3 a 6,1% para  $n = 3$ .

#### 4.10.1 Determinação de cádmio e chumbo por espectrometria de absorção atômica

A determinação por AAS mede a concentração de metal total presente nas amostras. Os resultados da determinação de cádmio e chumbo por AAS no conjunto de soluções estudadas estão expressos na Tabela 27.

**Tabela 27:** Valores encontrados na determinação de Cd e Pb por AAS.

Amostras	Adicionado		Encontrado	
	Cd ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Cd ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
1	--	--	0,055	0,447
2	5,0	--	5,056	0,447
3	10,0	--	10,06	0,446
4	--	5,0	0,049	5,444
5	--	10,0	0,045	11,02
6	--	--	0,056	0,452
7	5,0	--	5,054	0,451
8	10,0	--	10,06	0,454
9	--	5,0	0,057	5,458
10	--	10,0	0,059	12,34
11	--	--	0,058	0,458
12	5,0	--	5,057	0,464
13	10,0	--	10,07	0,449
14	--	5,0	0,058	5,501
15	--	10,0	0,056	11,44
16	--	--	0,074	0,648

Os desvios ( $n = 3$ ) foram de 1,7 a 9,6% para Cd e de 1,4 a 10,2% para o Pb.

Como se observa na Tabela 27 as concentrações encontradas para cádmio e chumbo foram superiores àquelas adicionadas. Isto se deve a contribuição da matéria-prima dos aminoácidos e também dos reagentes utilizados no preparo dos eluentes que apresentam uma relevante contaminação por metais pesados. Comparando-se a amostra 1 (aminoácidos + eluente) e a amostra 16 (eluente)

verifica-se que a contaminação introduzida pelo eluente é muito maior que a dos aminoácidos.

Geralmente, os reagentes apresentam contaminação por metais pesados em níveis razoáveis e na própria descrição dos produtos pelo fabricante, ela é identificada. No caso dos produtos utilizados, a contaminação do acetato de sódio por metais pesados na faixa de  $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ . Para o hidróxido de sódio a contaminação por metais pesados situa-se na faixa de  $0,0002\%$  (cerca de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ ).

A contaminação trazida pelos reagentes é um aspecto muito importante porque pode comprometer os resultados obtidos. Considerando a faixa de concentração utilizada neste ensaio, a contaminação é bastante expressiva, principalmente para o chumbo.

#### **4.10.2 Determinação de cádmio e chumbo por voltametria**

O objetivo ao realizar a medida voltamétrica da alíquota coletada do processo cromatográfico antes da eluição do 1º aminoácido é determinar a fração de metal livre na amostra.

Os resultados da determinação de cádmio e chumbo por voltametria estão expressos na Tabela 28.

**Tabela 28:** Concentrações encontradas de Cd e Pb medidos por ASV nas alíquotas recolhidas do processo cromatográfico.

Amostras	Adicionado		Encontrado	
	Cd ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Cd ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
1	--	--	0,056	0,449
2	5,0	--	4,804	0,448
3	10,0	--	9,264	0,448
4	--	5,0	0,061	3,976
5	--	10,0	0,059	8,141
6	--	--	0,058	0,450
7	5,0	--	4,156	0,493
8	10,0	--	9,078	0,457
9	--	5,0	0,081	3,984
10	--	10,0	0,074	6,924
11	--	--	n.d.	0,631
12	5,0	--	4,214	0,466
13	10,0	--	8,010	0,428
14	--	5,0	0,043	2,693
15	--	10,0	0,028	5,671
16	--	--	0,075	0,637

Os desvios encontrados ( $n = 3$ ) foram de 0,8 a 7,6% para Cd e de 1,2 a 6,3% para o Pb.

A diferença entre os resultados obtidos por AAS (concentração total de metal na amostra, Tabela 27) e aqueles obtidos por ASV (concentração de metal livre na amostra, Tabela 28) fornece a concentração de metal combinado (Tabela 29). Os resultados obtidos desta diferença foram comparados com a concentração de aminoácidos combinado (Tabela 26).

Na Tabela 29 estão expressos a concentração de metal combinado e a concentração de aminoácidos combinado.

**Tabela 29:** Comparação dos resultados obtidos por HPLC e AAS-ASV.

Amostras	Aminoácidos combinado	Metal combinado	
	( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Cd ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )
1	--	--	--
2	2,7	0,252	--
3	3,4	0,796	--
4	2,5	--	1,468
5	6,3	--	2,879
6	--	--	--
7	3,2	0,898	--
8	4,0	0,982	--
9	2,8	--	1,474
10	6,9	--	5,416
11	--	--	--
12	4,4	0,843	--
13	5,7	2,06	--
14	5,1	--	2,808
15	8,6	--	5,769
16	--	--	--

Como se observa na Tabela os resultados são muito discrepantes. Certamente a alta contaminação apresentada pelos reagentes foi o fator determinante para isso, principalmente na voltametria. Outro fato que deve ser

levado em conta é a concentração das soluções utilizadas neste estudo que está muito próxima da concentração dos contaminantes.

Portanto, a determinação por ASV para a quantificação da fração livre de cádmio e chumbo não produziu resultados satisfatórios e, por isso, não será utilizada para comparar os resultados obtidos por cromatografia.

#### **4.11 Aplicação em amostras comerciais de NP**

Inicialmente, o estudo da interação de cádmio e chumbo com os aminoácidos foi realizado em solução aquosa. Após verificar a eficiência do sistema cromatográfico, sua aplicação foi avaliada em amostras comerciais de NP, cuja composição de aminoácidos está descrita no apêndice A.

É importante ressaltar que além dos aminoácidos de interesse neste trabalho, as amostras de NP apresentam em sua composição outros aminoácidos, além de eletrólitos e minerais. Além disso, estas amostras têm uma concentração elevada de aminoácidos ( $\text{g L}^{-1}$ ) sendo necessária uma diluição antes de proceder a análise cromatográfica.

As amostras foram diluídas quatro mil vezes em água e nenhum ajuste de pH foi realizado. Esta medida foi tomada a fim de evitar alterações nos equilíbrios entre as espécies em solução e também para que não ocorram reações secundárias.

Os sinais cromatográficos dos analitos nas amostras de NP foram reconhecidos através da comparação dos tempos de retenção com aqueles de uma solução padrão dos aminoácidos e, também, através da adição destes às amostras. Na Tabela 30 podem ser vistos os resultados da quantificação dos aminoácidos presentes nas amostras de NP.

**Tabela 30:** Quantificação dos aminoácidos em soluções de NP comerciais por HPLC.

Aminoácido	A	B	C	D	E	F
Concentração em $\mu\text{mol L}^{-1}$						
Metionina <sup>a</sup>	1,842	6,365	8,877	6,365	7,202	7,705
Metionina <sup>b</sup>	1,372	6,576	9,044	6,002	7,819	6,869
Desvio <sup>c</sup>	(-1,1)	(+3,33)	(+1,88)	(-5,7)	(+2,65)	(+0,9)
Fenilalanina <sup>a</sup>	1,360	7,717	8,171	7,717	7,717	6,960
Fenilalanina <sup>b</sup>	1,372	7,509	7,811	7,956	7,819	6,869
Desvio <sup>c</sup>	(+0,9)	(-2,7)	(+4,4)	(+3,1)	(+1,32)	(-1,3)
Aspártico <sup>a</sup>	0	2,440	5,067	2,440	0	0
Aspártico <sup>b</sup>	0	2,448	5,350	2,576	0	0
Desvio <sup>c</sup>	--	(+0,35)	(+5,6)	(+5,6)	--	--
Glicina <sup>a</sup>	18,33	26,33	26,66	26,33	46,65	13,66
Glicina <sup>b</sup>	19,50	25,87	26,31	26,64	48,11	13,09
Desvio <sup>c</sup>	(+6,4)	(+1,74)	(-1,3)	(+1,2)	(+3,1)	(-4,2)
Glutâmico <sup>a</sup>	0	7,815	4,247	7,815	0	0
Glutâmico <sup>b</sup>	0	8,072	4,268	7,549	0	0
Desvio <sup>c</sup>	--	(+3,3)	(+0,5)	(-3,4)	--	--
Serina <sup>a</sup>	0	5,707	5,945	5,707	0	21,41
Serina <sup>b</sup>	0	5,510	5,992	5,918	0	22,14
Desvio <sup>c</sup>	--	(-3,45)	(+0,8)	(+3,7)	--	(+3,4)
Histidina <sup>a</sup>	0	8,375	7,408	8,375	4,832	6,602
Histidina <sup>b</sup>	0	8,785	7,689	8,567	5,084	6,751
Desvio <sup>c</sup>	--	(+4,9)	(+3,8)	(+2,3)	(+5,2)	(+2,2)
Treonina <sup>a</sup>	9,232	8,602	18,67	8,602	9,232	10,912
Treonina <sup>b</sup>	9,269	8,792	18,18	8,249	9,564	10,635
Desvio <sup>c</sup>	(+0,4)	(+2,2)	(-2,65)	(-4,1)	(+3,6)	(-2,5)
Alanina <sup>a</sup>	12,90	38,44	28,90	38,44	42,09	20,20
Alanina <sup>b</sup>	13,53	38,61	29,26	37,39	39,48	20,28
Desvio <sup>c</sup>	(+4,9)	(+0,45)	(+1,25)	(-2,7)	(-6,2)	(+0,4)

<sup>a</sup> concentração calculada considerando as informações do rótulo e a diluição das amostras; <sup>b</sup> concentração obtida por cromatografia e <sup>c</sup> desvios em relação à concentração esperada após a diluição das amostras .

Como se observa na Tabela 30, a quantificação dos aminoácidos (de interesse neste trabalho), em soluções de NP, apresentou desvios relativamente baixos em relação ao conteúdo “real” das amostras. É importante salientar que como conteúdo “real” foi considerado o valor de concentração fornecido pelos fabricantes das soluções, descrito nos rótulos.

Tendo em vista a complexidade da matriz e o mínimo de manipulação requerido para a utilização deste método cromatográfico na quantificação dos aminoácidos, os desvios podem ser tomados como não significativos. Em síntese, o sistema cromatográfico pode ser aplicado em amostras de NP obtendo bons resultados na quantificação dos aminoácidos investigados neste estudo.

#### **4.12 Interação do metal com os aminoácidos em amostras de NP**

O estudo da interação do metal (cádmio ou chumbo) com os aminoácidos foi realizado adicionando-se o equivalente a  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  de metal às amostras de NP. Após cinco dias da adição do metal, fez-se a quantificação por cromatografia.

O resultado da quantificação da fração livre dos aminoácidos em amostras de NP contendo  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cádmio estão expressos na Tabela 31.

**Tabela 31:** Fração livre dos aminoácidos em amostras de NP contendo 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de cádmio ( $n = 3$ ).

Aminoácido	Amostras de NP concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )					
	A	B	C	D	E	F
Metionina	1,805	5,920	8,257	5,921	6,591	7,094
Fenilalanina	1,356	7,598	8,045	7,597	7,598	6,841
Aspártico	--	2,182	4,531	2,179	--	--
Glicina	4,486	15,48	15,67	15,43	33,43	6,254
Glutâmico	--	7,083	3,849	7,080	--	--
Serina	--	5,352	5,575	5,350	--	16,08
Histidina	--	4,790	4,237	4,795	3,040	4,589
Treonina	8,039	7,567	16,42	7,565	8,040	9,502
Alanina	8,407	26,90	20,23	26,91	29,46	14,14

% RSD = 0,02 - 4,4;  $n = 3$ .

Na Tabela 32 estão os resultados da quantificação da fração livre dos aminoácidos em amostras de NP contendo 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de chumbo.

**Tabela 32:** Fração livre dos aminoácidos estudados em amostras de NP contendo  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  de chumbo ( $n = 3$ ).

Aminoácido	Amostras de NP concentração ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )					
	A	B	C	D	E	F
Metionina	1,815	6,041	8,425	6,021	6,787	7,231
Fenilalanina	1,338	7,003	7,414	7,002	7,008	6,242
Aspártico	--	2,077	4,313	2,080	--	--
Glicina	13,29	15,93	16,13	15,93	27,98	10,86
Glutâmico	--	7,144	3,882	7,145	--	--
Serina	--	5,431	5,657	5,430	--	17,51
Histidina	--	4,960	4,387	4,955	3,695	4,480
Treonina	8,465	7,936	17,22	7,937	8,465	9,841
Alanina	12,22	32,38	24,34	32,38	34,82	18,53

%RSD = 0,01- 4,7. ( $n = 3$ )

A diferença entre os resultados obtidos nas amostras sem metal e aqueles obtidos após a adição de metal, fornece a fração combinada de aminoácido. A Tabela 33 apresenta a porcentagem dos aminoácidos combinados com o cádmio (ou chumbo) adicionado às amostras de NP.

**Tabela 33:** Porcentagem de interação do cádmio e chumbo com alguns aminoácidos presentes em amostras de NP.

		Amostras de NP			
Aminoácido-metal (%)		A	B*	E	F
Cd	Metionina	2,01	6,99	8,48	7,93
	Fenilalanina	0,29	1,54	1,54	1,71
	Aspártico	--	10,6	--	--
	Glicina	75,5	41,2	28,3	54,2
	Glutâmico	--	9,37	--	--
	Serina	--	6,22	--	24,9
	Histidina	--	42,8	37,1	30,5
	Treonina	12,9	12,0	12,9	12,9
	Alanina	34,86	30,0	30,1	29,8
Pb	Metionina	1,47	5,09	5,76	6,15
	Fenilalanina	1,63	9,26	9,26	10,3
	Aspártico	--	14,9	--	--
	Glicina	27,5	39,5	40,2	20,5
	Glutâmico	--	8,59	--	--
	Serina	--	4,84	--	18,2
	Histidina	--	40,8	23,5	32,1
	Treonina	8,31	7,74	8,31	9,81
	Alanina	5,29	15,7	17,3	8,27

\*As amostras C e D foram omitidas da tabela porque apresentaram as mesmas porcentagens que a amostra B.

Os resultados mostraram que a porcentagem de metal combinado aos aminoácidos nas soluções de NP são diferentes daquelas em soluções aquosas.

A partir das constantes de estabilidades dos aminoácidos e cádmio ou chumbo pode-se supor que aqueles que apresentarem os maiores valores, formarão mais complexos e, conseqüentemente, apresentarão uma maior redução do sinal cromatográfico. Contudo, se colocarmos a fração metal-aminoácido em ordem crescente de interação, esta não é a mesma que a ordem crescente das constantes de estabilidade. Em outras palavras, um maior valor de constante de estabilidade não indica uma maior interação metal-aminoácido. Este comportamento pode ser atribuído ao fato de que os aspectos cinéticos não são levados em conta pelos valores das constantes. Outros fatores que podem explicar estes resultados são; o tempo necessário para que ocorra a reação de formação do complexo (o equilíbrio seja atingido), o pH da amostra que pode alterar a concentração das espécies em equilíbrio, a força iônica do meio, a temperatura e a complexidade das amostras de NP.

Observando a composição das soluções de NP, verifica-se que a concentração dos aminoácidos, bem como seus compostos constituintes, variam consideravelmente de uma amostra para outra. Este fato, associado aos inúmeros equilíbrios existentes no meio e os diversos fatores que afetam estes, torna estas amostras bastante complexas.

Além disso, os outros componentes da solução também interagem em alguma extensão com cádmio e chumbo, influenciando assim os resultados deste ensaio.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

A primeira parte deste trabalho foi investigar um pré-tratamento que permitisse a utilização da voltametria na determinação de contaminantes metálicos em amostras de NP.

Para isso, colunas de PE impregnado com PAN foram utilizadas para a separação e pré-concentração de zinco, cádmio, chumbo e cobre de amostras de NP de pequeno volume, permitindo deste modo limites de detecção para as determinações voltamétricas, considerando-se uma pré-concentração a partir de 40 mililitros de amostra. A partir da contaminação das soluções de NP com os metais na concentração de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , fez-se ensaios de recuperação cujo percentual obtido foi próximo a 100%.

Já para soluções de NP de grande volume (formulações contendo alta concentração de aminoácidos), foi possível quantificar simultaneamente zinco, cádmio, chumbo e cobre, por ASV, após o pré-tratamento com irradiação UV ou MW a fim de eliminar a interferência matricial.

As amostras de NP, analisadas após o pré-tratamento com irradiação UV ou MW, sob condições otimizadas, apresentaram contaminação pelos metais investigados. Ensaios de recuperação foram realizados a partir da contaminação das soluções de NP com os metais e percentuais de recuperação ficaram próximos a 100%. Deste modo, qualquer um dos dois pré-tratamentos pode ser utilizado para amostras de NP e a posterior quantificação por ASV. Esta metodologia apresenta inúmeras vantagens, tais como o menor custo uma vez que reduz o consumo de reagentes e, conseqüentemente, diminui a geração de

resíduos, além de oferecer maior segurança ao manipulador. Ademais, possibilita a determinação simultânea dos metais investigados por uma técnica rápida, confiável e de baixo custo como a voltametria.

Comprovada a contaminação das amostras de NP por metais tóxicos, investigou-se a interação de cádmio e chumbo com os aminoácidos alanina, glicina, serina, metionina, treonina, histidina, fenilalanina, ácido glutâmico e ácido aspártico. Nesta etapa do trabalho, aplicou-se um sistema cromatográfico capaz de separar e quantificar os aminoácidos e estudar a interação destes com cádmio e chumbo em soluções aquosas e soluções de NP. O objetivo foi mostrar, através da redução dos sinais cromatográficos, as frações de aminoácidos que complexaram com o metal adicionado à amostra.

Para isso, soluções aquosas dos aminoácidos estudados contendo cádmio ou chumbo em diferentes proporções molares, diferentes valores de pH do meio e tempo de interação foram investigados objetivando analisar a ocorrência ou não de interação. A ocorrência da interação foi constatada pela redução dos sinais cromatográficos e a ordem de redução mostrou relação com as constantes de formação dos respectivos complexos, após algum tempo.

O sistema cromatográfico mostrou-se adequado na separação e quantificação dos aminoácidos estudados em amostras de NP. Contudo, no estudo da interação, embora tenha ocorrido uma redução dos sinais cromatográficos, os resultados foram diferentes daqueles obtidos na matriz aquosa. Isto se deve, provavelmente, à composição das soluções de NP. Nestas, verifica-se que a concentração dos aminoácidos, bem como seus compostos constituintes, varia consideravelmente. Isto permite a existência de inúmeros equilíbrios no meio que são afetados por diversos fatores.

Outros fatores que podem explicar estes resultados são o tempo necessário para que ocorra a reação de formação do complexo, a idade das soluções (pode

promover a degradação ou formação de outras espécies em solução), a força iônica do meio e a temperatura das amostras de NP. Todos estes fatores são muito relevantes no que diz respeito às constantes de formação de complexos uma vez que estas são constantes condicionais, ou seja, dependem diretamente destes.

O uso de HPLC - AAS demonstrou que tanto o metal livre quanto o metal combinado não interagem com a coluna cromatográfica eluindo logo no início do processo cromatográfico.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MANUAL MERCK & CO., INC. (USA) seção 12 p 134, disponível em <<http://www.msd-BRAZIL.com>> acessado em 20 de setembro 2005.
2. HARRAKI, B., GUIRAUD, P., ROCHAT, M. H., ALARY, J. and FAVIER, A.; **Interactions related to trace elements in parenteral nutrition**, Pharm Acta Helv, v. 70, p. 269, 1995.
3. BUCHMAN, A L., NEELY, M., BRUCE GROSSIE JR, V., TRUONG, L., LYKISSA, E. and AHN, C.; **Organ Heavy-Metal accumulation during Parenteral Nutrition is associated with pathologic abnormalities in rats**, Nutrition, v. 17, p.600, 2001.
4. D'HAESE, P. C., VAN LANDEGHEM, G. F., LAMBERTS, L. V., DEBROE, M. E.; **Development and applications of a HPLC/ETAAS hybrid technique for studying the protein binding and speciation of trace metals in biological fluids**, Mikrochim Acta, v. 120, p. 83, 1995.
5. WAITABERG, D.L.; **Nutrição Enteral e Parenteral na prática clínica**, 2ª ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 1995.
6. MARTINS, P.; **Estudo da interação entre alumínio e aminoácidos que compõem soluções de nutrição parenteral**, Dissertação de Mestrado, UFSM, 2000.
7. PLUHATOR- MURTON, M. M., FEDORAK, R. N., AUDETTE, R. J., MARRIAGE, B. J., YATSCOFF, R. W., GRARULICH, L. M.; **Trace**

**element contamination of total parenteral nutrition. 1. Contribution of component solutions**, J Parenter Enter Nutr, v. 23, p. 222, 1999.

8. BINOTTO, R.; **Investigação sobre a origem da contaminação por alumínio em soluções de nutrição parenteral**, Dissertação de Mestrado, UFSM, 2001.

9. KLEIN, G. L., LEICHTNER, A. M., HEYMAN, M. B.; **Aluminium in large and small volume parenterals used in total parenteral nutrition: Response to the food and drug administration notice of proposed rule by the North American Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, J Ped Gastroen Nutr, v. 27 (4), p. 457, 1998.

10. GREENSTEIN, J. P., WINITZ, M.; **Chemistry of the amino acids**, volume II, Krieger Publishing Company, 1961.

11. TULLIUS, D. T. (Ed.); **Metal- DNA Chemistry**, Am Chem Soc, Washington, D.C., 1989.

12. CORNELIS, R., DEKIMPE, J.; **Elemental speciation in biological fluids**, J Anal Atom Spectrom, v. 9 (9), p. 945, 1994.

13. TEMPLETON, D. M.; **Acceleration of ionic reactions by naturally-occurring glycosaminoglycans 2**, Inorg Chim Acta, 153 (3), p. 165, 1988.

14. FISHBEIN, L., FURST, A., MEHLMAN M. A. (Eds.), **Genotoxic and Carcinogenic Metals: Enviromental and Occupational Ocurrence and Exposure**, Princeton Scientific, Princeton, N J, 1987.

15. VOGEL, A.; **Análise Inorgânica Quantitativa**, Guanabara Dois S. A. Editora, p. 195, 1981.

16. PEARSON, R. G., **Hard and soft acids and bases**, part I, J Chem, ed. 45 (9), p. 581-587, 1968.

17. COWAN, J. A.; **Inorganic Biochemistry: An Introduction**, New York: VCH Editora, p. 7, 1993.
18. STEPHEN, J. L., BERG, J. M.; **Principles of Bioinorganic Chemistry**, University Science Books, California, 1994.
19. BERTINI, I., GRAY, H.B., LIPPARD, S. J., VALENTINE, J. S., **Bioinorganic Chemistry**, University Science Books, California, 1994.
20. BERTHON, G.; **Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity**, *Coord Chem Rev*, v. 228 (2), p. 319, 2002.
21. 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*, v. 64, p. 1630, 1942.
22. DAVIES, C. W. and WAIN, G. M., *J. Am. Chem. Soc.*, v.301, 1950 (In GREENSTEIN, J. P., WINITZ, M.; **Chemistry of the amino acids**, volume II, Krieger Publishing Company, 1961).
23. NEVILLE, R. G. and GORIN, G., *J. Am. Chem. Soc.*, v.77, p. 5225, 1955 (In GREENSTEIN, J. P., WINITZ, M.; **Chemistry of the amino acids**, volume II, Krieger Publishing Company, 1961).
24. ROSSOTTI, H. S.; **Design and publication of work on stability-constants**, *Talanta*, v. 21 (8), p. 809, 1974.
25. AGUILAR, M., CORTINA, J. L., MARTINEZ, M., MIRALLES, N.; **Tablas de constantes de equilibrio**, Centre Publicacions D' Abast, Barcelona, p. 53, 1996.
26. GREENSTEIN, J. P., WINITZ, M.; **Chemistry of the amino acids**, Florida, Krieger Publishing Company, p. 487, 1984.

27.LI, N. C., DOODY, E.; **Acid dissociation constants and complex formation constants of several pyrimidine derivatives**, J Am Chem Soc, v. 76 (1), p. 221, 1954.

28.ALBERT, B. A., **Quantitative studies of the avidity of naturally occurring substances for trace metals .2. amino-acids having 3 ionizing groups**, Biochem J, v. 50 (5), p. 690, 1952.

29.MOTEKAITIS, R.J. Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database. Version 5.0, National Institute of Standards and Technology NIST : Gaithersburg, 1998.

30.PAVANETTO, F., GENTA, I., CONTI, B., et al; **Aluminum, cadmium and lead in large volume parenterals-contamination levels and sources**, Int J Pharm, v. 54 (2), p. 143, 1989.

31.GARCIA, T.A.; CORREDOR, L.; **Biochemical changes in the kidneys after perinatal intoxication with lead and/or cadmium and their antagonistic effects when coadministered**, Ecotox Environ Safe, v. 57, p. 184, 2004.

32.MUNDO DO QUÍMICO, disponível em [www.mundodoquimico.hpg.com.br](http://www.mundodoquimico.hpg.com.br) acessado em 29 de setembro 2005.

33.PATRIARCA, M. et al. **Levels of cadmium and lead in blood: an application of validated methods in a group of patients with endocrine/metabolic disorders from the Rome area**, Microchem J, v. 79, p. 349, 2005.

34.COUTINHO, F.M.B, GOMES, A.S., TEIXEIRA, V.G.; **Resinas poliméricas para separação e pré-concentração de chumbo**, Quim Nova, v. 27(2), p. 277, 2004.

35. BRZÓSKA, M. M., MONIUSZKO- JAKONIUK, J.; **Interactions between cadmium and zinc in the organism**, Food Chem Toxicol, v. 39 (10), p. 967, 2001.
36. GAETKE, L. M., CHOW, C. K.; **Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients**, Toxicology, v. 189, p. 147, 2003.
37. VALLEE, B. L., FALCHUK, K. H.; **The biochemical basis of zinc physiology**, Physiol Rev, v. 73, p. 79, 1993.
38. GOYER, R. A.; **Toxic and essential metal interactions**, Ann Rev Nutr, v.17, p. 37, 1997.
39. STUHNE- SEKALEC, L., XU, S. X., PARKERS, J. G., OLIVIERI, N. F., TEMPLETON, D. M.; **Speciation of tissue and cellular iron with on-line detection by inductively coupled plasma-mass spectrometry**, Anal Biochem, v.205 (2), p.278, 1992.
40. VOGEL, A.; **Análise química quantitativa**, 5<sup>a</sup> ed, Rio de Janeiro: LTC, 1992.
41. SKOOG, D.A., LEARY, J.J.; **Principles of Instrumental analysis**, 4<sup>a</sup> ed., Saunders College Publishing, 1992.
42. BAREK, J. et al.; **Polarography and voltammetry at mercury electrodes**, Crit Rev Anal Chem, v. 31, 291, 2001.
43. NURNBERG, H.W., VALENTA, P.; **Trace metals in sea water**, New York: Plenum Press, 1983.
44. GHONEIM, N. M. et al.; **Silmultaneous determination of Cd, Pb, Cu, Sb, Bi, Se, Zn, Mn, Ni, Co and Fe in water samples by differential pulse stripping voltammetry at a hanging mercury drop electrode**, Fresen J Anal Chem, v. 367, p. 378, 2000.

- 45.HARRIS, D.C.; **Química Analítica Quantitativa**, Rio de Janeiro: LTC Editora, 2001.
- 46.STOICA, A.-I. et al.; **Determination of cobalt in pharmaceutical products**, J Pharmaceut Biomed Analysis, v. 36, p. 653, 2004.
- 47.WANG, D. X., KOUDE, A.N., POLSKI, R.; **Electrochemical enzyme immunoassays on microchip platforms**, Anal Chem, 73 (21), p. 5576, 2001.
- 48.VAN DEN BERG, C.M.G; **In Chemical Oceanography**, London: Academic Press, p. 198, 1988.
- 49.GUTZ, I.G.R., CAVICCHIOLI, A.; **O uso de radiação ultravioleta para o pré-tratamento de amostras em análise inorgânica**, Quim Nova, v. 26, p. 913, 2003.
- 50.DUNEMANN, L., MEINERLING, M.; **Comparison of different microwave-based digestion techniques in view of their application to fat-rich foods**, Fresen J Anal Chem, v. 342, p. 714, 1992.
- 51.LABORATÓRIOS E CONTROLE DE PROCESSOS ON-LINE, Disponível em < <http://www.banasmetrologia.com.br>> acessado em 25 de setembro 2005.
- 52.MAYER, D. L., FRITZ, J. S.; **Semi-micro solid-phase extraction of organic compounds from aqueous and biological samples**, J Chromatogr A, v. 773, p. 189, 1997.
- 53.NAGHMUSH, A., PYRZYNSKA, K., TROJANOWICZ, M.; **Flame AAS determination of lead in water with flow-injection preconcentration and speciation using functionalized cellulose sorbent**, Talanta, v. 42, n. 6, p. 851, 1995.

54. JESUS, D. S. et alli; **Poliuretane foam as a sorbent for continuous flow analysis: preconcentration and spectrophotometric determination of zinc in biological materials**, Anal Chim Acta, v. 336, p. 263, 1998.

55. LIMA, R., LEANDRO, K. C., SANTELLI, R. E.; **Lead preconcentration onto C-18 minicolumn in continuous flow and its determination in biological and vegetable samples by flame atomic absorption spectrometry**, Talanta, v. 43, p. 977, 1975.

56. TORRE, M and MARINA, M. L.; **The state-of-the-art of ligand-loaded complexing resins-characteristics and applications**, Crit Rev Anal Chem, v. 24 (5-6), p. 327, 1994.

57. SCHWEDT, G. and NASCIMENTO, D. B.; **Polyethylene powder as an absorbent for preconcentration of aluminium, beryllium and thallium**, Mikrochim Acta, v.126 (1-2), p. 159, 1997.

58. BOHRER, D.; NASCIMENTO, P. C.; GUTERRES, M.; TREVISAN, M. and SEIBERT, E.; **Electrothermal atomic absorption spectrometric determination of lead, cadmium, copper and zinc in high-salt content samples after simultaneous separation on polyethylene powder impregnated with 1- (2-pyridylazo)-2- naphthol: application to the analysis of hemodialysis fluids**, Analyst, v. 124, p. 1345, 1999.

59. ANDERSON, R.; **Sample Pretreatment and Separation Analytical Chemistry by Opening Learning**, Chichester: John Wiley 1991.

60. ZIMMERMANN, S. et al.; **Trace analysis of platinum in biological samples: a comparison between sector field ICP-MS and adsorptive cathodic stripping voltammetry following different digestion procedures**, Anal Chim Acta, v. 439, p. 203, 2001.

61. TUROCZY, N.J., LAMBERT, D.F.; **Comparison of digestion methods for the determination of selenium in fish tissue by CSV**, *Anal Chim Acta*, v. 408, p. 97, 2000.
62. DUCROS, V. et al.; **Comparison of digestion methods for the determination of selenium in biological samples**, *Analyst*, v. 119, p. 1715, 1994.
63. GOLIMOWSKI, J., TYKARSKA, A.; **Voltammetric methods for the determination of heavy metals in domestic waste and compost produced from it**, *Fresen J Anal Chem*, v. 349, p. 620, 1994.
64. KOKOT, S. et al.; **Microwave Digestion: an analysis of procedures**, *Anal Chim Acta*, v. 259, p. 267, 1992.
65. NOBREGA, J.A. et al.; **Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation**, *Spectrochim Acta B*, v. 57, p. 1855, 2002.
66. PECORARO, E.; DAVOLOS, M.R.; JAFELICCI Jr, M.; **Adaptações para fornos de microondas doméstico para utilização em laboratório**, *Quim Nova*, v. 20, p. 89, 1997.
67. KARANASSIOS, V. et al.; **Rapid Stopped-flow microwave digestion system**, *J Anal Atom Spectrom*, v. 06, p. 457, 1991.
68. VASCONCELOS, M. T. S. D., LEAL, M. F. C.; **Speciation of Cu, Pb, Cd and Hg in waters of the Oporto coast in Portugal, using pre-concentration in a Chelamine resin column**, *Anal Chim Acta*, v. 353 (2-3), p.189, 1997.
69. VAN DEN BERG, C.M.G., ACHTERBERG, E.P.; **In-line ultraviolet-digestion of natural water samples for trace metal determination using an automated voltammetric system**, *Anal Chim Acta*, v. 291, 213, 1994.

70.KAUTSKY, H., MURRAY, C. N.; **Artificial radioactivity in the North-Sea**, Atom Energ Rev, v.63 (2), p. 105, 1981.

71.HAAG, W. R.; HOLGNE, J.; **Singlet oxygen in surface waters .3. photochemical formation and steady-state concentrations in various types of waters**, Environ Sci Technol, v. 20 (4), p. 341, 1986.

72.MERKEL, P. B., KEARNS, D. R.; **Radiationless decay of singlet molecular-oxygen in solution- experimental an theoretical study of electronic- to- vibrational energy-transfer**, J Am Chem Soc, v. 94 (21), p. 7244, 1972.

73.BAXTER, R. M., CAREY, J. H.; **Evidence for photochemical generation of superoxide ion in humic waters**, Nature, v. 306 (5943), p. 575, 1983.

74.SANDER S., WAGNER, W., HENZE, G.; **Direct determination of uranium traces by adsorptive stripping voltammetry**, Anal Chim Acta, v. 305 (1-3), p. 154, 1995.

75.CALVOSA, L., MONTEVERDI, A., RINDOME, B., RIVA, G.; **Ozone oxidation of compounds resistant to biological degradation**, Water Res, v. 25 (8), p. 985, 1991.

76.GOLIMOWSKI, J., GOLIMOWSKA, K.; **UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples**, Anal Chim Acta, v. 325, p. 111, 1996.

77.KOLB, M. et al.; **Investigations of oxidative UV photolysis**, Fresen J Anal Chem, v. 342, p. 341, 1992.

78.BATLEY, G.E., FARRAR, Y. J.; **Irradiation techniques for the release of bound heavy metals in natural waters and blood**, Anal Chim Acta, v. 99, p. 283, 1978.

79.SMYTH, W. F., OXSPRING, D.A., MAXWELL, T.J.; **UV-visible spectrophotometric, AdSV and CE study of PADAP and its chelates with selected metal ions: application to the determination of Co(III) in vitamin B<sub>12</sub>**, , Anal Chim Acta, v.323, p. 97, 1996.

80.WORSFOLD, P.J. et al.; **UV digestion of seawater samples prior to the determination pf copper using flow injection with chemiluminescence detection**, Anal Chim Acta, v.440, p. 27, 2001.

81.DUNEMANN, L.; TURFELD, M.; BEGEROW, J.; **Determination of physiological palladium, platinum, iridium and gold levels in human blood using ICP-MS**, J Anal Atom Spectrom, v. 12, p. 1095, 1997.

82.DEYL, Z.; HORAKOVA, M.; **Profiling of amino-acids in body-fluids and tissues by means of liquid-chromatography**, J Chromatogr, v. 379, p. 177, 1986.

83.BAFFI, F.; IANNI, M. C.; CARDINALE, A. M. et al.; **Study of reversed-phase c-18-silica in liquid-chromatography for the determination of free dissolved amino-acids and copper (II) amino- acid complexes at the picomole level in marine matrices** Anal Chim Acta, v. 260 (1), p. 99, 1992.

84.GEORGI, G., PIETSCH, C., SAWATZKI, G.; **High-performance liquid-chromatographic determination of amino-acids in protein hydrolysates and in plasma using automated precolumn derivatization with o-phthaldialdehyde 2-mercaptoethanol**, J Chromatogr- Biomed Appl, v. 613 (1), p. 35, 1993.

85.FERMO, I., VECCHI, E., DIOMEDE, L. et al.; **Serum amino-acid-analysis with precolumn derivatization- comparison of the ortho-phthaldialdehyde and N,N- diethyl-2,4-dinitro-5-fluoroaniline methods**, J Chromatogr- Biomed Appl, v. 534, p. 23, 1990.

86.HAMILTON, P.B., ANDERSON, R.A., **Ion exchange chromatography of amino acids- semiautomatic method of operation with cationic exchange resin columns**, Anal Chem, v. 31 (9), p. 1504, 1959.

87.BENSON, J.R., HARE, P.E., **Ortho-phthalaldehyde- fluorogenic detection of primary amines in picomole range-comparison with fluorecamine and ninhydrin**, Proc Natl Acad Sci USA, v. 72 (2), p. 619, 1975.

88.JONES, B.N.; PAÄBO, S.; STEIN, S.; **Amino-acid-analysis and enzymatic sequence determination of peptides by an improved ortho-phthaldialdehyde pre-column labeling procedure**, J Liq Chromatogr, v. 4 (4), p. 565, 1981.

89.HEINRIKSON, R.L.; MEREDITH, S.C.; **Amino-acid-analysis by reverse-phase high-performance liquid-chromatography-precolumn derivatization with phenylisothiocyanate**, Anal Biochem, v. 136 (1), p. 65, 1984.

90.WIEDMEIJER, V.T., PORTERFIELD, S.P., HENDRICH, C.E.; **Quantitation of DNS-amino acids from body-tissues and fluids using high-performance liquid-chromatography**, J Chromatogr, v. 231 (2), p. 410, 1982.

91.EINARSSON, S., JOSEFSSON, B., LAGERKVIST, S., **Determination of amino-acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed- phase high-performance liquid-chromatography**, J Chromatogr, v. 282, p. 609, 1983.

92.MORTON, R.C., GERBER, G.E., **Amino-acid analysis by dinitrophenylation and reverse-phase high-pressure liquid-chromatography**, Anal Biochem, v. 170 (1), p. 220, 1988.

93. KOCHBAR, S., CHRISTEN, P.; **Amino-acid analysis by high-performance liquid-chromatography after derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alanine amide**, *Anal Biochem*, v. 178 (1), p. 17, 1989.
94. FÜRST, P., POLLACK, L., GRASER, T. A. et al.; **Appraisal of 4 precolumn derivatization methods for the high-performance liquid-chromatographic determination of free amino-acids in biological-materials**, *J Chromatogr*, v. 499, p. 557, 1990.
95. MCCLUNG, G., FRANKENBERGER, W.T.; **Comparison of reverse-phase high-performance liquid-chromatographic methods for precolumn-derivatized amino-acids**, *J Liq Chromatogr*, v. 11 (3), p. 613, 1988.
96. CHAPPUIS, P., ARNAUD, J., JAUDON, M. C., ZAWISLAK, R., BELLANGER, J.; **Concentration of zinc, copper, selenium and aluminium in parenteral nutritive solutions**, *Annales de Biologie Clinique*, v. 49 (8), p. 421, 1991.
97. PAVANETTO, F., GENTA, I., CONTI, B., MODENA, T. and MONTANARI, L.; **Particulate matter contamination of small volume parenterals**, *Int J Pharm*, v. 51 (1), p. 55, 1989.
98. BOHRER, D., NASCIMENTO, P.C., POMBLUM, S., BINOTTO, R., BECKER, E.; **Contribution of the raw material to the aluminum contamination in parenterals**, *J Parenter Enter Nutr*, v.26 (6), p. 382, 2002.
99. LEUNG, F. Y., GRACE, D. M., ALFIERI, M. A. H., BRADLEY, C.; **Abnormal trace-elements in a patient on total parenteral-nutrition with normal renal-function**, *Clin Biochem*, v. 28 (3), p. 297, 1995.
100. LEUNG, F. Y., GRACE, D. M., ALFIERI, M. A. H.; **Selenium and zinc levels in surgical patients receiving total parenteral nutrition**, *Biol Trace Elem Res*, v. 61 (1), p. 33, 1998.

101. MAHAFFEY, K. R.; **Toxicity of lead, cadmium and mercury- considerations for total parenteral nutritional support**, Bull. N. Y. Acad. Med., v. 60 (2), p.196, 1984.
102. VAN DEN BERG, C.M.G; **In Chemical Oceanography**, London: Academic Press, p. 198, 1988.
103. BOHRER, D., POMBLUM, S. G., NASCIMENTO, P. C., BASTIANELLO, J. S., RAMIREZ, A.; **Determination of nickel, manganese, copper and zinc in blood serum by atomic absorption spectrometry after deproteinization by microwave irradiation**, Anal Letters, v. 33, p. 1265, 2000.
104. WANG, J., XU, D., KAWDE, A. N. and POLSKY, R.; **Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization**, Anal Chem, v.73 (22), p. 5576, 2001.
105. OMANOVIC, D. and BRANICA, M.; **Pseudopolarography of trace metals- Part I. The automatic ASV measurements of reversible electrode reactions**, J Electroanal Chem, v. 543 (1), p. 83, 2003.
106. BONFIL, Y. and EISNER, E. K.; **Determination of nanomolar concentrations of lead and cadmium by anodic- stripping voltammetry at the silver electrode**, Anal Chim Acta, v. 457 (2), p. 285, 2002.
107. LU, T. H.; YANG, H. Y. and SUN, I. W.; **Square-wave anodic stripping voltammetric determination of thallium (I) at a Nafion mercury film modified electrode**, Talanta, v.49 (1), p. 59, 1999.
108. HASSAN, H. N. A., HAUSSOUNA, M. E. M. and HABIB, I. H. I., **Multivariate analysis of Cd (II), In (III), Tl (I) and Pb (II) in mixtures using square wave anodic stripping voltammetry**, Talanta, v. 46 (5), p. 1195, 1998.

109. BOHRER, D. and SCHWEDT, G.; **Anodic stripping voltammetric determination of thallium as [TlBr<sub>4</sub>]-rhodamine B complex**, *Fresen J Anal Chem*, v. 362 (2), p. 224, 1998.
110. COLOMBO, C., VAN DEN BERG, C. M. G. and ANNE DANIEL; **A flow cell for on-line monitoring of metals in natural waters by voltammetry with a mercury drop electrode**, *Anal Chim Acta*, v.346 (1), p. 101, 1997.
111. SAUR, D. in: BRUTTEL, P. A.; SCHAFFER, J. (Eds.), **Sample Preparation Techniques in Voltammetric Trace Analysis**, Metrohm, Herisau, Switzerland, 1992.
112. GORSUCH, T. T., **The Destruction of Organic Matter**, Pergamon Press, Oxford, 1970.
113. KINGSTON, H. M. 'SKIP'; HASWELL, S. J. (Eds.), **Microwave-Enhanced Chemistry Fundamentals, Sample Preparation and Applications**, Am Chem Soc, Washington, 1997.
114. MILL, T., HENDRY, D. G. and RICHARDSON, H.; **Free-radical oxidants in natural-waters**, *Science*, v. 207 (4433), p. 886, 1989.
115. BOHRER, D.; NASCIMENTO, P.C.; POMBLUM, S.G. **Deproteinization of blood serum by acid treatment and microwave irradiation for the determination of aluminium by electrothermal atomic absorption spectrometry**, *Anal Atom Spectrom*, v. 13, p. 635, 1998.
116. NASCIMENTO, P.C. et al. **Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection of ethylenethiourea in blood serum after microwave irradiation as an auxiliary cleanup step**, *Analyst*, v.122, 733, 1997.
117. HOLME, D. J., PECK, H.; **Analytical biochemistry**, 3rd edn. Prentice Hall, England, 1998

118. FEKKES, D.; **State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples**, J Chromatogr B, v. 682, p. 3, 1996.

119. MILLER, J.C., MILLER, J.N.; **Estadística para Química Analítica**, Delaware : Addison-Wesley Iberoamerican, p. 100, 1993.

120. MENDONÇA, J. K. A.; **Interação de alumínio com ânions de baixo peso molecular e alguns aminoácidos presentes no sangue**, Tese de Doutorado, UFSM, 2003.

121. CARVALHO, C. W.; **Avaliação de procedimentos de digestão voltamétrica de traços metálicos em aminoácidos usados em nutrição parenteral-aplicação na determinação de cádmio e chumbo**, Dissertação de Mestrado, UFSM, 2004.

122. PARAMÁS, A. M. G., BÁREZ, J.A. G. , MARCOS, C. C., GARCIA-VILLANOVA, R. J., SÁNCHEZ, J. S.; **HPLC- fluorimetric method for analysis of amino acids in products of the hive (honey and bee-pollen)**, Food Chem, article in press disponível em [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com), 2005.

123. DIN 38406 Part 16 **Verfahren zur Bestimmung von Zink, Cadmium, Blei, Kupfer, Thallium, Nickel, Cobalt mittels Voltammetrie. E16 Deutsche Einheitsverfahren.**

## APÊNDICE A

As soluções de NP de pequeno volume utilizadas nos ensaios de separação e pré-concentração dos metais foram:

Amostra	Fabricante
Água para injeção	Cellofarm
NaCl 10%	Aster
KCl 10%	Aster
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2 mEq/mL	Aster
Glicose 25%	Aster

O nome comercial, o fabricante e a composição das soluções de NP de grande volume utilizadas neste trabalho estão descritos a seguir.

	Nome comercial	Fabricante
A	Aminosteril Hepa 8%	Fresenius Laboratórios Ltda.
B	Aminon 20	JP Indústria Farmacêutica S.A.
C	Soramim 10%	Darrow Laboratórios S/A.
D	Aminoplasmal L – 10 <sup>A</sup>	Laboratórios B. Braun S.A.
E	Aminosteril 10%	Fresenius Laboratórios Ltda.
F	Aminoped 10%	Fresenius Laboratórios Ltda.
G	Aminosteril Nefro	Fresenius Laboratórios Ltda.
H	Nefroamino	Laboratórios B.Braun S.A.

Composição das soluções de NP de acordo com os fabricantes.

Aminoácido (g L <sup>-1</sup> )	Marcas							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Ile	10,4	5,10	3,7	5,1	5,0	6,40	7,5	7,0
Leu	13,1	8,90	9,8	8,9	7,4	10,8	11,4	11,0
Lys	6,9	7,90	5,9	7,9	6,6	7,1	9,6	11,3
Met	1,1	3,80	5,3	3,8	4,3	4,6	6,6	11,0
Cis2	0,5	--	0,3	--	--	--	--	--
Phe	0,9	5,10	5,4	5,1	5,1	4,6	7,8	11,0
Thr	4,4	4,10	8,9	4,1	4,4	5,2	6,8	5,0
Ala	4,6	13,70	10,3	13,7	15,0	7,2	--	--
Pro	5,8	8,90	8,4	8,9	15,0	16,2	--	--
Gly	5,5	7,90	8,0	7,9	14,0	4,1	--	--
Trp	--	1,80	1,80	1,8	2,0	1,8	2,9	2,5
Val	--	4,80	5,3	4,8	6,2	7,1	9,5	8,0
Arg	--	9,20	10,6	9,2	12,0	6,4	--	--
His	--	5,20	4,6	5,2	3,0	4,1	4,9	5,5
Asp	--	1,30	2,7	1,3	--	--	--	--
Asn	--	3,30	3,8	3,3	--	--	--	--
Cys	--	0,72	--	--	--	0,4	--	--
Glu	--	4,60	2,5	4,6	--	--	--	--
Orn	--	3,20	2,6	3,2	--	--	--	--
Ser	--	2,40	2,5	2,4	--	9,0	--	--
N-Tyr	--	1,60	--	1,6	--	--	--	--
Tyr	--	--	1,6	--	--	5,5	--	--

Não estão descrito na tabela os outros componentes das soluções de NP.

## APÊNDICE B

### Parâmetros experimentais das medidas voltamétricas

1) Para as soluções de NP de pequeno volume:

Eletrólito suporte -  $\text{HClO}_4$  1%

Volume total na célula voltamétrica – 5 mL (1,5 mL de eluato e 3,5 mL de água)

Eletrodo de trabalho - HMDE (eletrodo de mercúrio de gota pendente)

Tamanho da gota –  $0,6 \text{ mm}^2$

Velocidade de rotação da agitação na pré-concentração - 2000 rpm

Modo de medida – pulso diferencial (DP)

Tempo de purga (desaeramento da solução) – 300 s

Amplitude de pulso – 0,05 V

Duração do pulso – 40 ms

Potencial de deposição - -1,10 V

Tempo de pré-concentração – 90 s

Faixa de varredura de potenciais - entre -1,10 e + 0,1 V

Velocidade de varredura –  $0,06 \text{ V s}^{-1}$

2) Para as soluções de NP de grande volume:

A determinação voltamétrica foi feita de acordo com a norma DIN 38406 parte 16[123].

Eletrólito suporte - 1 mL da solução tampão KCl/NaCH<sub>3</sub>COO pH 4,6

Volume total na célula voltamétrica – 11 mL (10 mL da amostra e 1 mL de eletrólito).

Eletrodo de trabalho - HMDE (eletrodo de mercúrio de gota pendente)

Tamanho da gota – 0,6 mm<sup>2</sup>

Velocidade de rotação da agitação na pré-concentração - 2000 rpm

Modo de medida – pulso diferencial (DP)

Tempo de purga (desaeramento da solução) – 300 s

Amplitude de pulso – 0,05 V

Duração do pulso – 40 ms

Potencial de deposição - -1,15 V

Tempo de pré-concentração – 120 s

Faixa de varredura de potenciais - entre -1,15 e + 0,1 V

Velocidade de varredura – 0,06 V s<sup>-1</sup>

## APÊNDICE C

Condições de operação do AAS e programas de temperatura empregados na análise de zinco, cádmio, chumbo e cobre.

### Parâmetros de operação do instrumento.

	Zinco	Cádmio	Chumbo	Cobre
<i>Monocromador</i>				
Comp. de onda (nm)	231,9	228,8	283,3	324,8
Corrente da lâmpada (mA)	5	4	5	4
Largura da fenda espectral (nm)	1,0	0,5	0,5	0,5
<i>Condições do forno<sup>a</sup></i>				
Volume de amostra (µL)	2	10	5	5
Volume total (µL <sup>b</sup> )	12	20	15	15
Faixa de concentração (µg L <sup>-1</sup> )	10-30	2-8	20-80	20-60

<sup>a</sup> Sem plataforma e sem modificador. <sup>b</sup> Volume amostra + enxágüe (H<sub>2</sub>O – C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 3+2).

Os programas de temperatura foram os programas padrões do instrumento

*Programa de temperatura - Zinco*

Etapa	Temperatura ( °C)	Tempo (s)	Fluxo gás (1 min <sup>-1</sup> )
1	85	5,0	3,0
2	95	40,0	3,0
3	120	10,0	3,0
4	300	5,0	3,0
5	300	1,0	3,0
6	300	2,0	0
7	1900	0,8	0*
8	1900	2,0	0*
9	1900	2,0	3,0

\* etapas onde foi realizada a medida.

*Programa de temperatura - Cádmio*

Etapa	Temperatura ( °C)	Tempo (s)	Fluxo gás (1 min <sup>-1</sup> )
1	85	5,0	3,0
2	95	40,0	3,0
3	120	10,0	3,0
4	250	5,0	3,0
5	250	1,0	3,0
6	250	2,0	0
7	1800	0,8	0*
8	1800	2,0	0*
9	1800	2,0	3,0

\* etapas onde foi realizada a medida.

*Programa de temperatura - Chumbo*

Etapa	Temperatura ( °C)	Tempo (s)	Fluxo gás (1 min <sup>-1</sup> )
1	85	5,0	3,0
2	95	40,0	3,0
3	120	10,0	3,0
4	400	5,0	3,0
5	400	1,0	3,0
6	400	2,0	0
7	2100	1,0	0*
8	2100	2,0	0*
9	2100	2,0	3,0

\* etapas onde foi realizada a medida.

*Programa de temperatura - Cobre*

Etapa	Temperatura ( °C)	Tempo (s)	Fluxo gás (1 min <sup>-1</sup> )
1	85	5,0	3,0
2	95	40,0	3,0
3	120	10,0	3,0
4	800	5,0	3,0
5	800	1,0	3,0
6	800	2,0	0
7	2300	1,1	0*
8	2300	2,0	0*
9	2300	2,0	3,0

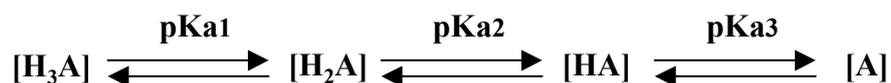
\* etapas onde foi realizada a medida.

## APÊNDICE D

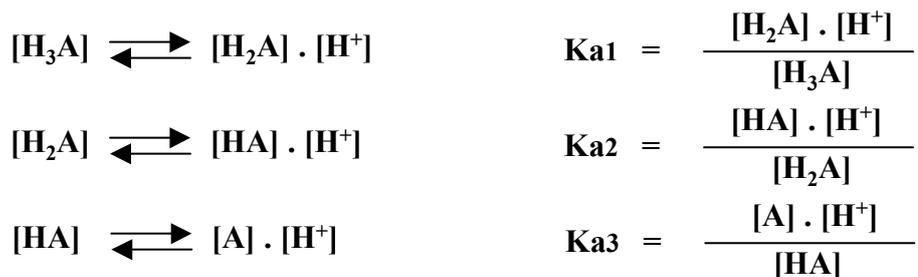
### Diagrama da composição fracionária dos aminoácidos em diferentes valores de pH.

A dedução das equações de composição fracionária para um sistema triprótico (aminoácidos estudados), segue o mesmo padrão utilizado para o sistema diprótico descrito na literatura [132].

Os nove aminoácidos estudados podem doar ou aceitar dois ou três prótons. Abaixo, estão apresentados de forma genérica os equilíbrios envolvidos num sistema triprótico.



Onde as constantes de equilíbrio dos aminoácidos, nos diferentes estados de protonação, podem ser descritas da seguinte forma:



O balanço de massa das concentrações dos aminoácidos nos diferentes estados de protonação está descrito na equação abaixo, sendo F a soma das frações dos aminoácidos:

$$F = [\text{H}_3\text{A}] + [\text{H}_2\text{A}] + [\text{HA}] + [\text{A}]$$

ou

$$1 = \alpha[\text{H}_3\text{A}] + \alpha[\text{H}_2\text{A}] + \alpha[\text{HA}] + \alpha[\text{A}]$$

Assim, deduziram-se as equações das frações de um ácido triprótico, considerando as constantes de equilíbrio das espécies:

$$\alpha_{\text{H}_3\text{A}} = \frac{[\text{H}_3\text{A}]}{F} = \frac{[\text{H}^+]^3}{[\text{H}^+]^3 + [\text{H}^+]^2 K_{a1} + [\text{H}^+] K_{a1} \cdot K_{a2} + K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}}$$

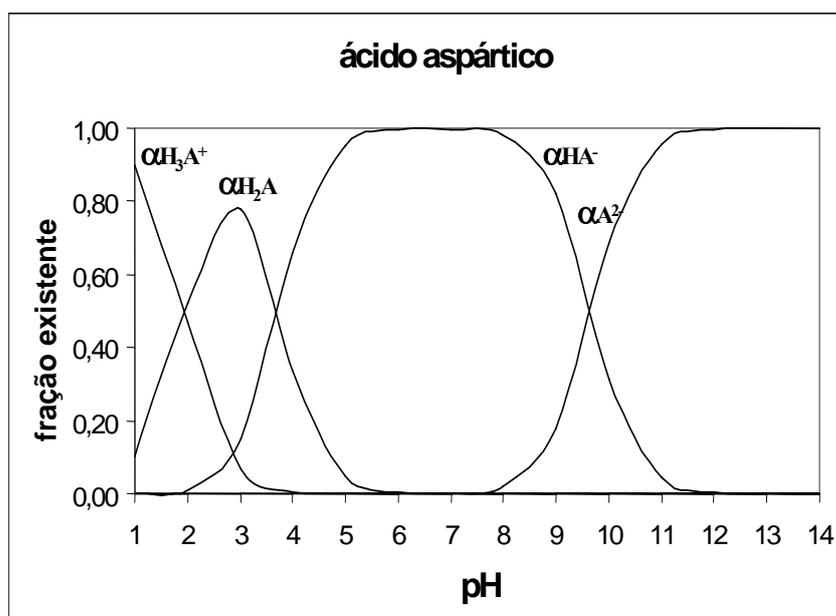
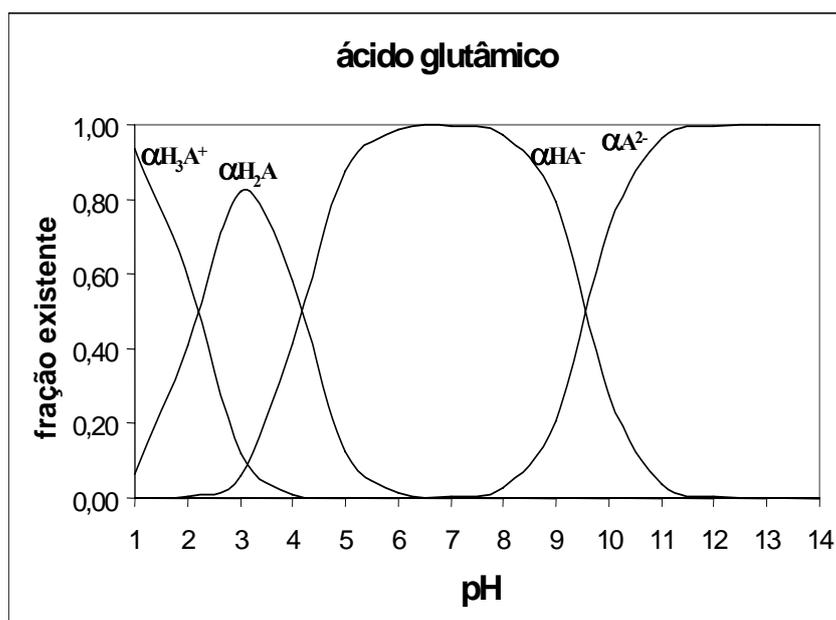
$$\alpha_{\text{H}_2\text{A}} = \frac{[\text{H}_2\text{A}]}{F} = \frac{K_{a1} [\text{H}^+]^2}{[\text{H}^+]^3 + [\text{H}^+]^2 K_{a1} + [\text{H}^+] K_{a1} \cdot K_{a2} + K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}}$$

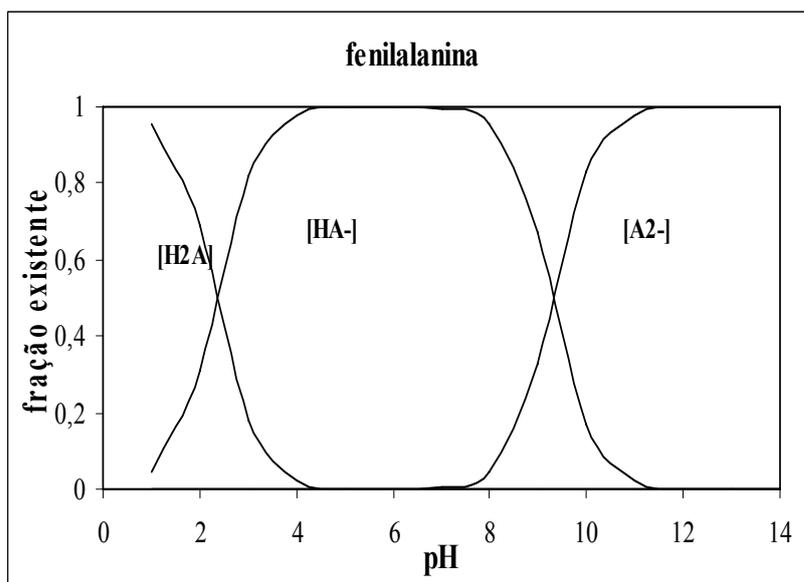
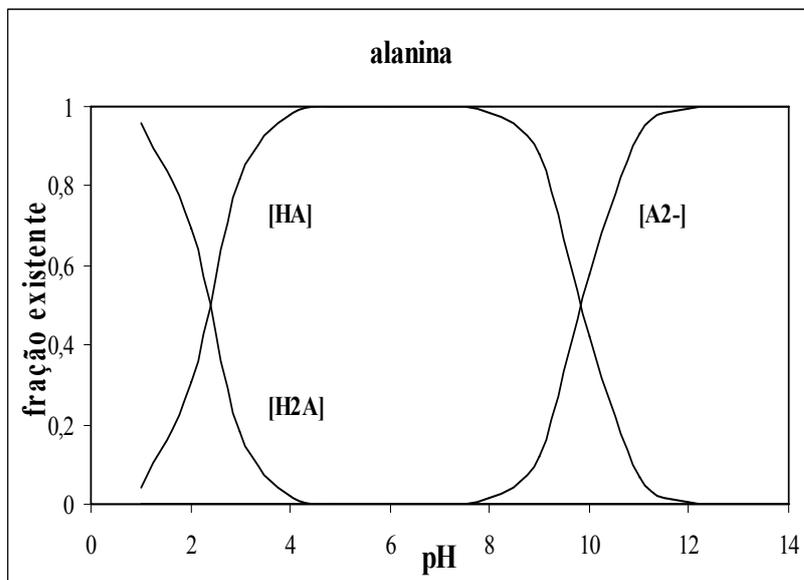
$$\alpha_{\text{HA}} = \frac{[\text{HA}]}{F} = \frac{K_{a1} \cdot K_{a2} [\text{H}^+]}{[\text{H}^+]^3 + [\text{H}^+]^2 K_{a1} + [\text{H}^+] K_{a1} \cdot K_{a2} + K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}}$$

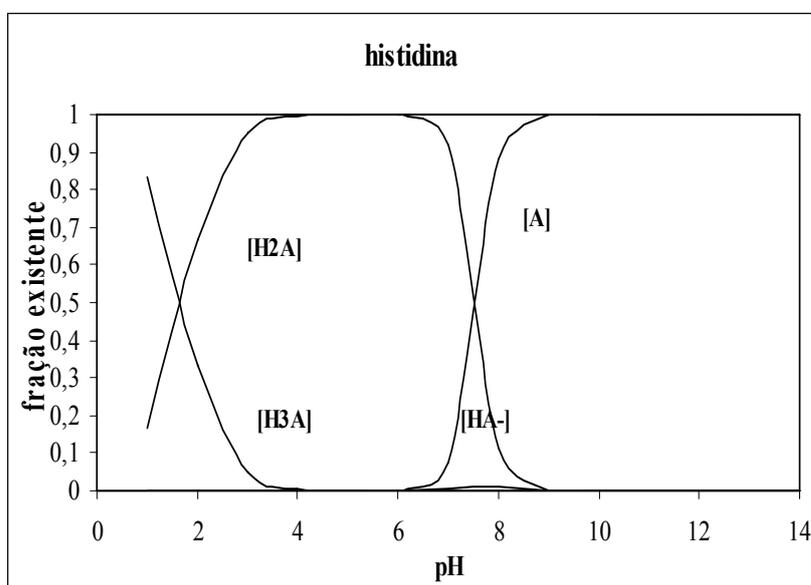
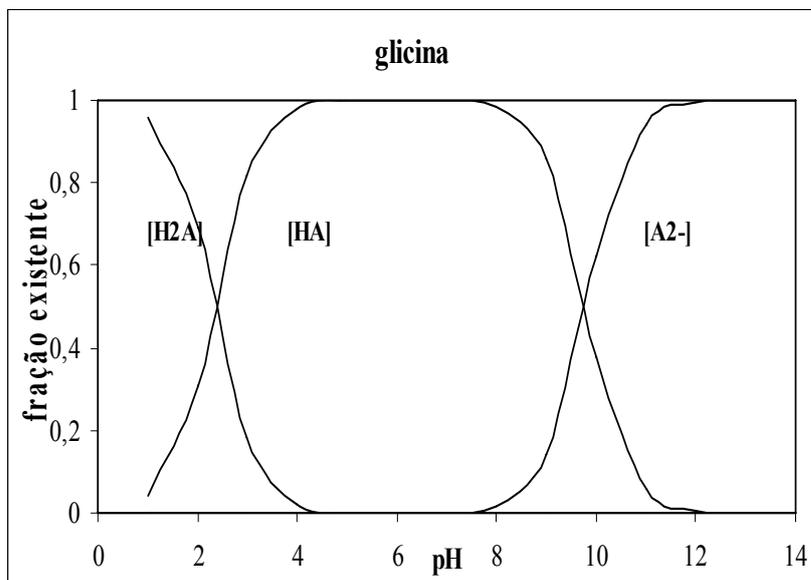
$$\alpha_{\text{A}} = \frac{[\text{A}]}{F} = \frac{K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}}{[\text{H}^+]^3 + [\text{H}^+]^2 K_{a1} + [\text{H}^+] K_{a1} \cdot K_{a2} + K_{a1} \cdot K_{a2} \cdot K_{a3}}$$

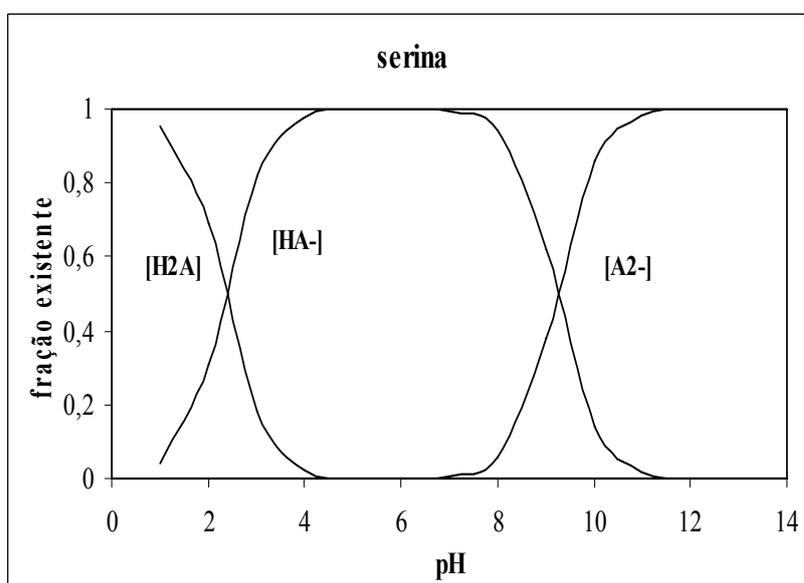
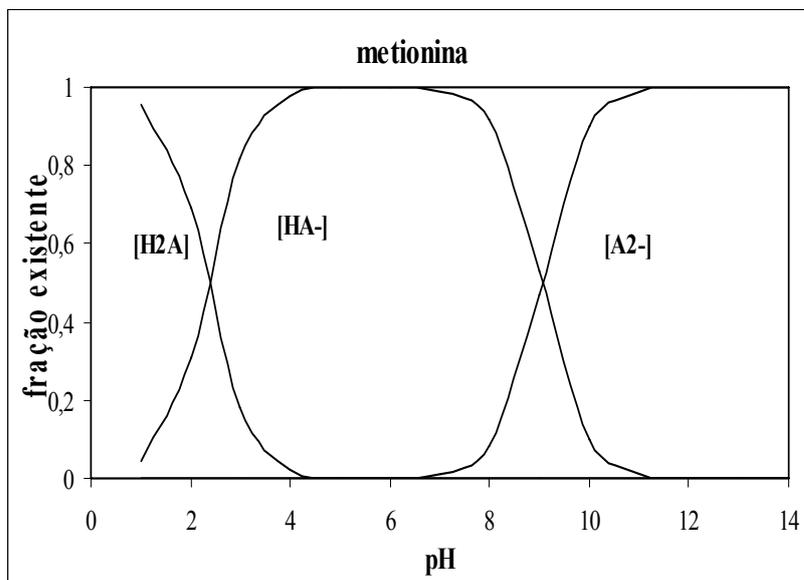
Para os aminoácidos dipróticos fez-se o mesmo cálculo.

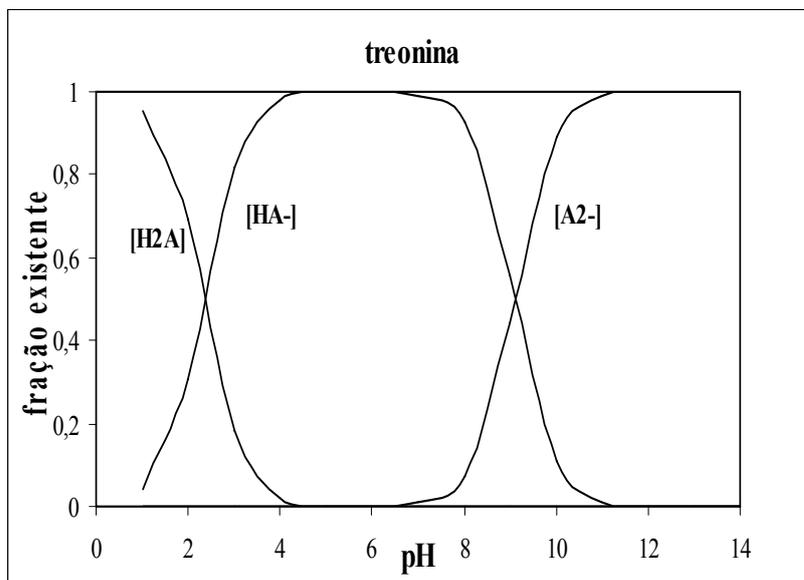
Com as equações acima e os valores das constantes de acidez de cada aminoácido (pKa), construiu-se os diagramas de composição fracionária (no Excel). São eles:







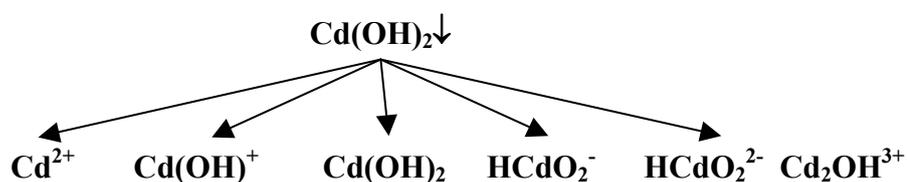




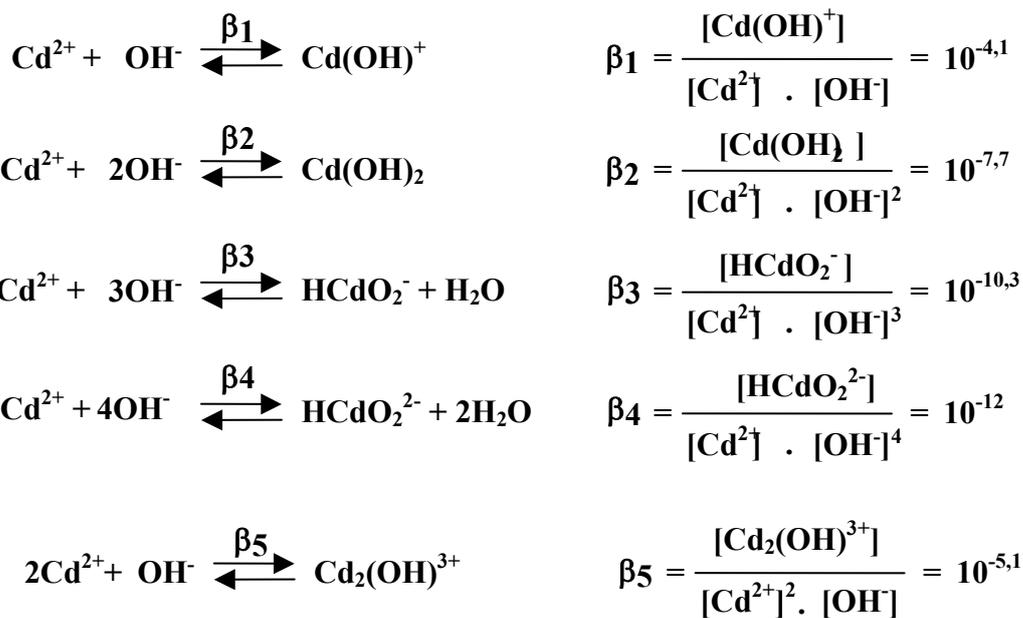
## APÊNDICE E

### Diagrama de solubilidade das espécies em uma solução de cádmio e em uma solução de chumbo.

Os hidróxidos metálicos nunca se dissolvem originando unicamente a espécie  $\text{Me}^{n+}$  e íons  $\text{OH}^-$ ; sempre aparecem em dissolução hidroxocomplexos do cátion com as variações do seu número de coordenação. Este é o caso de uma solução aquosa de Cd, onde se tem as seguintes espécies em solução [133]:



Pode-se calcular facilmente a concentração de cada uma destas espécies em equilíbrio com o precipitado de  $\text{Cd(OH)}_2$ , em qualquer pH, conhecendo as seguintes constantes:



$$K_s = 10^{-14,4} = [\text{Cd}^{2+}] + [\text{OH}^-]^2$$

Através da equação do produto de solubilidade ( $K_s$ ), tem-se o valor de  $[\text{Cd}^{2+}]$ , e substituindo esse valor nas equações  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$  e  $\beta_5$  têm-se as equações logarítmicas das outras espécies:

$$\log [\text{Cd}^{2+}] = 13,6 - 2 \text{ pH}$$

$$\log [\text{Cd(OH)}^+] = -4,5 - \text{pH}$$

$$\log [\text{Cd(OH)}_2] = -22,1$$

$$\log [\text{HCdO}_2^-] = -38,7 + \text{pH}$$

$$\log [\text{HCdO}_2^{2-}] = -54,4 + 2 \text{ pH}$$

$$\log [\text{Cd}_2\text{OH}^{3+}] = 8,1 - 3 \text{ pH}$$

## Diagrama da composição fracionária das espécies de cádmio em diferentes valores de pH

O balanço de massas das concentrações das espécies está descrito na equação abaixo, sendo F a soma das frações dos aminoácidos:

$$F = [\text{Cd}^{2+}] + [\text{Cd}(\text{OH})^+] + [\text{Cd}(\text{OH})_2] + [\text{HCdO}_2^-] + [\text{HCdO}_2^{2-}] + [\text{Cd}_2\text{OH}^{3+}] \quad \text{ou}$$

$$1 = \alpha\text{Cd}^{2+} + \alpha\text{Cd}(\text{OH})^+ + \alpha\text{Cd}(\text{OH})_2 + \alpha\text{HCdO}_2^- + \alpha\text{HCdO}_2^{2-} + \alpha\text{Cd}_2\text{OH}^{3+}$$

Desta forma, deduziu-se a equação de cada uma das frações, considerando as constantes de equilíbrio das espécies ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ,  $\beta_4$  e  $\beta_5$ ):

$$\alpha\text{Cd}^{2+} = \frac{[\text{Cd}^{2+}]}{F} = \frac{1}{1 + \beta_1[\text{OH}^-] + \beta_2[\text{OH}^-]^2 + \beta_3[\text{OH}^-]^3 + \beta_4[\text{OH}^-]^4 + \beta_5[\text{OH}^-]}$$

$$\alpha\text{Cd}(\text{OH})^+ = \frac{[\text{Cd}(\text{OH})^+]}{F} = \frac{\beta_1[\text{OH}^-]}{1 + \beta_1[\text{OH}^-] + \beta_2[\text{OH}^-]^2 + \beta_3[\text{OH}^-]^3 + \beta_4[\text{OH}^-]^4 + \beta_5[\text{OH}^-]}$$

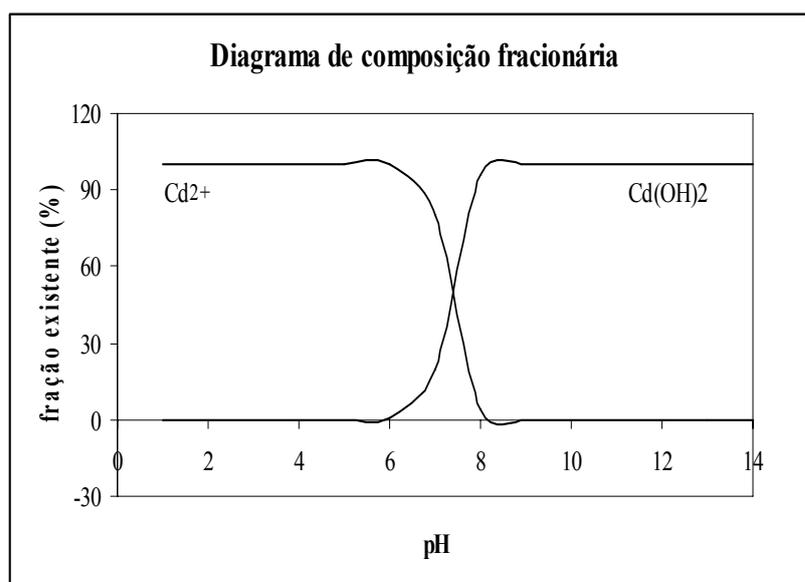
$$\alpha\text{Cd}(\text{OH})_2 = \frac{[\text{Cd}(\text{OH})_2]}{F} = \frac{\beta_2[\text{OH}^-]^2}{1 + \beta_1[\text{OH}^-] + \beta_2[\text{OH}^-]^2 + \beta_3[\text{OH}^-]^3 + \beta_4[\text{OH}^-]^4 + \beta_5[\text{OH}^-]}$$

$$\alpha_{\text{HCdO}_2^-} = \frac{[\text{HCdO}_2^-]}{F} = \frac{\beta_3[\text{OH}^-]^3}{1 + \beta_1[\text{OH}^-] + \beta_2[\text{OH}^-]^2 + \beta_3[\text{OH}^-]^3 + \beta_4[\text{OH}^-]^4 + \beta_5[\text{OH}^-]^5}$$

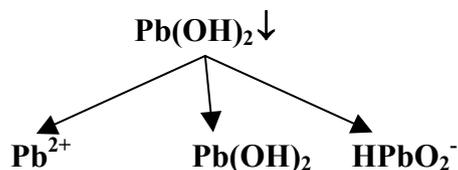
$$\alpha_{\text{HCdO}_2^{2-}} = \frac{[\text{HCdO}_2^{2-}]}{F} = \frac{\beta_4[\text{OH}^-]^4}{1 + \beta_1[\text{OH}^-] + \beta_2[\text{OH}^-]^2 + \beta_3[\text{OH}^-]^3 + \beta_4[\text{OH}^-]^4 + \beta_5[\text{OH}^-]^5}$$

$$\alpha_{\text{Cd}_2\text{OH}^{3+}} = \frac{[\text{Cd}_2\text{OH}^{3+}]}{F} = \frac{\beta_5[\text{OH}^-]^5}{1 + \beta_1[\text{OH}^-] + \beta_2[\text{OH}^-]^2 + \beta_3[\text{OH}^-]^3 + \beta_4[\text{OH}^-]^4 + \beta_5[\text{OH}^-]^5}$$

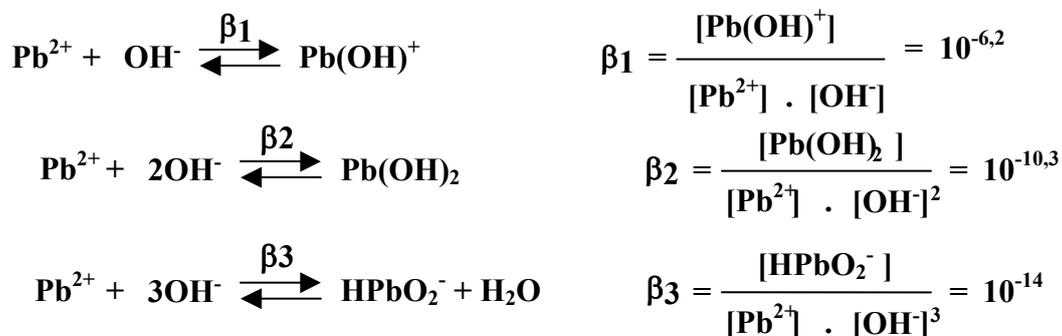
Com as equações acima e os valores das constantes, construiu-se os diagramas de composição fracionária das espécies de cádmio.



Para o chumbo procedeu-se da mesma forma:



Calculou-se a concentração de cada uma destas espécies em equilíbrio com o precipitado de  $\text{Pb(OH)}_2$  utilizando as constantes:



$$K_s = 10^{-14,4} = [\text{Pb}^{2+}] \cdot [\text{OH}^-]^2$$

Através da equação do produto de solubilidade ( $K_s$ ), tem-se o valor de  $[\text{Pb}^{2+}]$ , e substituindo esse valor nas equações  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  têm-se as equações logarítmicas das outras espécies:

$$\log [\text{Pb}^{2+}] = 13,6 - 2 \text{ pH}$$

$$\log [\text{Pb(OH)}^+] = -6,6 - \text{pH}$$

$$\log [\text{Pb(OH)}_2] = -24,7$$

$$\log [\text{HPbO}_2^-] = -42,4 + \text{pH}$$

## Diagrama da composição fracionária das espécies de chumbo em diferentes valores de pH

O balanço de massas das concentrações das espécies está descrito na equação abaixo, sendo F a soma das frações dos aminoácidos:

$$F = [\text{Pb}^{2+}] + [\text{Pb}(\text{OH})^+] + [\text{Pb}(\text{OH})_2] + [\text{HPbO}_2^-]$$

Ou

$$1 = \alpha_{\text{Pb}^{2+}} + \alpha_{\text{Pb}(\text{OH})^+} + \alpha_{\text{Pb}(\text{OH})_2} + \alpha_{\text{HPbO}_2^-}$$

Desta forma, deduziu-se a equação de cada uma das frações, considerando as constantes de equilíbrio das espécies ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ ):

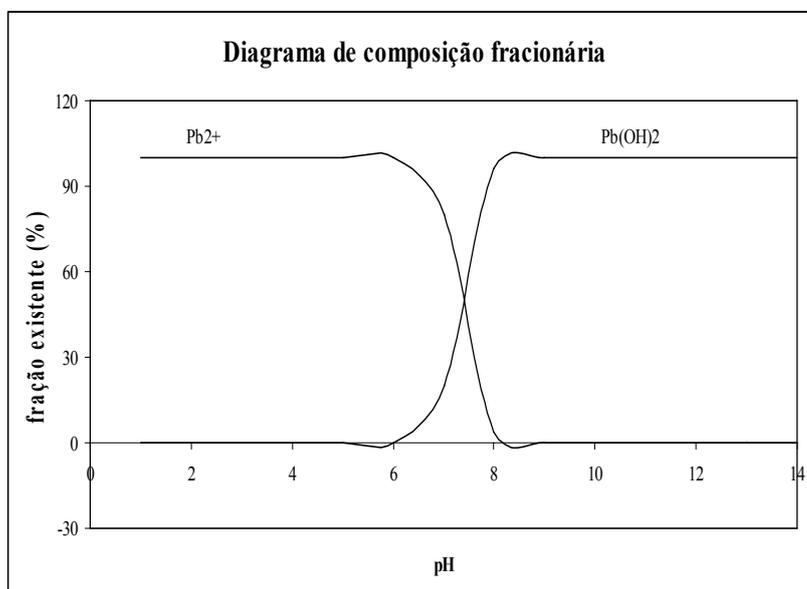
$$\alpha_{\text{Pb}^{2+}} = \frac{[\text{Pb}^{2+}]}{F} = \frac{1}{1 + \beta_1[\text{OH}^-] + \beta_2[\text{OH}^-]^2 + \beta_3[\text{OH}^-]^3}$$

$$\alpha_{\text{Pb}(\text{OH})^+} = \frac{[\text{Pb}(\text{OH})^+]}{F} = \frac{\beta_1[\text{OH}^-]}{1 + \beta_1[\text{OH}^-] + \beta_2[\text{OH}^-]^2 + \beta_3[\text{OH}^-]^3}$$

$$\alpha_{\text{Pb}(\text{OH})_2} = \frac{[\text{Pb}(\text{OH})_2]}{F} = \frac{\beta_2[\text{OH}^-]^2}{1 + \beta_1[\text{OH}^-] + \beta_2[\text{OH}^-]^2 + \beta_3[\text{OH}^-]^3}$$

$$\alpha_{\text{HPbO}_2^-} = \frac{[\text{HPbO}_2^-]}{F} = \frac{\beta_3[\text{OH}^-]^3}{1 + \beta_1[\text{OH}^-] + \beta_2[\text{OH}^-]^2 + \beta_3[\text{OH}^-]^3}$$

Com as equações acima e os valores das constantes, construiu-se os diagramas de composição fracionária das espécies de chumbo.



## APÊNDICE F

Parâmetros utilizados na cromatografia líquida – eluição por gradiente

Alça de amostragem - 25 $\mu$ L

Coluna cromatográfica aniônica – Amino Pac PA1 250 x 4,6 mm

(Dionex)

Vazão – 0,8 mL min<sup>-1</sup>

$\lambda_{\text{Ex}} = 330 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{Em}} = 455 \text{ nm}$

Parâmetros de integração

Width: 50

Drift: 0

T. Dbl: 0

Atten: 9

Spl. Wt: 1

Slope: 50

Min. Área: 5000

Speed: 4

Is. Wt: 1

Stop Tm: 30