

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

FERNANDO CÉSAR DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA E APLICAÇÃO DE ICP-OES PARA
DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM EXTRATOS VEGETAIS**

Belo Horizonte

2021

FERNANDO CÉSAR DA COSTA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA E APLICAÇÃO DE ICP-OES PARA
DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM EXTRATOS VEGETAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Cristina D. Vianna Soares

Coorientadores: Profa. Isabela da Costa César e Prof. Heinrich Adolf Horn

Belo Horizonte

2021

Costa, Fernando César da.

C837d Desenvolvimento de metodologia e aplicação de ICP-OES para determinação de impurezas elementares em extratos vegetais / Fernando César da Costa. – 2021.
119 f. : il.

Orientadora: Cristina D. Vianna Soares.

Coorientadora: Isabela da Costa César.

Coorientador: Heinrich Adolf Horn.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Espectroscopia de emissão atômica – Teses. 2. Validação de método – Teses. 3. Medicamentos fitoterápicos – Teses. 4. Extratos vegetais – Uso terapêutico – Teses. 5. Controle de qualidade – Teses. I. Vianna-Soares, Cristina Duarte. II. César, Isabela da Costa. III. Horn, Adolf Heinrich. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 615.4

Elaborado por Darlene Teresinha Schuler – CRB-6/1759



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

“DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA E APLICAÇÃO DE ICP-OES PARA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES EM EXTRATOS VEGETAIS”

FERNANDO CÉSAR DA COSTA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega
Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Profa. Dra. Ana Carolina Guimarães Ribeiro
Faculdade de Minas – FAMINAS BH

Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Prof. Dr. Adolf Heinrich Horn - Coorientador
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Profa. Dra. Isabela da Costa César - Coorientadora
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Belo Horizonte, 26 de abril de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Isabela da Costa Cesar, Membro**, em 26/04/2021, às 14:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Duarte Vianna Soares, Subcoordenador(a)**, em 27/04/2021, às 13:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Joaquim de Araújo Nóbrega, Usuário Externo**, em 28/04/2021, às 16:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020



Documento assinado eletronicamente por **Adolf Heinrich Horn, Subchefe**, em 28/04/2021, às 18:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Carolina Guimarães Ribeiro, Usuário Externo**, em 29/04/2021, às 14:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0690585** e o código CRC **E6573F8A**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que conduziu a minha vida até aqui para a realização desse objetivo. A Ele toda glória, honra e louvor.

Também agradeço aos familiares, amigos, professores e colegas de trabalho que contribuíram, seja através de palavras de incentivo, das orações e também do apoio técnico concedido por eles.

Em especial, à minha querida esposa Sheila que com todo amor e companheirismo dividiu comigo os momentos de aflição e desespero, dando total apoio para a conclusão desse trabalho.

À minha orientadora Profa. Cristina que desde a graduação vem me acompanhando em trabalhos desafiadores através de toda a sua experiência acadêmica e profissional. Agradeço não só pela orientação, mas também pelo carinho, apoio e palavras que me fortaleceram em momentos decisivos.

À comissão examinadora pelo tempo e dedicação em contribuir para a melhoria deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Análises Minerais - Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais (LAMIN-CPRM), em Caeté, MG, em especial à Química Magda Pinto pelo apoio e experiência compartilhada. Os dias de trabalho foram mais agradáveis, ao nos receber com deliciosos bolos e um café esplêndido. Os conhecimentos adquiridos com a utilização do equipamento ICP-OES lotado no LAMIN-Caeté foram proveitosos e contribuíram para o aprendizado na técnica empregada neste trabalho.

Também ao NGqA pela parceria na realização desse estudo e empréstimo do equipamento de digestão por micro-ondas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BEC	Concentração equivalente ao sinal de fundo, do inglês <i>Background equivalent concentration</i>
BP	Farmacopeia Britânica, do inglês <i>British Pharmacopoeia</i>
CCD	Planejamento composto central, do inglês <i>Design composite central</i>
CPMTC	Centro de Pesquisas Professor Manoel Teixeira da Costa
CPRM	Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais
DMA	Analisador direto de mercúrio
DPR	Desvio padrão relativo
EIE	Elementos facilmente ionizáveis, do inglês <i>Easy ionizable elements</i>
EMA	Agência Europeia de Medicamentos, do inglês <i>European Medicines Agency</i>
ESP	Especialidade farmacêutica
EXP	Excipiente
FB6	Farmacopeia Brasileira 6ª edição
FD	Fator de diluição
FDA	Administração de alimentos e medicamentos, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
ICH	Conferência Internacional em Harmonização para Regulamentação Técnica para Registro de Fármacos para Uso Humano, do inglês <i>International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
ICP-MS	Espectrometria de Massas por Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
IFA	Insumo farmacêutico ativo
IOM	Instituto de Medicina
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação

MDD	Dose diária máxima, do inglês <i>maximum daily dose</i>
MSR	Metodologia de superfície de resposta, do inglês <i>Methodology Surface Response</i>
NGqA	Núcleo de Pesquisa em Geoquímica Ambiental
PDE	Exposição diária permitida, do inglês <i>Permissible Diary Exposition</i>
PTFE	Politetrafluoroetileno
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS
SBR	Razão sinal analítico/sinal de fundo, do inglês <i>signal-to-background</i>
TOC	Carbono Orgânico Total, do inglês <i>Total Organic Carbon</i>
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos, do inglês <i>United States Pharmacopeia</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

RESUMO

Fitoterápicos são medicamentos fabricados de insumos vegetais e utilizados, no Brasil, como prática integrativa e complementar em saúde. Para garantir a qualidade de derivados vegetais, como extratos secos, é imprescindível realizar testes de pureza, pois há grande risco de contaminação residual de agrotóxicos e/ou metais pesados quando as plantas são cultivadas em solos na presença destas impurezas. Neste contexto, objetivou-se o desenvolvimento e otimização de um método para quantificação de possíveis impurezas elementares em extratos secos de quatro espécies vegetais [Maracujá (*Passiflora incarnata*), Guaraná (*Paullinia cupana*), Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e Kava-Kava (*Piper methysticum*)] popularmente conhecidas e consolidadas na fitoterapia brasileira. Na avaliação por ICP-OES adotaram-se os métodos gerais da Farmacopeia Americana (USP) <232> e <233>. Os elementos avaliados foram Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Se, Ag, Tl, Pt, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Li, Sb, Ba, Mo, Cu, Sn e Cr. Um planejamento fatorial completo foi empregado para otimizar parâmetros envolvidos na digestão por micro-ondas das amostras, como a concentração de ácido nítrico, temperatura do forno e tempo de digestão. A resposta obtida por meio de gráficos de superfície tridimensionais mostrou uma digestão eficiente empregando uma solução de ácido nítrico 2 M, por 10 minutos a 180 °C. Nas análises por ICP-OES, diversos parâmetros instrumentais (potência da radiofrequência, vazão do gás de nebulização e outros relacionados à robustez do plasma) foram ajustados com base na razão MgII/MgI e otimizado por meio de ferramentas quimiométricas. O método otimizado foi validado e aplicado para avaliar as impurezas elementares nos extratos secos. A recuperação média apresentou resultado satisfatório dentro dos limites de 70 a 150% para todos os elementos, exceto para o ósmio. Não foram encontradas concentrações de impurezas acima dos valores de *J* permitidos, entretanto, foi detectada a presença de mercúrio nos extratos de Maracujá e de Barbatimão, e arsênio em Kava-kava. Esse trabalho reflete a importância do controle de impurezas elementares para fitoterápicos e aponta para os desafios no desenvolvimento de técnicas modernas voltadas para análise elementar, desconhecidas por muitos farmacêuticos.

Palavras-chave: ICP-OES; digestão assistida por micro-ondas; impurezas elementares; validação analítica, extratos vegetais.

ABSTRACT

Herbal medicines are drugs made from plant raw materials and used in Brazil as an integrative and complementary health practice. To ensure the quality of plant derivatives, such as dried extracts, it is essential to perform purity tests, because there is a great risk of contamination by pesticide and heavy metal residues when plants are grown in soils in the presence of these impurities. Thus, the objective was to develop and optimize a method for quantification of possible elemental impurities in dried extracts of four plant species [Passion fruit (*Passiflora incarnata*), Guarana (*Paullinia cupana*), Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) and Kava-Kava (*Piper methysticum*)] popularly known and consolidated in the Brazilian phytotherapy. The evaluation by ICP-OES, followed the general methods of the United States Pharmacopoeia (USP) <232> and <233>. The elements evaluated were Cd, Pb, As, Hg, Co, V, Ni, Se, Ag, Tl, Pt, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Li, Sb, Ba, Mo, Cu, Sn, and Cr. A full factorial design was employed to optimize parameters involved in the microwave digestion of the samples, such as nitric acid concentration, oven temperature, and digestion time. The response obtained by means of three-dimensional surface plots showed an efficient digestion employing a 2 M nitric acid solution for 10 minutes at 180 °C. In the ICP-OES analyses, several instrumental parameters (radiofrequency power, nebulizer gas flow rate, and others related to plasma robustness) were adjusted based on the MgII/MgI ratio and optimized using chemometric tools. The optimized method was validated and applied to evaluate elemental impurities in the dried extracts. The average recovery showed satisfactory results within the range 70-150% for all elements, except osmium. No impurity concentrations above the permitted *J* values were found, however, the presence of mercury was detected in Passion Fruit and Barbatimão extracts, and arsenic in Kava-kava. This work reflects the importance of controlling elemental impurities for herbal medicines and points to the challenges in developing modern techniques for elemental analysis, unknown to many pharmacists.

Keywords: ICP-OES; microwave assisted digestion; elemental impurities; analytical validation, plant extracts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação de contaminantes em fitoterápicos.....	19
Figura 2 - Folhas, flor e fruto de <i>Passiflora incarnata</i> Linnaeus	23
Figura 3 - Frutos e sementes de Guaraná (<i>Paullinia cupana</i>).....	24
Figura 4 – Folhas (A) e rizoma (B) de Kava-Kava (<i>Piper methysticum</i>)	25
Figura 5 – Exemplar de (A) árvore de barbatimão <i>Stryphnodendron adstringens</i> e (B) detalhe do tronco do barbatimão com casca rugosa.....	26
Figura 6 - Estrutura química do monômero pirogalol (galoil) e taninos poliméricos de proantocianidina obtida da casca do caule de <i>Stryphnodendron adstringens</i>	27
Figura 7 - Gráfico comparativo das recuperações obtidas para 14 elementos entre as técnicas ensaio limite de metais pesados e ICP-MS em IFAs.....	28
Figura 8 - Possíveis fontes de contaminação de impurezas elementares em produtos farmacêuticos.....	30
Figura 9 - Classificação dos elementos de acordo com a toxicidade em humanos de acordo com ICHQ3D	32
Figura 10 - Principais mecanismos de toxicidade dos metais no organismo humano	36
Figura 11 - Espectro eletromagnético indicando a região das micro-ondas.....	44
Figura 12 - Esquema geral de um espectrômetro óptico com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) indicando da amostra desde a sua aspiração no sistema de introdução até o processamento do sinal analítico.....	47
Figura 13 - Esquema geral de funcionamento de um analisador direto de mercúrio (DMA-80) da Millestone.....	49
Figura 14 - Desenho representativo dos pontos axiais de um planejamento composto central.	52
Figura 15 - Espectrômetro de emissão Óptica com plasma indutivamente acoplado, modelo AVIO 500, Perkin Elmer, disponível no Laboratório de Análises Minerai – LAMIN em Caeté.....	56
Figura 16 - Esquema do procedimento para otimização da digestão por micro-ondas	65
Figura 17 - Pool de amostras digerido em forno de micro-ondas.....	66

Figura 18 - Amostras digeridas dos extratos secos de cada fitoterápico (1- <i>Passiflora incarnata</i> , 2- <i>Paullinia cupana</i> Kunth, 3- <i>Stryphnodendron adstringens</i> , 4- <i>Piper methysticum</i>) com evidência ao precipitado formado.....	67
Figura 19 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados	70
Figura 20 - Gráfico de superfície de resposta para as variáveis concentração do ácido e temperatura do forno de micro-ondas em um tempo fixo de 7,5 minutos.	72
Figura 21 - Gráfico de contorno para as variáveis concentração do ácido e temperatura do forno de micro-ondas, em um tempo fixo de 7,5 minutos.....	72
Figura 22 - Gráfico de superfície para as variáveis: concentração do ácido e tempo de digestão, em uma temperatura fixa de 160 °C.	73
Figura 23 - Gráfico de contorno para as variáveis: concentração do ácido e tempo de digestão em uma temperatura fixa de 160 °C.	74
Figura 24 - Gráfico de contorno para as variáveis: tempo de digestão e temperatura em uma concentração de ácido fixa em 4,5 M.....	75
Figura 25 - Gráfico de superfície para as variáveis: tempo de digestão e temperatura em uma concentração de ácido fixa em 4,5 M.....	75
Figura 26 - Gráfico de superfície da função desejabilidade para identificação da região ótima de maior eficiência dos parâmetros na digestão assistida por micro-ondas....	76
Figura 27 - Resultados em razão de MgII/MgI obtidos com o nebulizador pneumático variando a potência de radiofrequência, vazão do gás de nebulização e modo de visão da tocha.....	79
Figura 28 - Resultados em razão de MgII/MgI obtidos com o nebulizador ultrassônico variando a potência de radiofrequência, vazão do gás de nebulização e modo de visão.	79
Figura 29 - Gráfico de superfície de resposta obtido para as variáveis potência de radiofrequência e vazão do gás de nebulização em função da razão de MgII/MgI. ...	83
Figura 30 - Gráfico de contorno obtido para as variáveis potência de radiofrequência e vazão do gás de nebulização em função da razão MgII/MgI.	84
Figura 31 - Curva analítica de cádmio em 228,802 nm.....	85
Figura 32 - Curva analítica de chumbo em 224,688 nm.....	86
Figura 33 - Curva analítica de arsênio em 188,979 nm.....	86
Figura 34 - Curva analítica de mercúrio em 302,15 nm	87

Figura 35 - Resultados de exatidão por meio da porcentagem de recuperação obtida para os elementos, após adição de padrão no nível de concentração de 0,5 J a partir dos extratos de quatro fitoterápicos estudados.	93
Figura 36 - Resultados de exatidão por meio da porcentagem de recuperação obtida para os elementos, após adição de padrão no nível de concentração de 1,0 J, a partir dos extratos de quatro fitoterápicos estudados.	94
Figura 37 - Resultados de exatidão por meio da porcentagem de recuperação obtida para os elementos, após adição de padrão no nível de concentração de 1,5 J, a partir dos extratos de quatro fitoterápicos estudados.	94
Figura 38 - Porcentagem de impurezas elementares detectadas no extrato de <i>Passiflora incarnata</i> em relação do valor limite J preconizado na USP<232>, por ICP-OES.....	100
Figura 39 - Porcentagem de impurezas elementares detectadas no extrato de <i>Paullinia cupana</i> em relação do valor limite J preconizado na USP<232>, por ICP-OES.	100
Figura 40 - Porcentagem de impurezas elementares detectadas no extrato de <i>Stryphnodendron adstringens</i> em relação do valor limite J preconizado na USP<232>, por ICP-OES.	101
Figura 41 - Porcentagem de impurezas elementares detectadas no extrato de <i>Piper methysticum</i> em relação do valor limite J preconizado na USP<232>, por ICP-OES.	102
Figura 42 - Curva analítica do Mercúrio obtida no DMA.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Limites de arsênio e metais tóxicos preconizados para produtos medicinais de origem vegetal em diferentes países.....	21
Tabela 2 - Limites de exposição diária permitidos de acordo com a via de administração do medicamento, conforme USP<232>.	34
Tabela 3 - Propriedades físico-químicas (densidade, d; ponto de ebulição, PE) dos agentes oxidantes mais comumente utilizados na digestão por via úmida, e suas propriedades	42
Tabela 4 - Dados das amostras de fitoterápicos na forma de extratos secos analisadas no estudo.....	54
Tabela 5 - Programa de aquecimento ajustado para a digestão das amostras no digestor MARS5 (CEM) para as amostras de fitoterápicos.	57
Tabela 6 - Planejamento fatorial completo 2 ³ para otimização dos parâmetros envolvidos na digestão.	57
Tabela 7 - Definição dos níveis dos parâmetros em estudo no ICP-OES.....	58
Tabela 8 – Concentração J obtida para cada elemento com base no PDE, MDD e FD.	59
Tabela 9 - Volumes pipetados para a construção da curva analítica.	60
Tabela 10 - Curva analítica com seis níveis de J e as concentrações finais.....	61
Tabela 11 - Condições operacionais do ICP-OES para a determinação de impurezas elementares nos extratos de fitoterápicos.....	64
Tabela 12 - Dados para construção da curva analítica de baixa concentração de mercúrio (célula 0) no DMA.....	64
Tabela 13 - Resultados de teor de carbono orgânico total (TOC/COT) de digestão ácida assistida por micro-ondas dos extratos secos dos fitoterápicos na matriz de planejamento fatorial completo 2 ³ em duplicata	68
Tabela 14 - Significância dos efeitos principais e de interação das variáveis estudadas na digestão ácida, para otimização de condições experimentais.....	69
Tabela 15 - Distribuição normal padronizada dos efeitos das variáveis estudadas na digestão ácida assistida por micro-ondas.	69
Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) e validação do modelo matemático proposto	71

Tabela 17 - Resultados em razão de MgII/MgI obtidos no planejamento fatorial 2 ⁴ para monitoramento das variáveis: 1-vazão do gás de nebulização (G), 2-potência de radiofrequência (P), 3-tipo de nebulizador (N) e 4-modo de visão (V).	78
Tabela 18 - Resultados obtidos em razão de MgII/MgI no planejamento composto central para otimização das variáveis potência de radiofrequência e vazão do gás de nebulização.	81
Tabela 19 - Análise de variância e validação do modelo proposto para as variáveis potência de radiofrequência e vazão do gás de nebulização em função da resposta razão de MgII/MgI	82
Tabela 20 - Coeficientes da curva analítica obtidos para cada elemento em determinada linha de emissão.....	88
]Tabela 21 - Resultados de avaliação da precisão (repetitividade) após adição de padrão na concentração de 1 J para cada elemento, em amostras de quatro fitoterápicos (n=6).....	89
Tabela 22 - Resultados de avaliação da precisão intermediária após adição de padrão na concentração de 1 J para cada elemento nas quatro amostras de fitoterápicos (n=12).....	91
Tabela 23 - Resultados de exatidão obtidos por meio da porcentagem de recuperação, após a adição de padrão no nível de concentração de 0,5 J para avaliação da exatidão do método por ICP-OES.....	92
Tabela 24 - Resultados de exatidão obtidos por meio da porcentagem de recuperação após a adição de padrão no nível de concentração de 1 J para avaliação da exatidão do método por ICP-OES	95
Tabela 25 - Resultados de exatidão obtidos por meio da porcentagem de recuperação, após a adição de padrão no nível de concentração de 1,5 J para avaliação da exatidão do método por ICP-OES.....	96
Tabela 26 - Limites de detecção e de quantificação obtidos para os elementos analisados.	97
Tabela 27 - Resultados da determinação das 24 impurezas elementares nos extratos secos de fitoterápicos, por ICP-OES (n=3)	99
Tabela 28 – Leituras de absorvância dos padrões para obtenção da curva analítica do Mercúrio no DMA	102
Tabela 29 - Resultados obtidos em concentração de mercúrio (µg/kg) nos extratos vegetais obtidos pelo método de combustão, por meio de DMA.....	103

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 FITOTERÁPICOS	18
2.1.2 Tipos de contaminantes	18
2.1.3 Impurezas elementares em fitoterápicos	20
2.1.4 Fitoterápicos estudados	22
2.2 IMPUREZAS ELEMENTARES EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS	27
2.2.1 Histórico	27
2.2.2 Definição	29
2.2.3 Fontes de contaminação	30
2.2.4 Classificação das impurezas elementares	32
2.3 CAPÍTULOS GERAIS <232> E <233> DA USP	33
2.4 TOXICIDADE DOS ELEMENTOS	35
2.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES	39
2.5.1 Preparo de amostras – aspectos gerais	39
2.5.2 Decomposição da amostra por via seca	40
2.5.3 Digestão da amostra por via úmida convencional	41
2.5.4 Digestão da amostra por via úmida em forno de micro-ondas	43
2.5.5 Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP- OES)	45
2.5.6. Analisador direto de mercúrio (DMA)	48
2.6 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS	49
2.6.1 Planejamento fatorial completo	50
2.6.2 Planejamento composto central	51
3 OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo geral	53
3.2 Objetivos específicos	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS	54
4.1 Materiais	54
4.1.1 Amostras	54
4.1.2 Substâncias Químicas de Referência (SQR)	54

4.1.3 Reagentes e outros materiais.....	55
4.1.4 Equipamentos	55
4.2 Métodos.....	56
4.2.1 Preparo das amostras para digestão	56
4.2.2 Digestão ácida assistida em forno de micro-ondas	56
4.2.3 Otimização dos parâmetros instrumentais do ICP-OES.....	58
4.2.4 Validação do procedimento de análise elementar por ICP-OES	59
4.2.5 Aplicação da análise de impurezas elementares nos extratos vegetais por ICP-OES em extratos vegetais.....	63
4.2.6 Determinação de mercúrio nos extratos vegetais pelo DMA.....	64
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1. Avaliação dos digeridos obtidos na digestão.....	65
5.2 Otimização das variáveis envolvidas na digestão por micro-ondas	67
5.3 Avaliação da influência de parâmetros instrumentais do ICP-OES.....	77
5.5 Validação do procedimento de análise de impurezas elementares nas amostras de fitoterápicos por ICP-OES	84
5.5.1 Linearidade.....	84
5.5.2 Precisão	87
5.5.3 Exatidão.....	90
5.5.4 Limite de detecção e quantificação	97
5.6 Determinação de impurezas elementares nas amostras dos extratos secos de fitoterápicos.....	98
5.7 Determinação de Mercúrio nos extratos secos de fitoterápicos, obtida por meio de Analisador Direto de Mercúrio – DMA	102
6 CONCLUSÃO	104
REFERÊNCIAS.....	105
APENDICE A - Curvas analíticas dos elementos obtidas por ICP-OES	116

1 INTRODUÇÃO

As plantas têm sido utilizadas para fins terapêuticos e medicinais há milhões de anos. Estima-se que existam mais de 250 mil espécies de plantas no mundo e que pelo menos 10% já tiveram algum uso curativo ou profilático de doenças em alguma época da História. Só o Brasil detém de 15 a 20% de todas as espécies existentes no mundo. Essa biodiversidade associada à facilidade de acesso e ao baixo custo contribui para o crescimento da fitoterapia no país e em outras partes do mundo (WORLD, 2002).

Além do uso natural e direto, na forma de chás e infusões, as plantas medicinais são importantes matérias-primas para a produção de fitoterápicos, representando uma parcela significativa no mercado farmacêutico. Nesse cenário, a Alemanha é o país que possui a maior produção de fitoterápicos movimentando cerca de três bilhões de reais, seguido da França e Itália (CASTRO; ALBIERO, 2016).

O crescente aumento no uso de fitoterápicos, aliado a uma expansão global no mercado, despertou nas agências regulatórias em todo o mundo a necessidade de averiguar minuciosamente a presença de contaminantes diversos nesses medicamentos tradicionais, garantindo a segurança e eficiência dessa terapia.

Apesar do estimativo valor terapêutico, esses produtos à base vegetal também podem provocar efeitos adversos para a saúde, assim como outros tipos de medicamentos. A *Piper methysticum*, popularmente conhecida como kava, possui propriedades sedativas e tem sido utilizada no tratamento de ansiedade e depressão há vários anos. Recentemente, a sua venda passou a ser controlada depois que problemas hepáticos foram associados ao seu uso (SINGH, 1992).

Efeitos adversos podem ser provocados, em grande parte, por uma infinidade de substâncias ativas presentes na planta, advir de contaminantes químicos, como metais pesados e outros elementos tóxicos encontrados naturalmente, ou serem adicionados propositalmente, como relatado historicamente na medicina tradicional chinesa de preparações farmacêuticas contendo sais de mercúrio para tratamentos diversos (JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Relatos como esse pressionaram as agências regulatórias em todo mundo a atualizar o controle de impurezas elementares em produtos farmacêuticos. Por definição, essas impurezas são produtos indesejáveis oriundos de catalisadores utilizados no processo de síntese dos fármacos ou de contaminação ambiental que

podem estar presentes em insumos farmacêuticos e medicamentos. Elas podem ocorrer naturalmente devido à origem do insumo farmacêutico ativo (IFA) ou do excipiente (EXP), ou ainda, adicionadas propositalmente (catalisador) para acelerar um processo sintético de uma substância (UNITED, 2019).

Em 2013, foram publicados na edição 37 da Farmacopeia Americana (United States Pharmacopeia – USP) dois novos capítulos gerais (USP<232>, USP<233>) contendo diretrizes para o controle de impurezas elementares em medicamentos. Esta atualização se deu em função da ineficácia de métodos clássicos, como por exemplo, os ensaios-limite, na determinação de impurezas inorgânicas em IFA e especialidades farmacêuticas (ESP). As limitações se devem, principalmente, à falta de sensibilidade e especificidade que dificultam a quantificação individual dos elementos presentes na amostra (UNITED, 2014; POHL et al., 2018).

No capítulo geral USP<232> (*Elemental Impurities – Limits*) estão listadas 24 impurezas em termos de exposição diária permitida (do inglês, *Permitted Daily Exposure – PDE*), bem como o agrupamento em classes de risco (Classes 1, 2A, 2B, 3) em função das vias de administração oral, parenteral e inalatória, consideradas no caso de consumo de produtos farmacêuticos. No capítulo geral <233> (*Elemental Impurities - Procedures*), recomenda-se o uso de técnicas espectrométricas mais sensíveis com capacidade analítica multielementar, como a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (UNITED, 2014).

Com a nova regulação, desde 2018 os fabricantes estão obrigados a demonstrar a conformidade dos seus produtos em relação a esses limites, avaliando o risco de probabilidade de contaminação como diferentes impurezas elementares por meio do ICP-OES ou ICP-MS, juntamente com os procedimentos adequados para o preparo da amostra (POHL et al., 2018). Entretanto, mesmo com mudanças introduzidas na USP 37, a 6ª edição da Farmacopeia Brasileira, publicada em 15 de agosto de 2019 ainda não se atualizou em relação à análise de impurezas elementares (FARMACOPEIA, 2019).

Com isso, reitera-se a importância dos investimentos de órgãos regulatórios para aprimorar ferramentas de controle de qualidade de IFA e ESP, incluindo os derivados vegetais. Tendo em vista esta demanda, com este trabalho objetiva-se desenvolver e aplicar um método por ICP-OES para análise de impurezas elementares em alguns extratos vegetais padronizados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FITOTERÁPICOS

2.1.1 Definição

Os fitoterápicos abrangem uma variedade de produtos de origem vegetal que, dependendo do país, podem ser classificados em alimentos, suplementos dietéticos, cosméticos ou medicamentos. A Organização Mundial de Saúde (do inglês, *World Health Organization* - WHO) define fitoterápico como um material ou preparação derivada de plantas com benefícios terapêuticos ou outros para a saúde humana. Podem conter ingredientes *in natura* ou processados de uma ou mais plantas (WORLD, 2003).

A agência regulatória norte americana (*Food and Drug Administration* - FDA) classifica os fitoterápicos como suplementos dietéticos que inclui não só produtos derivados de plantas, mas também vitaminas, minerais, aminoácidos, dentre outros. Podem ser comercializados em diferentes formas farmacêuticas como comprimidos, cápsulas e pós (FDA, 2014).

No Brasil, segundo a RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fitoterápicos constituem uma classe de medicamentos que são obtidos exclusivamente de matérias primas ativas vegetais e possuem eficácia e segurança garantida por meio de levantamentos etnofarmacológicos, bem como comprovação por meio de ensaios clínicos (BRASIL 2014; BEZERRA CARVALHO et al., 2014).

A falta de consenso mundial na definição sobre esses produtos acaba enfraquecendo as leis de vigilância sanitária que ficam sob a competência local de cada país. Além disso, o comércio torna-se livre, sem muita fiscalização e os produtos podem ser comprados tanto em farmácias, quanto em mercados comuns e até mesmo pela internet.

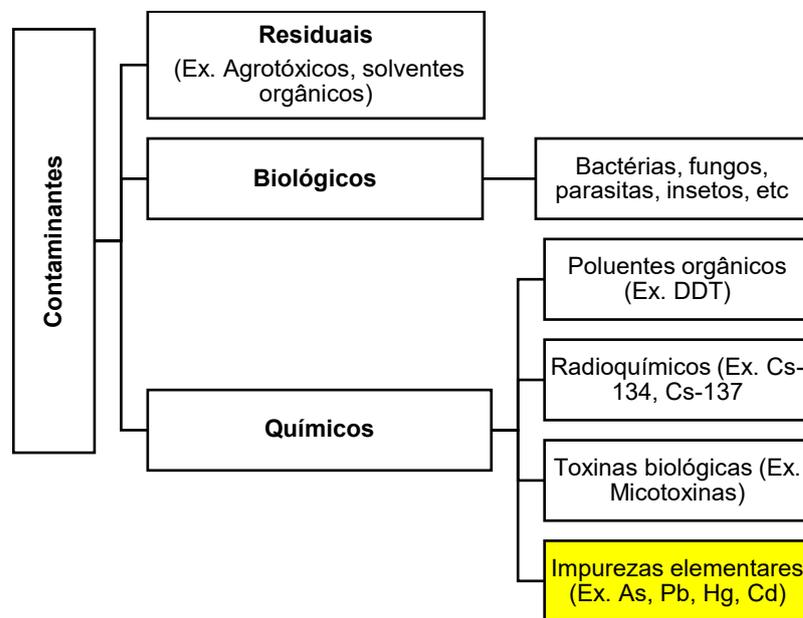
2.1.2 Tipos de contaminantes

O controle de qualidade de medicamentos tem por objetivo assegurar não só a eficácia, mas também a segurança dos produtos por meio da verificação de agentes tóxicos, produtos de degradação ou contaminantes. Neste aspecto, o monitoramento

de contaminantes em fitoterápicos é uma prática indispensável na garantia da qualidade desses produtos (STEINHOFF, 2019).

A contaminação em fitoterápicos se dá através da introdução indesejada de impurezas de natureza química ou biológica em uma matéria prima vegetal ou produto acabado durante a produção, amostragem, embalagem, armazenamento ou transporte (WORLD, 2002). Eles podem ser sumariamente categorizados em residuais, químicos e biológicos, como visto na Figura 1. Muitas dessas substâncias, além de alterar as propriedades do medicamento, podem causar danos à saúde dos consumidores.

Figura 1 - Classificação de contaminantes em fitoterápicos



Fonte: Adaptado de WORLD, 2007

Muitos contaminantes ocorrem naturalmente no solo e na atmosfera, a exemplo dos radionuclídeos e alguns metais tóxicos. Outros, surgem da poluição ambiental decorrente da emissão de fábricas e outras fontes poluentes (KOSALEC; CVEK; TOMIĆ, 2009; TRIPATHY et al., 2015).

Um tipo de contaminação química que merece atenção é por metais pesados. Eles são um grupo de metais e semimetais da Tabela periódica que possuem características em comum quanto à elevada densidade e potencial tóxico. Porém, apesar de ser popularmente utilizada, essa nomenclatura é inconsistente e obsoleta e se restringe a um pequeno número de elementos. Por isso, a comunidade científica

tem discutido e atualizado esse tipo de contaminante como “Impurezas elementares” (APPENROTH, 2010; DUFFUS, 2007).

2.1.3 Impurezas elementares em fitoterápicos

A contaminação química de produtos medicinais de origem vegetal por elementos tóxicos como arsênio e outros metais pode ter causas variadas, que incluem a poluição ambiental de origem antropogênica, a composição do solo e o uso de fertilizantes (WORLD, 2007)

A poluição ambiental decorre, principalmente, da emissão de contaminantes químicos por fábricas, veículos automotivos, geradores de energia elétrica, resíduos municipais, queima de lixo e pelo uso de pesticidas (ANNAN et al., 2010).

O conteúdo elementar da planta que é absorvido pela sua raiz é influenciado não só pelas características geoquímicas do solo, mas também pela capacidade de certas espécies vegetais em acumular seletivamente certos elementos, incluindo aqueles que são tóxicos (ZEINER; JURANOVIĆ CINDRIĆ, 2017). Um estudo conduzido por Barthwal e colaboradores (2008) investigou o acúmulo de chumbo, cádmio, cromo e níquel em cinco espécies vegetais cultivadas em área de tráfego pesado, área industrial e área residencial. O nível de metais pesados variou entre as espécies, embora fossem cultivadas em um mesmo local. Além disso, uma mesma planta apresentou diferentes concentrações de um local para outro, sendo menor em áreas residenciais do que em áreas de tráfego intenso.

A fitoterapia é uma prática medicinal alternativa que inclui o uso de plantas, colhidas diretamente da natureza (*in natura*), e/ou de preparações farmacêuticas contendo essas espécies vegetais. Nesse contexto, a contaminação por elementos tóxicos pode ser proveniente do ambiente de cultivo, das condições de secagem e processamento, das formas de armazenamento e transporte ou ainda de várias etapas de fabricação desse tipo de medicamento (CHAN, 2003).

O preparo do fitoterápico relacionado às suas diferentes formas de uso, como chás, sob decocção ou infusão, também influencia na transferência de quantidades de traços de determinados elementos na bebida final. Um trabalho que quantificou diversos elementos em duas formas de preparação, trituração e decocção, de uma espécie de Líquen mostrou que as concentrações elementares em decocções foram significativamente menores do que sob a forma triturada (GIORDANI et al., 2017). Em outro estudo, com infusões de espécies de *Ginkgo biloba*, *Cymbopogon citratus*, *Aloe*

vera, entre outras, também verificou que esse tipo de preparação pode ser uma fonte significativa de impurezas elementares na dieta humana (MALIK et al., 2013).

Os produtos medicinais de origem vegetal exportados por países asiáticos, especialmente a China e a Índia, têm recebido bastante atenção das agências de vigilância sanitária. Isso porque, culturalmente, esses países utilizavam metais pesados em suas preparações farmacêuticas alegando propriedades medicinais de certos elementos como o mercúrio (ERNST, 2002; JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Também possuem uma legislação branda em relação aos limites permitidos de elementos tóxicos como pode ser consultado na Tabela 1, constituindo um grande risco dos produtos vegetais oriundos dessas regiões. A Farmacopeia Chinesa, por exemplo, tem um limite de aceitação para chumbo em matéria prima vegetal dez vezes maior do que o valor estabelecido pela USP, que considera os fitoterápicos como suplementos dietéticos. Mais alarmante ainda é o caso da legislação de Singapura, que tem o limite aceitável desse metal em 20 ppm (TRIPATHY et al., 2015).

Tabela 1 - Limites de arsênio e metais tóxicos preconizados para produtos medicinais de origem vegetal em diferentes países

Agências regulatórias	Tipo de material	Limites de elementos tóxicos (ppm)				
		Cd	Pb	As	Hg	Total
WHO	MP	0,3	10	10	1	-
USP<2322>	SD	0,5	1	1,5	1,5	-
Farmacopeia Europeia (EP)	EV	1	5	-	0,1	-
Farmacopeia Chinesa (CP)	MP	1	10	2	0,2	20
Singapura (HAS)	ESP	0,05	20	5	0,5	-
Índia (AYUSH)	MP/ESP	0,3	1	10	1	-
Tailândia	MP/ESP	0,3	10	4	-	-
FB6	ESP	-	-	-	-	10

MP – Matéria prima vegetal; SD – Suplemento dietético; EV – Extrato vegetal; ESP – Especialidade farmacêutica; HAS – *Healthy Sciences Authority*; AYUSH – Ayurveda, Yoga, Unani, Siddha and Homeopathy

FONTE: Adaptado de (KOSALEC; CVEK; TOMIĆ, 2009; LI, SHU MEI et al., 2012; TRIPATHY et al., 2015)

Com o aumento da comercialização via internet, a aquisição desses produtos tem se tornado cada vez mais intensa (JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Um estudo realizado por pesquisadores chineses, no qual analisaram-se os teores de metais tóxicos em quatro fitoterápicos mais utilizados na população chinesa, as

concentrações de cádmio estavam acima dos valores permitidos em sua legislação (TING; CHOW; TAN, 2013).

O Brasil, por sua vez, também possui um controle de impurezas elementares em fitoterápicos bastante incipiente. A FB6 preconiza apenas o ensaio limite de metais pesados para estes medicamentos. Porém, esse teste é inespecífico e pouco sensível na determinação elementar permitindo uma concentração de elementos totais de até 10 ppm. Estudos de composição elementar de ervas comercializadas em diferentes regiões do Brasil também foram realizados. Doze oligoelementos, essenciais para a vida, foram quantificados nas ervas e em suas infusões. Milani e colaboradores (2019) mostraram níveis aceitáveis dentro dos limites das normas reguladoras. No entanto, notou-se a presença de cádmio e chumbo em grande parte das amostras analisadas.

De acordo com o guia de impurezas em plantas medicinais da OMS, espera-se que não haja aumento de exposição da população a metais pesados devido à utilização de fitoterápicos. Contudo, o teor destes elementos em plantas deve ser cada vez mais minimizado (WORLD, 2007).

2.1.4 Fitoterápicos estudados

Fitoterápicos em estudo de prospecção fitoquímica e controle de qualidade já desenvolvidos pelo grupo de pesquisa no laboratório foram selecionados na forma de extratos secos para avaliação das impurezas elementares. Esses insumos são obtidos de diferentes partes de plantas medicinais consolidadas na fitoterapia brasileira: *Passiflora incarnata* (flores e folhas), *Paullinia cupana* Kunth (semente), *Piper Methysticum* (rizoma) e *Stryphnodendron adstringens* (caule). A presença de grupos fitoquímicos, como flavonóides e taninos, que são capazes de quelar metais como ferro e alumínio, sugere o acúmulo destas e outras impurezas metálicas ao longo do processo produtivo.

2.1.4.1 *Passiflora incarnata* (Maracujá)

A espécie *Passiflora incarnata* (Figura 2), popularmente conhecida como Maracujá, pertence à família *Passifloraceae* e é originária da América do Norte. O gênero compreende mais de 500 espécies de plantas pertencentes a esta família. Além do uso medicinal difundido em todo o mundo, outras espécies, como a *Passiflora*

edulis sims são bastante cultivadas por seus frutos comestíveis e suas flores ornamentais (DHAWAN, 2004; MIRODDI et al., 2013).

Há relatos de uso popular, na forma de extrato de partes aéreas, folhas e flores de *Passiflora incarnata*, principalmente pelas evidências de ação sobre o sistema nervoso central. Efeitos sedativos, ansiolíticos e para tratamento de insônia são descritos na literatura (BRASIL, 2015).

Figura 2 - Folhas, flor e fruto de *Passiflora incarnata* Linnaeus



Fonte: BRASIL (2015)

Apesar de ser empregado para o tratamento de leves distúrbios do sistema nervoso central, o uso de medicamentos fitoterápicos a base de Maracujá deve ser observado quanto ao surgimento de efeitos adversos, já que sintomas como náuseas, vômitos e até alterações eletrocardiográficas foram relatados (FISHER; PURCELL; LE COUTEUR, 2000).

Os principais constituintes dos extratos dessa planta são os flavonoides, em especial os flavonoides C-glicosilados derivados de luteonina e apigenina. A presença de outras substâncias como alcaloides indólicos, carboidratos e óleos essenciais também foram relatados (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004).

No Brasil, a *Passiflora incarnata* tem sido o principal componente em formulações ansiolíticas naturais na forma encapsulada, extrato fluido e tintura, estando incluída no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira e no Memento Fitoterápico. Também apresenta monografias em outros compêndios oficiais como a USP e as Farmacopeia Britânica. (BRITISH, 2011, BRASIL, 2015; BRASIL, 2016; FARMACOPEIA, 2019).

2.1.4.2 *Paullinia cupana* (Guaraná)

A espécie *Paullinia cupana* (Figura 3), conhecida popularmente como Guaraná, é uma planta tipicamente brasileira oriunda da região da Amazônia. Historicamente, a descoberta e uso do guaraná para fins medicinais se deram por tribos indígenas e data da época pré-colombiana. Devido à fama lendária da planta e de seus efeitos estimulantes, o aproveitamento do guaraná expandiu para além de seu uso medicinal, e tem sido bastante consumido na forma de bebida refrigerante (ERICKSON; CORREA; ESCOBAR, 1984; SCHIMPL et al., 2013).

Figura 3 - Frutos e sementes de Guaraná (*Paullinia cupana*)



Fonte: <https://www.cfn.org.br/index.php/guarana/>

A propriedade estimulante é atribuída às sementes, parte comercialmente valorizada, devido à presença de metilxantinas, em especial a cafeína, e outros compostos como teofilina e teobromina. Além disso, atividades antioxidantes e antimicrobianas foram encontradas devido à presença de compostos fenólicos, taninos condensados e saponinas (ANTONELLI USHIROBIRA et al., 2007; MAJHENIČ; ŠKERGET; KNEZ, 2007; MARQUES et al., 2019). Estudos realizados por Machado e colaboradores (2018) para a quantificação de taninos mostraram que o extrato seco fracionado, rico em taninos e livre de metilxantinas, proporcionou forte atividade antioxidante do radical DPPH e inibição da liberação de fator de necrose tumoral, TNF-alfa (MACHADO et al. 2018, 2021). Os autores ainda identificaram o trimero de procianidina tipo-A no extrato enriquecido.

A monografia de *Paullinia cupana* Kunth presente na FB6 preconiza que a droga vegetal deve conter no mínimo 5% de metilxantinas totais, sendo no mínimo 3,5% de cafeína. De taninos, deve conter, no mínimo, 4% (BRASIL, 2016; FARMACOPEIA, 2019).

2.4.1.3 *Piper methysticum* (Kava-kava)

A espécie *Piper methysticum* (Figura 4) pertencente à família *Piperaceae*, é conhecida popularmente como kava-kava, pimenta kava e raiz kava. É uma planta de origem oriental, cultivada em algumas ilhas do pacífico, onde tem grande valor econômico (BARBOSA; LENARDON; PARTATA, 2002). Seu uso para o tratamento de ansiedade, estresse, insônia e agitação, epilepsia, psicose e depressão tem sido relatado (SINGH, 1992).

O nome do gênero vem da palavra grega *peperi*, derivada de um nome indígena. A kava-kava é um arbusto de médio porte com folhas grandes e rígidas. A parte da planta que apresenta atividade é o rizoma, que supostamente tem uma longa história de uso nas ilhas do Pacífico Sul para certas preparações medicinais, incluindo uma bebida sedativa chamada kava. A bebida é consumida para promover relaxamento e aliviar o estresse, sem alterar o estado funcional mental. Também é utilizada tradicionalmente em cerimônias religiosas e até mesmo em encontros sociais (MISSOURI, 2019).

Figura 4 – Folhas (A) e rizoma (B) de Kava-Kava (*Piper methysticum*)



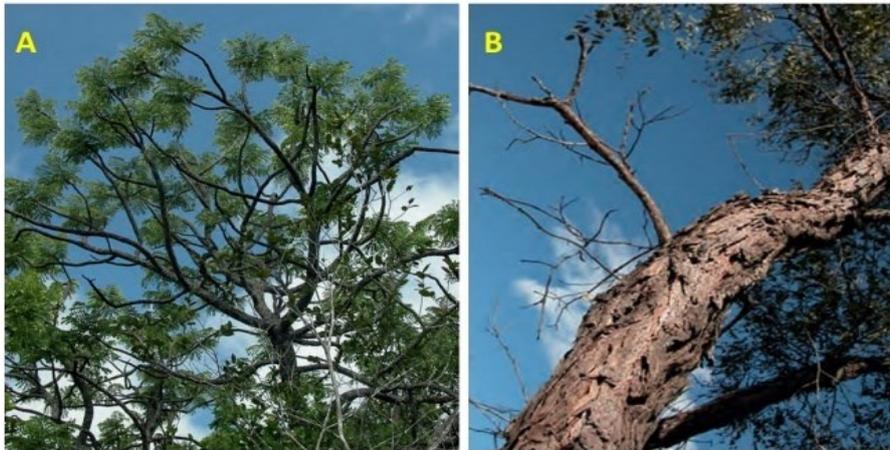
Fonte: JUSTO E SILVA (2008)

Os constituintes ativos nos rizomas são as kavalactonas (kavaína, iangonina, diidro-kavaína, metisticina), que possuem propriedades sedativas e anestésicas. No entanto, a composição química da planta é bastante variada contendo ácido benzoico, ácido cinâmico, açúcares, bornil-cinamato, estigmasterol, flavocavaínas, mucilagens, pironas, dentre outros. Além disso, há grande quantidade de sais minerais, ressaltando-se o potássio (BARBOSA; LENARDON; PARTATA, 2002).

2.4.1.4 *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão)

O barbatimão é uma planta medicinal bem conhecida na medicina tradicional brasileira (Figura 5). Tem sido usado como anti-inflamatório, adstringente e cicatrizante desde o século XIX. A alta concentração de taninos condensados nas cascas é a responsável pelos seus efeitos terapêuticos (MISSOURI, 2019).

Figura 5 – Exemplar de (A) árvore de barbatimão *Stryphnodendron adstringens* e (B) detalhe do tronco do barbatimão com casca rugosa

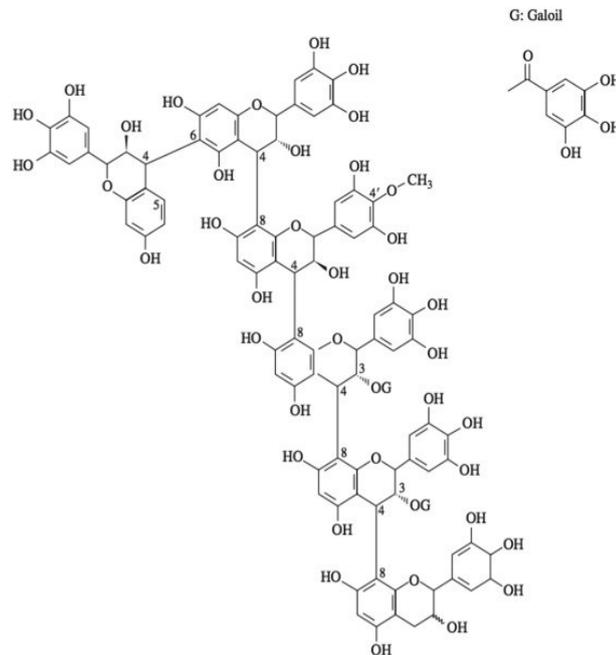


Fonte: DIAS E LAUREANO (2010)

Taninos são oligômeros e polímeros formados pela poli condensação de duas ou mais unidades flavan-3-ol e flavan-3,4-diol. Essa classe também é conhecida como proantocianidina (NASCIMENTO, 2013). Quimicamente, a sua estrutura (Figura 6) possui núcleos de pirogalol que são capazes de formar complexos estáveis com íons metálicos como ferro, manganês, alumínio, dentre outros. Isso é uma propriedade importante não só para as atividades biológicas da planta, mas também para o meio ambiente, já que atuam como bioacumuladores naturais desses metais (HASLAM, 1996).

Devido aos diversos estudos etnobotânicos e pela confirmação de sua eficácia terapêutica, esta espécie foi inserida na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) e recomendada, também, no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira como cicatrizante na forma farmacêutica de creme (BRASIL, 2009; BRASIL, 2018).

Figura 6 - Estrutura química do monômero pirogalol (galoil) e taninos poliméricos de proantocianidina obtida da casca do caule de *Stryphnodendron adstringens*



Fonte: ISHIDA et al., 2009

2.2 IMPUREZAS ELEMENTARES EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS

2.2.1 Histórico

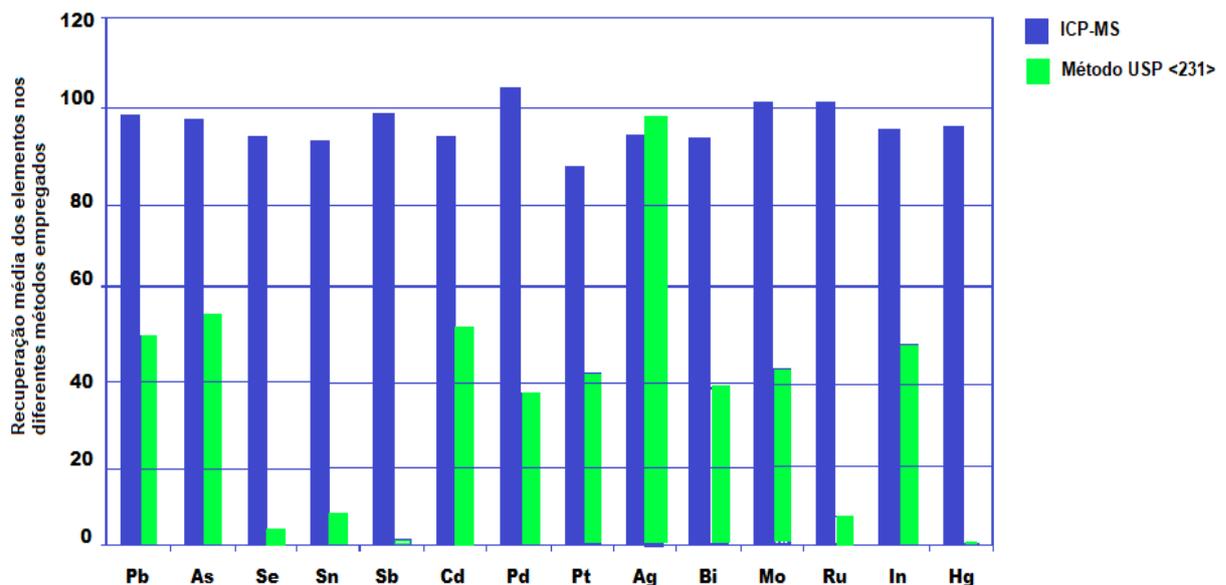
A análise de impurezas elementares em produtos farmacêuticos é abordada inicialmente pela USP em 1908, quando publicou o capítulo geral USP<231>, intitulado “*Heavy Metals*” (DESTEFANO; THOMAS, 2018). Nesta seção, o método semiquantitativo clássico para identificação de alguns metais em insumos farmacêuticos baseia-se na formação de um precipitado colorido originado da reação com íon sulfeto. A intensidade da cor na amostra é comparada com aquela formada na solução padrão de concentração igual ao limite aceitável da impureza metálica (UNITED, 2014).

Contudo, apesar desse método ter sido preconizado por mais de 100 anos pela USP, o teste apresenta uma série de limitações que o torna ineficaz na quantificação precisa de metais em insumos farmacêuticos. Segundo Lewen e colaboradores (2004), este ensaio é inespecífico e limitado somente a alguns elementos, além de requerer grande quantidade de amostra. Também, como se trata de um ensaio de comparação visual, o resultado fica subjetivo ao analista. Outra limitação da técnica é

que o preparo da amostra para o teste de alguns elementos envolve processos de digestão ácida com aquecimento que podem levar a perdas consideráveis de espécies voláteis como, por exemplo, mercúrio, cádmio, chumbo e estanho.

Estes autores demonstraram, quantitativamente, a diferença na recuperação de 14 elementos entre o método clássico para metais pesados e um método instrumental moderno de determinação elementar em IFAs. É possível verificar na Figura 7 que a maioria dos elementos teve recuperações médias em torno de 50%, mas, para selênio, estanho, antimônio e rutênio os resultados foram inferiores a 10%. O único elemento que obteve uma recuperação comparável pelo método da USP foi a Prata (LEWEN, 2004).

Figura 7 - Gráfico comparativo das recuperações obtidas para 14 elementos entre as técnicas ensaio limite de metais pesados e ICP-MS em IFAs



Fonte: Adaptado de LEWEN *et al.*, 2004

Os resultados desse e de outros estudos semelhantes apontaram a necessidade de atualização das diretrizes de análise de impurezas elementares em medicamentos. A partir de 2005, iniciou-se um ciclo de debates relacionado ao tema em todo o mundo. Uma equipe do Instituto de Medicina (IOM) nos Estados Unidos da América, composta por especialistas das áreas de toxicologia, química analítica e também de representantes da indústria farmacêutica de todo o mundo definiram sobre um escopo de elementos e seus respectivos limites toxicológicos em PDE. Havia um consenso de que os metais mercúrio, chumbo, arsênio e cádmio eram os mais tóxicos e naturalmente presentes no meio ambiente e por isso, deveriam ser primariamente

analisados em insumos farmacêuticos (DESTEFANO; THOMAS, 2018; MAITHANI et al., 2019).

Em 2008, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), publicou um guia estabelecendo diretrizes sobre o controle de catalisadores metálicos residuais em produtos farmacêuticos. O objetivo era limitar o uso destas impurezas, garantindo a segurança para o paciente (EMA, 2008).

Corroborando com a implementação das análises de impurezas elementares no âmbito farmacêutico, a organização *International Council for Harmonisation* (ICH) aprovou, em 2009, o desenvolvimento inicial de um documento, denominado Q3D, a fim de esclarecer detalhadamente os requisitos analíticos necessários para atender com eficiência o controle de impurezas. Nele fica claro que o teste convencional era obsoleto para a determinação de metais pesados e não poderia mais ser aceito, devido aos baixos valores das concentrações dos limites atualizados segundo o perfil toxicológico de cada elemento e definidos em estudos bem conduzidos. Finalmente, em 2014, foi publicada o guia ICHQ3D contendo uma lista harmonizada de 24 elementos agrupados em três categorias definidas conforme a toxicidade, probabilidade de ocorrência e a via de administração (CLARK; PUNZI, 2013; ICH, 2019; MAITHANI et al., 2019).

Com base nas informações discutidas pelas agências regulatórias, a USP publicou em 2010, dois artigos abordando os elementos tóxicos de interesse e as metodologias escolhidas para a sua determinação elementar e que atingissem os limites de exposição estabelecidos. Estas publicações foram um arcabouço para que em 2014, a USP difundisse novas diretrizes em dois capítulos gerais numerados como <232> e <233> (CLARK; PUNZI, 2013; UNITED, 2014).

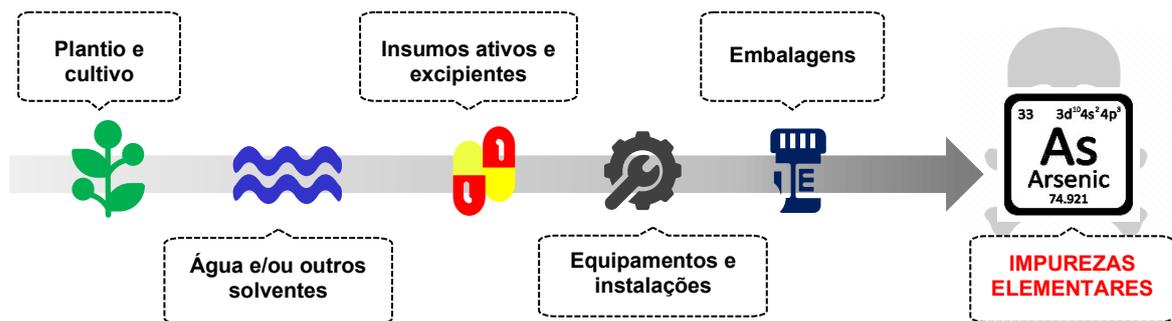
2.2.2 Definição

Em geral, impurezas elementares são definidas como elementos catalisadores e/ou contaminantes ambientais que podem ser adicionadas de maneira natural, acidental ou intencional em insumos farmacêuticos ativos, excipientes ou medicamentos (ICH, 2019).

2.2.3 Fontes de contaminação

Como a produção industrial de um medicamento envolve processos variados, a presença de impurezas elementares pode ter origens diversas, que vão desde a etapa inicial de obtenção do fármaco, através do uso de reagentes e solventes que podem conter impurezas, até mesmo de superfícies e utensílios empregados nas diversas etapas de produção industrial do medicamento. Na Figura 8 está apresentado um esquema de possíveis fontes de contaminação nesta produção. Nas etapas de reação de síntese, por exemplo, catalisadores metálicos de platina e paládio utilizados podem ser solubilizados durante o processo e se tornar contaminantes em potencial (LEWEN, 2011; BARIN et al., 2016).

Figura 8 - Possíveis fontes de contaminação de impurezas elementares em produtos farmacêuticos



Fonte: Adaptado de ICH, 2014

No caso de fitoterápicos, como já mencionado anteriormente, etapas envolvendo o plantio e o tratamento para cultivo, como a utilização de pesticidas ou a presença de contaminantes no solo, podem contribuir para a presença de impurezas elementares em um medicamento (KOSALEC; CVEK; TOMIĆ, 2009).

As matérias primas utilizadas na produção de um medicamento também podem ser ou conter uma fonte de contaminação que demande atenção. Uma análise quantitativa de impurezas elementares em variados fármacos foi realizada por Muller e Oliveira (2015). Dentre as classes de substâncias ativas estão anti-hipertensivos, antibióticos e antimaláricos. Foram encontradas concentrações elevadas de As e Cr em Captopril (MULLER; OLIVEIRA, 2015; DA SILVA et al., 2017).

Os excipientes, substâncias auxiliares, farmacologicamente inativas, adicionadas a formulação farmacêutica têm variadas funções. Podem atuar como

estabilizadores, aglutinantes, corantes, dentre outros. Em estudo de quantificação de 24 contaminantes em diversos excipientes, de origem sintética e derivados de celulose, comumente utilizados em medicamentos, os autores mostraram que apesar das baixas concentrações encontradas nos excipientes, é importante que os fabricantes monitorem estas impurezas a fim de garantir a pureza dos seus produtos (LI et al., 2015).

Entretanto, a presença de metais no insumo ativo pode ser de valor terapêutico, como é o caso de alguns antimicrobianos que contêm prata; antipsicóticos que contêm lítio ou quimioterápicos a base de platina. Outros elementos como alumínio e zinco também são componentes de formulação de antiácidos, de insulina ou de polivitamínicos (BALARAM, 2016).

A água, em suas diversas etapas produtivas e em sua inserção na fabricação de um medicamento ou limpeza de equipamentos e superfícies pode ser um potencial contaminante. Por isso, nas farmacopeias, em geral, verifica-se o controle de impurezas elementares na água (UNITED, 2014; BARIN et al., 2016; ICH, 2019; POHL et al., 2018).

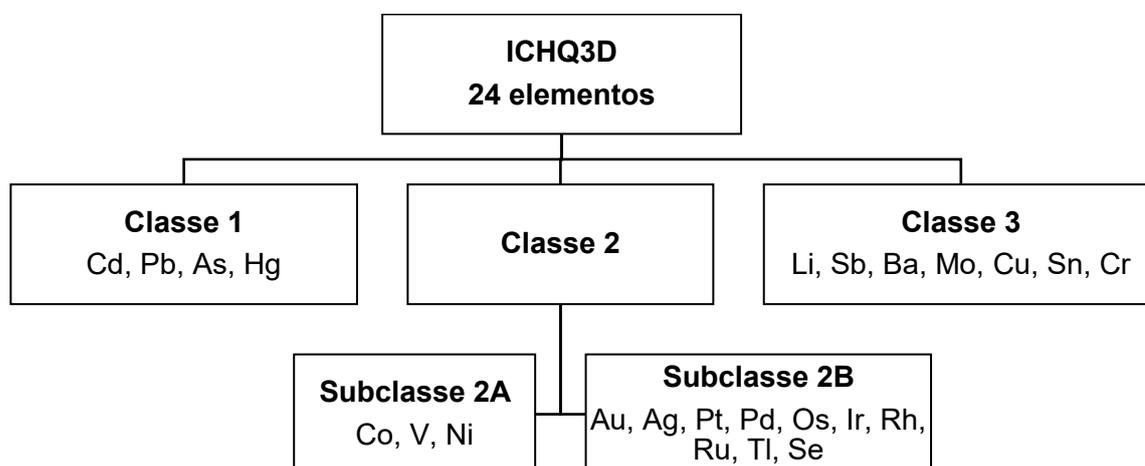
Outras fontes estão relacionadas ao contato das matérias primas ou até do produto acabado com o próprio maquinário e as superfícies metálicas envolvidas. Esses ambientes podem conter impurezas metálicas que serão acidentalmente carregadas para o produto final. Além disso, os processos de desgaste natural e por corrosão podem liberar partículas durante a fabricação (BARIN et al., 2016).

A contaminação é frequentemente atribuída a constituintes do próprio medicamento, o IFA ou EXP, ou ainda como citado, à presença de impurezas em equipamentos. Contudo, a presença ubíqua de certos elementos no ambiente laboratorial, bem como a contaminação intrínseca de reagentes, vidrarias e materiais empregadas no preparo, podem confundir a análise de pureza elementar de uma especialidade farmacêutica (KOSTA, 1982; JIN, 2016). Isso demanda um investimento em construção de salas limpas, instalação de capelas de fluxo laminar além de procedimentos adicionais de descontaminação química de materiais empregados no preparo da amostra. A finalidade seria garantir a pureza adequada para execução da análise elementar ao empregar técnicas espectro-analíticas sensíveis e com baixos limites de detecção.

2.2.4 Classificação das impurezas elementares

A classificação das impurezas elementares, segundo o guia ICHQ3D, se dá de acordo com as características toxicológicas e a prevalência nos produtos farmacêuticos. O nível de toxicidade de cada elemento está relacionado aos valores de PDE, valor limite que representa a concentração máxima aceitável de determinada substância ingerida por dia. Fatores como: via de administração, estudos prévios de segurança na exposição humana e possíveis estados de oxidação são avaliados para a definição dos valores de PDE individualmente para 24 elementos. Por outro lado, a prevalência do elemento na forma farmacêutica final envolve a abundância isotópica do elemento na natureza e também a probabilidade de uso nos processos de fabricação, como por exemplo, a síntese de um fármaco por meio de catalisadores metálicos. Portanto, o modelo de classificação de impurezas elementares atenta-se para os elementos mais tóxicos com alta probabilidade de contaminação de produtos farmacêuticos (ICH, 2019). Os 24 elementos são divididos em três categorias, conforme esquema na Figura 9.

Figura 9 - Classificação dos elementos de acordo com a toxicidade em humanos de acordo com ICHQ3D



Fonte: Adaptado de ICH, 2014

A classe 1 é formada por quatro elementos, também chamados “*big four*”, a saber, arsênio (As), cádmio (Cd), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg). Eles são tóxicos para o organismo humano e, raramente, encontrados nos produtos farmacêuticos. Porém, por serem ubíquos no ambiente devem ser obrigatoriamente monitorados.

Os elementos da classe 2 podem ser altamente tóxicos dependendo da via de administração. São divididos em dois subgrupos de acordo com a probabilidade de ocorrência. A subclasse 2A constituída pelos elementos cobalto (Co), vanádio (V) e níquel (Ni) tem alta probabilidade de contaminar os produtos farmacêuticos porque estão na composição de peças e materiais inoxidáveis envolvidos no processo produtivo, desde o armazenamento da matéria prima até a embalagem final do medicamento. Além disso, estes elementos são alergênicos e por isso, são monitorados obrigatoriamente em produtos dermatológicos (ICH, 2019).

Já na subclasse 2B, os elementos têm baixa probabilidade de ocorrência em medicamentos, pois não estão facilmente disponíveis na natureza nem na composição de materiais do processo fabril. O selênio, integrante dessa subclasse, é um microelemento essencial para o organismo humano com função estrutural e regulatória por meio de ativação enzimática. Além disso, fortalece o sistema imunológico na defesa contra patógenos e participa na proteção do corpo contra substâncias tóxicas a partir da formação de uma selenoproteína importante no bloqueio e remoção de metais pesados (SOBOLEV et al., 2017). Isso justifica os maiores limites de Se para as vias de administração parenteral e inalatória em comparação aos demais elementos, como mostrado na Tabela 2.

A classe 3 é constituída por elementos que possuem baixa toxicidade quando presentes em um medicamento administrado por via oral e demais vias. Com exceção a lítio (Li), cobre (Cu) e antimônio (Sb) que devem ser considerados na avaliação de risco para medicamentos administrados via parenteral e inalatória.

Os limites de impurezas considerados para via inalatória são bem menores comparados com as outras vias de administração. Em média, observam-se limites 10 a 100 vezes menores para esta via em comparação com a via oral. Isso se deve à rápida absorção pelo trato respiratório e alcance sistêmico, sem, contudo, passar pelo metabolismo de primeira passagem (ICH,2019).

2.3 CAPÍTULOS GERAIS <232> E <233> DA USP

O capítulo USP<232> “Impurezas elementares: limites” da USP, em conformidade com o guia ICHQ3D, estabelece uma lista de 24 elementos e seus respectivos limites PDE, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Limites de exposição diária permitidos de acordo com a via de administração do medicamento, conforme USP<232>.

Elemento	Classe	Via de administração (µg/dia)		
		Oral	Parenteral	Inalatória
Cádmio	1	5	2	2
Chumbo	1	5	5	5
Arsênio	1	15	15	2
Mercúrio	1	30	3	1
Cobalto	2A	50	5	3
Vanádio	2A	100	10	1
Níquel	2A	200	20	5
Tálio	2B	8	8	8
Ouro	2B	300	100	1
Paládio	2B	100	10	1
Írídio	2B	100	10	1
Ósmio	2B	100	10	1
Ródio	2B	100	10	1
Rutênio	2B	100	10	1
Selênio	2B	150	80	130
Prata	2B	150	10	7
Platina	2B	100	10	1
Lítio	3	550	250	25
Antimônio	3	1200	90	20
Bário	3	1400	700	300
Molibdênio	3	3000	1500	10
Cobre	3	3000	300	30
Estanho	3	6000	600	60
Cromo	3	11000	1100	3

Estas impurezas podem aparecer nos produtos finais, caso existentes a partir da síntese do IFA e de processos de fabricação ou de armazenamento e embalagem. Ao inferir que a probabilidade de presença das impurezas no insumo ou produto final pode ser alta ou possui elevada toxicidade, a concentração do elemento deve ser rastreada nas etapas críticas e obedecer ao limite especificado de exposição diária permitido, de acordo com a via de administração. Para os elementos da Classe 1: mercúrio, chumbo, arsênio e cádmio, como são potenciais contaminantes ao ambiente, devem ser obrigatoriamente monitorados.

Esta orientação se aplica a uma ampla gama de produtos para a saúde, exceto para radio-fármacos, medicamentos veterinários, vacinas, hemoderivados e produtos derivados de plantas como os fitoterápicos. De acordo com o FDA, tais produtos são

classificados em suplementos dietéticos e possuem legislação específica descrita em um capítulo suplementar, designado <2322>. Para estes produtos preconiza-se o monitoramento apenas de elementos da Classe 1 (Cd, Pb, As, Hg). No entanto, os fitoterápicos são classificados como medicamentos em outros países e, portanto, devem seguir as diretrizes recomendadas nos novos capítulos gerais, elencando em seu controle de impurezas os demais elementos. (UNITED, 2014)

Vale destacar que os limites estabelecidos na USP se referem às impurezas contidas no produto acabado e não em suas matérias primas, individualmente. Contudo, o monitoramento individual, apesar de não ser obrigatório, é uma ferramenta importante no controle de impurezas elementares no produto final (UNITED, 2014)

O capítulo USP<233> orienta sobre os procedimentos de preparo e diluição de amostras e recomenda as técnicas de ICP-OES e ICP-MS para a quantificação das 24 impurezas elementares (UNITED, 2014).

2.4 TOXICIDADE DOS ELEMENTOS

Os metais ocorrem naturalmente na crosta terrestre e estão presentes em diferentes concentrações no ambiente. Com isso, é inevitável a exposição humana aos metais por meio do ar, solo, água, medicamentos e/ou alimento. Entretanto, Vale ressaltar que alguns metais exercem funções bioquímicas essenciais em níveis adequados no corpo humano (JAISHANKAR et al., 2014).

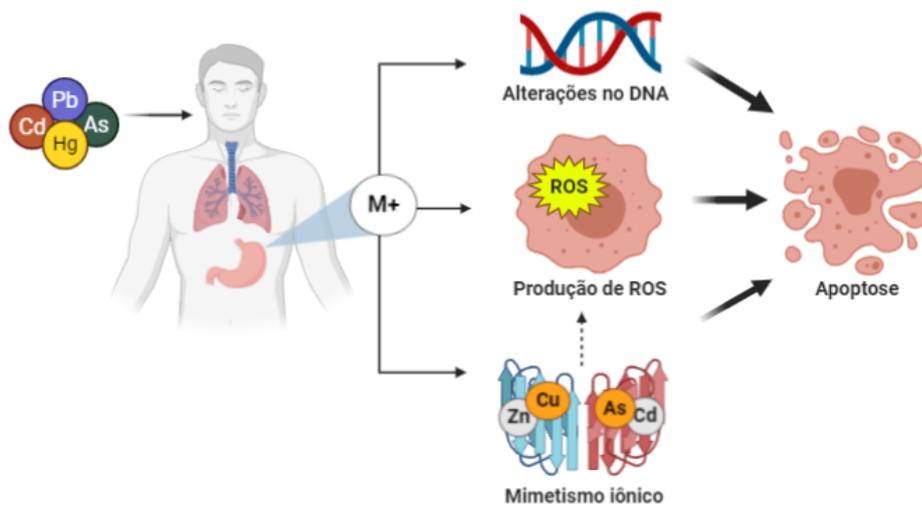
O grau de intoxicação por um metal está relacionado tanto a fatores inerentes à exposição como dose, via de exposição, duração e frequência, quanto a características fisiológicas do indivíduo como sexo e idade (JAISHANKAR et al., 2014).

Os mecanismos de toxicidade em humanos não são totalmente esclarecidos, mas estão relacionados e incluem: interferências no sistema de reparo do DNA; estresse oxidativo pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS); indução ou supressão de apoptose celular e desbalanço de elementos essenciais para o organismo (ĐUKIĆ-ĆOSIĆ et al., 2020).

A compreensão do mecanismo preciso de toxicidade dos metais é um desafio para a toxicologia, principalmente devido à variedade e especificidade química de cada elemento. Dependendo da sua forma química, um metal pode ser altamente reativo e interagir com diferentes sistemas biológicos de maneiras distintas. Contudo, já é demonstrando que íons metálicos como ferro, cádmio, cromo, níquel e outros, têm

a capacidade de produzir excessivamente espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) (GALARIS; EVANGELOU, 2002). Na Figura 10 estão exemplificados os três principais mecanismos gerais de toxicidade para os metais tóxicos como a alteração do DNA, a produção de ROS ou o mimetismo iônico, discutidos a seguir.

Figura 10 - Principais mecanismos de toxicidade dos metais no organismo humano



A carcinogenicidade dos metais está relacionada a modificações em proteínas nucleares e ao próprio DNA. A própria valência de coordenação do metal pode induzir uma mudança conformacional na proteína alterando a sua função. Também a ligação do metal ao DNA pode promover a formação de espécies reativas em um tipo de reação denominada Fenton. Este estresse oxidativo também leva a alteração de proteínas/enzimas inviabilizando os processos de reparo do DNA que normalmente aconteceriam (KLEIN; FRENKEL; COSTA, 1991; STOHS; BAGCHI, 1995; GALARIS; EVANGELOU, 2002).

Quantidades mínimas de radicais livres e outras espécies reativas estão fisiologicamente presentes no organismo com seu estado de oxirredução e concentração controlados por agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Eles participam de inúmeros processos oxidativos importantes para a célula e sinalizam para os macrófagos os ambientes de desenvolvimento tumoral e/ou bacteriano (KLEIN; FRENKEL; COSTA, 1991). Porém, a presença de metais tóxicos pode levar a um desequilíbrio regulatório na produção de ROS, culminando em um estresse oxidativo e morte celular. Esse mecanismo químico está envolvido em

processos tumorais e de envelhecimento precoce e tem sido constantemente investigado (KLEIN; FRENKEL; COSTA, 1991).

Os metais tóxicos também podem mimetizar elementos essenciais para o organismo nos processos celulares. Essa habilidade possibilita a ligação iônica em sítios específicos de proteínas transportadores ou sinalizadoras presentes na membrana plasmática levando a uma perturbação na função normal da célula (BRIDGES; ZALUPS, 2005). Um exemplo é a substituição de zinco provocado pelo mimetismo do cádmio na metalotioneína, importante enzima na eliminação de radicais livres (JAISHANKAR et al., 2014).

Destaca-se a seguir o perfil toxicológico de alguns elementos, chamados “*big four*”, cádmio, chumbo, arsênio e mercúrio devido a sua alta toxicidade e ubiquidade no ambiente, o que contribui para maior probabilidade de serem contaminantes em produtos farmacêuticos, em especial, aqueles derivados de plantas.

Cádmio (Cd): é um elemento tóxico, classificado quimicamente como um metal de transição que é encontrado na natureza em compostos minerais ligado a outros elementos como zinco e cobre. Apesar de sua toxicidade, o cádmio tem sido amplamente utilizado na fabricação de baterias, produção de pigmentos e como estabilizante do plástico. A absorção ocorre em maior parte por via inalatória, mas também pode ter absorção via gastrointestinal. O Cádmio que entra no corpo vai para o fígado e os rins se acumulando. A excreção é lenta e ocorre principalmente pela urina (SATARUG et al., 2010; WORLD, 2010).

Os alimentos constituem a principal fonte de ingestão de Cádmio para pessoas não expostas, ocupacionalmente. Baixas concentrações podem ser encontradas em vegetais, cereais e raízes com amido. O arroz, comum na refeição diária do brasileiro, é capaz de acumular Cádmio e Arsênio se for cultivado em solo contaminado (LIU et al., 2005; WORLD, 2010; NGUYEN et al., 2021).

Chumbo (Pb): é um elemento altamente tóxico que causa sérios problemas ambientais e conseqüentemente para a saúde humana. Ele está disperso em todo o ambiente principalmente como resultado de atividades antrópicas. A fabricação de produtos contendo chumbo como tintas, baterias, pesticidas e principalmente, da gasolina, foram ao longo dos anos eliminada ou limitada. No ar, estas partículas acabam se depositando no solo e em cursos d'água e, podem concentrar em organismos vivos como plantas e animais. Nos seres humanos, a exposição ao

chumbo pode levar a sérios efeitos ao sistema nervoso, cardiovascular, renal e imunológico (JAISHANKAR et al., 2014; AGENCY, 2002).

Seus efeitos tóxicos são explicados por dois mecanismos moleculares: pelo estresse oxidativo provocado pelo desequilíbrio entre a formação de radicais livres e de antioxidantes que estabilizem essas formas reativas; e pela substituição iônica de metais essenciais nos processos celulares de transporte, adesão, sinalização, etc. (JAISHANKAR et al., 2014).

Arsênio (As): é um metaloide que ocorre naturalmente e está distribuído por toda a crosta terrestre, sendo o vigésimo elemento mais abundante. Pode se apresentar em sua forma inorgânica quando ligado a elementos como oxigênio, cloro e enxofre, e, também na forma orgânica ligado a estruturas de carbono. Além disso, pode estar em diferentes estados de oxidação, a forma trivalente é a mais tóxica. Em relação à toxicocinética, cerca de 80% do arsênio inorgânico ingerido por via oral é absorvido e se distribui pelo corpo. No fígado sofre metilação e em maior parte é excretado pela urina (JAISHANKAR et al., 2014; AGENCY, 2002).

Mercúrio (Hg): é um elemento que ocorre naturalmente sob três formas: metálica ou elementar; inorgânica, quando ligado a outros elementos formando sais de mercúrio e orgânica quando combinado com o carbono, sendo o mais conhecido o metilmercúrio ($\text{CH}_3\text{-Hg}$) (AGENCY, 1999).

Até décadas atrás, compostos de mercúrio eram utilizados em produtos medicinais. O cloreto de mercúrio I possui ação antisséptica e antifúngica e foi empregado em formulações de cremes e pomadas para uso tópico no tratamento de sífilis, mas devido a sua toxicidade foram substituídos por ativos mais seguros e eficazes. Outros produtos contendo mercúrio eram utilizados como conservantes em formulações cosméticas (DAMAS; BERTOLDO; COSTA, 2014).

O mercúrio inorgânico é muito pouco absorvido pelo trato gastrointestinal, principalmente quando forma sais insolúveis. A distribuição pelo corpo é restrita e não passa facilmente pelas barreiras hematoencefálica e placentária, ao contrário das formas orgânicas metiladas. Um acúmulo é observado nos rins, que é o órgão com maior afinidade pelo mercúrio (AGENCY, 1991; CLARKSON, 2002)

2.5 TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ELEMENTARES

2.5.1 Preparo de amostras – aspectos gerais

Em uma análise química, cuidados nas etapas pré-analíticas que envolvem a escolha do método, amostragem, preservação da amostra e também o preparo adequado são fundamentais para garantir precisão e exatidão nos resultados, principalmente quando a determinação de elementos traços é requerida no processo. O preparo de amostras para análise elementar é muitas vezes complexo e possui várias funções primordiais enumeradas a seguir (MITRA, 2003):

- degradar a matriz, permitindo a solubilização e disponibilidade dos elementos;
- extrair os metais para um solvente compatível com a técnica analítica de escolha;
- concentrar os analitos a níveis detectáveis pelo instrumento;
- isolar um analito ou separar um grupo de analitos de outras espécies interferentes e
- diluir a matriz, a fim de minimizar o seu efeito na análise.

Os avanços na instrumentação analítica trouxeram equipamentos mais sensíveis, capazes de medir concentrações muito pequenas na ordem de partes por bilhão ou trilhão (ppb, ppt). Essa melhoria veio acompanhada de vantagens e desvantagens em relação ao preparo de amostras. A determinação de traços de elementos requer um ambiente analítico adequado com salas limpas, isolamento e até mesmo paramentação do analista. O uso de reagentes com elevado grau de pureza analítica tem alto impacto no custo da análise. Além disso, a maioria dessas técnicas requer a introdução da amostra na forma líquida, portanto, o uso de ácidos/solventes eficientes na digestão da matriz, solubilização dos metais presentes e que não danifiquem o instrumento ou interfiram na análise, são detalhes extremamente importantes no preparo da amostra (MITRA, 2004; FLORES, 2014)

Outro fator importante é a possibilidade de contaminação da amostra durante a sua digestão. Isso porque esse processo utiliza, muitas vezes, ácidos fortes que podem atacar ou lixiviar os recipientes e frascos, transferindo possíveis quantias contaminantes dos elementos a serem determinados para a solução digerida da amostra. Além disso, impurezas contidas nos próprios reagentes também podem

contaminar a amostra durante o preparo. Para mitigar estes problemas é recomendado o uso de reagentes ultrapuros, ou obtidos por sub-destilação. Também se recomenda a lavagem adequada do material utilizado no preparo seguido de sua descontaminação em uma solução de ácido nítrico a 10% v/v (HOENIG; DE KERSABIEC, 1996).

Além da contaminação adicional, a perda de elementos no preparo também deve ser considerada. Uma dessas perdas ocorre por volatilização de elementos como arsênio, ósmio, antimônio e mercúrio e de complexos voláteis quando aquecidos a certas temperaturas. Esse problema pode ser evitado usando sistemas fechados nos processos de decomposição e abertura da amostra (HOENIG; DE KERSABIEC, 1996; VENZAGO et al., 2013).

Fenômenos de adsorção e dessorção também estão envolvidos nos processos de digestão e contribuem para perdas elementares. Eles acontecem devido a uma interação físico-química dos elementos disponíveis com as superfícies dos materiais utilizados no procedimento. Apesar de não poder ser impedido, esse efeito pode ser reduzido mantendo a precisão dos resultados obtidos. Uma solução é a utilização de frascos de teflon modificado que são constituídos de polímeros altamente resistentes que possibilitam o trabalho em condições de temperatura e pressão mais elevadas. Também por terem uma superfície menos porosa são menos susceptíveis aos fenômenos físico-químicos de superfície do que os tubos convencionais (FLORES, 2014).

Podemos categorizar os métodos de preparo de amostras em dois grupos, de acordo com a forma de decomposição/digestão da amostra que pode ser por via seca ou por via úmida. Esses procedimentos são extensamente discutidos na literatura (ISAAC; JOHNSON, 1975; MATEJOVIC; DURACKOVA, 1994; AKINYELE; SHOKUNBI, 2015).

2.5.2 Decomposição da amostra por via seca

O método de decomposição a seco também chamado de cinzas a seco, é instrumentalmente simples e consiste na queima da amostra em um cadinho refratário por aquecimento em bico de Bunsen ou mufla a altas temperaturas. Geralmente é utilizado para amostras com alto teor de matéria orgânica que, após pirólise, é convertida em CO₂ e H₂O. As cinzas residuais inorgânicas são então solubilizadas em

ácido diluído para posterior análise (HOENIG; DE KERSABIEC, 1996; MULLER; MULLER; et al., 2015).

Apesar de ser um método simples, de fácil execução e de baixo custo, a decomposição a seco pode requerer muito tempo e levar a grande perda de analitos por volatilização, o que pode ser a principal desvantagem desse procedimento. Uma grande vantagem é a possibilidade de se concentrar os analitos de interesse devido a capacidade de se decompor grandes massas de amostras em pequeno volume de ácido. (SNEDDON et al., 2006; ALTUNDAG; TUZEN, 2011)

Essa técnica é bastante antiga, mas muitos órgãos ainda a citam em seus compêndios oficiais, como é o caso da Farmacopeia Brasileira 6ª edição. O método descrito no método geral 5.4.1.5 *Determinação de cinzas* consiste na queima da amostra em cadinho, com ou sem a presença de ácido. O objetivo é a quantificação do teor de resíduos inorgânicos presentes, que é um indicativo de impurezas (BRASIL, 2019).

2.5.3 Digestão da amostra por via úmida convencional

No método digestão por via úmida, um agente líquido oxidante é utilizado para decompor os compostos orgânicos. Esse processo geralmente é acompanhado de um aquecimento, que pode ser convencional em chapa elétrica ou em forno de micro-ondas. A escolha do ácido como agente oxidante deve ser adequada e depende da composição da amostra. Aspectos importantes a serem considerados são a força do ácido, poder oxidante, temperatura de ebulição e solubilidade dos sais formados. Também devem ser tomados cuidados quanto à segurança na manipulação visto que os ácidos utilizados são substâncias fortemente corrosivas (DE OLIVEIRA, 2003).

Ácidos inorgânicos como HNO_3 e H_2SO_4 são oxidantes fortes e os mais frequentemente escolhidos para a digestão podendo estar de forma isolada ou combinados entre si. O HCl , apesar de não ser oxidante, é também empregado na digestão ácida. O uso de um adjuvante como o peróxido de hidrogênio também tem sido empregado (SANTOS et al., 2019).

Apesar do uso de ácidos minerais aumentarem a eficiência da digestão de amostras visando uma análise elementar por ICP-OES, pode-se observar interferências espectrais que levam a um aumento significativo do sinal. Certas características físico-químicas inerentes aos ácidos (Tabela 3), como a densidade e a

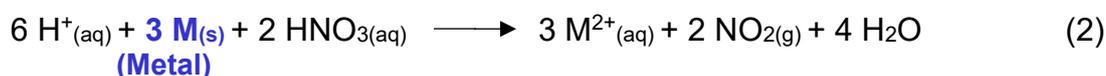
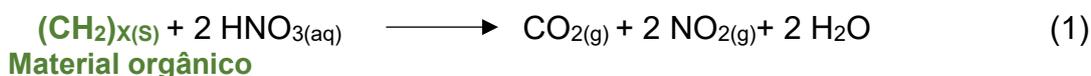
viscosidade, influenciam na formação dos aerossóis e na eficiência do transporte dos analitos ao longo do equipamento (ROMERO; POUSSSEL; MERMET, 1997).

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas (densidade, d ; ponto de ebulição, PE) dos agentes oxidantes mais comumente utilizados na digestão por via úmida, e suas propriedades

Agente oxidante	Fórmula	Massa molar (g/mol)	Concentração		d (kg/L)	P.E (°C)
			% p/p	M		
Ácido Nítrico	HNO ₃	63,01	68	16	1,42	122
Ácido Clorídrico	HCl	36,46	36	12	1,19	110
Ácido Fluorídrico	HF	20,01	48	29	1,16	112
Ácido Perclórico	HClO ₄	100,46	70	12	1,67	203
Ácido Sulfúrico	H ₂ SO ₄	98,08	98	18	1,84	338
Ácido Fosfórico	H ₃ PO ₄	98	85	15	1,71	213
Peróxido de Hidrogênio	H ₂ O ₂	34,01	30	10	1,12	106

Fonte: KOTZ; KAISER; TSCHOPEL; TOLG, 1972; FLORES, 2014

O ácido nítrico (HNO₃) é um oxidante forte que é frequentemente utilizado na digestão de matéria orgânica e de diversos metais conforme as Equações químicas 1 e 2 (GARCIA, 2016). Entretanto, devido a sua temperatura de ebulição (122 °C) ser relativamente baixa, o uso de forma isolada, em sistema aberto, não garante uma digestão completa, visto que a reação é limitada à sua ebulição. Por isso, recomenda-se que a digestão com este ácido ocorra em sistemas pressurizados e misturado a outro oxidante auxiliar como é sugerido no estudo de Bizzi e colaboradores (2011, 2014). Em contrapartida, é um reagente de fácil manuseio (FLORES, 2014).



Fonte: GARCIA, 2016

O ácido clorídrico (HCl) não tem força oxidante e possui propriedades redutoras fracas, mas é comum o uso de água régia que consiste numa solução preparada de ácido nítrico e ácido clorídrico na proporção de 1:3. O HCl é comercializado em sua forma azeotrópica, na concentração de 36% (p/p) de ácido clorídrico, e sua baixa temperatura de ebulição à temperatura ambiente limita a sua eficiência na digestão em sistema aberto. Outro aspecto importante que desfavorece a sua escolha como

digestor é a capacidade de formar alguns sais insolúveis como AgCl , PbCl_2 e HgCl_2 . Além disso, perdas por volatilização têm sido relatadas pela formação de espécies voláteis (FLORES, 2014).

Outro ácido amplamente usado nos processos de digestão é o ácido sulfúrico (H_2SO_4). Esse reagente é comercializado na concentração de 98% (p/p) (ou fumegante também), possui um elevado ponto de ebulição em comparação aos outros ácidos, o que favorece a digestão, aumentando a taxa de decomposição de algumas amostras específicas (SNEDDON et al., 2006). Por isso, é adicionado em mistura com outros ácidos, a fim de melhorar a digestão. Enquanto, o alto ponto de ebulição é vantajoso, a alta densidade e viscosidade elevada, prejudicam a introdução nos instrumentos de detecção por espectrometria de absorção atômica e plasma indutivamente acoplado, muitas vezes suprimindo o sinal analítico ou ainda criando interferentes poliatômicos no método ICP-MS (TODOLÍ; MERMET, 1999; MESTER; STURGEON, 2003). Outra desvantagem do ácido sulfúrico é a formação de sais de sulfato insolúveis na presença de íons de Pb, Ba e Ag, principalmente (SKOOG et al., 2005).

O ácido fluorídrico é o reagente de escolha quando se pretende digerir amostras silicadas como solos, minerais e rochas (HOENIG; DE KERSABIEC, 1996). Todavia, seu uso deve ser evitado quando possível devido a sua alta periculosidade. Quando necessário, a manipulação do ácido fluorídrico precisa ser feita somente com recipientes e equipamentos plásticos, como os de F-carbônio, politetrafluoroetileno (PTFE) e usando todos os equipamentos para a segurança coletiva e individual. O contato do HF com a pele pode causar danos graves e dores agonizantes (DE OLIVEIRA, 2003).

Outra substância com perfil de segurança perigoso é o ácido perclórico (HClO_4), que ao reagir com amostras de elevado teor orgânico pode causar explosão (DE OLIVEIRA, 2003; FLORES, 2014).

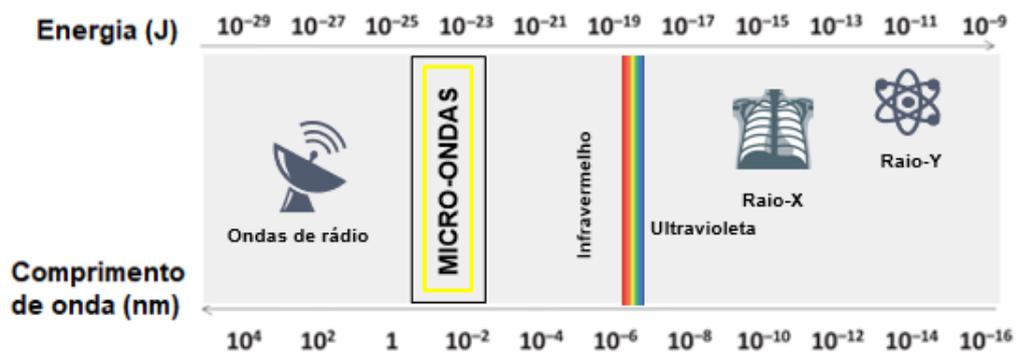
2.5.4 Digestão da amostra por via úmida em forno de micro-ondas

O avanço tecnológico dos instrumentos analíticos de detecção elementar vem acompanhado do desenvolvimento de técnicas de preparo de amostra cada vez mais eficientes e modernas, com foco nos princípios da química verde de diminuição do uso de reagentes e substâncias tóxicas ao meio ambiente (BIZZI et al., 2017). Para abertura de amostras, a tecnologia micro-ondas foi utilizada pela primeira vez em 1975

e revolucionou os métodos tradicionais de preparo de amostras. Tem sido empregada em diferentes matrizes orgânicas e inorgânicas, desde amostras biológicas até geológicas (SMITH; ARSENAULT, 1996).

A digestão por radiação micro-ondas envolve a teoria da interação energia-matéria. O efeito dessa interação está relacionado à frequência da onda eletromagnética. Na extensa região do espectro eletromagnético, as micro-ondas estão situadas entre a radiação do infravermelho e as ondas de rádio (Figura 11), sendo classificada como um tipo de energia não ionizante (KUBRAKOVA, 2002).

Figura 11 - Espectro eletromagnético indicando a região das micro-ondas.



Fonte: Adaptado de FLORES, 2014

O mecanismo de interação das micro-ondas com a matéria envolve a absorção da energia e geração de calor. No estado líquido, a interação ocorre devido a dois fenômenos: reorientação dipolar da estrutura e condução de íons. A proporção desses dois mecanismos vai depender da característica do solvente. No caso da água e outras substâncias de baixo grau de dissociação, a rotação de dipolo é o principal mecanismo envolvido no aquecimento. A condução de íons acontece por uma migração de íons em solução e está relacionada à condutividade elétrica que por sua vez depende da concentração dos íons, grau de dissociação das moléculas e temperatura da solução (KUBRAKOVA, 2002).

A digestão de amostras assistida por micro-ondas pode ocorrer em sistemas abertos, a pressão atmosférica ou em sistema fechados com temperatura e pressão elevadas. Uma forma de se trabalhar com a técnica em sistema aberto é por meio da radiação focada que foi extensamente discutido na revisão de Nóbrega e colaboradores (2002). Consiste na aplicação direcionada das micro-ondas na amostra contida em vasos abertos. Esses recipientes podem ser fabricados em vidro, quartzo

ou politetrafluoretileno (PTFE). As principais vantagens são a possibilidade de digerir uma quantidade de amostra maior e com mais segurança devido a reação ocorrer em sistema aberto. Porém, essa técnica apresenta uma série de dificuldades operacionais relacionadas ao controle dos parâmetros de digestão e a distribuição uniforme da radiação em todos os vasos reacionais, além da desvantagem de permitir a perda de voláteis durante o aquecimento (BARIN et al., 2012)

Digerir amostras em sistemas fechados com o uso das micro-ondas é a forma mais adequada e eficiente para a determinação elementar, mas requer conhecimento da evolução de evaporação dos compostos usados. Nesse ambiente, a taxa de evaporação dos ácidos e outras substâncias oxidantes diminui com o aumento da pressão, tornando a reação mais efetiva e evitando a perda de voláteis durante a digestão. Essas vantagens associadas à rapidez e à eficiência do aquecimento coroam esta técnica como o “estado da arte” em preparação de amostras (NÓBREGA et al., 2012).

Nos últimos anos, a USP vem propondo, no capítulo geral <233> mudanças nos procedimentos para análise de impurezas elementares em produtos farmacêuticos, incluindo os fitoterápicos. Uma das opções é a digestão assistida por micro-ondas em sistema fechado. Essa técnica tem inúmeras vantagens em relação a tecnologias convencionas (AGAZZI; PIROLA, 2000):

- a) impede a perda de impurezas elementares voláteis, como por exemplo, mercúrio;
- b) requer menos tempo para digestão, e
- c) necessita de pequenas quantidades de reagentes, diminuindo a exposição do manipulador aos reagentes fortemente ácidos.

2.5.5 Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES)

A técnica espectrométrica de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) foi introduzida há mais de 50 anos e vem sendo aperfeiçoada nas últimas décadas. O princípio fundamental da ICP-OES consiste na excitação dos elementos a serem analisados pelo plasma de argônio por campo indutivo (THOMAS, 2018).

De acordo com os fundamentos da espectrometria de emissão atômica, átomos de um analito em seu estado fundamental são excitados por meio de uma fonte de

energia externa sob a forma de calor ou energia elétrica. Os elétrons da camada de valência atingem esse estado mais elevado e em seguida voltam para o estado fundamental, emitindo essa energia como fótons de radiação visível ou ultravioleta (SKOOG et al., 2005).

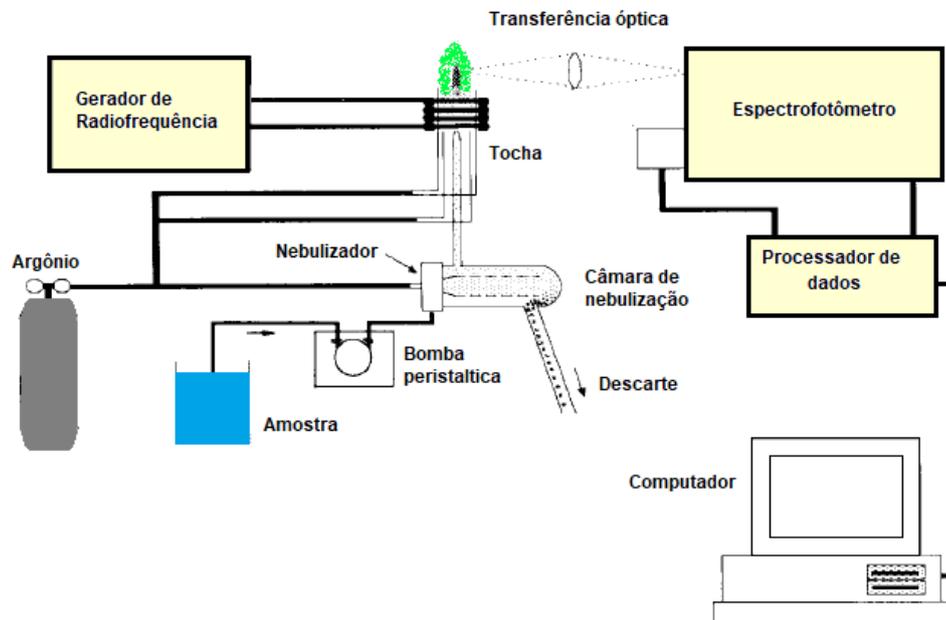
No caso de uma análise por ICP-OES, a fonte de energia para excitação e ionização dos átomos é o plasma de argônio, que é um estado do gás onde coexistem elétrons livres e cátions em movimento. A temperatura do plasma pode variar de 6000 a 10000 °C com uma energia da ordem de 15 eV que é suficiente para remover um até todos elétrons das camadas de valência da maior parte dos átomos (GINÉ, 2018).

O plasma é formado numa região denominada tocha que é constituída por três tubos concêntricos de quartzo que conduzem o argônio, a amostra e o gás de fluxo/resfriamento (Figura 12). No tubo interior, corre o gás de arraste que tem a finalidade de introduzir a amostra na forma de aerossol no plasma. Na seção intermediária entra o gás auxiliar que estabiliza o plasma e externamente percorre o gás de resfriamento. Na parte superior da tocha há uma bobina de indução, fabricada em cobre, que descarrega uma radiofrequência (RF) de 27 ou 40 MHz. Essa energia induz um campo magnético oscilante que mantém o plasma (DEAN, 2018; GINÉ, 2018).

Uma solução da amostra é introduzida no nebulizador, onde é convertida em aerossol. A gotícula então é direcionada para a tocha de plasma de argônio onde é dessolvatada, vaporizada e atomizada. O relaxamento de volta a um átomo do estado fundamental produz energia na forma de um fóton que é a base para as medições de emissão atômica (LEWEN, 2011; THOMAS, 2018).

Na Figura 12 está apresentado um esquema geral que mostra o caminho percorrido pela amostra desde a sua aspiração no sistema de introdução até o processamento do sinal analítico.

Figura 12 - Esquema geral de um espectrômetro ótico com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) indicando da amostra desde a sua aspiração no sistema de introdução até o processamento do sinal analítico.



Fonte: Adaptado de BOSS; FREDEEN (1997, p.36)

O conceito de robustez do plasma foi introduzido por Mermet (1991), considera a capacidade do plasma não sofrer alterações significativas diante de diferentes matrizes, mesmo que complexas. Essa condição robusta está relacionada a um processo eficaz de transferência de energia ajustado por parâmetros instrumentais no equipamento.

Para avaliação da robustez (estabilidade) do plasma, é medida a razão de intensidade Mg II 280 nm/ Mg I 285 nm. O magnésio é o elemento de escolha porque as suas linhas de emissão atômica (Mg II 280 nm) e iônica (285 nm), são bem próximas e as intensidades de sinal são de mesma magnitude. Além disso, os valores de probabilidade de transição são conhecidos possibilitando calcular razões teóricas (DENNAUD et al., 2001).

O estado do plasma é considerado robusto quando os valores da razão de Mg entre as linhas são superiores a 10. Geralmente essa condição é encontrada quando combinamos baixa vazão do gás de nebulização com uma alta potência de radiofrequência, associado a um alto diâmetro do tubo injetor da tocha. Segundo Mermet (1991), a vazão do gás de nebulização e o diâmetro do tubo injetor da tocha são os parâmetros que mais afetam a robustez (estabilidade) do plasma.

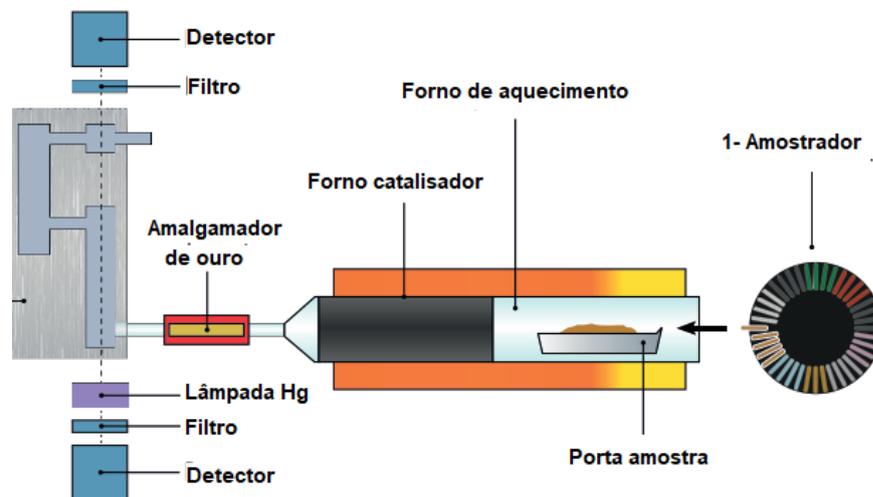
O método de ICP-OES é indicado no capítulo <232> da USP como uma alternativa adequada para a determinação de impurezas elementares em produtos farmacêuticos. Apesar de fornecer limites de detecção menores se comparados ao ICP-MS, é capaz de atender os limites de impurezas preconizados na legislação para via oral, além de ter um menor custo de aquisição e operação. Stoving e colaboradores (2013) desenvolveram e validaram um método ICP-OES para a quantificação de As, Cd, Cu, Cr, Fe, Hg, Ir, Mn, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, V e Zn em comprimidos de Lu, ativo em pesquisa para tratamento de esquizofrenia. O método apresentou LD e LQ excelentes atendendo aos limites preconizados, tanto da USP quanto da EMA, para todos os elementos. Ressaltam-se algumas interferências na detecção de Pb, Pt e Rh que devem ser observadas, e efeito de memória para o Os, relato comum em outros trabalhos.

2.5.6. Analisador direto de mercúrio (DMA)

O equipamento analisador direto de mercúrio (do inglês, *Direct Mercury Analyser* – DMA) é um equipamento moderno empregado exclusivamente na determinação de mercúrio inorgânico em diferentes matrizes, desde minerais até biológicas, e tem apresentado resultados satisfatórios em ensaios de recuperação e precisão sendo capaz de quantificar o elemento na ordem de ppt (COSTLEY et al., 2000; CIZDZIEL; HINNERS; HEITHMAR, 2002; KINGSTON; CAIN, 2003).

A análise direta de mercúrio envolve uma série de processos físicos e químicos que culminam na detecção do mercúrio por espectrometria de absorção atômica. A sequência das etapas pode ser vista na Figura 13. Uma pequena quantidade da amostra é colocada em um porta-amostra, fabricado em quartzo ou níquel, e introduzida em um forno onde sofre uma decomposição térmica e é incinerada levando a redução do mercúrio e volatilização. Essa forma reduzida do elemento é presa seletivamente em um amalgamador de ouro que, em sequência, sofre um último aquecimento, a uma temperatura elevada, e libera o mercúrio aprisionado. Por fim, uma radiação incide sobre o átomo e a quantidade de energia absorvida seletivamente é quantificada por um espectrômetro (MELENDEZ-PEREZ; FOSTIER, 2013).

Figura 13 - Esquema geral de funcionamento de um analisador direto de mercúrio (DMA-80) da Milestone



Fonte: MILESTONE, 2018

As principais vantagens em relação a técnicas analíticas convencionais como espectrometria de absorção atômica em forno de grafite ou em vapor frio, ICP-OES e ICP-MS é que etapas de preparo da amostra relacionadas a decomposição da matriz, solubilização do analito e pré-concentração são dispensáveis por meio da técnica de DMA em que a amostra é analisada diretamente na forma sólida, líquida ou gasosa.

2.6 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

A realização de inúmeros experimentos acaba sendo uma rotina na vida de um pesquisador, principalmente quando há interesse em monitorar a resposta de uma ou mais variáveis envolvidas num processo produtivo ou analítico. Essa prática acaba tornando o trabalho bastante exaustivo, além de elevar os custos. Portanto, a ação de planejar de forma sistemática um experimento é fundamental como etapa pré-analítica, a fim de minimizar custos operacionais e alcançar os objetivos propostos com conclusões estatisticamente válidas (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

No planejamento de um experimento, a definição das variáveis e das respostas de interesse é o primeiro passo. As variáveis, também chamadas de fatores, são aquelas que o experimentador é capaz de controlar, como por exemplo, temperatura, agitação, potência, dentre outros. (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Em uma análise elementar por ICP-OES vários parâmetros devem ser controlados e otimizados, desde a etapa de preparo de amostras, que envolve a digestão assistida por micro-ondas, até os ajustes instrumentais do equipamento. Para isso, o planejamento multivariado tem sido bastante empregado a fim de obter as melhores condições instrumentais para uma análise (SOUZA, 2017).

Os tipos principais de planejamento utilizados para essa finalidade são: o planejamento fatorial completo, o planejamento composto central (*Central Composite Design* - CCD) e a matriz de Doehlert (BEZERRA et al., 2008).

2.6.1 Planejamento fatorial completo

O planejamento fatorial completo (ou fracionário), de primeira ordem, é a ferramenta empregada em estudos preliminares ou nas etapas iniciais de uma otimização. Nesse tipo de planejamento, representado pela fórmula 2^k em que k corresponde ao número de variáveis, cada fator é estudado apenas em dois níveis simplificando o experimento e economizando recursos e tempo. Quando se tem muitas variáveis a serem estudadas, ao invés de se aplicar o fatorial completo, é possível reduzir o número de experimentos utilizando a matriz de planejamento fracionário representada pela fórmula: 2^{k-p} , em que o p corresponde ao número de redução no experimento. Por exemplo, quando se tem um estudo de 5 variáveis num planejamento completo, são necessários $2^5 = 32$ experimentos, porém quando se aplica o planejamento fracionário, é possível reduzir para $2^{5-1} = 16$, ou seja, pela metade o número de experimentos (BRENNER; ZANDER, 2000; NOVAES et al., 2016).

Para estimar o erro experimental, o estudo deve ser feito sempre em duplicata e analisado de forma aleatória a fim de evitar resultados tendenciosos. Outra forma de se determinar esse erro, é inserindo um ponto central 0 entre os níveis superior (+1) e inferior (-1) que deve ser analisado em triplicata.

Esse tipo de planejamento é facilmente aplicado por ICP-OES, desde a etapa pré-analítica de digestão da matriz até o ajuste de parâmetros instrumentais do equipamento. Como exemplo, um estudo realizado por Souza e colaboradores (2019) otimizaram as variáveis envolvidas na digestão por micro-ondas de amostras de ração de peixes. Empregando um planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} envolvendo as concentrações de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, temperatura do forno, tempo de digestão e potência das micro-ondas foi possível identificar as variáveis

significativas no estudo e otimizar os parâmetros envolvidos na digestão. No ajuste ótimo foram definidas as seguintes condições: 1 M HNO₃, 5% m/m de H₂O₂, 400 Watts de potência, 170 °C para a temperatura do forno de micro-ondas e duração de 20 minutos da digestão (SOUZA et al., 2019).

A estratégia do planejamento fatorial também foi aplicada na otimização da digestão assistida por micro-ondas de amostras de petróleo bruto para a determinação de níquel e vanádio. Um planejamento completo 2³ avaliou a influência de três variáveis em dois níveis: volume de ácido nítrico, peróxido de hidrogênio e temperatura do forno. Nesse caso, as concentrações dos dois elementos foram utilizadas como resposta para o planejamento. Após estabelecer as condições ideais, foi aplicado um planejamento de segunda ordem, do tipo matriz de Doehlert, para estabelecer os parâmetros instrumentais do equipamento (DOS ANJOS et al., 2018).

Outro trabalho desenvolvido por Correia e colaboradores (2017), empregou ferramentas quimiométricas para otimização de preparo de amostras para análise elementar por ionização por ICP. O estudo foi realizado em amostras de farinha de mandioca, milho e trigo. Foram investigadas a combinação das concentrações de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio na eficiência de decomposição da matéria orgânica, por meio de um planejamento fatorial completo de dois níveis e o ponto central em triplicata. O uso de maior concentração de peróxido de hidrogênio (5% m/m) como oxidante auxiliar na digestão em combinação com uma pequena concentração de ácido nítrico (2 M) demonstrou maior eficiência de decomposição da matéria orgânica. Em seguida, 17 elementos foram determinados por ICP-OES e ICP-MS após ajuste da vazão do gás de nebulização e da potência de radiofrequência utilizando um planejamento em três níveis (CORREIA et al., 2017).

2.6.2 Planejamento composto central

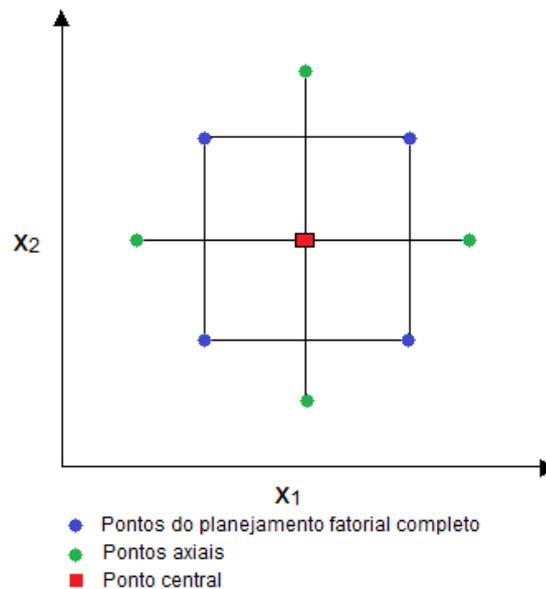
Após a etapa de triagem das variáveis, aquelas significativas são selecionadas para um estudo mais completo, já que o planejamento fatorial é limitado a um modelo linear e nem sempre estabelece uma função devidamente ajustada. Para isso, utilizamos entre outras metodologias de superfície de resposta (MSR), o planejamento composto central (CCD). O objetivo principal da MSR é determinar um polinômio que descreve adequadamente o comportamento da resposta em função das variáveis dentro dos níveis experimentais definidos no projeto (BEZERRA et al., 2008).

O CCD acrescenta pontos adicionais a um planejamento fatorial completo ou fracionário. Esses pontos axiais, na forma de estrela, geram propriedades como rotatividade ou ortogonalidade, permitindo o ajuste polinomial a fim de obter os coeficientes do modelo quadrático (Figura 14). O número de experimentos (N) requerido para o planejamento usando o CCD é dado pela Equação 3.

$$N = 2^k + 2k + n \quad (3)$$

Em que k corresponde ao número de variáveis estudadas; 2^k refere-se ao planejamento fatorial completo, $2k$ refere-se aos pontos axiais e n corresponde ao número de pontos centrais para estimativa do erro.

Figura 14 - Desenho representativo dos pontos axiais de um planejamento composto central.



3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Desenvolver, validar e aplicar um método analítico por ICP-OES para a determinação de impurezas elementares em extratos vegetais consolidados na fitoterapia brasileira.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e otimizar parâmetros de procedimento para digestão assistida por micro-ondas, bem como para ICP-OES na determinação de 24 elementos em amostras de fitoterápicos.
- Validar o procedimento de quantificação de 24 elementos em amostras digeridas de extratos vegetais secos nos parâmetros de desempenho preconizadas no capítulo geral USP<233>.
- Aplicar o método desenvolvido e validado nas amostras digeridas dos extratos secos selecionados: Maracujá (*Passiflora incarnata*), Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e Kava-Kava (*Piper methysticum*).
- Avaliar as concentrações obtidas dos elementos por ICP-OES e buscar outras técnicas de quantificação, a exemplo de Mercúrio, por meio de DMA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Amostras

As amostras analisadas (Tabela 4) foram extratos vegetais secos de kava-kava (*Piper methysticum* G. Forst), Maracujá (*Passiflora incarnata*), Guaraná (*Paullinia cupana* Kunth) e Barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). Os extratos secos foram obtidos por doação de fabricantes de matérias-primas e de farmácias de manipulação.

Tabela 4 - Dados das amostras de fitoterápicos na forma de extratos secos analisadas no estudo.

Fitoterápico	Nome científico	Fabricante	Parte da planta
Kava-kava	<i>Piper methysticum</i> G. Forst	Finzelberg	Rizoma
Passiflora	<i>Passiflora incarnata</i>	Florien	Flor
Guaraná	<i>Paullinia cupana</i> Kunth	Infinet	Semente
Barbatimão	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	LCQ-FAFAR	Casca

LCQ-FAFAR – Laboratório de controle de qualidade da Faculdade de Farmácia/UFMG

4.1.2 Substâncias Químicas de Referência (SQR)

Para a construção da curva analítica foram utilizados os padrões para impurezas elementares de acordo com o guia ICH Q3D aplicável para testes de acordo com USP<232> e Farmacopeia Europeia, capítulo geral 5.20, todos do fabricante *Sigma-Aldrich*.

- Padrão 1, traceCERT® da Sigma-Aldrich contendo os elementos: Ag (150 mg/L), As (15 mg/L), Cd (5 mg/L), Co (50 mg/L), Hg (30 mg/L), Ni (200 mg/L), Pb (5 mg/L), Se (150 mg/L), Tl (8 mg/L), V (100 mg/L) em ácido nítrico 12% v/v
- Padrão 2, traceCERT® da Sigma-Aldrich contendo os elementos: Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru na concentração de 100 mg/L em ácido clorídrico 10% v/v.
- Padrão 3, traceCERT® da Sigma-Aldrich contendo os elementos: Ba (140 mg/L), Cr (1100 mg/L), Cu (300 mg/L), Li (55 mg/L), Mo (300 mg/L), Sb (120 mg/L), Sn (600 mg/L) em ácido nítrico 5% v/v e ácido fluorídrico 0,5% v/v.

4.1.3 Reagentes e outros materiais

Para a etapa de digestão das amostras serão utilizados os seguintes reagentes e materiais:

- Ácido nítrico concentrado 65%, marca EMSURE®, (Merck), purificado em um destilador de ácidos *sub-boiling* de quartzo DuoPUR® (Milestone).
- Ácido clorídrico concentrado 37% concentrado, p.a (Synth).
- Peróxido de hidrogênio 30% concentrado, (Synth).
- Água ultrapura.
- Tubos de centrífuga de polipropileno (15 e 50,0 mL) (Corning).
- Pipetas automáticas com certificado de calibração RBC.
- Vidraria comum de laboratório.

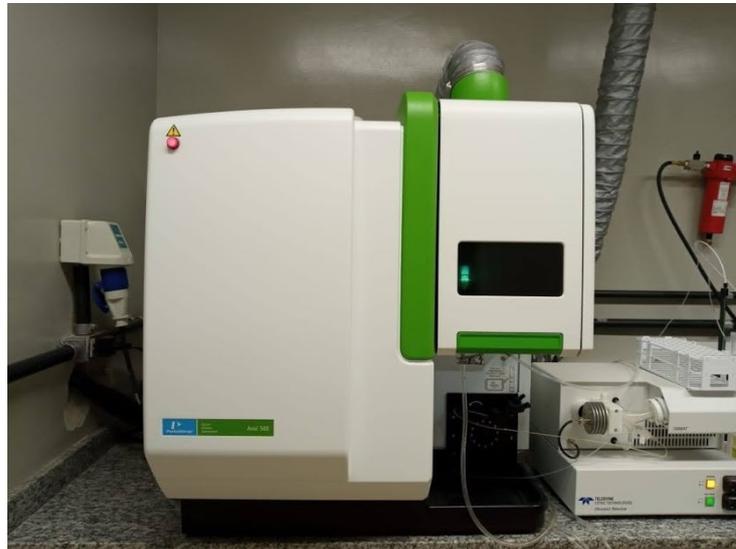
Para a análise por ICP-OES foi utilizado gás argônio com pureza de 99,9999% (*AirLiquid*).

Todos os materiais de vidro e plástico empregados nas análises foram lavados com água, deixados em banho com Extran® MA 02 Neutro 5% v/v (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 48 h, enxaguados com água ultrapurificada Mili-Q® (Merck) e colocados em banho de ácido nítrico 10% v/v por no mínimo, 24 h.

4.1.4 Equipamentos

- Balança Analítica, modelo AL 500C (Shimadzu, São Paulo, Brasil);
- Purificador de água Milli-Q® modelo Direct-Q 3 (Millipore, MA, EUA);
- Digestor de micro-ondas, modelo Mars 5 (CEM) – IGC/UFMG;
- Analisador de carbono orgânico total, modelo TOC-L com detector dispersivo infravermelho (NDIR) (SHIMADZU) – DESA/UFMG;
- Espectrômetro ICP-OES, Avio™ 200 (PerkinElmer, EUA) (Figura 15); acoplado a amostrador automático ASX-560, Teledyne (CETAC) – LAMIN-CPRM;
- Analisador direto de mercúrio (da sigla em inglês, *Direct Mercury Analyzer - DMA*), modelo evo-80.

Figura 15 - Espectrômetro de emissão Óptica com plasma indutivamente acoplado, modelo AVIO 500, Perkin Elmer, disponível no Laboratório de Análises Mineraias – LAMIN em Caeté.



4.2 Métodos

4.2.1 Preparo das amostras para digestão

Para a digestão, aproximadamente 20 g do pó seco e pulverizado de cada extrato vegetal foram misturados e homogeneizados. Em seguida, pesaram-se aproximadamente 250 mg do *pool* dos extratos secos dos fitoterápicos diretamente para um tubo de PTFE apropriado para o digestor. A pesagem foi repetida mais 7 vezes. Adicionaram-se nos quatro primeiros tubos 7 mL de solução de ácido nítrico 2 M e nos outros quatro tubos 7 mL de solução de ácido nítrico 7 M, conforme esquema da Tabela 6. Os tubos foram deixados em repouso por 30 minutos e, após esse tempo, foi acrescentado 1 mL de peróxido de hidrogênio 35% v/v. Rapidamente, os tubos foram fechados e colocados no carrilhão do forno de micro-ondas para iniciar a digestão.

4.2.2 Digestão ácida assistida em forno de micro-ondas

Os ensaios de digestão assistida em forno de micro-ondas dos extratos secos foram realizados no equipamento Digestor Mars 5 (CEM) disponível no laboratório de geoquímica ambiental (NGqA) do Centro de Pesquisa Manoel Teixeira da Costa (CPMTC) do Instituto de Geociências da UFMG. Os tubos contendo as amostras devidamente preparadas foram dispostos no carrilhão do forno de micro-ondas. Os

ensaios seguiram diferentes programas de aquecimento, conforme Tabela 5. Após a digestão, a pressão interna de cada tubo foi cuidadosamente liberada, o digerido foi transferido quantitativamente para o tubo Falcon de 50 mL e lavado por 3 vezes com aproximadamente 5 mL de água ultrapurificada. O tubo foi avolumado para 25 mL com água ultrapurificada.

Tabela 5 - Programa de aquecimento ajustado para a digestão das amostras no digestor MARS5 (CEM) para as amostras de fitoterápicos.

Step	Tempo	Temperatura	Potência
1	0-10 min	0-120 °C	800 W
2	5 min	120 °C	800 W
3	0-5 min	140 °C	800 W
4	5 min ou 10 min	140 °C ou 180 °C	800 W

A eficiência da digestão por micro-ondas depende de ajustes paramétricos que envolvem condições de temperatura, tempo de digestão e concentração do ácido. A fim de determinar quais as melhores condições, foi realizado uma série de experimentos por meio de um planejamento fatorial 2³, em duplicata e os ensaios efetuados de forma aleatória. Os resultados obtidos foram manipulados no *software* Statistica 6.0 (Statsoft, Tulsa, EUA) e no *Microsoft Excel*. O esquema das combinações é mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Planejamento fatorial completo 2³ para otimização dos parâmetros envolvidos na digestão.

Experimento	Concentração de ácido nítrico	Temperatura	Tempo
1	2 M (-) ^a	140 °C (-)	5 min (-)
2	7 M (+) ^b	140 °C (-)	5 min (-)
3	2 M (-)	180 °C (+)	5 min (-)
4	7 M (+)	180 °C (+)	5 min (-)
5	2 M (-)	140 °C (-)	10 min (+)
6	7 M (+)	140 °C (-)	10 min (+)
7	2 M (-)	180 °C (+)	10 min (+)
8	7 M (+)	180 °C (+)	10 min (+)

a: (-), nível inferior; b: (+), nível superior das variáveis.

As variáveis independentes definidas foram concentração molar do ácido nítrico, temperatura do forno e tempo de digestão. A resposta monitorada foi o teor de carbono orgânico total (TOC/COT) obtido pelo analisador de carbono Shimadzu TOC-L CPH com detector NDIR. Para a concentração molar de ácido nítrico, foram definidos os níveis alto e baixo como 7 M e 2 M, respectivamente. As temperaturas foram 140 °C e 180 °C e o tempo variou em 5 e 10 minutos.

4.2.3 Otimização dos parâmetros instrumentais do ICP-OES

Para esse estudo, foi utilizado o digerido obtido do extrato seco de kava-kava (*Piper methysticum*) adicionado de uma solução padrão multielementar contendo Mg a 2 mg/L. Numa primeira etapa de triagem, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^4 em duplicata, para a investigação dos seguintes parâmetros instrumentais: vazão do gás de nebulização e potência de radiofrequência como variáveis numéricas e, tipo de visão do plasma e tipo de nebulizador como variáveis categóricas. Os níveis foram estabelecidos conforme Tabela 7. Como resposta, foram obtidas as intensidades dos picos de Mg em duas linhas de emissão II e I correspondentes a 280 nm e 285 nm, respectivamente, resultados esses já obtidos após a multiplicação pelo fator 1,8.

Tabela 7 - Definição dos níveis dos parâmetros em estudo no ICP-OES.

Parâmetro	Unidade	Nível maior (+)	Nível menor (-)
Vazão do gás de nebulização	mL/min	0,8	0,4
Potência de Radiofrequência	W	1450	1100
Tipo de visão	-	Axial	Radial
Tipo de nebulizador	-	Ultrassônico	Pneumático

Baseado no estudo anterior, os parâmetros significativos e de maior influência na resposta foram selecionados e por meio de um planejamento composto central foram realizados experimentos para a otimização desses parâmetros. Nessa etapa, os resultados experimentais foram conduzidos e avaliados por meio dos softwares Statistica 6.0 (Statsoft, Julsa, EUA) e *Microsoft Excel*.

4.2.4 Validação do procedimento de análise elementar por ICP-OES

4.2.4.1 Linearidade

Construiu-se uma curva analítica multielementar dos analitos de interesse com seis níveis de concentrações, definidos com base na concentração J conforme Tabela 8. Essa concentração é calculada por meio da equação 4 que considera o limite de exposição diária permitido (PDE) para via oral; a dose diária máxima (MDD) do fitoterápico e o fator de diluição. Para os fitoterápicos, foi considerado a MDD de 10 g/dia em razão das várias formas de uso e diferentes posologias. O FD foi de 100, considerando o preparo da amostra de 0,25 g do extrato diluído para 25 mL de solução final.

$$\text{Concentração } J = \frac{PDE}{MDD \times FD} \quad (4)$$

Tabela 8 – Concentração J obtida para cada elemento com base no PDE, MDD e FD.

Elemento	Classe	PDE ($\mu\text{g}/\text{dia}$)	Concentração J ($\mu\text{g}/\text{L}$)
Cádmio	1	5	5
Chumbo	1	5	5
Arsênio	1	15	15
Mercúrio	1	30	30
Cobalto	2A	50	50
Vanádio	2A	100	100
Níquel	2A	200	200
Tálio	2B	8	8
Ouro	2B	100	100
Paládio	2B	100	100
Írídio	2B	100	100
Ósmio	2B	100	100
Ródio	2B	100	100
Rutênio	2B	100	100
Selênio	2B	150	150
Prata	2B	150	150
Platina	2B	100	100
Lítio	3	550	550
Antimônio	3	1200	1200
Bário	3	1400	1400
Molibdênio	3	3000	3000
Cobre	3	3000	3000
Estanho	3	6000	6000
Cromo	3	11000	11000

As diluições finais foram feitas a partir de soluções padrão estoque descritas a seguir.

- Solução padrão estoque 1 (SE1): pipetaram-se 2,5 mL do padrão 1 (Ag, As, Cd, Co, Hg, Ni, Pb, Se e V) para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água ultrapurificada. As concentrações obtidas foram as seguintes: Ag (7,5 mg/L), As (0,75 mg/L), Cd (0,25 mg/L), Co (2,5 mg/L), Hg (1,5 mg/L), Ni (10 mg/L), Pb (0,25 mg/L), Se (7,5 mg/L), Tl (0,4 mg/L), V (5 mg/L). Essa solução padrão estoque foi preparada em triplicata.

- Solução padrão estoque2 (SE2): pipetaram-se 2,5 mL do padrão 2 (Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru) para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água ultrapurificada, obtendo-se a concentração de 5 mg/L para os elementos citados. Essa solução padrão estoque foi preparada em triplicata.

A partir das soluções padrão estoque 1 e 2 e com o padrão 3, foram preparados os seis níveis da curva analítica em triplicatas autênticas com as respectivas diluições (Tabela 9). Os volumes pipetados foram transferidos para balão de 10 mL, pipetaram-se 0,4 mL de peróxido de hidrogênio, 2,8 mL de ácido nítrico 2 M e finalmente os balões foram avolumados até o menisco com água ultrapurificada. As concentrações finais obtidas estão descritas na Tabela 10.

Tabela 9 - Volumes pipetados para a construção da curva analítica.

Solução diluída	Elementos	Volume da alíquota (mL)					
		0,25 J	0,5 J	0,75 J	1 J	1,25 J	1,5 J
SE1	Ag, As, Cd, Co, Hg, Ni, Pb, Se e V	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
SE2	Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh e Ru	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
P3	Ba, Cr, Cu, Li, Mo, Sb e Sn	0,025	0,05	0,075	0,1	0,125	0,15

Tabela 10 - Curva analítica com seis níveis de *J* e as concentrações finais.

Analito	Concentração final ($\mu\text{g/L}$)					
	0,25 <i>J</i>	0,5 <i>J</i>	0,75 <i>J</i>	1 <i>J</i>	1,25 <i>J</i>	1,5 <i>J</i>
Cádmio	1,25	2,5	3,75	5	6,25	7,5
Chumbo	1,25	2,5	3,75	5	6,25	7,5
Arsênio	3,75	7,5	11,25	15	18,75	22,5
Mercúrio	7,5	15	22,5	30	37,5	45
Cobalto	12,5	25	37,5	50	62,5	75
Vanádio	25	50	75	100	125	150
Níquel	50	100	150	200	250	300
Selênio	37,5	75	112,5	150	187,5	225
Prata	37,5	75	112,5	150	187,5	225
Tálio	2	4	6	8	10	12
Platina	25	50	75	100	125	150
Ouro	25	50	75	100	125	150
Paládio	25	50	75	100	125	150
Irídio	25	50	75	100	125	150
Ósmio	25	50	75	100	125	150
Ródio	25	50	75	100	125	150
Rutênio	25	50	75	100	125	150
Lítio	137,5	275	412,5	550	687,5	825
Antimônio	300	600	900	1200	1500	1800
Bário	350	700	1050	1400	1750	2100
Molibdênio	750	1500	2250	3000	3750	4500
Cobre	750	1500	2250	3000	3750	4500
Estanho	1500	3000	4500	6000	7500	9000
Cromo	2750	5500	8250	11000	13750	16500

As soluções finais foram analisadas aleatoriamente no equipamento e as intensidades dos picos de cada analito foram registradas para a construção das curvas de calibração. Foi realizada inicialmente uma análise visual de cada curva obtida verificando a presença de *outliers* pelo teste de Jackknife. Após tratamento de *outliers* foram obtidos os coeficientes de determinação R^2 . Em seguida, foram verificadas as premissas de regressão linear: normalidade dos resíduos pelo método de Ryan-Joiner, independência pelo método de Durbin-Watson e a homoscedasticidade pelo teste de Levene modificado. Por fim, foi testada a adequação do modelo matemático de regressão linear simples pela análise de variância (ANOVA) onde foram calculados os valores F para a regressão e falta de ajuste (desvio da linearidade). Para facilitar o tratamento dos resultados, os dados obtidos no software do equipamento foram exportados para planilha eletrônica do Excel (DE SOUZA; JUNQUEIRA, 2005).

4.2.4.2 Exatidão

A exatidão, verificada por meio da recuperação foi avaliada pelo método de adição de padrão multielementar em três níveis de concentração dos analitos correspondente aos valores 0,5 J; 1,0 J e 1,5 J. Para três tubos de PFA contendo as amostras pesadas com os reagentes adicionados prontas para a digestão por micro-ondas, foram pipetados das soluções padrão estoque 1 e 2 volumes de 250; 500 e 750 µL, respectivamente, correspondendo às concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 J dos referidos elementos. Da solução padrão 3 foram pipetados 125, 250 e 375 µL, também correspondente a 0,5; 1,0 e 1,5 J. Esses preparos foram realizados em triplicata. Os resultados do teste de exatidão do procedimento foram expressos em porcentagem de recuperação dos analitos adicionados ao extrato pré-digestão. A USP<233> estabelece que a faixa de recuperação deve ser de 70-150% do analito adicionado.

4.2.4.3 Precisão (repetitividade e precisão intermediária)

A repetitividade foi avaliada por meio do desvio padrão relativo (DPR) obtido na determinação dos elementos adicionados na concentração de 1 J nas amostras preparadas independentes (n = 6). As soluções amostras foram preparadas pipetando-se 500 µL das soluções padrão estoque 1 e 2 e 250 µL do padrão 3 nos tubos Falcon contendo os digeridos obtidos. Em seguida, completou-se o volume para 25 mL com água ultrapurificada.

A precisão intermediária foi avaliada por meio do desvio padrão relativo (DPR) obtido na determinação dos elementos adicionados na concentração de 1 J em 6 amostras preparadas adicionalmente ao ensaio da repetibilidade (n = 12). O preparo se deu da mesma forma, porém as diluições foram realizadas por diferentes analistas e analisadas em dias diferentes.

4.2.4.4 Limites de detecção e quantificação

O cálculo do limite de detecção foi realizado adotando-se o conceito da concentração equivalente de sinal de fundo (*background equivalent concentration - BEC*), que se refere à concentração do analito que produz um sinal equivalente à intensidade de emissão do fundo para a linha medida (THOMSEN, 2003). Para esse cálculo foi considerado a concentração de cada analito referente a 0,5 J como pode ser visto na Equação 5.

$$BEC = \frac{C_{0,5J}}{SBR} \quad SBR = \frac{I_{0,5J} - I_{branco}}{I_{branco}}$$

Em que: BEC é a concentração equivalente de sinal de fundo; $C_{0,5J}$ é a concentração do analito referente a 0,5 J; SBR é a razão do sinal do analito pelo sinal de fundo; $I_{0,5J}$ é a intensidade do sinal correspondente a concentração de 0,5 J do analito e I_{branco} é a intensidade do sinal correspondente ao branco.

Por sua vez, o limite de detecção foi calculado pela Equação 6 a seguir, em que: LD é o limite de detecção em $\mu\text{g/L}$ e RSD_{branco} é o desvio padrão relativo obtido em dez leituras independentes do branco analítico.

$$LD = \frac{3 \times RSD_{branco} \times BEC}{100} \quad (6)$$

O limite de quantificação pode ser calculado a partir do limite de detecção conforme a Equação 7

$$LQ = 3,3 \times LD \quad (7)$$

4.2.5 Aplicação da análise de impurezas elementares nos extratos vegetais por ICP-OES em extratos vegetais

A partir das condições otimizadas nas etapas de preparo de amostras e adequação do sistema instrumental, as amostras dos extratos das quatro espécies vegetais foram preparadas em triplicata e analisadas no ICP-OES.

Pesaram-se aproximadamente 250 mg do extrato seco diretamente para o tubo de digestão. Em seguida adicionaram-se 7 mL de uma solução de ácido nítrico 2 M deixando a amostra em repouso por aproximadamente 30 minutos. Após esse tempo, adicionou-se 1 mL da solução de peróxido de hidrogênio 30%. Fechou-se o tubo com a tampa rosqueada e colocou-se no carrilhão do digestor de micro-ondas. O programa de aquecimento foi ajustado para atingir uma temperatura máxima de 180 °C e a digestão ocorrer por 10 minutos. Após o término, aguardaram-se aproximadamente 2 horas para resfriamento dos tubos que cuidadosamente foram abertos para alívio da pressão. O digerido foi transferido quantitativamente para o tubo Falcon de 50 mL e avolumado para 25 mL. Os tubos foram alocados no amostrador automático e o espectrômetro ajustado conforme as configurações da Tabela 11.

Tabela 11 - Condições operacionais do ICP-OES para a determinação de impurezas elementares nos extratos de fitoterápicos.

Parâmetros instrumentais	Condição
Visão da tocha	Axial
Tipo de Nebulização	Ultrassônica
Diâmetro interno da tocha (mm)	2
Gerador de radiofrequência (MHz)	40
Potência de radiofrequência (W)	1250
Vazão do gás de plasma (L/min)	15
Vazão do gás de nebulização (L/min)	0,45
Vazão do gás auxiliar (L/min)	0,2
Taxa de aspiração da amostra (mL/min)	1,5
<i>Source equilibration delay (s)</i>	15

4.2.6 Determinação de mercúrio nos extratos vegetais pelo DMA

Como etapa preliminar, foram realizadas as limpezas de todas as barcas de níquel através da queima no equipamento. Em seguida, foi preparada uma solução padrão de mercúrio na concentração 2,5 ppb, a partir da pipetagem de 62,5 µL de uma solução padrão de mercúrio 1 ppm para um balão de 25 mL completando o menisco com água ultrapurificada. Desta solução foram pipetados para cada barca, diferentes volumes conforme podem ser vistos na Tabela 12 para a construção da curva analítica. Foram pesadas aproximadamente 0,1000 g dos extratos secos dos fitoterápicos pulverizados para as barcas de níquel e colocadas no amostrador. A amostra é inicialmente seca a 200 °C por 2 min e em seguida sofre decomposição a 800 °C por 1,5 min. Após um intervalo de tempo de 1 minutos, o mercúrio aprisionado no amalgamador de ouro é liberado e quantificado em 254 nm.

Tabela 12 - Dados para construção da curva analítica de baixa concentração de mercúrio (célula 0) no DMA

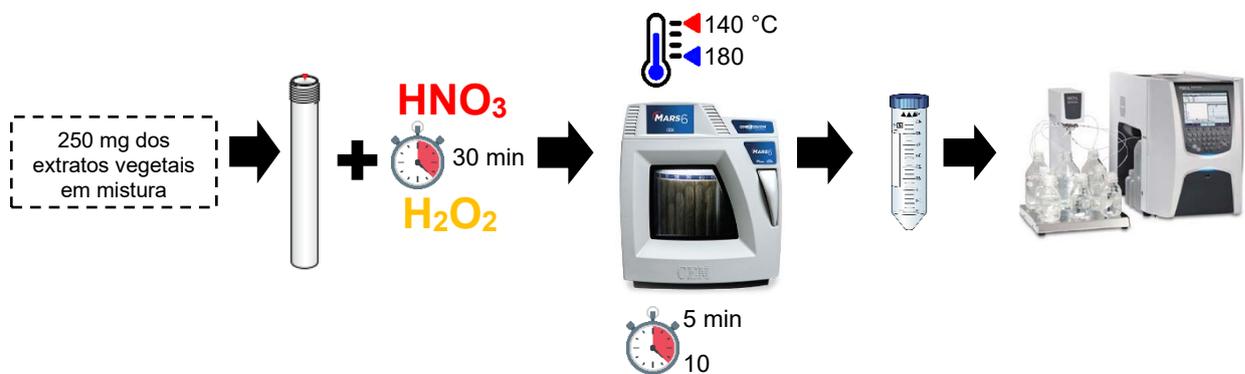
Ponto nº	Massa de Hg (ng)	Peso teórico (g)	Volume (µL)
1	0,125	0,05	50
2	0,25	0,1	100
3	0,375	0,15	150
4	0,5	0,2	200
5	0,75	0,3	300
6	1	0,4	400

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação dos digeridos obtidos na digestão

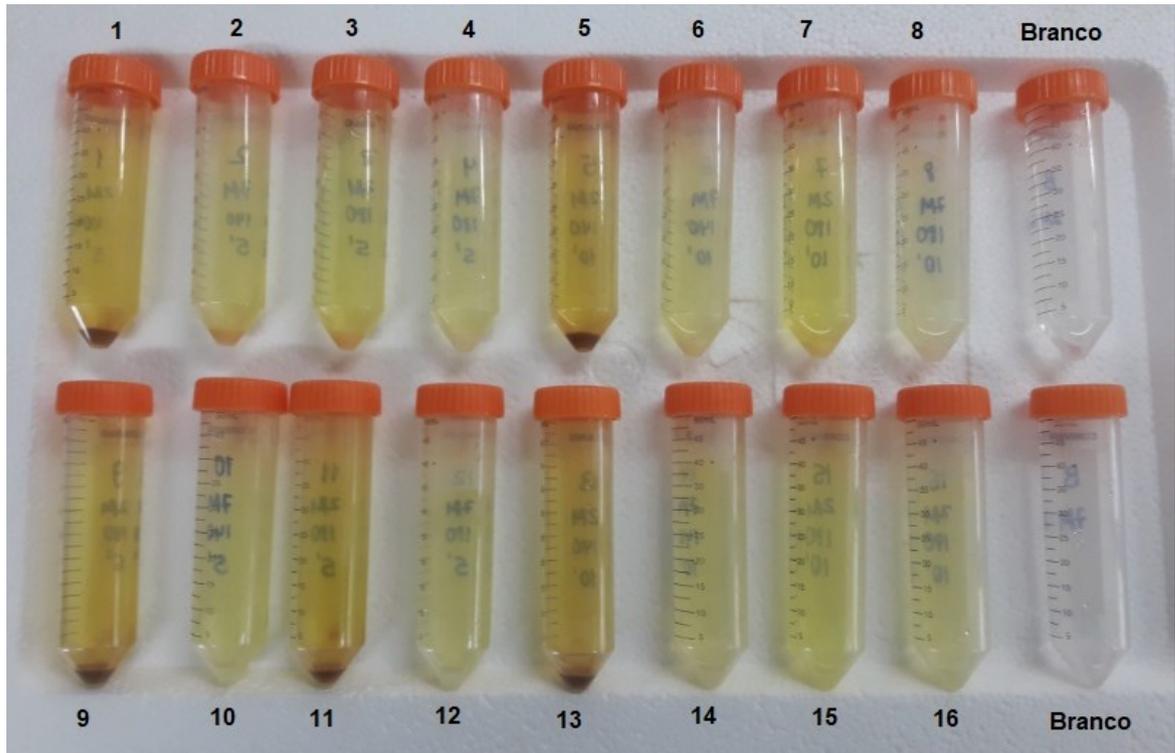
Os digeridos resultantes das amostras homogeneizadas dos extratos secos de cada fitoterápico foram analisados visualmente quanto à cor e a presença de precipitados sólidos a fim de avaliar qualitativamente as melhores condições experimentais de concentração (2 M ou 7 M) de ácido nítrico, temperatura e tempo de digestão, conforme esquematizado na Figura 16.

Figura 16 - Esquema do procedimento para otimização da digestão por micro-ondas



Observou-se visualmente que os experimentos 1 (C = 2 M; T = 140 °C e t = 5 min) e 5 (C = 2 M; T = 140 °C e t = 10 min) e suas replicatas foram os que apresentaram menor eficiência na digestão devido a presença de resíduo sólido não digerido e coloração mais escura da solução, como mostra a Figura 17. Os experimentos 4 (C = 7 M; T = 180 °C e t = 5 min) e 8 (C = 7 M; T = 180 °C e t = 10 min) visivelmente tiveram melhor desempenho e uma digestão mais eficiente com maior clareamento da solução. Contudo, após repetição nestas condições, detectou-se a presença de um precipitado branco em pequena quantidade como mostrado na Figura 18.

Figura 17 - Pool de amostras digerido em forno de micro-ondas

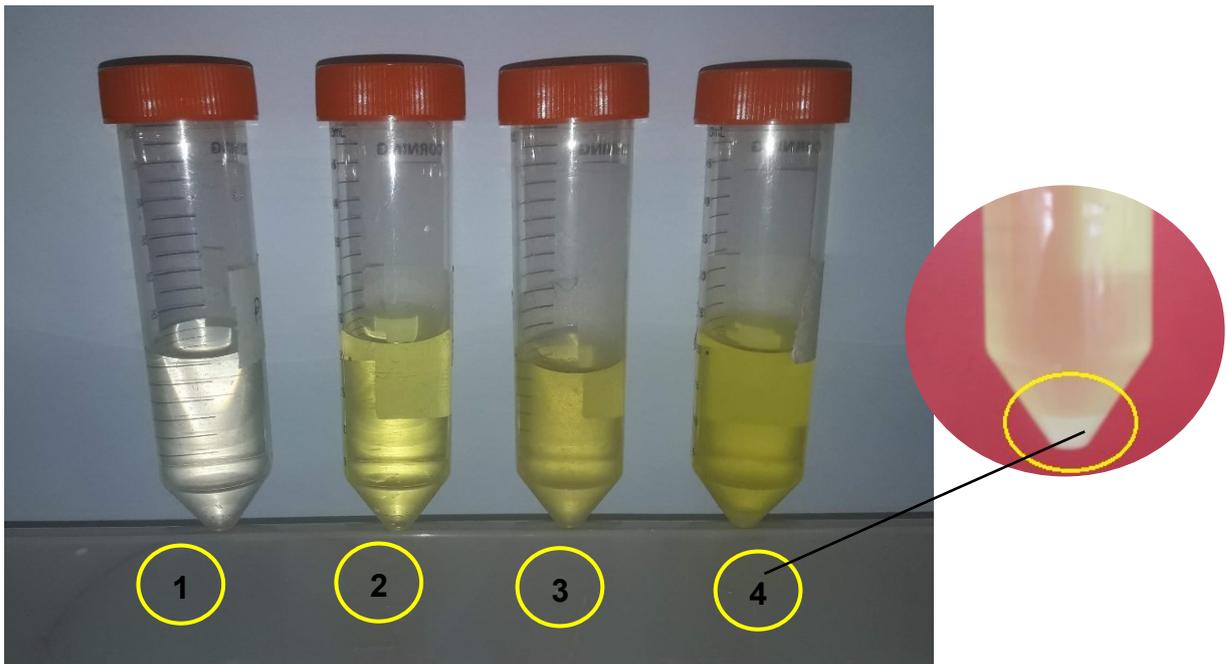


Para identificar a origem do precipitado, foi realizada uma digestão ácida em cada amostra de fitoterápico, separadamente nas condições do experimento 8 descritos na Tabela 13. As amostras dos fitoterápicos de Maracujá, Guaraná e Barbatimão foram totalmente digeridas sem formação de precipitado, como é mostrado na Figura 18, enquanto a Kava-kava apesar de formar um sobrenadante clarificado, evidenciando boa digestão, apresentou uma pequena quantidade de corpo de fundo fino e branco.

O precipitado contido nesse tubo foi separado por centrifugação e o sobrenadante descartado. Em seguida, foi colocado em estufa para secagem a 105 °C e o pó muito fino e esbranquiçado obtido pareceu tratar-se de material silicato, conhecido como fitólito (NAWAZ et al., 2019). Para confirmar essa hipótese, foi testada a sua solubilização em ácido fluorídrico 1 M e em hidróxido de sódio 1,5 M. O pó dissolveu-se completamente em ambos os tubos e apresentou estrutura amorfa quando foi submetido a análise por difração de raios-X. Procedimento semelhante, empregando solução de hidróxido de sódio 1,5 M foi proposto por Barros e colaboradores (2016) para digestão completa de folhas de cana-de-açúcar em micro-ondas, planta essa que contém concentrações elevadas de sílica. Apesar da

possibilidade de solubilização do precipitado utilizando hidróxido de sódio com uma etapa subsequente de neutralização com ácido nítrico, optou-se pelo descarte do precipitado não digerido e análise elementar do sobrenadante obtido na amostra de Kava-kava.

Figura 18 - Amostras digeridas dos extratos secos de cada fitoterápico (1- *Passiflora incarnata*, 2-*Paullinia cupana* Kunth, 3-*Stryphnodendron adstringens*, 4-*Piper methysticum*) com evidência ao precipitado formado



5.2 Otimização das variáveis envolvidas na digestão por micro-ondas

Por meio de um planejamento fatorial completo 2^3 em duplicata, foi feito o estudo de três variáveis (x_1 -concentração do ácido nítrico, x_2 -temperatura do forno, x_3 -tempo de digestão) envolvendo a digestão ácida assistida por micro-ondas para determinar a influência de cada parâmetro no processo. A eficiência da digestão foi verificada através da obtenção da concentração porcentual de TOC/COT na amostra digerida. Na Tabela 13 está demonstrada a matriz de planejamento utilizada com os resultados de TOC/COT obtidos nos experimentos.

Tabela 13 - Resultados de teor de carbono orgânico total (TOC/COT) de digestão ácida assistida por micro-ondas dos extratos secos dos fitoterápicos na matriz de planejamento fatorial completo 2^3 em duplicata

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃	Y
	Concentração do ácido (M)	Temperatura do forno (°C)	Tempo de digestão (min)	TOC/COT (%)
1	2	140	5	30,75
2	7	140	5	22,36
3	2	180	5	20,86
4	7	180	5	14,70
5	2	140	10	31,20
6	7	140	10	22,86
7	2	180	10	11,63
8	7	180	10	10,60
9	2	140	5	29,21
10	7	140	5	22,34
11	2	180	5	21,11
12	7	180	5	13,79
13	2	140	10	29,56
14	7	140	10	22,05
15	2	180	10	11,30
16	7	180	10	12,08

Observa-se que os experimentos da duplicata 8 e 16 foram os que apresentaram menor percentual de carbono orgânico total no digerido, similarmente a duplicata 7 e 15 e, portanto, melhor eficiência na digestão das amostras. Contudo, pretende-se avaliar também a influência individual e de interação das variáveis estudadas, a fim de propor uma condição experimental otimizada e compatível com o ICP para a análise elementar dos extratos digeridos.

A partir das respostas geradas no planejamento fatorial completo, foram calculados os efeitos principais e de interação, bem como os erros experimentais. Os efeitos significativos foram analisados com 95% de confiança por meio do erro experimental e do teste *t* com 7 graus de liberdade (g.l.). Na Tabela 14 apresentam-se os resultados obtidos.

Tabela 14 - Significância dos efeitos principais e de interação das variáveis estudadas na digestão ácida, para otimização de condições experimentais.

Fatores	Efeito	Erro padrão	Valor-t	p
Média/intersecção	20,4000	0,186535	109,3628	0,000000
X ₁ -Concentração do ácido	-5,6050	0,373070	-15,0240	0,000000
X ₂ -Temperatura	-11,7825	0,373070	-31,5825	0,000000
X ₃ -Tempo de digestão	-2,9800	0,373070	-7,9878	0,000044
Efeito de interação 1-2	2,1725	0,373070	5,8233	0,000395
Efeito de interação 1-3	1,5800	0,373070	4,2351	0,002856
Efeito de interação 2-3	-3,2325	0,373070	-8,6646	0,000024
Efeito de interação 1-2-3	1,7275	0,373070	4,6305	0,001687

De forma conjunta, os valores dos efeitos principais, expressos na Tabela 14, das variáveis (X₁-concentração do ácido, X₂-temperatura do forno e X₃-tempo de digestão) foram significativos e negativos indicando que o aumento nessas variáveis leva a diminuição dos teores de carbono orgânico residual, ou seja, contribui para uma melhor eficiência de digestão. Na Tabela 15, é possível ver a ordem de influência dos efeitos. A temperatura do forno foi o fator mais relevante para resposta e maior do que a concentração e o tempo. Isso porque a temperatura fornece a energia de ativação necessária para que a reação de oxidação ocorra. Sendo assim, ela é um parâmetro de controle fundamental na digestão de amostras orgânicas. Também foram avaliados os efeitos de interação entre as variáveis que se mostraram significativos, embora alguns são positivos para a resposta, levando a menor eficiência de digestão.

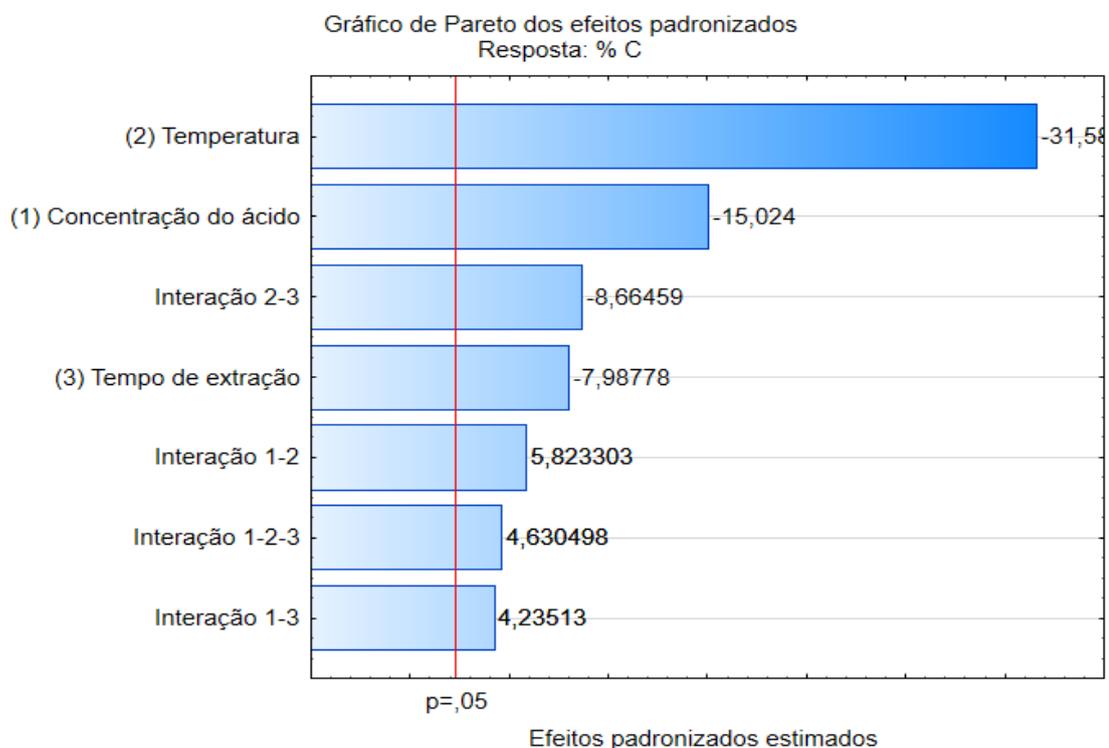
Tabela 15 - Distribuição normal padronizada dos efeitos das variáveis estudadas na digestão ácida assistida por micro-ondas.

Efeitos	Valor	Ordem	Ponto central	Z
1	-5,605	2	0,227273	-0,75
2	-11,7825	1	0,090909	-1,34
3	-2,98	4	0,5	0,00
12	2,1725	7	0,909091	1,34
13	1,58	5	0,636364	0,35
23	-3,2325	3	0,363636	-0,35
123	1,7275	6	0,772727	0,75

Utilizando análise de variância (ANOVA) com probabilidade estatística ($p=0,05$), foi construído o gráfico de Pareto dos efeitos padronizados (Figura 19).

Pode-se observar que as três variáveis estudadas foram estatisticamente significativas por apresentarem os efeitos padronizados à direita da linha vermelha. Os valores negativos para os efeitos indicam que há uma relação inversa entre as variáveis e a resposta, ou seja, o aumento da concentração do ácido, da temperatura e do tempo de extração implica na redução do carbono orgânico total, indicando melhor eficiência de digestão. Nota-se também que a temperatura foi a variável que exerce maior influência na resposta seguida da concentração do ácido nítrico.

Figura 19 - Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados



A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para validação do modelo matemático desenvolvido. Os valores são apresentados na Tabela 16. O teste F foi aplicado para avaliar a significância da regressão e obteve-se um $F_{\text{calc}} = 493,4 > F_{(4,11)} = 3,35$ (tabelado), indicando que o modelo é estatisticamente adequado. Também se avaliou a distribuição dos resíduos através do erro puro e da falta de ajuste obtendo-se um $F_{\text{calc}} = 1,096\text{E}-28 < F_{(3,8)} = 4,066$ (tabelado). Nesse caso, um F calculado menor que o F tabelado indica ausência de falta de ajuste no modelo.

Tabela 16 - Análise de variância (ANOVA) e validação do modelo matemático proposto

Fatores	SQ	g.l	MQ	F_{calculado}	F_{tabelado}
X ₁ -Concentração do ácido	125,6641	1	125,6641	225,7202	
X ₂ -Temperatura	555,3092	1	555,3092	997,4570	
X ₃ -Tempo de extração	35,5216	1	35,5216	63,8046	
Interação X ₁₋₂	18,8790	1	18,8790	33,9109	
Interação X ₁₋₃	9,9856	1	9,9856	17,9363	
Interação X ₂₋₃	41,7962	1	41,7962	75,0752	
Interação X ₁₋₂₋₃	11,9370	1	11,9370	21,4415	
Regressão	799,0928	4	199,7732	493,4000	3,3567
Resíduos	4,4538	11	0,4049		
Falta de ajuste	1,83E-28	3	6,1E-29	1,096E-28	4,06618
Erro puro	4,4538	8	0,5567		
TOTAL	803,5466				

A equação polinomial do modelo ajustado e validado é descrita abaixo:
 $Z = 20,8485 + 2,747C + 0,083325T - 0,0301CT - 0,9792tC - 0,6342tT + 0,00691CTt + 67,368$, sendo C = concentração do ácido nítrico; T = Temperatura do forno e t = tempo de digestão.

Após a validação do modelo matemático, foi possível gerar os gráficos de superfície de resposta e contorno para as variáveis estudadas a fim de avaliar a influência de cada uma delas na resposta em TOC/COT.

No primeiro gráfico de superfície de resposta (Figura 20), relacionando as variáveis concentração e temperatura em um tempo de digestão fixo de 7,5 min, percebe-se no gráfico tridimensional uma elevada inclinação ao longo do eixo da temperatura, demonstrando que essa variável tem uma alta influência na resposta. Já no eixo concentração do ácido, observa-se uma ligeira inclinação indicando que essa variável exerce uma baixa influência na resposta. Ou seja, em termos práticos, é possível combinar uma temperatura fixa de 180 °C com um tempo de digestão de 7,5 min e variar a concentração do ácido, desde o mais diluído, 2 M, até o mais concentrado 7 M, obtendo uma porcentagem de carbono residual em torno de 10% v/v, desejável para análise por ICP-OES. Em uma outra visão, bidimensional (Figura 21), observamos com detalhes a faixa verde que se estende de uma concentração de ácido 2 M até 7 M.

Figura 20 - Gráfico de superfície de resposta para as variáveis concentração do ácido e temperatura do forno de micro-ondas em um tempo fixo de 7,5 minutos.

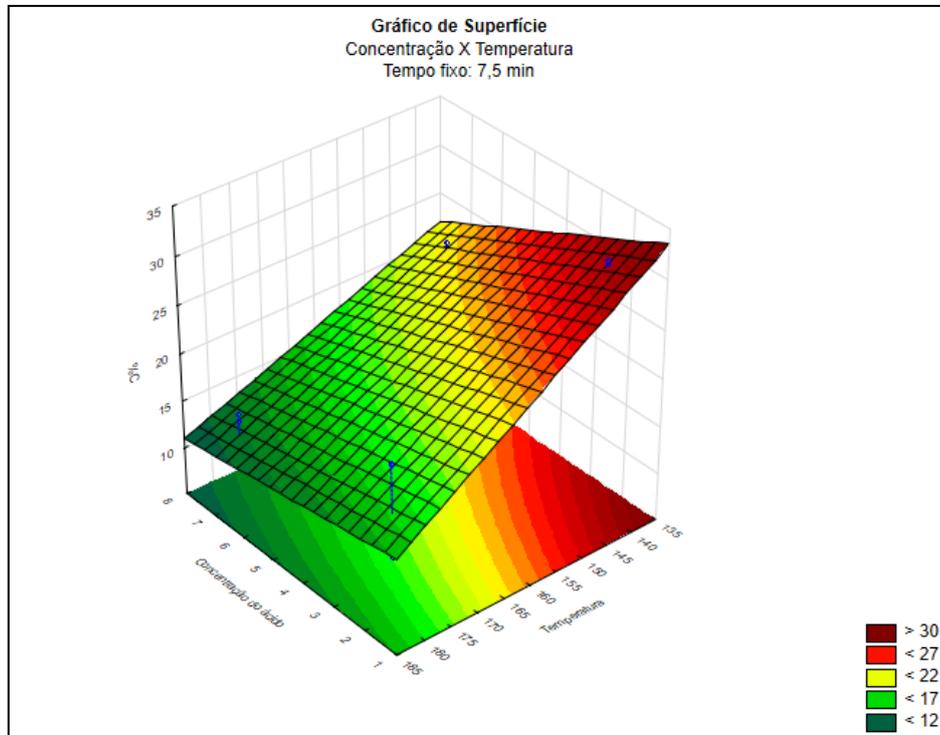
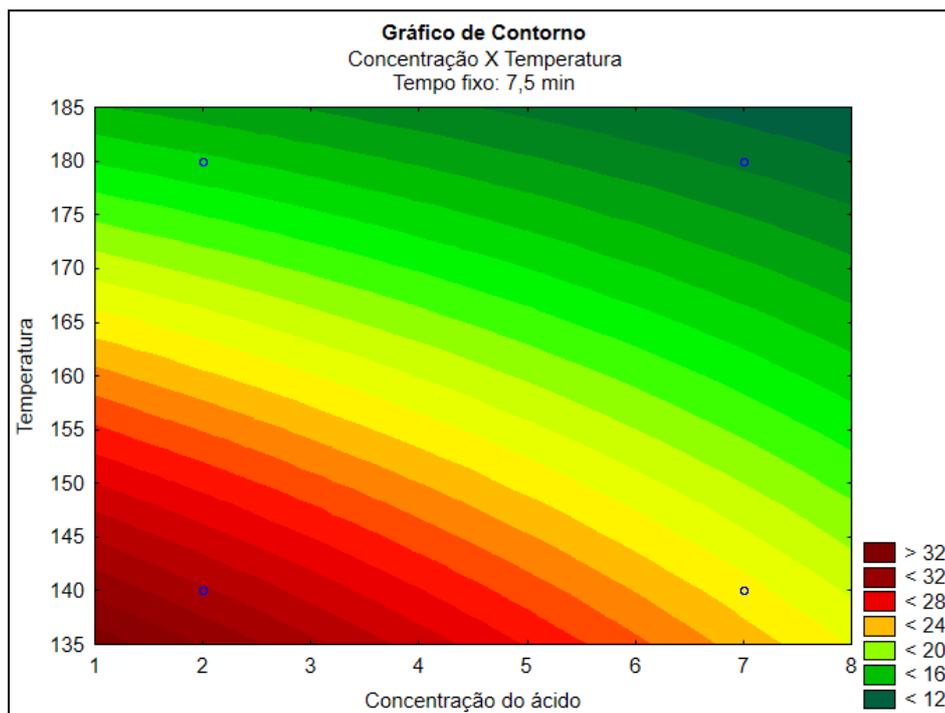
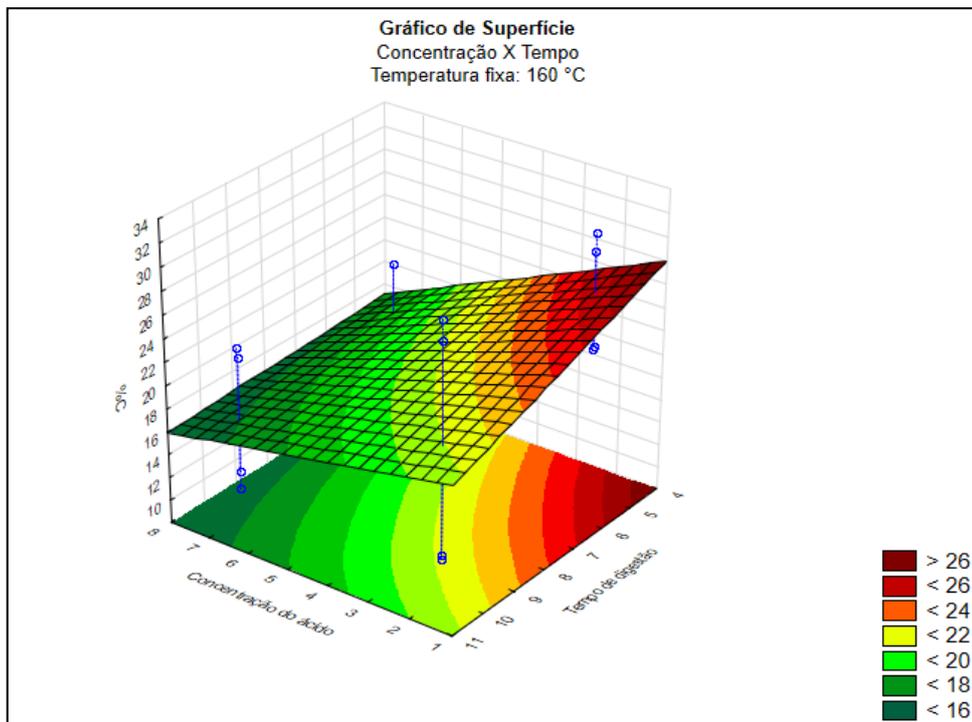


Figura 21 - Gráfico de contorno para as variáveis concentração do ácido e temperatura do forno de micro-ondas, em um tempo fixo de 7,5 minutos.



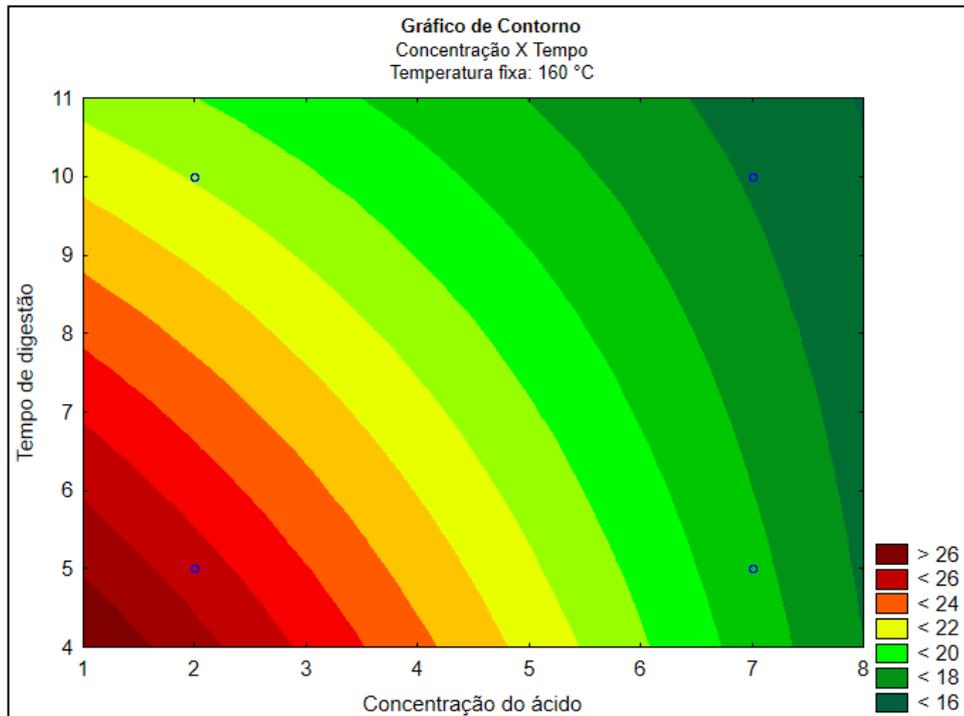
Para analisar graficamente a influência de interação das variáveis concentração do ácido e tempo de digestão na resposta, foi fixada a temperatura média de 160 °C e gerados os gráficos de superfície de resposta e contorno, Figuras 22 e 23 respectivamente. Em comparação ao gráfico anterior, verificou-se uma menor inclinação de ambos os eixos concentração e tempo de digestão, confirmando uma menor influência dessas variáveis na oxidação do carbono orgânico.

Figura 22 - Gráfico de superfície para as variáveis: concentração do ácido e tempo de digestão, em uma temperatura fixa de 160 °C.



No gráfico da Figura 23, verifica-se que a região de menor porcentagem de carbono residual correspondente à faixa verde escuro é restrita a uma pequena área do gráfico, mostrando que é necessário trabalhar com concentrações de ácido nítrico bem altas, em torno de 6 e 7 M, para se alcançar um nível de resposta adequado no experimento com temperatura fixa de 160 °C.

Figura 23 - Gráfico de contorno para as variáveis: concentração do ácido e tempo de digestão em uma temperatura fixa de 160 °C.



Em outra análise quimiométrica, fixando-se a concentração do ácido em 4,5 M, avaliou-se visualmente a influência de interação das variáveis tempo de digestão e temperatura do forno nos gráficos nas Figuras 24 e 25. Nota-se também uma inclinação pronunciada no eixo da temperatura em comparação a inclinação da superfície ao longo do eixo da variável tempo de digestão. Isso mostra que o tempo é uma variável pouco significativa na eficiência de digestão da amostra, quando comparado a influência das outras variáveis.

Figura 25 - Gráfico de superfície para as variáveis: tempo de digestão e temperatura em uma concentração de ácido fixa em 4,5 M

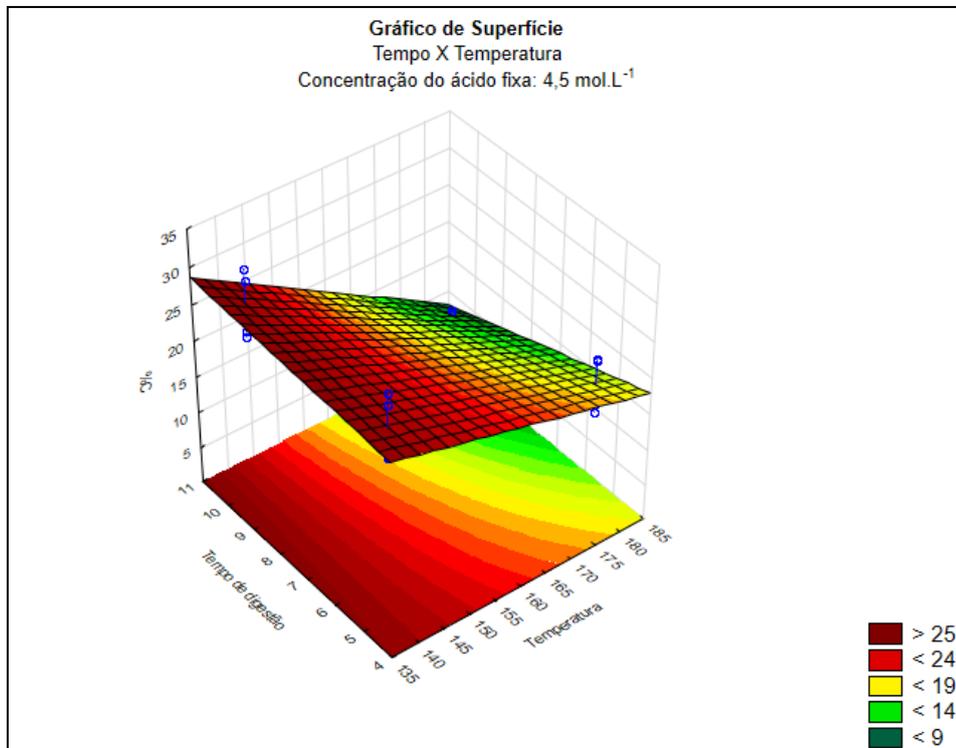
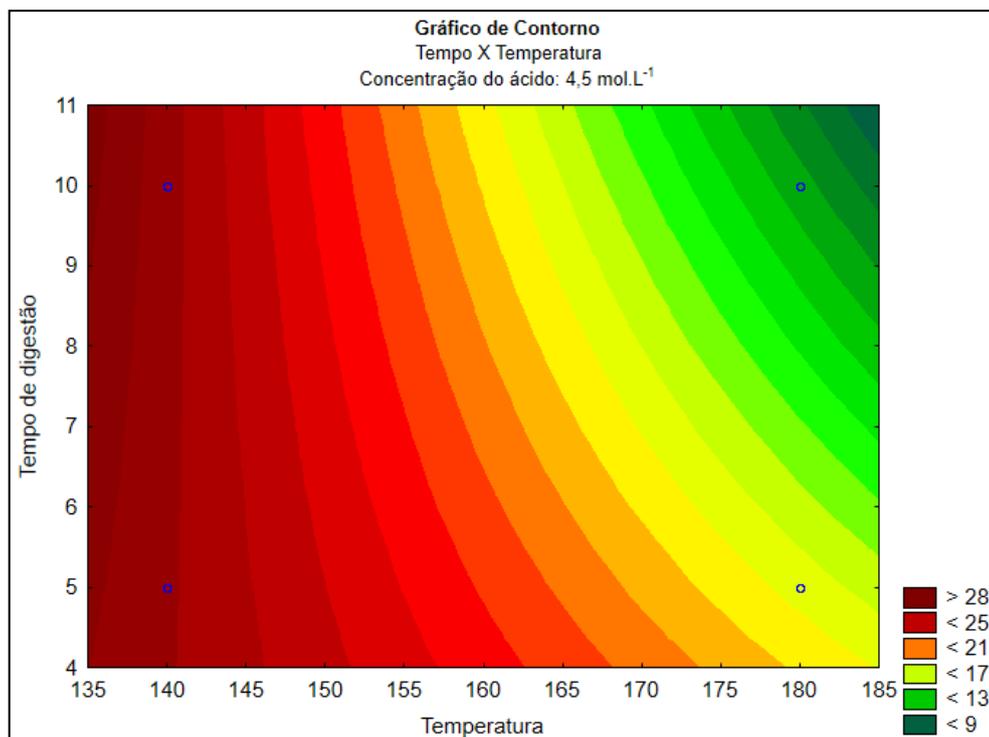
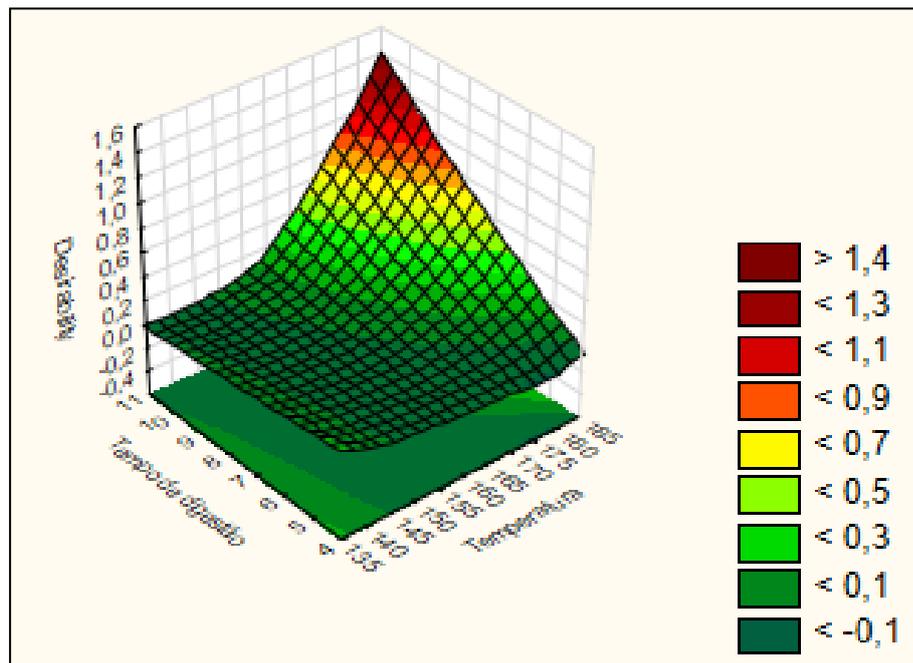


Figura 24 - Gráfico de contorno para as variáveis: tempo de digestão e temperatura em uma concentração de ácido fixa em 4,5 M



Para concluir o estudo das variáveis concentração do ácido, tempo de digestão e temperatura do forno envolvidas na digestão assistida por micro-ondas obtendo a melhor combinação desses parâmetros para a resposta de interesse, foi aplicada a função desejabilidade do software Statistica®. Foi estabelecido o valor ótimo igual a 1 na região de menor porcentagem residual de carbono orgânico com o uso fixo de ácido nítrico 2 M e variando-se as condições de temperatura e tempo de digestão. Na Figura 25 foi representado o gráfico da superfície de resposta da função desejabilidade. É possível apontar uma pequena região em vermelho que corresponde à faixa desejável, em que se obtém a melhor resposta. Esta faixa corresponde à combinação de uma temperatura de 180 °C com um tempo de digestão de 10 minutos empregando-se a menor concentração de ácido nítrico 2 M, na presença de peróxido de hidrogênio 30% v/v como oxidante auxiliar.

Figura 26 - Gráfico de superfície da função desejabilidade para identificação da região ótima de maior eficiência dos parâmetros na digestão assistida por micro-ondas.



Este resultado mostrou a eficiência de digestão dos fitoterápicos empregando baixas concentrações de ácido que parece ser potencializada com o aumento da temperatura e do tempo em sistema fechado assistido por micro-ondas. Araújo e colaboradores (2002) também demonstraram a eficiência de digestão micro-ondas em amostras de *Paspalum* utilizando baixas concentrações de ácido nítrico auxiliado por peróxido de hidrogênio.

O emprego de soluções diluídas, com baixa concentração de ácido, na digestão assistida por micro-ondas é uma maneira não só de reduzir custos na compra de ácido, mas também no desgaste de componentes do equipamento, aumentando sua vida útil (ARAÚJO et al., 2002). Outra vantagem é a diminuição da exposição ocupacional quando se trabalha com ácidos corrosivos em soluções mais diluídas.

5.3 Avaliação da influência de parâmetros instrumentais do ICP-OES

O ajuste instrumental das condições envolvidas na análise elementar por ICP-OES é necessário para garantir resultados satisfatórios em termos de intensidade do sinal espectral. Por isso, os parâmetros relacionados a vazão do gás de nebulização, potência de radiofrequência, tipo de nebulizador e visão foram estudados inicialmente por meio de um planejamento fatorial completo 2^4 .

A definição dos níveis dos parâmetros estudados se deu em função da rotina empregada no laboratório e de dados da literatura. Para a vazão do gás de nebulização foi escolhido como nível maior 0,8 mL/min, valor utilizado na análise elementar de rotina em amostras de águas superficiais e subterrâneas. Contudo, dados da literatura apontam que uma vazão em torno de 0,5 mL/min leva a uma resposta melhor, por isso, definiu-se como nível menor o valor de 0,4 mL/min (SILVA; BACCAN; NÓBREGA, 2003). A potência de RF teve como nível maior o valor de 1450 W, pois além de ser comum na rotina já estabelecida, não excede o valor limite de 1500 W, que deve ser evitado para diminuir o desgaste da tocha e de outros componentes do equipamento. A influência do tipo de visão também foi considerada no planejamento, já que em concentrações mais elevadas, a visão radial também fornece sinais intensos. Além disso, os tipos de nebulizadores ultrassônico e pneumático foram considerados no estudo, pois influenciam na formação da névoa e direcionamento para a tocha, impactando diretamente no sinal. Na Tabela 17 consta a matriz completa do planejamento para estimativa do erro com os resultados de Razão MgII/MgI obtidos em duplicata.

Tabela 17 - Resultados em razão de MgII/MgI obtidos no planejamento fatorial 2^4 para monitoramento das variáveis: 1-vazão do gás de nebulização (G), 2-potência de radiofrequência (P), 3-tipo de nebulizador (N) e 4-modo de visão (V).

Ensaio	Variáveis				Razão MgII/MgI		
	1 (G)	2 (P)	3 (N)	4 (V)	Rep1	Rep2	Média
1	0,4	1100	Pneumático	Axial	7,54	7,57	7,56
2	0,8	1100	Pneumático	Axial	6,72	6,77	6,75
3	0,4	1450	Pneumático	Axial	8,80	8,84	8,82
4	0,8	1450	Pneumático	Axial	9,21	9,17	9,19
5	0,4	1100	Ultrassônico	Axial	4,99	5,10	5,04
6	0,8	1100	Ultrassônico	Axial	5,45	5,44	5,45
7	0,4	1450	Ultrassônico	Axial	5,39	5,41	5,40
8	0,8	1450	Ultrassônico	Axial	6,50	6,57	6,54
9	0,4	1100	Pneumático	Radial	11,93	11,83	11,88
10	0,8	1100	Pneumático	Radial	11,11	11,04	11,07
11	0,4	1450	Pneumático	Radial	13,40	13,42	13,41
12	0,8	1450	Pneumático	Radial	13,20	13,17	13,18
13	0,4	1100	Ultrassônico	Radial	6,40	6,44	6,42
14	0,8	1100	Ultrassônico	Radial	6,26	6,25	6,26
15	0,4	1450	Ultrassônico	Radial	8,07	8,02	8,04
16	0,8	1450	Ultrassônico	Radial	7,83	7,80	7,81

Como o estudo envolveu variáveis nominais, não foi possível efetuar os cálculos para ANOVA. Contudo, foram obtidos os gráficos abaixo (Figuras 27 e 28) que possibilitam uma análise visual comparativa da resposta em razão de Mg II/I para o tipo de nebulizador e tipo de visão empregados no estudo.

Figura 27 - Resultados em razão de MgII/MgI obtidos com o nebulizador pneumático variando a potência de radiofrequência, vazão do gás de nebulização e modo de visão da tocha.

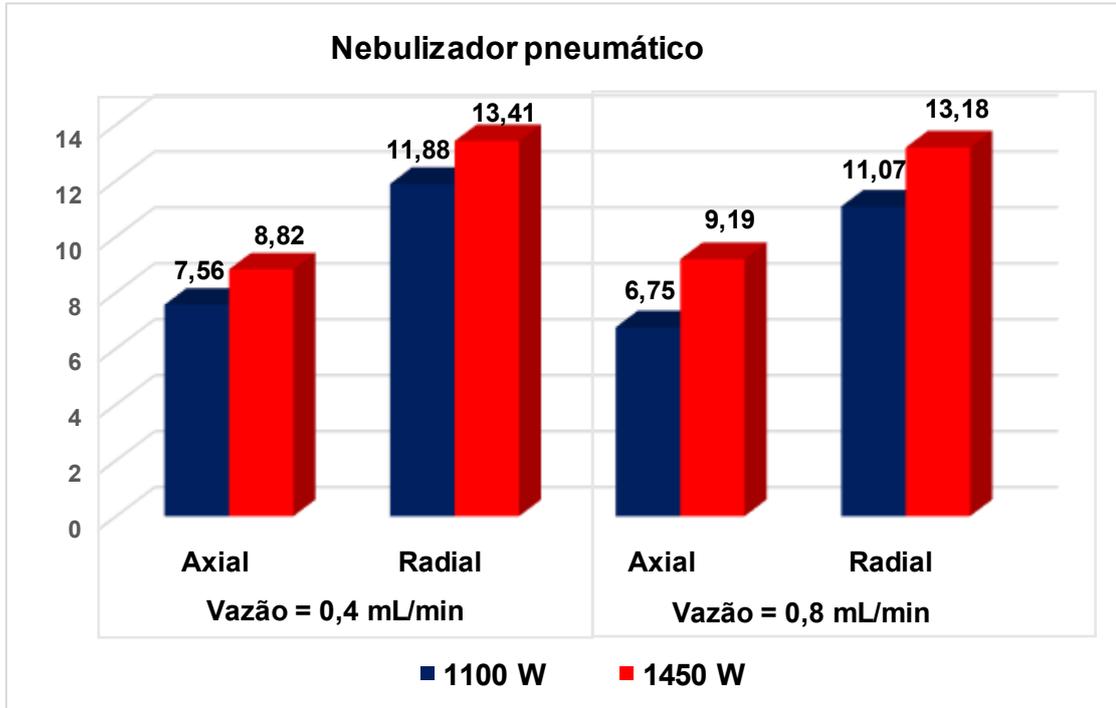
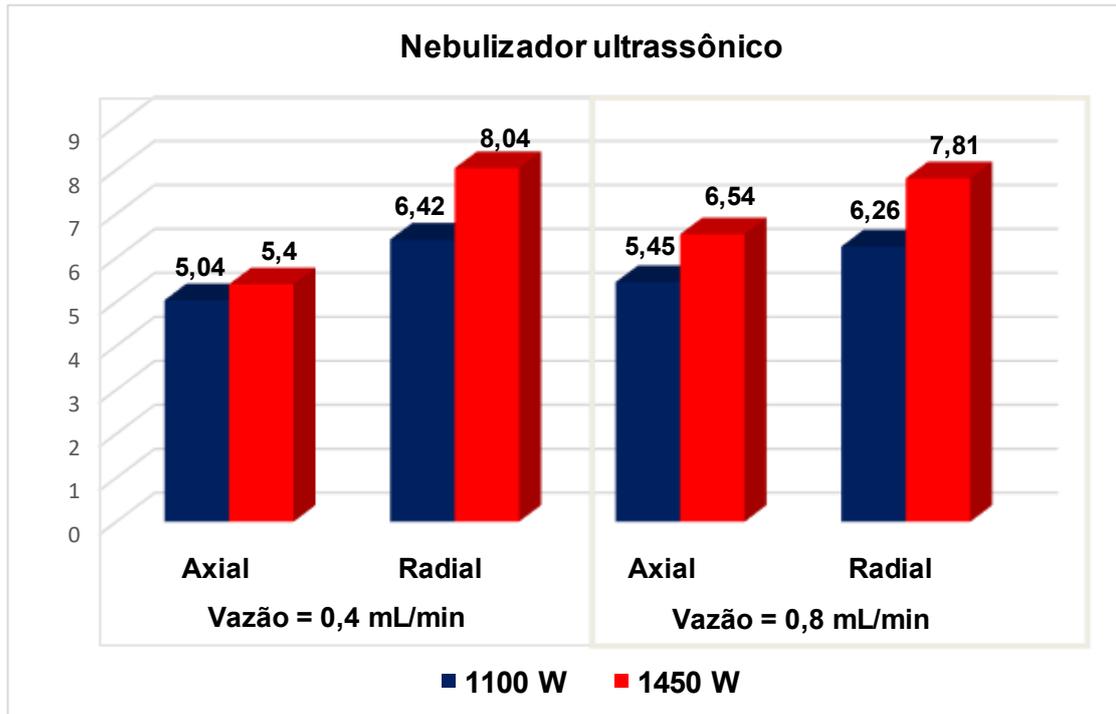


Figura 28 - Resultados em razão de MgII/MgI obtidos com o nebulizador ultrassônico variando a potência de radiofrequência, vazão do gás de nebulização e modo de visão.



Comparando os dados obtidos, verifica-se que maiores valores de razão de Mg foram obtidos nos experimentos usando o nebulizador pneumático (concêntrico com câmara de nebulização ciclônica) do que com o nebulizador ultrassônico. Este resultado indica que a nebulização ultrassônica sofre mais influência da matriz que reduz a intensidade de emissão das linhas espectrais. Uma possível explicação é de que devido à menor quantidade de solvente nebulizador, juntamente com os analitos, a excitação atômica torna-se mais sensível a outros componentes da matriz. Tal informações dados corroboram com o estudo comparativo desenvolvido por BORKOWSKA-BURNECKA e colaboradores (2006) e mostram que apesar do nebulizador ultrassônico diminuir a robustez do plasma em comparação ao do modo convencional, ele aumenta a eficiência de transporte do analito, melhorando a sensibilidade. Por isso, foi escolhido o nebulizador ultrassônico para analisar as amostras favorecendo a maior sensibilidade em detrimento ao sinal de fundo devido a matriz.

Em relação ao modo de visão, axial ou radial, maiores razões de $MgII/MgI$ foram obtidas pelo modo radial. Apesar do modo axial ter uma maior sensibilidade, ele é mais susceptível a interferências da matriz, principalmente na presença dos chamados elementos facilmente ionizáveis - EIE (do inglês, *Easily Ionized Elements*) (BRENNER; ZANDER, 2000). Por isso, o modo radial se mostrou-se mais robusto, como evidenciado no segundo conjunto de colunas nos histogramas das Figuras 27 e 28. Entretanto, em condições otimizadas do plasma estas diferenças de razões de $MgII/MgI$, obtidas em ambos os modos de visão, podem ser atenuadas possibilitando a configuração em modo axial para quantificar elementos em concentrações muito baixas.

A potência de radiofrequência aplicada mostrou uma relação direta com o aumento das razões de Mg. Quando foi aplicada uma potência de 1100 Watts (W), os valores obtidos se mantiveram, em sua maioria, abaixo de 8, indicando uma baixa eficiência do plasma. Já quando aplicado uma potência de 1450 W, a maioria dos experimentos se mostrou bastante robusto, com valores até acima de 13. Esta influência positiva da potência de RF na razão de Mg está relacionada a energia aplicada, ou seja, quanto maior essa energia, menor é a interferência de matriz provocada pela amostra. Contudo, valores próximos ao limite de potência de RF, 1500 W, devem ser evitados na rotina, a fim de reduzir o desgaste da tocha aumentando a vida útil desse componente (DUBUISSON et al.; 1998)

Outro parâmetro observado foi a vazão do gás de nebulização. Foi observado que para a maioria dos experimentos, as razões de MgII/MgI foram maiores com uma vazão de 0,4 mL/min se comparada a vazão de 0,8 mL/min nas mesmas condições de nebulização, visão e potência de RF. Isso porque em um fluxo menor, a velocidade com que as partículas de aerossóis passam pelo plasma é menor implicando em um tempo de residência maior para promover os processos de excitação (SILVA; BACCAN; NÓBREGA, 2003).

5.4 Otimização dos parâmetros potência de radiofrequência e vazão do gás de nebulização por planejamento em CCD

Após a triagem inicial das variáveis envolvidas no ajuste instrumental do ICP-OES para análise dos fitoterápicos, os parâmetros potência de radiofrequência e vazão do gás de nebulização foram selecionados para um estudo quimiométrico mais refinado, empregando a metodologia de superfície de resposta, a fim de se obter um modelo matemático adequado que descrevesse o comportamento dessas variáveis. Os outros parâmetros foram fixados em modo de visão axial e nebulizador ultrassônico.

Portanto, foi aplicado um planejamento composto central em que se avaliaram as duas variáveis ($k = 2$) de maior impacto na resposta, razão de MgII/MgI, a saber, potência de radiofrequência e a vazão do gás de nebulização (Tabela 18).

Tabela 18 - Resultados obtidos em razão de MgII/MgI no planejamento composto central para otimização das variáveis potência de radiofrequência e vazão do gás de nebulização.

Ensaio	Variáveis		Y – Razão de MgII/MgI
	X ₁ – Potência de Radiofrequência (W)	X ₂ – Vazão do gás de nebulização (L/min)	
1	1200 (-1)	0,35 (-1)	7,33
2	1200 (-1)	0,45 (+1)	11,34
3	1300 (+1)	0,35 (-1)	7,13
4	1300 (+1)	0,45 (+1)	11,42
5	1179 (-1,41)	0,40 (0)	8,54
6	1320 (+1,41)	0,40 (0)	10,21
7	1250 (0)	0,33 (-1,41)	6,60
8	1250 (0)	0,47 (+1,41)	11,83
9	1250 (0)	0,40 (0)	10,92
10	1250 (0)	0,40 (0)	10,91

Como visualizado na Tabela 18, o número de níveis estudados foram cinco (-1,41; -1; 0; +1; +1,41). A matriz do planejamento CCD e os resultados obtidos em razão de MgII/MgI.

Foram calculados os efeitos das variáveis e o erro experimental estimado pela duplicata no ponto central. Os ensaios foram realizados de forma aleatória. Observando a Tabela 19, percebe-se que tanto os termos lineares quanto quadráticos dos dois fatores são importantes, entretanto, o termo de interação entre os fatores não é significativo e foi excluído do modelo. Não houve evidência de falta de ajuste, portanto, o modelo proposto se mostra ajustado e eficiente apresentando um coeficiente de correlação de 0,9759 (97,59% de variação explicada).

Tabela 19 - Análise de variância e validação do modelo proposto para as variáveis potência de radiofrequência e vazão do gás de nebulização em função da resposta razão de MgII/MgI

Fatores	Soma quadrática	g.l. ^a	Média quadrática	Teste F	p
X₁ - Potência de RF (L)	0,63898	1	0,63898	203,673	0,044535
X₁ - Potência de RF (Q)	2,56781	1	2,56781	818,486	0,022243
X₂ - Vazão de nebulização (L)	30,77783	1	30,77783	9810,373	0,006427
X₂ - Vazão de nebulização (Q)	3,16193	1	3,16193	1007,858	0,020046
Interação X₁₋₂ (L)	0,01887	1	0,01887	6,014	0,246496
Falta de ajuste	0,87317	3	0,29106	92,774	0,076137
Erro puro	0,00314	1	0,00314		
TOTAL	36,33902	9			

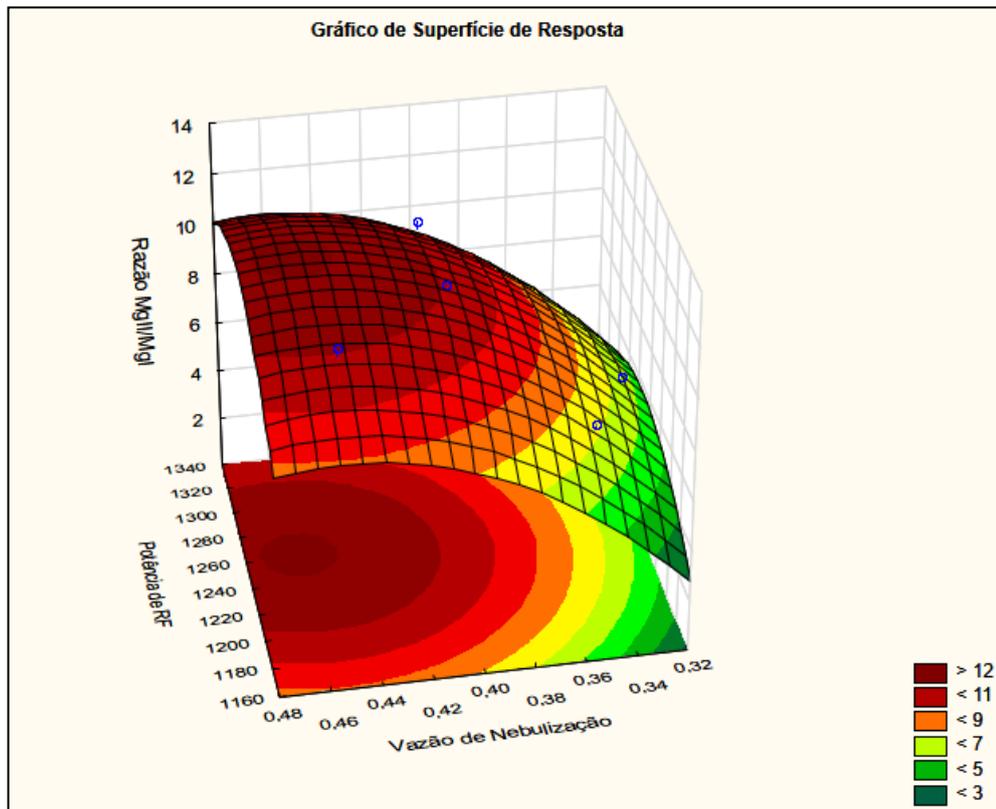
^ag.l.: graus de liberdade

Sendo assim, a equação polinomial obtida para este modelo otimizado relativo a potência de radiofrequência (R) e vazão de nebulização (V) é a seguinte:

$$Y = -519,78875236408 + 0,74413645146917*(R) - 0,00029978907237752*(R)^2 + 271,02310816514*(V) - 332,66710308641*(V)^2 + 0,02747142573747*(R)*(V)$$

A partir do modelo matemático, foi possível gerar a superfície de resposta para as variáveis estudadas conforme a Figura 29. É possível visualizar que a resposta (razão MgII/MgI) passa por um ponto de máximo cujas coordenadas foram determinadas e correspondem a 1262,15 Watts para a potência aplicada ao gerador de radiofrequência e 0,46 L/min para a vazão do gás de nebulização.

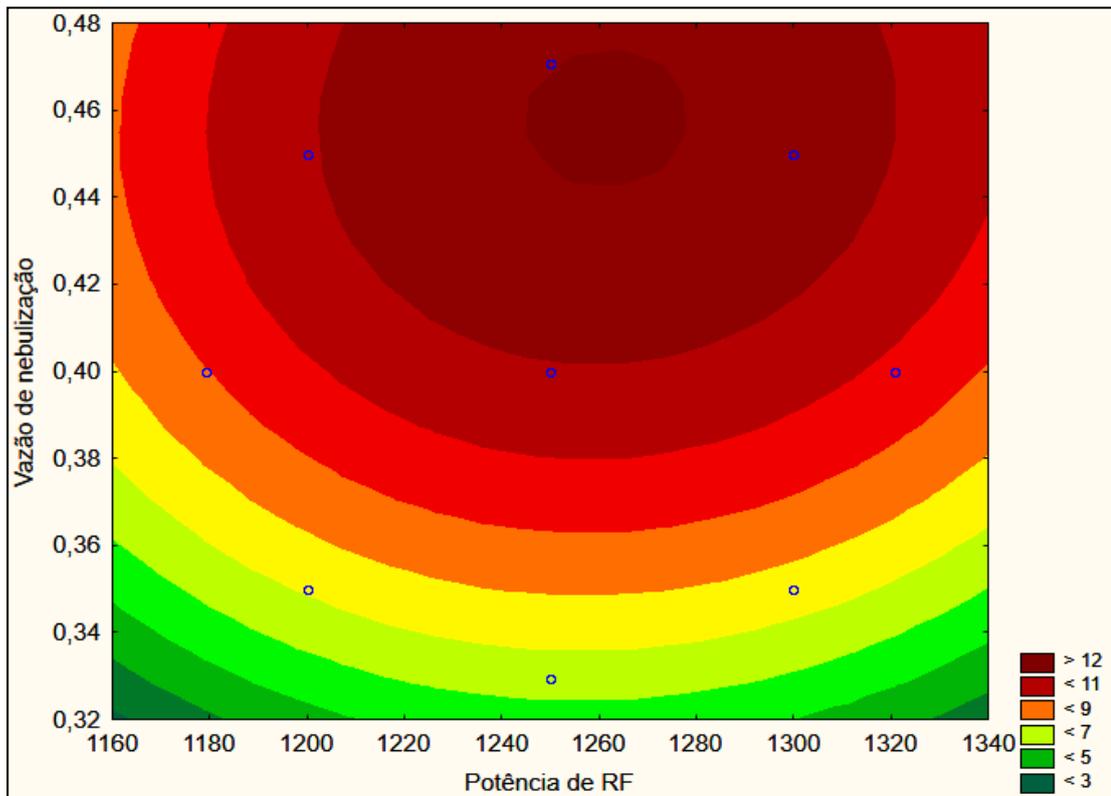
Figura 29 - Gráfico de superfície de resposta obtido para as variáveis potência de radiofrequência e vazão do gás de nebulização em função da razão de MgII/MgI.



No gráfico de contorno (Figura 30), é possível ter uma visão bidimensional do modelo, apresentado em curvas de nível que servem para indicar melhor a região em torno do máximo de resposta obtida para o modelo. Os pontos experimentais do planejamento também são evidenciados de azul no gráfico. Verifica-se que tanto a potência de radiofrequência quanto a vazão do gás de nebulização devem ser minimamente ajustados para obtenção de uma resposta otimizada. Nota-se, por exemplo, que a resposta é bastante sensível a variável vazão do gás de nebulização e que alterações pequenas, até mesmo na ordem de decimais, podem comprometer os resultados.

A região de melhor resposta se encontra na faixa de vazão de 0,45 a 0,47 e potência aplicada de 1250 a 1270 W. De acordo com MERMET (1991), a condição de plasma robusto é indicada por valores de razão das intensidades MgII/MgI acima de 10. Portanto, é possível ajustar a vazão minimamente em torno de 0,4 L/min e potência de 1250 W e encontrar uma condição adequada para a análise.

Figura 30 - Gráfico de contorno obtido para as variáveis potência de radiofrequência e vazão do gás de nebulização em função da razão MgII/MgI.



5.5 Validação do procedimento de análise de impurezas elementares nas amostras de fitoterápicos por ICP-OES

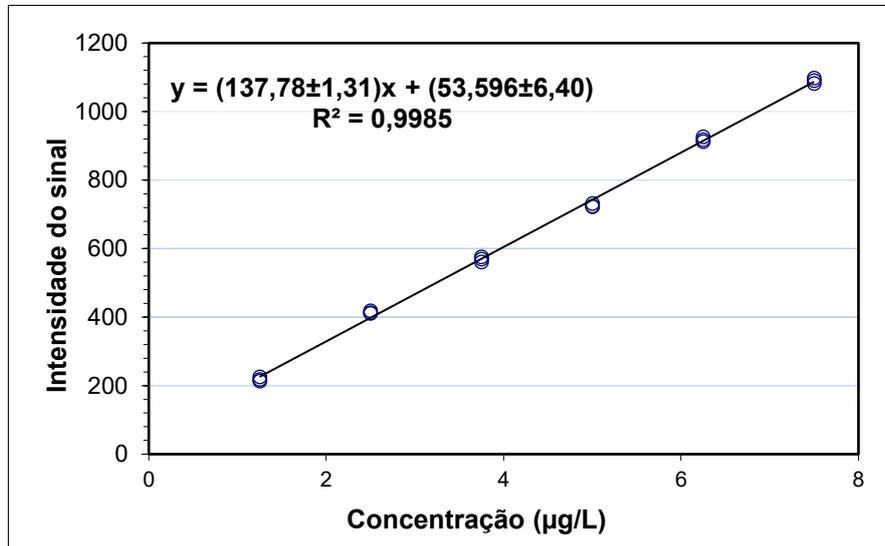
5.5.1 Linearidade

Após estabelecer as condições instrumentais ideais para a análise por ICP-OES, foi procedida a validação do método de quantificação de 24 elementos nas amostras dos fitoterápicos: Cd, Pb, Hg, As, Co, V, Ni, Tl, Au, Pd, Ir, Os, Rh, Ru, Se, Ag, Pt, Li, Sb, Ba, Mo, Cu, Sn e Cr. Os elementos foram avaliados de acordo com seus máximos de emissão ajustados finamente por meio do software Syngistix® versão 3.0.

A faixa testada para a curva contemplou o valor J para cada elemento e os demais pontos em função de J , a saber: 0,25 J ; 0,5 J ; 0,75 J ; 1 J ; 1,25 J e 1,5 J . Para os elementos da Classe 1: Cd, As, Pb e Hg, de maior toxicidade e menor valor de J , as curvas analíticas são mostradas nas Figuras 30, 31, 32 e 33.

A partir dos dados obtidos para o Cádmiu em 228,802 nm, a curva analítica foi construída e demonstrou uma faixa linear (1,25 - 7,5 µg/L) conforme Figura 31.

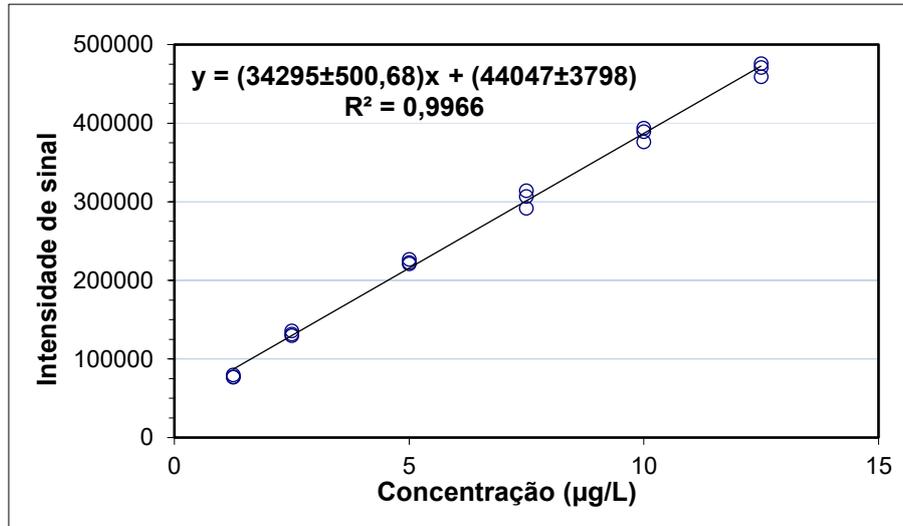
Figura 31 - Curva analítica de cádmio em 228,802 nm



Não houve indícios de *outliers* nem de efeito alavanca, que foram verificados pelo teste de Jacknife. Os resíduos seguiram a distribuição normal, foram independentes e homocedásticos. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que a regressão foi significativa e não houve desvio de linearidade. Sendo assim, a equação da reta pelo modelo é $y = (137,78 \pm 1,31)x + (53,596 \pm 6,40)$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9985$, ou seja, 99,85% dos dados são explicados por este modelo.

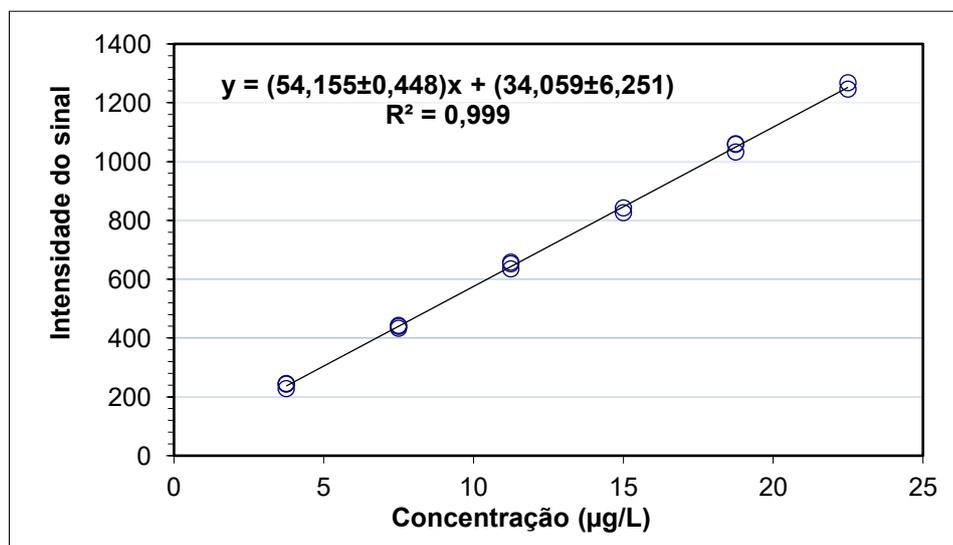
A partir dos dados de leitura obtidos para o chumbo, a curva analítica foi construída (Figura 32) e demonstrada a linearidade para a faixa estudada (1,25 - 12,5 µg/L). O modelo proposto seguiu as premissas para a regressão linear simples: os resíduos seguiram a normalidade, foram independentes e homocedásticos. Não se evidenciaram *outliers* que foram verificados pelo teste de Jacknife. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que a regressão é significativa e não há desvio de linearidade. Sendo assim, a equação da reta é $y = (34295 \pm 500,68)x + 44047 \pm 3798$ com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9966$.

Figura 32 - Curva analítica de chumbo em 224,688 nm



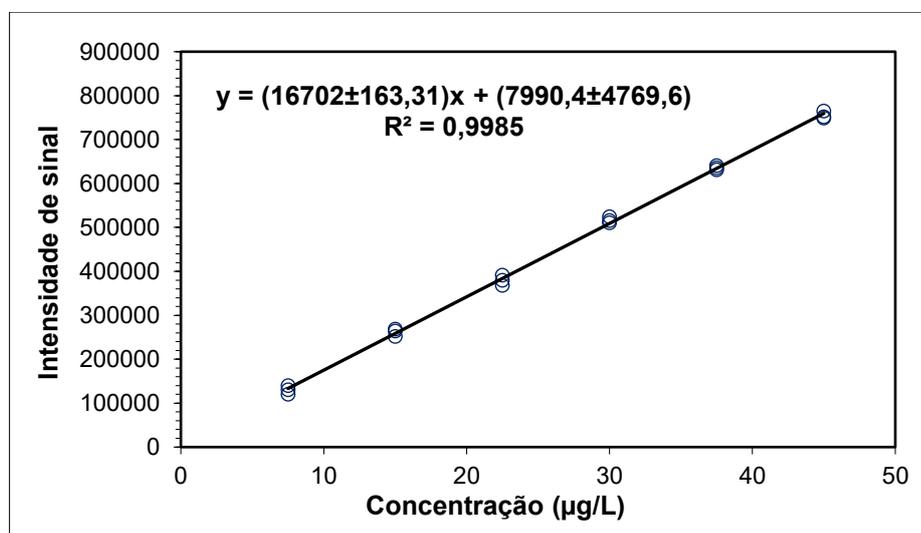
A partir dos dados de leitura obtidos para o arsênio, a curva analítica foi construída (Figura 33) e demonstrada a linearidade para a faixa estudada (3,75 - 22,5 µg/L). O modelo proposto obedeceu às premissas de regressão linear simples: os resíduos seguem a normalidade, são independentes e homocedásticos. Foram identificados 2 *outliers* pelo teste de Jackknife, mas que foram retirados ponto a ponto sem prejudicar a validação da linearidade. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que a regressão é significativa e não há desvio de linearidade. Sendo assim, a equação da reta é $y = (54,155 \pm 0,448)x + 34,059 \pm 6,251$ com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9990$.

Figura 33 - Curva analítica de arsênio em 188,979 nm



A partir dos dados de leitura obtidos para o mercúrio, a curva analítica foi construída (Figura 34) e demonstrada a linearidade para a faixa estudada (7,5-45,0 µg/L). O modelo proposto seguiu as premissas para a regressão linear simples: os resíduos seguiram a normalidade, foram independentes e homocedásticos. Não se evidenciaram *outliers* que foram verificados pelo teste de Jackknife. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que a regressão é significativa e não há desvio de linearidade. Sendo assim, a equação da reta é $y = (16702,27 \pm 163,31)x + 7790,4 \pm 4769,6$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,9985$.

Figura 34 - Curva analítica de mercúrio em 302,15 nm



Para os demais elementos, as curvas analíticas não foram representadas, mas os parâmetros das curvas de calibração analítica são expressos na Tabela 20. A linearidade das curvas foi checada individualmente de forma visual e também através do coeficiente de determinação R^2 obtido para cada equação da reta. Da mesma forma, as premissas da regressão linear também foram verificadas assim como o tratamento de *outliers*. Em todas as curvas para os demais elementos, obteve-se o coeficiente $R^2 > 0,99$, sendo grande parte maior que 0,995 (Tabela 20). Portanto, considera-se que os modelos matemáticos são adequados e indicam uma relação proporcional entre o sinal do equipamento e a concentração dos diversos analitos.

5.5.2 Precisão

Para avaliar a repetitividade, foram preparadas seis replicatas de cada amostra e adicionadas as concentrações correspondentes a 1 J, em cada replicata. As

concentrações recuperadas foram obtidas por meio da equação da reta previamente determinada para cada elemento e os desvios padrão relativos foram calculados e avaliados. A USP estabelece como critério de aceitação que os valores de DPR devem ser menores que 20%. Os resultados obtidos são expressos na Tabela 21. Os valores de DPR para todos os elementos, exceto o Ósmio, foram menores que 20%, indicando que o procedimento proposto é preciso.

Tabela 20 - Coeficientes da curva analítica obtidos para cada elemento em determinada linha de emissão.

Analito	nm	Intercepto	Inclinação	R²
Cd	228,802	53,60	137,78	0,9985
Pb	224,688	44047,13	34295,19	0,9966
Hg	302,15	7990,39	16702,28	0,9985
As	188,979	34,06	54,15	0,9991
Co	228,616	6,59	67,89	0,9986
V	311,071	1264,85	1860,72	0,996
Ni	231,604	681,15	217,72	0,9964
Tl	248,87	-203,49	1238,36	0,9985
Au	242,795	-687,02	147,63	0,9948
Pd	340,458	2172,6	475,33	0,995
Ir	224,268	3220,36	428,36	0,9933
Os	228,286	84,31	45,64	0,9984
Rh	343,489	16688,24	4456,24	0,9953
Ru	349,894	437,85	137,52	0,9955
Se	196,026	42,38	4,55	0,993
Ag	243,778	0,887	19,39	0,997
Pt	265,945	15,52	52,28	0,994
Li	413,256	-8658,3	2502,9	0,994
Sb	231,146	443,4	4,84	0,9916
Ba	233,527	-4439,6	99,03	0,9964
Mo	202,031	-789,24	21,79	0,994
Cu	327,385	7230,2	161,94	0,9944
Sn	189,927	-632,42	6,011	0,9977
Cr	205,56	-3139,6	24,749	0,9976

Tabela 21 - Resultados de avaliação da precisão (repetitividade) após adição de padrão na concentração de 1 J para cada elemento, em amostras de quatro fitoterápicos (n=6).

Analitos	<i>Passiflora incarnata</i>		<i>Paullinia cupana</i>		<i>Stryphnodendron adstringens</i>		<i>Piper methysticum</i>	
	% rec.	DPR	% rec.	DPR	% rec.	DPR	% rec.	DPR
Cd	87,8	1,88	115,8	12,11	80,2	3,21	88,2	7,89
Pb	101,4	2,97	101,4	3,32	101,8	4,31	89,1	1,82
Hg	97,4	9,44	97,4	0,40	95,4	2,44	97,4	1,47
As	103,3	1,56	103,3	12,39	98,0	2,61	102,2	5,08
Co	111,9	1,44	111,9	1,53	112,3	1,29	98,8	3,10
V	77,5	1,29	77,5	4,58	78,8	1,66	95,3	3,43
Ni	102,9	0,76	102,9	7,72	97,4	2,14	77,0	5,12
Tl	96,2	5,40	96,2	3,77	98,6	4,35	99,2	5,72
Au	98,6	0,09	98,6	3,26	122,0	1,32	77,3	9,77
Pd	91,6	4,30	91,6	8,64	71,0	3,04	92,8	10,64
Ir	100,2	0,16	100,2	0,28	101,3	0,86	94,8	6,03
Os	69,5	35,67	69,5	36,27	52,5	25,58	69,6	37,34
Rh	101,0	5,83	101,0	0,51	92,0	0,17	92,3	2,07
Ru	97,6	0,90	97,6	7,51	92,8	2,10	70,3	2,73
Se	90,6	4,71	90,6	6,40	80,4	5,04	90,1	7,69
Ag	107,2	1,18	107,2	6,93	91,0	1,44	96,6	3,40
Pt	132,9	0,56	132,9	2,12	102,2	1,48	100,9	4,58
Li	103,5	1,06	103,5	4,06	103,6	2,02	91,7	1,99
Sb	94,7	2,55	94,7	8,68	99,3	5,16	99,6	2,24
Ba	99,7	2,06	99,7	1,96	100,3	1,36	98,4	4,06
Mo	97,8	1,44	97,8	1,35	97,8	1,60	95,5	1,36
Cu	96,8	0,72	96,8	0,15	97,3	3,28	97,7	1,66
Sn	100,4	3,26	100,4	1,41	96,2	3,58	93,4	5,11
Cr	94,5	5,62	94,5	4,18	97,3	2,10	90,9	4,49

As recuperações avaliadas para outras seis replicatas para cada fitoterápico permitiu o estudo da precisão intermediária. As amostras foram preparadas de forma independente e diluídas por um analista diferente em outro dia. Os dados obtidos são expressos na Tabela 22. É possível verificar que para todos os elementos, exceto o Ósmio, os desvios foram menores que 25%, conforme preconizado na Farmacopeia Americana.

O ósmio tem sido apontado como um elemento difícil de ser quantificado com exatidão e precisão adequadas, até mesmo por ICP-MS. Essa grande variação na porcentagem de recuperação do ósmio é explicada pela sua capacidade de formar espécies voláteis, como o tetróxido de ósmio (OsO_4), além de provocar efeito memória que leva a deposição do ósmio ao longo do equipamento, problemas esses que tem sido apontados na quantificação há muito tempo (CONRAD GREGOIRE, 1990; NOWELL et al., 2008)

Trabalhos desenvolvidos por Venzago e colaboradores (2013) tem mostrado soluções analíticas que melhorem os resultados de recuperação do ósmio na determinação por ICP-MS. Uma delas é a complexação com tiouréia, seguida da estabilização com ácido ascórbico após a digestão por micro-ondas utilizando ácido nítrico concentrado. Este tratamento elevou a média de recuperações para em torno de 80% com um desvio padrão relativo de 7%, resultados que atendem aos limites preconizados na USP<233>.

5.5.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio de ensaios de adição e recuperação, utilizando as amostras dos quatro fitoterápicos. A USP orienta que concentrações correspondentes a 0,5, 1,0 e 1,5 J devem ser adicionadas às amostras antes da etapa de digestão e as porcentagens de recuperação avaliadas. O ensaio foi realizado nesses três níveis, em triplicatas, e os resultados por nível estão expostos nas Tabelas 23, 24 e 25.

Tabela 22 - Resultados de avaliação da precisão intermediária após adição de padrão na concentração de 1 J para cada elemento nas quatro amostras de fitoterápicos (n=12).

Analitos	<i>Passiflora incarnata</i>		<i>Paullinia cupana</i>		<i>Stryphnodendron adstringens</i>		<i>Piper methysticum</i>	
	%	DPR	%	DPR	%	DPR	%	DPR
Cd	90,6	3,73	115,3	8,69	86,3	8,44	91,0	6,45
Pb	103,5	3,82	103,5	3,89	102,1	3,41	94,1	6,39
Hg	99,9	7,67	99,9	5,90	96,4	3,09	94,4	3,66
As	102,2	5,26	102,2	9,06	99,1	2,34	101,0	4,61
Co	107,3	5,06	107,3	2,56	110,4	2,49	101,2	3,81
V	83,3	9,06	83,3	6,91	81,6	4,64	97,1	4,23
Ni	102,1	1,52	102,1	7,54	98,6	2,24	79,8	5,78
Tl	97,8	4,74	97,8	3,16	100,4	3,58	98,4	4,35
Au	99,0	0,56	99,0	4,62	119,1	3,57	82,7	9,46
Pd	93,1	4,68	93,1	10,30	73,4	5,65	92,5	7,47
Ir	101,9	2,11	101,9	2,12	102,5	0,86	94,2	4,26
Os	80,7	28,16	80,7	31,43	62,4	28,66	70,3	32,59
Rh	102,2	4,27	102,2	2,09	93,7	3,01	94,3	3,02
Ru	99,8	3,80	99,8	7,62	95,6	4,90	72,4	5,33
Se	94,3	5,44	94,3	5,41	85,3	8,79	91,8	7,02
Ag	105,3	2,47	105,3	6,68	95,6	5,81	100,7	5,29
Pt	131,4	1,53	131,4	5,62	101,7	1,46	101,0	4,01
Li	101,7	2,66	101,7	3,79	103,3	2,30	97,7	7,17
Sb	97,1	3,80	97,1	6,80	101,5	4,18	101,0	2,81
Ba	100,8	2,32	100,8	2,38	101,9	2,03	101,2	5,30
Mo	99,5	2,23	99,5	1,44	99,8	2,40	98,7	3,92
Cu	98,6	2,20	98,6	4,42	99,6	3,30	100,8	4,15
Sn	101,1	2,68	101,1	2,89	99,6	4,53	98,7	7,10
Cr	98,0	5,53	98,0	3,94	100,0	3,14	96,0	6,55

Tabela 23 - Resultados de exatidão obtidos por meio da porcentagem de recuperação, após a adição de padrão no nível de concentração de 0,5 J para avaliação da exatidão do método por ICP-OES.

Analitos	<i>Passiflora incarnata</i>		<i>Paullinia cupana</i>		<i>Stryphnodendron adstringens</i>		<i>Piper methysticum</i>	
	%	DPR	%	DPR	%	DPR	%	DPR
Cd	102,0	5,6	110,9	3,8	99,2	2,9	125,6	9,4
Pb	86,3	1,0	92,2	0,9	95,8	3,5	85,6	8,6
Hg	93,0	10,9	89,6	2,4	89,8	2,4	92,5	7,9
As	88,7	5,7	96,2	3,9	86,2	2,9	108,5	9,3
Co	112,1	11,5	115,1	10,9	103,8	12,2	129,7	17,1
V	80,2	4,7	118,7	2,4	110,3	1,6	108,9	5,6
Ni	83,0	17,5	113,6	2,8	93,1	2,4	95,1	7,7
Tl	129,5	1,1	100,4	0,3	117,9	0,6	115,0	2,8
Au	135,2	8,9	129,2	2,4	136,9	1,9	146,1	6,2
Pd	123,6	2,8	90,5	8,6	105,5	2,5	112,5	3,6
Ir	98,5	3,8	93,0	3,3	94,8	0,8	90,2	1,9
Os	83,1	54,1	93,3	10,4	108,7	13,1	94,4	9,5
Rh	115,5	7,6	110,3	1,8	115,4	0,4	115,7	4,2
Ru	86,4	14,6	102,1	1,9	100,0	3,9	100,8	5,3
Se	144,0	6,6	91,0	5,3	94,1	12,2	76,9	3,5
Ag	132,4	10,3	138,0	7,3	99,1	11,3	120,9	13,6
Pt	137,8	9,3	105,4	5,2	102,3	10,2	92,0	10,3
Li	101,6	4,8	94,0	3,7	97,2	6,3	102,4	3,5
Sb	74,1	1,4	71,3	5,5	72,7	5,7	104,0	7,1
Ba	126,9	3,1	114,6	3,2	116,4	2,3	117,1	1,8
Mo	117,0	5,6	102,2	1,6	105,0	5,3	107,7	1,2
Cu	90,7	7,0	98,6	1,8	98,6	1,0	94,9	7,1
Sn	109,0	2,1	78,0	16,4	99,6	0,0	78,9	4,5
Cr	116,0	4,3	101,7	1,7	103,3	3,0	102,1	3,8

A Figura 35 apresenta de forma gráfica os valores de porcentagem de recuperação de cada elemento obtidos para a concentração de 0,5 J de quatro extratos vegetais estudados. As barras coloridas representam a média das recuperações (n=3) de cada amostra por elemento. As linhas horizontais em negrito representam os limites inferior (70%) e superior (150%) estabelecidos pela USP <233>. Observa-se que apesar das porcentagens de recuperação estarem dentro dos limites, no menor nível de concentração adicionado os resultados para alguns elementos beiram o limite inferior de 70%, em virtude da maior sensibilidade de perdas desde o preparo da amostra até a introdução no equipamento. O antimônio foi o analito que apresentou menor recuperação nessa faixa de concentração.

Avaliando a exatidão, todas as médias de recuperações obtidas nos três níveis de concentração J, para os quatro fitoterápicos estudados, tiveram resultados dentro dos limites preconizados pela USP<233> conforme as Figuras 35, 36 e 37, indicando uma exatidão aceitável. As variações encontradas podem ser relacionadas a possíveis perdas durante as etapas analíticas, ou ainda, decorrentes de efeito de matriz (TODOLÍ, 2002).

Figura 35 - Resultados de exatidão por meio da porcentagem de recuperação obtida para os elementos, após adição de padrão no nível de concentração de 0,5 J a partir dos extratos de quatro fitoterápicos estudados.

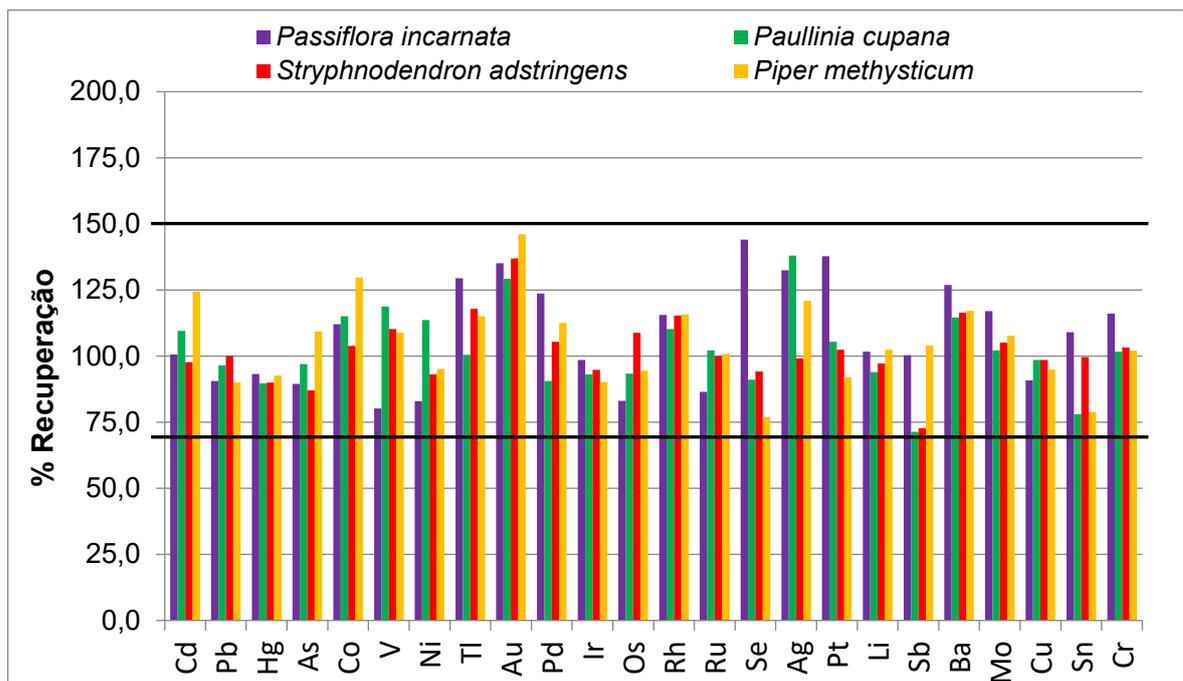


Figura 36 - Resultados de exatidão por meio da porcentagem de recuperação obtida para os elementos, após adição de padrão no nível de concentração de 1,0 J, a partir dos extratos de quatro fitoterápicos estudados.

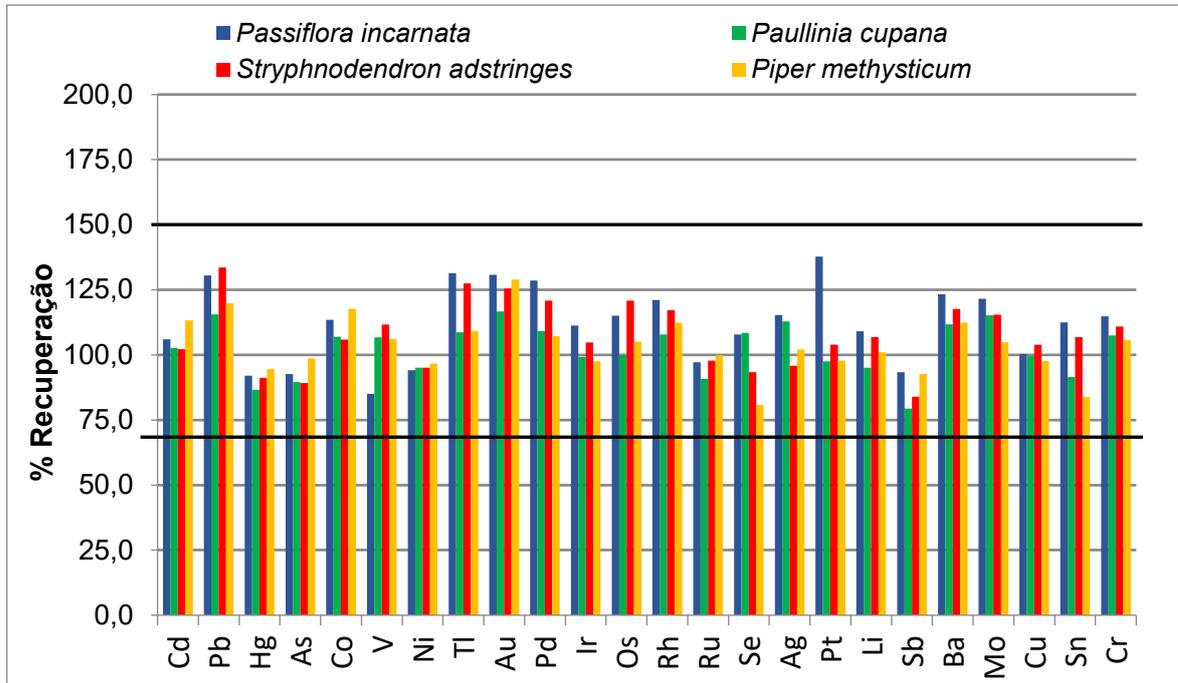


Figura 37 - Resultados de exatidão por meio da porcentagem de recuperação obtida para os elementos, após adição de padrão no nível de concentração de 1,5 J, a partir dos extratos de quatro fitoterápicos estudados.

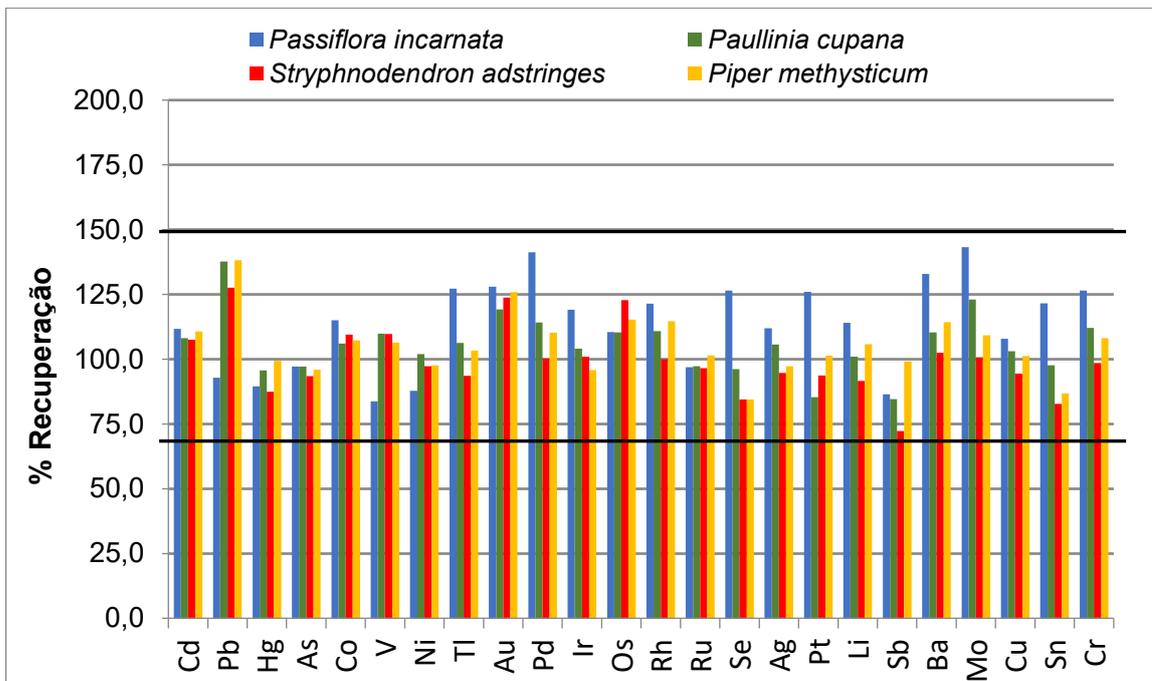


Tabela 24 - Resultados de exatidão obtidos por meio da porcentagem de recuperação após a adição de padrão no nível de concentração de 1 J para avaliação da exatidão do método por ICP-OES .

Analitos	% Recuperação - NIVEL: 1 J (n=3)							
	<i>Passiflora incarnata</i>		<i>Paullinia cupana</i>		<i>Stryphnodendron adstringens</i>		<i>Piper methysticum</i>	
	%	DPR	%	DPR	%	DPR	%	DPR
Cd	106,3	0,9	103,0	1,9	102,5	1,2	113,5	4,5
Pb	128,6	4,9	113,7	4,6	131,7	0,9	117,9	1,8
Hg	91,2	5,1	85,9	4,8	90,4	3,6	93,8	3,6
As	92,2	0,9	89,2	2,3	88,8	1,2	98,3	4,3
Co	113,5	5,0	107,0	2,5	105,9	14,0	117,6	4,1
V	85,0	3,6	106,8	6,3	111,6	0,5	106,2	3,3
Ni	94,1	4,9	95,1	8,4	95,1	1,6	96,7	2,2
Tl	131,4	1,4	108,6	1,7	127,5	5,5	109,2	8,8
Au	130,8	1,9	116,7	4,6	125,5	0,7	128,9	1,0
Pd	128,5	3,7	109,1	1,4	120,8	8,6	107,2	9,2
Ir	111,3	1,7	99,3	2,6	104,7	3,7	97,5	1,0
Os	115,0	7,1	100,0	12,9	120,8	4,1	105,0	9,2
Rh	121,0	1,6	107,8	2,7	117,1	2,1	112,3	2,2
Ru	97,1	5,1	90,8	14,5	97,8	6,5	99,8	7,2
Se	107,8	14,7	108,4	5,0	93,3	9,2	80,7	2,0
Ag	115,3	12,2	112,9	7,4	95,8	12,0	102,0	9,6
Pt	137,8	9,3	97,5	7,0	103,9	14,8	97,8	14,1
Li	109,1	0,6	95,1	4,8	106,9	2,6	100,9	2,6
Sb	93,4	3,0	79,4	7,5	84,0	13,4	32,3	15,6
Ba	123,3	3,9	111,7	11,2	117,7	5,4	112,4	5,9
Mo	121,5	1,8	115,2	2,8	115,4	6,5	104,9	6,3
Cu	100,4	1,5	99,5	3,4	103,9	3,5	97,7	3,5
Sn	112,4	3,0	91,5	11,6	106,8	10,8	83,8	11,2
Cr	114,8	4,9	107,5	4,0	110,9	3,2	105,7	2,2

Tabela 25 - Resultados de exatidão obtidos por meio da porcentagem de recuperação, após a adição de padrão no nível de concentração de 1,5 J para avaliação da exatidão do método por ICP-OES.

Analitos	% Recuperação - NIVEL: 1,5 J (n=3)							
	<i>Passiflora incarnata</i>		<i>Paullinia cupana</i>		<i>Stryphnodendron adstringens</i>		<i>Piper methysticum</i>	
	%	DPR	%	DPR	%	DPR	%	DPR
Cd	111,6	7,5	108,0	5,0	107,4	5,5	110,6	6,1
Pb	91,6	1,2	136,5	0,8	126,5	0,7	137,0	1,7
Hg	88,5	2,4	94,6	1,3	86,5	1,9	98,3	1,8
As	96,9	7,5	96,9	7,5	93,2	5,7	95,7	6,1
Co	115,1	13,1	106,1	11,7	109,5	7,5	107,3	9,3
V	83,7	4,3	109,8	2,1	109,7	1,9	106,4	2,9
Ni	87,7	17,1	101,9	3,8	97,3	2,8	97,6	3,7
Tl	127,2	2,8	106,3	3,1	93,6	1,4	103,3	7,1
Au	128,0	2,9	119,2	0,1	123,8	2,2	125,8	0,8
Pd	141,2	3,7	114,1	2,4	100,2	1,2	110,2	10,3
Ir	119,1	1,2	104,1	0,8	101,0	3,0	95,8	6,7
Os	110,4	8,2	110,3	3,9	122,8	2,1	115,3	2,8
Rh	121,4	3,9	110,8	2,4	99,9	1,7	114,6	2,2
Ru	96,9	3,1	97,2	6,2	96,5	7,5	101,5	8,3
Se	126,5	28,6	96,1	5,1	84,5	17,0	84,4	6,4
Ag	111,9	10,5	105,7	11,5	94,7	11,3	97,3	11,5
Pt	126,0	3,6	85,4	13,8	93,7	16,0	101,3	16,1
Li	114,0	0,6	101,0	1,8	91,6	0,3	105,8	0,2
Sb	86,4	1,5	84,5	5,1	72,3	15,3	38,8	79,9
Ba	132,9	3,3	110,3	10,2	102,5	1,1	114,3	5,5
Mo	143,3	5,6	123,0	7,4	100,7	1,2	109,3	14,9
Cu	107,9	0,5	103,1	2,5	94,5	1,5	101,2	0,3
Sn	121,6	1,7	97,6	7,5	82,7	8,2	86,8	19,1
Cr	126,5	3,8	112,0	2,0	98,5	0,6	108,1	3,4

5.5.4 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) calculados para cada elemento estão expressos na Tabela 26. Todos os valores estão abaixo do valor J limite estabelecido para as impurezas elementares em produtos farmacêuticos. Cabe ressaltar que apesar dos resultados estarem de acordo com os objetivos proposto deste estudo, os limites obtidos para o elemento Selênio (Se), em destaque, se mostraram bem acima do desejado.

Tabela 26 - Limites de detecção e de quantificação obtidos para os elementos analisados.

Analito	LD ($\mu\text{g/L}$)	LQ ($\mu\text{g/L}$)	0,25 J ($\mu\text{g/L}$)	J ($\mu\text{g/L}$)
Cádmio	0,16	0,53	1,25	5
Chumbo	0,37	1,22	1,25	5
Mercúrio	0,64	2,11	7,5	30
Arsênio	0,51	1,7	3,75	15
Cobalto	0,94	3,10	12,5	50
Vanádio	0,51	1,68	25	100
Níquel	0,12	0,39	50	200
Selênio	4,27	14,09	37,5	150
Prata	1,80	5,94	37,5	150
Tálio	0,61	2,01	2	8
Platina	1,05	3,50	25	100
Ouro	0,50	1,67	25	100
Paládio	0,71	2,36	25	100
Írídio	0,66	2,17	25	100
Ósmio	1,81	5,97	25	100
Ródio	1,8	5,93	25	100
Rutênio	1,08	3,56	25	100
Lítio	1,65	5,46	137,5	550
Antimônio	3,02	9,96	300	1200
Bário	0,39	1,28	350	1400
Molibdênio	1,69	5,58	750	3000
Cobre	0,1	0,31	750	3000
Estanho	1,36	4,49	1500	6000
Cromo	0,97	3,20	5500	11000

5.6 Determinação de impurezas elementares nas amostras dos extratos secos de fitoterápicos

Os ajustes paramétricos definidos na otimização instrumental do ICP-OES foram aplicados para a análise dos digeridos dos extratos secos vegetais. As concentrações dos 24 elementos quantificados em mg/kg (ppm) são expressos na Tabela 27. De forma geral, todas as impurezas elementares detectadas e quantificadas estão abaixo dos limites estabelecidos na Farmacopeia Americana. Vale ressaltar que para os elementos mais tóxicos, com menores valores de J , nenhum apresentou concentrações preocupantes. Os metais Cádmiio e Chumbo não foram encontrados em concentrações detectáveis em nenhuma das amostras. Mercúrio foi encontrado nos fitoterápicos de *Passiflora incarnata* e *Stryphnodendron adstringens* nas concentrações de 0,87 mg/kg e 0,25 mg/kg respectivamente. A presença desses contaminantes em produtos originários de flor e tronco pode indicar uma tendência maior em absorver esses elementos do ambiente. Já o Arsênio foi detectado somente na amostra de *Piper methysticum* na concentração de 0,21 mg/kg.

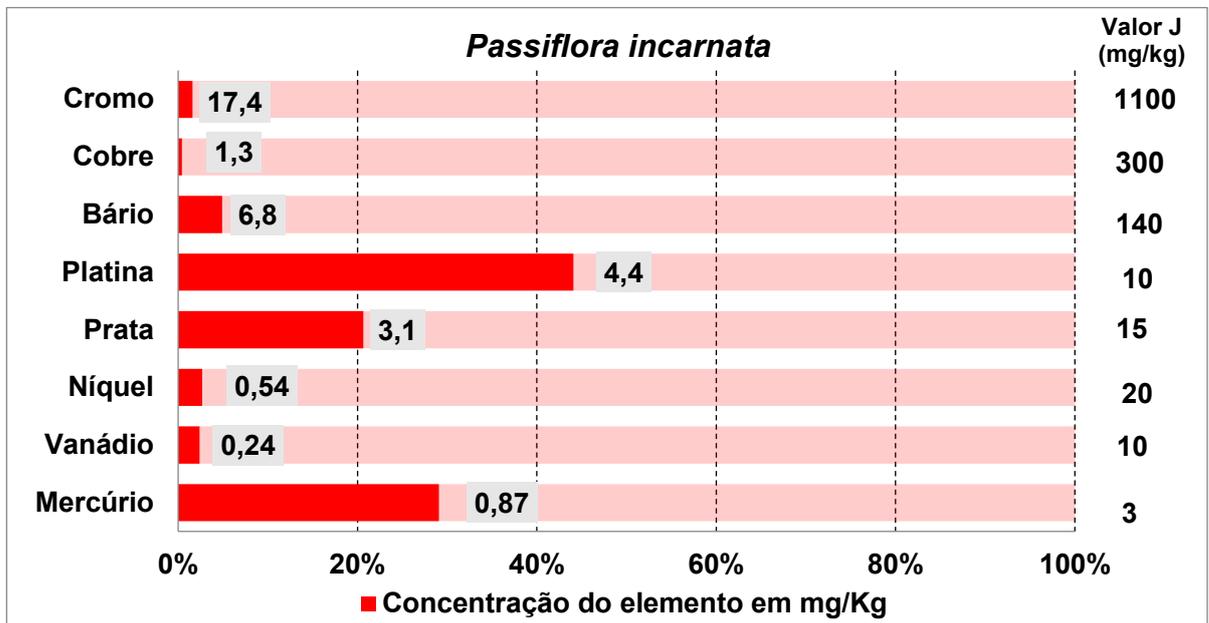
Os resultados obtidos na determinação de impurezas elementares nesses fitoterápicos demonstram a necessidade de se controlar rigorosamente os níveis dos elementos das classes 2 e 3, além de Pb, As, Hg e Cd (Classe A) que já são de monitoramento obrigatório conforme estabelece o capítulo USP <2322>. A presença de Platina em concentrações até 60 ppb nas amostras alerta para o aumento na emissão desse poluente no ambiente, que tem como principal fonte conversores catalíticos de veículos automotivos. Estudos mostram uma capacidade aumentada de plantas em bioacumular este metal do ambiente, seja através do solo ou do ar. (RAUCH; MORRISON, 2008; RAVINDRA, 2004).

Tabela 27 - Resultados da determinação das 24 impurezas elementares nos extratos secos de fitoterápicos, por ICP-OES (n=3)

Analitos	Concentração (mg/kg)				Limite J
	<i>Passiflora incarnata</i>	<i>Paullinia cupana</i>	<i>Stryphnodendron adstringens</i>	<i>Piper methysticum</i>	
Cádmio	<LD	<LD	<LD	<LD	0,5
Chumbo	<LD	<LD	<LD	<LD	0,5
Mercúrio	0,87	<LD	0,25	<LD	3
Arsênio	<LD	<LD	<LD	0,21	1,5
Cobalto	<LD	0,37	<LD	1,01	5
Vanádio	0,24	0,98	0,26	0,28	10
Níquel	0,54	2,60	0,43	0,85	20
Tálio	<LD	<LD	<LD	<LD	0,8
Ouro	<LD	<LD	<LD	<LD	10
Paládio	<LD	<LD	<LD	<LD	10
Írídio	<LD	<LD	<LD	<LD	10
Ósmio	<LD	<LD	<LD	<LD	10
Ródio	<LD	<LD	<LD	<LD	10
Rutênio	<LD	<LD	<LD	<LD	10
Selênio	<LD	<LD	<LD	<LD	15
Prata	3,10	3,28	0,67	2,89	15
Platina	4,41	5,68	1,69	<LD	10
Lítio	<LD	0,41	0,27	<LD	55
Antimônio	<LD	<LD	<LD	<LD	120
Bário	6,86	8,53	7,78	7,14	140
Molibdênio	<LD	<LD	<LD	<LD	300
Cobre	1,29	17,32	5,40	2,38	300
Estanho	<LD	<LD	4,11	5,84	600
Cromo	17,45	17,79	16,68	17,04	1100

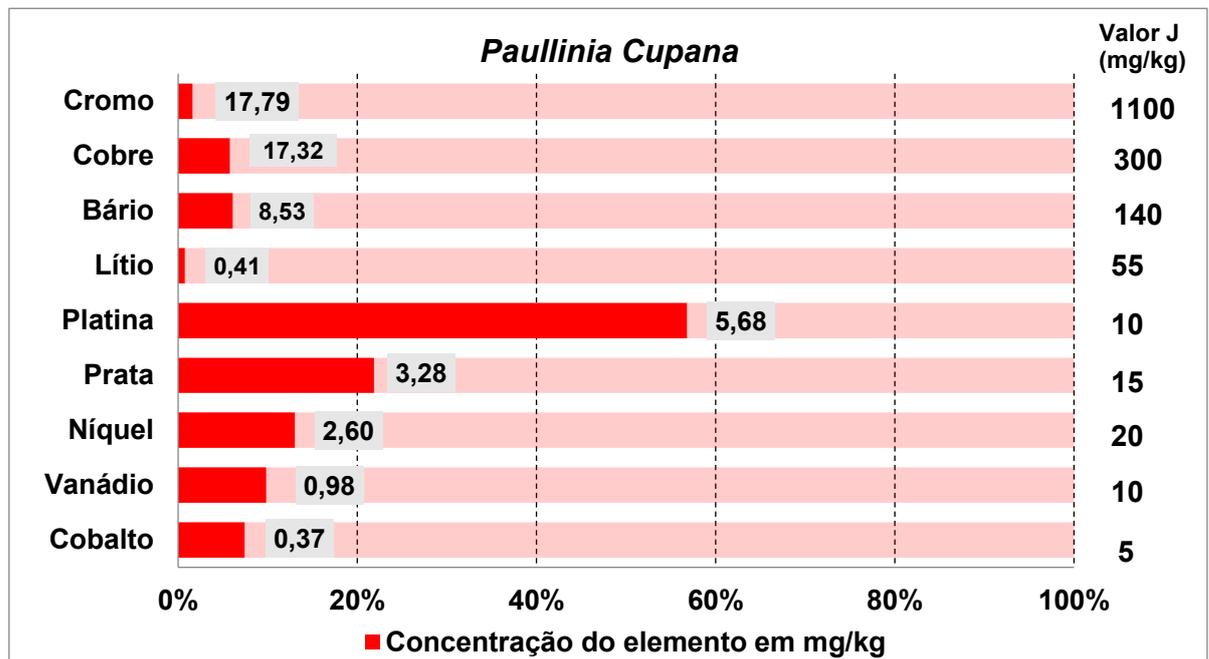
No extrato de *Passiflora incarnata*, foi encontrada uma concentração de Mercúrio de 0,87 mg/kg relativa a quase 30% do valor limite que é 3 mg/kg, como mostrado na Figura 38. Também foram encontradas quantidades superiores a 30% de Prata e Platina em relação ao valor limite J.

Figura 38 - Porcentagem de impurezas elementares detectadas no extrato de *Passiflora incarnata* em relação do valor limite *J* preconizado na USP<232>, por ICP-OES.



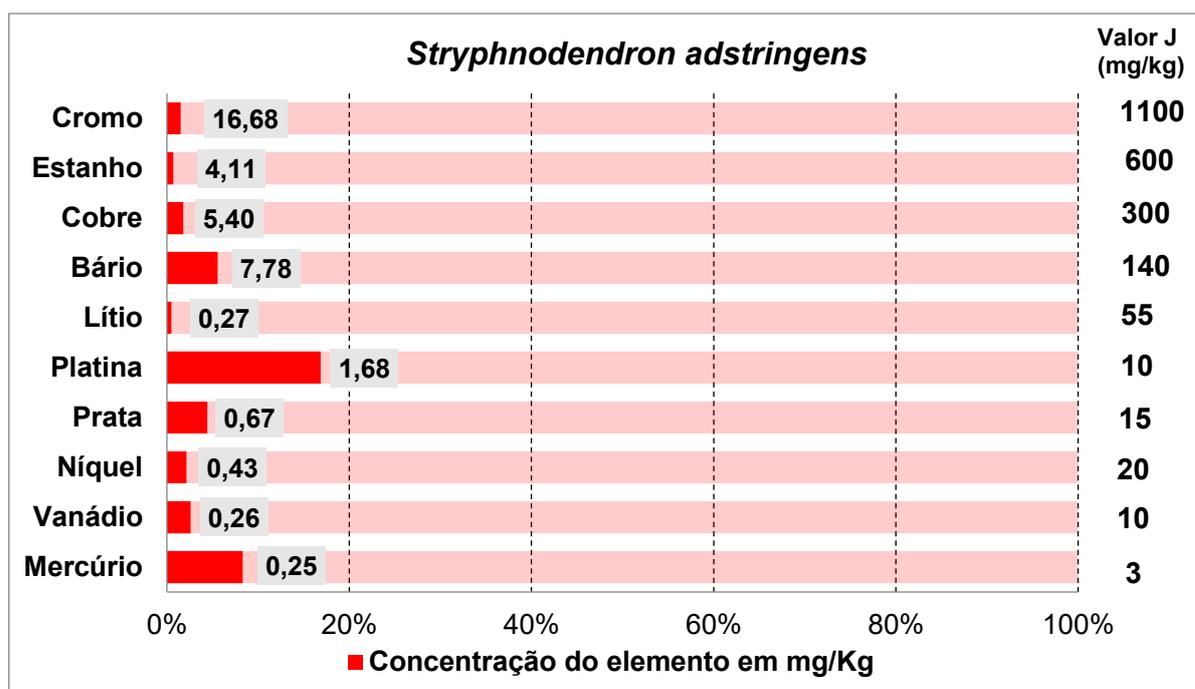
No extrato de *Paullinia cupana*, a concentração de Platina atingiu quase 60% do valor limite *J* preconizado na legislação, como é visto na Figura 39. Os elementos da classe 2A (Ni, Co e V) também foram encontrados nessa amostra em concentração inferior a 20% em relação ao valor *J* limite.

Figura 39 - Porcentagem de impurezas elementares detectadas no extrato de *Paullinia cupana* em relação do valor limite *J* preconizado na USP<232>, por ICP-OES.



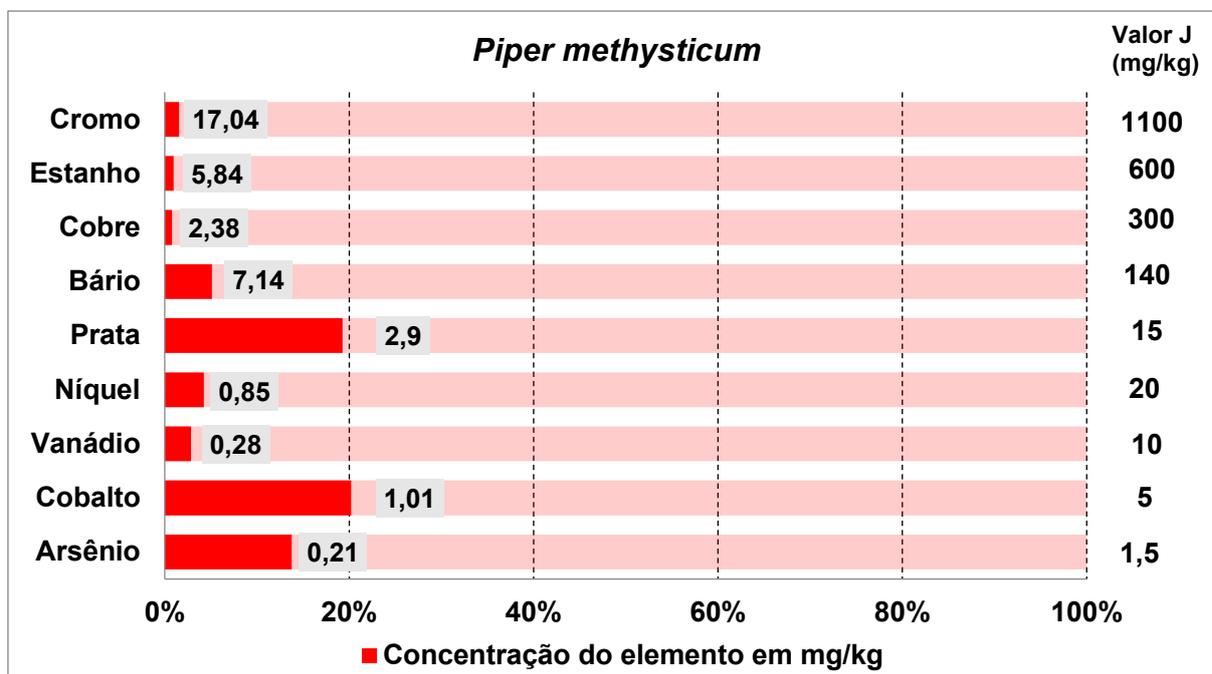
No extrato seco de *Stryphnodendron adstringens*, obtido no Laboratório de Controle de Qualidade da FAFAR, foi detectada a presença de mercúrio, além de impurezas de outras classes, como pode ser visto na Figura 40. O acúmulo desses elementos também pode estar relacionado a rota de obtenção dos extratos, a pureza dos reagentes e solventes e a limpeza de vidrarias e materiais utilizados. Por outro lado, ao invés de adicionar impurezas elementares, o uso de solventes na obtenção e purificação do extrato pode eliminá-las. Portanto, só é possível estabelecer a origem definitiva dessas impurezas contidas no produto final se houver uma análise quantitativa do produto antes e após cada etapa do processo (JIN, 2016).

Figura 40 - Porcentagem de impurezas elementares detectadas no extrato de *Stryphnodendron adstringens* em relação do valor limite J preconizado na USP<232>, por ICP-OES.



Na amostra de *Piper methysticum*, foi detectado concentração de Arsênio de 2,11 ppb (Figura 41). Esse valor, apesar de estar abaixo do limite preconizado, alerta para possível contaminação do solo com Arsênio decorrente de processos de irrigação, aplicação de fertilizantes ou pesticidas.

Figura 41 - Porcentagem de impurezas elementares detectadas no extrato de *Piper methysticum* em relação do valor limite *J* preconizado na USP<232>, por ICP-OES.

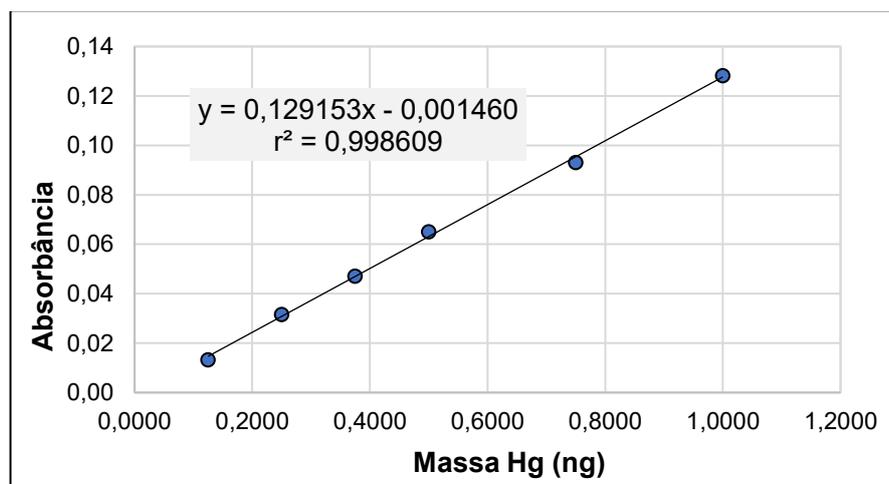


5.7 Determinação de Mercúrio nos extratos secos de fitoterápicos, obtida por meio de Analisador Direto de Mercúrio – DMA

O mercúrio elementar foi quantificado nos extratos vegetais pelo analisador direto de mercúrio (DMA). Os dados para a construção da curva analítica do DMA são mostrados na Tabela 28 e a curva analítica na Figura 42.

Tabela 28 – Leituras de absorvância dos padrões para obtenção da curva analítica do Mercúrio no DMA

Ponto nº	Massa de Hg (ng)	Absorvância
1	0,125	0,0133
2	0,25	0,0317
3	0,375	0,0472
4	0,5	0,0651
5	0,75	0,0931
6	1	0,1283

Figura 42 - Curva analítica do Mercúrio obtida no DMA

Os resultados da quantificação de mercúrio nos extratos vegetais pelo método de combustão utilizando o analisador direto de mercúrio estão expressos na Tabela 29. Foram obtidos resultados bem diferentes daqueles encontrados na determinação elementar por ICP-OES. Isso porque a análise de mercúrio no DMA se dá de forma direta, ou seja, não é necessário nenhum tipo de digestão/decomposição da matriz para a amostra ser analisada. Essa facilidade garante a integridade e preservação de analitos voláteis como o próprio Mercúrio, além de menores limites de detecção (LD) (VIEIRA; NASCENTES; WINDMÖLLER, 2014). Contudo, não foram realizados testes de exatidão, a partir de ensaios de adição e recuperação com um material de referência branco para certificar da existência de algum efeito de matriz.

Uma outra dificuldade analítica comum na determinação de mercúrio por ICP-OES, e que pode ser evitado pela análise no DMA, é o efeito de memória, capaz de superestimar a concentração elementar na amostra. Todas as concentrações de mercúrio encontradas nos extratos estão dentro do limite especificado para medicamentos de uso oral, que é de 3 µg/g (UNITED, 2014).

Tabela 29 - Resultados obtidos em concentração de mercúrio (µg/kg) nos extratos vegetais obtidos pelo método de combustão, por meio de DMA.

Amostra	Massa de amostra (g)	Absorvância altura (A)	Concentração (µg/kg)
<i>Passiflora incarnata</i>	0,095	0,0073	0,7139
<i>Paullinia cupana</i>	0,1003	0,0174	1,4559
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	0,0999	0,0406	3,2598
<i>Piper methysticum</i>	0,0966	0,0051	0,5258

6 CONCLUSÃO

O tratamento prévio dos extratos vegetais por meio da digestão por micro-ondas foi eficiente por meio da redução do tempo, da quantidade de ácido digestor e da adequação da temperatura em comparação à digestão convencional em sistema aberto. O emprego de solução de ácido nítrico menos concentrado (2M) conduz a menos riscos ocupacionais e ambientais, e à produção de menos resíduos, o que vai ao encontro dos princípios da química verde. As soluções digeridas resultantes apresentaram clareza e baixo teor de TOC/COT residual compatíveis com a nebulização empregada na quantificação elementar por ICP-OES.

O método de análise quantitativa dos 24 elementos, por ICP-OES, apresentou resultados satisfatórios em termos de exatidão e precisão. Os limites de detecção e quantificação mostraram-se adequados e menores que os limites especificados na legislação.

O emprego de métodos quimiométricos no estudo de variáveis envolvidas na análise de impurezas elementares em medicamentos fitoterápicos, desde a etapa de digestão da amostra até a análise instrumental, propriamente dita, foi essencial na definição e otimização dos parâmetros necessários para o desenvolvimento de um método eficiente.

A análise elementar dos extratos secos de *Passiflora incarnata*, *Paullinia cupana*, *Stryphnodendron adstringens* e *Piper methysticum* não evidenciou concentrações de impurezas acima dos limites especificados na USP<233>. Contudo, em se tratando do aumento no uso de fitoterápicos em todo o mundo, reitera-se a importância do controle de impurezas elementares em produtos fitoterápicos.

O desenvolvimento de técnicas analíticas instrumentais de alta especificidade e sensibilidade, como ICP-OES e a qualificação de mão de obra possibilitarão o aprimoramento em controle de qualidade para IFA ou ESP, tanto de fitoterápicos quanto farmacêuticos, na rotina de uma indústria.

REFERÊNCIAS

AGAZZI, A.; PIROLA, C. Fundamentals, methods and future trends of environmental microwave sample preparation. **Microchemical Journal**, v. 67, n. 1–3, p. 337–341, 2000.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. **Toxicological profile for mercury**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1999.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. **Toxicological profile for lead**. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2002.

AKINYELE, I. O.; SHOKUNBI, O. S. Comparative analysis of dry ashing and wet digestion methods for the determination of trace and heavy metals in food samples. **Food Chemistry**, v. 173, p. 682–684, 2015.

ALTUNDAG, H.; TUZEN, M. Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2800–2807, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.07.064>>.

ANNAN, K.; KOJO, A. I; CINDY, A. SAMUEL, A.; TUNKUMGNEN, B. M. Profile of heavy metals in some medicinal plants from Ghana commonly used as components of herbal formulations. **Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 1, p. 41–44, 2010.

ANTONELLI USHIROBIRA, T. M.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L. M; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P; DE MELLO, J. C. P. Chemical and microbiological study of extract from seeds of Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 1, p. 5–9, 2007.

APPENROTH, K. J. What are “heavy metals” in plant sciences? **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, n. 4, p. 615–619, 2010.

ARAÚJO, G. C. L.; GONZALEZ, M. H; FERREIRA, A. G.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 12, p. 2121–2132, 2002.

BALARAM, V. Recent advances in the determination of elemental impurities in pharmaceuticals - Status, challenges and moving frontiers. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 83–95, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2016.02.001>>.

BARBOSA, D. R.; LENARDON, L.; PARTATA, A. K. Kava-kava (*Piper methysticum*): uma revisão geral. **Revista Científica do ITPAC**, v. 6, n. 3, pub. 3, p. 1-19, 2013.

BARIN, J. S.; PEREIRA, J. S. F.; MELLO, P. A.; KNORR, C. L.; MORAES, D. P.; MESKO, M. F.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A.; FLORES, E. M. M.; Focused microwave-induced combustion for digestion of botanical samples and metals determination by ICP OES and ICP-MS. **Talanta**, v. 94, p. 308–314, 2012.

BARIN, J. S.; MELLO, P. A.; MESKO, M. F.; DUARTE, F. A. Determination of elemental impurities in pharmaceutical products and related matrices by ICP-based methods: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 17, p. 4547–4566, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9471-6>>.

BARROS, J. A. V. A.; DE SOUZA, P. F.; SCHIAVO, D.; NÓBREGA, J. A. Microwave-assisted digestion using diluted acid and base solutions for plant analysis by ICP OES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, n. 1, p. 337–343, 2016.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 2003. 401p. (Livro-texto).

BARTHWAL, J.; NAIR, S.; KAKKAR, P. Heavy metal accumulation in medicinal plants collected from environmentally different sites. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 21, n. 4, p. 319–324, 2008.

BEZERRA CARVALHO, A. C.; RAMALHO, L. S.; MARQUES, R. F. D.; PERFEITO, J. P. S. Regulation of herbal medicines in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, n. Part B, p. 503–506, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.08.019>>.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BIZZI, C. A.; PEDROTTI, M. F.; SILVA, J. S.; BARIN, J. S.; NÓBREGA, J. A.; FLORES, E. M. M. Microwave-assisted digestion methods: Towards greener approaches for plasma-based analytical techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, n. 8, p. 1448–1466, 2017.

BIZZI, C. A.; FLORES, E. L. M.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, L. S.; MORTARI, S. R. Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 2, p. 332–338, 2014.

BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; GARCIA, E. E.; NÓBREGA, J. A. Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent. **Microchemical Journal**, v. 99, n. 2, p. 193–196, 2011.

BORKOWSKA-BURNECKA, J.; LEŚNIEWICZ, A.; ZYRNICKI, W. Comparison of pneumatic and ultrasonic nebulizations in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry - matrix effects and plasma parameters. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 5, p. 579–587, 2006.

BOSS, C. B.; FREDEEN, K. J. **Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry**, 3. ed. Perkin Elmer, Waltham, 1997

BRASIL. Ministério da Saúde. **Monografia da espécie *Passiflora incarnata* Linnaeus**. v. 5, p. 1–85, 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2016/fevereiro/05/Monografia-Passiflora-incarnata.pdf>>.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira - Primeiro Suplemento**. [S.l: s.n.], 2018.

BRASIL, RDC nº 26, de 13 de maio de 2014. Regulamenta o registro de Medicamentos Fitoterápicos (MF) e o registro e a notificação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos (PTF). **Diário oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 14 maio. 2014.

BRENNER, I. B.; ZANDER, A. T. Axially and radially viewed inductively coupled plasmas - A critical review. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 55, n. 8, p. 1195–1240, 2000.

BRIDGES, C. C.; ZALUPS, R. K. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 204, n. 3, p. 274–308, 2005.

BRITISH Pharmacopoeia 2011. London: Her Majesty's Stationary Office, 2011. 6 v.

CASTRO, R. A.; ALBIERO, A. L. M. O mercado de matérias primas para indústria de fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 10, n. 1, p. 59–72, 2016.

CHAN, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. **Chemosphere**, v. 52, n. 9, p. 1361–1371, 2003.

CIZDZIEL, J. V.; HINNERS, T. A.; HEITHMAR, E. M. Determination of total mercury in fish tissues using combustion atomic absorption spectrometry with gold amalgamation. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 135, n. 1–4, p. 355–370, 2002.

CLARK, J. E.; PUNZI, J. S. Modernization of the standards for elemental impurities. **Pharmaceutical Technology**, v. 37, n. 2, p. 52–55, 2013.

CLARKSON, T. W. The toxicology of mercury. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 34, n. 3, p. 369–403, 1997.

CONRAD G. D. Sample Introduction Techniques for the Determination of Osmium Isotope Ratios by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 2, p. 141–146, 1990.

CORREIA, F. O.; SILVA, SILVA, D. S.; COSTA, S. S. L.; SILVA, I. K.; DA SILVA, D. R.; ALVES, J. P. H.; GARCIA, C. A. B.; MARANHÃO, T. A.; PASSOS, E. A.; ARAUJO, R. G. O. Optimization of microwave digestion and inductively coupled plasma-based methods to characterize cassava, corn and wheat flours using chemometrics. **Microchemical Journal**, v. 135, p. 190–198, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.09.007>>.

COSTLEY, C. T.; MOSSOP, K. F.; DEAN, J. R.; GARDEN, L. M.; MARSHALL, J.; CARROLL, J. Determination of mercury in environmental and biological samples using pyrolysis atomic absorption spectrometry with gold amalgamation. **Analytica Chimica Acta**, v. 405, n. 1–2, p. 179–183, 2000.

DA SILVA, C. S.; PINHEIRO, F. C.; DO AMARAL, C. D. B.; NÓBREGA, J. A. Determination of As, Cd, Hg and Pb in continuous use drugs and excipients by plasma-based techniques in compliance with the United States Pharmacopeia requirements. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, calibração externa e adição de padrão, v. 138, p. 14–17, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.sab.2017.10.004>>.

DAMAS, G. B.; BERTOLDO, B.; COSTA, L. T. Mercury: from antiquity to nowadays. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 4, p. 1010–1020, 2014.

DE OLIVEIRA, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 174–182, 2003.

DE SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**, v. 552, n. 1–2, p. 25–35, 2005.

DEAN, J. R. **Practical inductively coupled plasma spectroscopy**. [S.l.: s.n.], p. 186, 2018.

DENNAUD, J.; HOWES, A.; POUSSEL, E.; MERMET, J. Study of ionic-to-atomic line intensity ratios for two axial viewing-based inductively coupled plasma atomic emission spectrometers. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 56, n. 1, p. 101–112, 2001.

DESTEFANO, T.; THOMAS, R. From heavy metals testing to the measurement of elemental impurities in pharmaceuticals: Over 100 years in making the change. **Spectroscopy**, v. 33, n. 5, p. 14–19, 2018.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. Passiflora: A review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1–23, 2004.

DIAS, J. E.; LAUREANO, L. C. **Farmacopeia popular do cerrado**. Goiânia: Articulação Pacari, 2009, 352p.

DOS ANJOS, S. L.; ALVES, J. C.; SOARES, S. A. R.; ARAÚJO, R. G. O.; DE OLIVEIRA, O. M. C.; QUEIROZ, A. F. S.; FERREIRA, S. L. C. Multivariate optimization of a procedure employing microwave-assisted digestion for the determination of nickel and vanadium in crude oil by ICP OES. **Talanta**, v. 178, n. October 2017, p. 842–846, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.010>>.

DUBUISSON, C.; POUSSEL, E.; MERMET, J. M.; TODOLI, J. L. Comparison of the effect of acetic acid with axially and radially viewed inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: Influence of the operating conditions. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 13, n. 1, p. 63–67, 1998.

DUFFUS, J. H. “Heavy metals” a meaningless term? (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793–807, 2007.

ĐUKIĆ-ĆOSIĆ, D.; BARALIC, K.; JAVORAC, D.; DJORDJEVIC, A. B.; BULAT, Z. An overview of molecular mechanisms in cadmium toxicity. **Current Opinion in Toxicology**, v. 19, p. 56–62, 2020.

EMA EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Guideline on the Specification Limits for Residues of Metal Catalysts or Metal Reagents. **Regulation Document**, p. 1–34, 2008.

ERICKSON, H. T.; CORREA, M. P. F.; ESCOBAR, J. R. Guaraná (*Paullinia cupana*) as a commercial crop in Brazilian Amazonia. **Economic Botany**, v. 38, n. 3, p. 273–286, 1984.

ERNST, E. Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 23, n. 3, p. 136–139, 2002.

FARMACOPEIA brasileira. 6. ed. Brasília, DF: Anvisa, 2019. 2 v.

FOOD and Drug Administration - FDA. Guidance for Industry Considerations Regarding Substances. **Contains Nonbinding Recommendations**, n. January 2014, 2014.

FISHER, A. A.; PURCELL, P.; LE COUTEUR, D. G. L. Toxicity of *Passiflora incarnata* L. **Journal of Toxicology - Clinical Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 63–66, 2000.

FLORES, E. M. M. Microwave-Assisted sample preparation for trace element determination. **Elsevier**, p. 401, 2014.

GALARIS, D.; EVANGELOU, A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 42, n. 1, p. 93–103, 2002.

GARCIA, M. O. **Preparo de amostras e análise elementar de produtos farmacêuticos**. 2016. Dissertação (Mestrado Profissional em Química), Universidade Federal de São Carlos, p. 98. 2016.

GINÉ, M. F. **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES)**. Piracicaba: [s.n.], p. 148, 2018.

GIORDANI, P.; MINGANTI, V.; BRIGNOLE, D.; MALASPINA, L. C.; DRAVA, G. Is there a risk of trace element contamination in herbal preparations? A test study on the lichen *Cetraria islandica*. **Chemosphere**, v. 181, p. 778–785, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.140>>.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible mechanism of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205–215, 1996.

HOENIG, M.; DE KERSABIEC, A. M. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 51, n. 11, p. 1297–1307, 1996.

ICH. **Guideline for elemental impurities Q3D (R1)**. *Ema/Chmp/Ich/353369/2013*, v. 31, n. March, p. 82, 2019.

ISAAC, R. A; JOHNSON, W. C. COLLABORATIVE study of wet and dry ashing techniques for the elemental analysis of plant tissue by atomic absorption spectrophotometry. **Journal of AOAC International**, v. 58, n. 3, p. 436–440, 1975.

ISHIDA, K.; ROZENTAL, S.; MELLO, J. C. P, NAKAMURA, C. V. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: Effects on growth, capsule size and pigmentation. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, p. 29, 2009.

JAISHANKAR, M.; TSETEN, T.; ANBALAGAN, N.; MATHEW, B. B.; BEEREGOWDA, K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 7, n. 2, p. 60–72, 2014.

JIN, C. Clean chemistry for elemental impurities analysis of pharmaceuticals in compliance with USP 232. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n.: 5, p. 1141-49, 2016.

JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

JUSTO, S. C.; SILVA, C. M. *Piper methisticum* G. Forster (Kava-kava): Uma abordagem geral. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 1, p. 73-82, 2008.

KINGSTON, H. M.; CAIN, R. D. A new method to assess mercury emissions: a study of three coal-fired electric-generating power station configurations. **Journal of the Air and Waste Management Association**, v. 53, n. 11, p. 1318–1325, 2003.

KLEIN, C. B.; FRENKEL, K.; COSTA, M. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. **Chemical Research in Toxicology**, v. 4, n. 6, p. 592–604, 1991.

KOSALEC, I.; CVEK, J.; TOMIĆ, S. Contaminants of medicinal herbs and herbal products. **Herb and Herbal Product Contaminants**, v. 60, n. 4, p. 485–501, 2009.

KOSTA, L. Contamination as a limiting parameter in trace analysis. **Talanta**, v. 29, n. 11, Part 2, p. 985–992, 1982.

KOTZ, L.; KAISER, G.; TSCHOPEL, P.; TOLG, G. Theory of sample preparation using acid digestion , pressure digestion and microwave digestion (microwave decomposition). **Analytical Chemistry**, v. 260, p. 207–209, 1972.

KUBRAKOVA, I. V. Microwave radiation in analytical chemistry: The scope and prospects for application. **Russia Chemical Reviews**, v. 71, n. 4, p. 338–340, 2002.

LEWEN, N.; MATHEW, S.; SCHENKENBERGER, M.; RAGLIONE, T. A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 4, p. 739–752, 2004.

LEWEN, N. The use of atomic spectroscopy in the pharmaceutical industry for the determination of trace elements in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 653–661, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2010.11.030>>.

LI, G.; SCHONEKER, D.; ULMAN, K. L.; STURM, J. J.; THAKERY, L. M.; KAUFFMAN, J. F. Elemental impurities in pharmaceutical excipients. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 12, p. 4197–4206, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/jps.24650>>.

LI, S.; FANG, Y.; NING, H.; WU, Y. X. Heavy metals in chinese therapeutic foods and herbs. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 34, n. 5, p. 1091–1095, 2012.

LIU, J.; ZHU, Q.; ZHANG, Z.; XU, J.; YANG, J.; WONG, M. H. Variations in cadmium accumulation among rice cultivars and types and the selection of cultivars for reducing cadmium in the diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 1, p. 147–153, 2005.

MACHADO, K. N.; DE FREITAS, A. A.; CUNHA, L. H.; FARACO, A. A. G.; DE PÁDUA, R. M.; BRAGA, F. C.; VIANNA-SOARES, C. D.; CASTILHO, R. O. A rapid simultaneous determination of methylxanthines and proanthocyanidins in brazilian guaraná (*Paullinia cupana* Kunth.). **Food Chemistry**, v. 239, p. 180-188. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.089>

MACHADO, K. N.; BARBOSA, A. P.; FREITAS, A. A.; PÁDUA, R. M.; FARACO, A. A. G.; BRAGA, F. C.; VIANNA-SOARES, C. D.; CASTILHO, R. O. TNF- α inhibition, antioxidant effects and chemical analysis of extracts and fraction from Brazilian guaraná seed powder. **Food Chemistry**, v. 355, 129563, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814621005690>

MAITHANI, M.; RATURI, R.; SHARMA, P.; GUPTA, V.; BANSAL, P. Elemental impurities in pharmaceutical products adding fuel to the fire. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 108, 104435, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104435>>.

MAJHENIČ, L.; ŠKERGET, M.; KNEZ, Ž.. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1258–1268, 2007.

MALIK, J.; FRANKOVA, A.; DRABEK, O.; SZAKOVA, J.; ASH, C.; KOKOSKA, L. Aluminium and other elements in selected herbal tea plant species and their infusions. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 728–734, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.013>>.

MARQUES, L. L. M.; FERREIRA, E. D. F.; DE PAULA, M. N.; KLEIN, T.; DE MELLO, J. C. P. *Paullinia cupana*: a multipurpose plant – a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 1, p. 77–110, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjp.2018.08.007>>.

MATEJOVIC, I.; DURACKOVA, A. Comparison of microwave digestion, wet and dry mineralization, and solubilization of plant sample for determination of calcium, magnesium, potassium, phosphorus, sodium, iron, zinc, copper, and manganese. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 25, n. 9–10, p. 1277–1288, 1994.

MESTER, Z., STURGEON, R. organizadores. Sample preparation for trace element analysis, Elsevier, 2003.

MELENDEZ-PEREZ, J. J.; FOSTIER, A. H. Assessment of direct Mercury Analyzer® to quantify mercury in soils and leaf samples. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 11, p. 1880–1886, 2013.

MERMET, J. M. Use of magnesium as a test element for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry diagnostics. **Analytica Chimica Acta**, v. 250, n. 1, p. 85–94, 1991.

MILANI, R. F.; SILVESTRE, L. K.; MORGANO, M. A.; CADORE, S. “Investigation of Twelve Trace Elements in Herbal Tea Commercialized in Brazil”. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, vol. 52, março de 2019, p. 111–17. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.jtemb.2018.12.004.

MILESTONE. Save time. Go direct to mercury analysis, 2018. Disponível em: <<https://www.milestonesrl.com/products/mercury-determination/dma-80-evo>>

MIRODDI, M.; CALAPAI, G.; NAVARRA, M.; MINCIULLO, P. L.; GANGEMI, S. *Passiflora incarnata* L.: ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 791–804, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.047>>.

MISSOURI botanical garden. **Nomenclatural database**. 2020. Disponível em: <<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>>.

MITRA, S., (org.). **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. J. Wiley, p. 458, 2003.

MULLER, A. L. H.; MULLER, E. I.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M. Microwave-assisted digestion using diluted acids for toxic element determination in medicinal plants by ICP-MS in compliance with united states pharmacopeia requirements. **Analytical Methods**, v. 7, n. 12, p. 5218–5225, 2015.

MULLER, A. L. H.; OLIVEIRA, J. S. S.; MELLO, P. A.; MULLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Study and determination of elemental impurities by ICP-MS in active pharmaceutical ingredients using single reaction chamber digestion in compliance with USP requirements. **Talanta**, v. 136, p. 161–169, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.12.023>>.

NASCIMENTO, A. M.; GUEDES, P. T.; CASTILHO, R. O., VIANNA-SOARES, C. D.; *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) proanthocyanidins quantitation by RP-HPLC. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**.v. 49, n. 3, p. 549-558. 2013.

NAWAZ, M. A.; ZAKHARENKO, A. M.; ZEMCHENKO, I. V.; HAIDER, M. S.; ALI, M. A.; IMTIAZ, M.; CHUNG, G.; TSATSAKISM A.; SUN, S.; GOLOKHAVAST, K. S. Phytolith formation in plants: from soil to cell. **Plants**, v. 8, n. 8, p. 249, 2019.

NGUYEN, M. N.; DAM, T. T. N.; NGUYEN, A. T. Q.; NGUYEN, A. M.; NGUYEN, L. N.; DUONG, L. T.; DANG, Q. T.; TRAN, T. T. Arsenic in rice straw phytoliths: Encapsulation and release properties. **Applied Geochemistry**, v. 127, p. 104907, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2021.104907>>.

NÓBREGA, J. A.; PIROLA, C.; FIALHO, L. L.; ROTA, G.; C.E.K.M.A.; POLLO, F. Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become? **Talanta**, v. 98, p. 272–276, 2012.

NÓBREGA, J. A.; TREVIZAN, L. C.; ARAÚJO, G. C. L.; NOGUEIRA, A. R. A. Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, v. 57, n. 12, p. 1855–1876, 2002.

NOBREGA, J. A.; PIROLA C. **Getting Ready for USP 232, 233 and 2322**. Microwave-assisted sample preparation and determination of elemental impurities in pharmaceutical products. *Iknos*, p. 108, 2017

NOBREGA, J. A.; PIROLA C. **Think Green. Modern Approaches to Microwave-assisted Digestion**. *Iknos*, p. 259, 2018.

NOVAES, C. G.; BEZERRA, M. A.; SILVA, E. G. P.; DOS SANTOS, A. M. P.; ROMÃO, I. L. D.; NETO, J. H. S. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). **Microchemical Journal**, v. 128, p. 331–346, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2016.05.015>>.

NOWELL, G. M.; LUGUET, A.; PEARSON, D. G.; HORSTWOOD, M. S. A. Precise and accurate 186Os/188Os and 187Os/188Os measurements by multi-collector plasma ionisation mass spectrometry (MC-ICP-MS) part I: Solution analyses. **Chemical Geology**, v. 248, n. 3–4, p. 363–393, 2008.

POHL, P.; BIELAWSKA-POHL, A.; DZIMITROWICZ, A.; JAMROZ, P.; WELNA, M.; Impact and practicability of recently introduced requirements on elemental impurities. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 101, p. 43–55, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.011>>.

RAUCH, S.; MORRISON, G. M. Environmental relevance of the platinum-group elements. **Elements**, v. 4, n. 4, p. 259–263, 2008.

RAVINDRA, K. Platinum group elements in the environment and their health risk. **The Science of Total Environment** v. 318, n. 03, p. 1–43, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14654273/>>

RICHTER, R. C.; NOBREGA, J. A.; PIROLA, C. **Think Blank: Clean Chemistry Tools for Atomic Spectroscopy**. p. 126, 2016.

ROMERO, X.; POUSSEL, E.; MERMET, J. M. Influence of the operating conditions on the efficiency of internal standardization in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 52, n. 4, p. 487–493, 1997.

SANTOS, H. M.; COUTINHO, J. P.; AMORIM, F. A. C.; LÔBO, I. P.; MOREIRA, L. S.; NASCIMENTO, M. M.; DE JESUS, R. M. Microwave-assisted digestion using diluted HNO₃ and H₂O₂ for macro and microelements determination in guarana samples by ICP OES. **Food Chemistry**, v. 273, n. August 2017, p. 159–165, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.074>>.

SATARUG, S.; GARETT, S. H.; SENS, M. A.; SENS, D. A. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 2, p. 182–190, 2010.

SCHIMPL, F. C.; DA SILVA, J. F.; GONÇALVES, J. F. C.; MAZZAFERA, P. Guarana: Revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 14–31, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.08.023>>.

SILVA, J. C. J.; BACCAN, N.; NÓBREGA, J. A. Analytical performance of an inductively coupled plasma optical emission spectrometry with dual view configuration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 310–315, 2003.

SINGH, Y. N. Kava : an overview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, p. 13–45, 1992.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. v. 58, 2016, p. 374, 2005.

SMITH, F. E.; ARSENAULT, E. A. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. **Talanta**, v. 43, n. 8, p. 1207–1268, 1996.

SNEDDON, J.; HARDAWAY, C. BOBBADI, K. K.; REDDY, A, K. Sample preparation of solid samples for metal determination by atomic spectroscopy - an overview and selected recent applications. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 41, n. 1, p. 1–14, 2006.

SOBOLEV, O.; GUTY, B.; PETRYSHAK, R.; PIVTORAK, J.; KOVALSKYI, Y.; NAUMYUK, A.; PETRYSHAK, O.; SEMCHUK, I.; MATEUSZ, V.; SHCHERBATYY, A.; SEMENIV, B. Biological role of selenium in the organism of animals and humans. **Ukrainian Journal of Ecology**, v. 7, n. 1, p. 22–29, 2017.

SOUZA, S. O.; PEREIRA, T. R. S.; ÁVILA, D. V. L.; PAIXÃO, L. B.; SOARES, S. A. R.; QUEIROZ, A. F. S.; PESSOA, A. G. G.; KORN, M. G.; MARANHÃO, T. A.; ARAUJO, R. G. O. Optimization of sample preparation procedures for evaluation of the mineral composition of fish feeds using ICP-based methods. **Food Chemistry**, v. 273, p. 106–114, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.178>>.

SOUZA, M. O.; SILVA, F. L. F.; MATOS, W. O.; FERREIRA, R. Q. Otimização dos parâmetros operacionais do ICP-OES para Determinação de Metais em petróleo pesado após digestão por micro-ondas. **Revista Virtual de Química**, vol. 9, n° 4, 2017, p. 1658-71. doi:10.21577/1984-6835.20170095.

STEINHOFF, B. Review: Quality of herbal medicinal products: State of the art of purity assessment. **Phytomedicine**, v. 60, p. 2019–2021, 2019.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 321–336, 1995.

STØVING, C.; JENSEN, H.; GAMMELGAARD, B.; STÜRUP, S. Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets

according to coming US pharmacopeia chapters. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 84, n. July 2016, p. 209–214, 2013.

THOMAS, R. **Measuring elemental impurities in pharmaceuticals: a practical guide**. CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 473, 2018.

THOMSEN, V.; SCHATZLEIN, D.; MERCURO, D. **Limits of detection in spectroscopy**. **Spectroscopy**, v. 18, n. 12, p. 112–114, 2003.

TING, A.; CHOW, Y.; TAN, W. Microbial and heavy metal contamination in commonly consumed traditional Chinese herbal medicines. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 33, n. 1, p. 119–124, 2013. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0254-6272\(13\)60112-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0254-6272(13)60112-0)>.

TODOLÍ, J. L.; GRAS, L.; HERNANDIS, V.; MORA, J. Elemental matrix effects in ICP-AES. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 17, n. 2, p. 142–169, 2002.

TRIPATHY, V.; BASAK, B. B.; VARGHESE, T. S.; SAHA, A. Residues and contaminants in medicinal herbs - a review. **Phytochemistry Letters**, v. 14, p. 67–78, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2015.09.003>>.

UNITED States Pharmacopeia. 37. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p. 6151-6155, 2014.

VENZAGO, C.; POPP, M.; KOVAC, J.; KUNKEL, A. Pharmacopeial requirements for elemental impurities: A novel approach to the trace determination of osmium by oxidative pressure vessel sample digestion and measurement using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) after complexation and sta. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, n. 7, p. 1125–1129, 2013.

VIEIRA, H. P.; NASCENTES, C. C.; WINDMÖLLER, C. C. Development and comparison of two analytical methods to quantify the mercury content in honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 34, n. 1, p. 1–6, 2014.

WORLD Health Organization, (org.). **WHO guidelines on good agricultural and collection practices [GACP] for medicinal plants**. WHO, 2003.

WORLD Health Organization, (org.). **WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues**. WHO, 2007.

WORLD Health Organization. Exposure to cadmium: a major public health concern. **Preventing disease through healthy environments**, p. 3–6, 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/ipcs/features/cadmium.pdf>>.

WORLD Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005. World Health Organisation Geneva, p. 1–74, 2002. Disponível em: <http://www.wpro.who.int/health_technology/book_who_traditional_medicine_strategy_2002_2005.pdf>.

ZEINER, M.; JURANOVIĆ CINDRIĆ, I. Review-trace determination of potentially toxic elements in (medicinal) plant materials. **Analytical Methods**, v. 9, n. 10, p. 1550–1574, 2017.

APENDICE A - Curvas analíticas dos elementos obtidas por ICP-OES

