

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Rafaela Marques Pereira

Determinação de constituintes
inorgânicos em amostras de ervas
e raízes medicinais por espectrometria
de absorção atômica com chama

Belo Horizonte

2010

UFMG-ICEX.DQ. 796^a

D. 462^a

RAFAELA MARQUES PEREIRA*

**DETERMINAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS EM
AMOSTRAS DE ERVAS E RAÍZES MEDICINAIS POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química: Química Analítica.

***Bolsista CAPES**

Belo Horizonte

2010

Pereira, Rafaela Marques

Determinação de constituintes inorgânicos em amostras de ervas e raízes medicinais por espectrometria de absorção atômica com chama./ Rafaela Marques Pereira. 2010.

xii, 82 f. : il.

Orientadora:Letícia Malta Costa.

Co-orientadora:Clésia Cristina Nascentes.

Dissertação(mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais.
Departamento de Química.

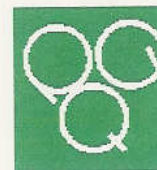
Bibliografia p.83-94

1.Química analítica - Teses 2.Absorção Atômica - Teses 3.ervas medicinais - Teses I. Costa, Letícia Malta, Orientador II. Nascentes, Clésia Cristina, Co-orientadora III. Título.

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3409-5732
FAX: 031 - 3409-5711
E-MAIL: pgquimic@qui.ufmg.br




**"Determinação de Constituintes Inorgânicos em Amostras de Ervas e Raízes
Medicinais por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama"**

Rafaela Marques Pereira

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:


Prof. Leticia Malta Costa - Orientadora
UFMG


Prof. Clésia Cristina Nascentes - Co-Orientadora
UFMG


Prof. Maria José de Sousa Ferreira da Silva
UFMG


Prof. Marcelo Martins de Sena
UFMG

Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2010.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, sobretudo a Deus, por ter me mostrado o caminho e caminhar comigo em mais uma etapa da minha vida.

A minha família: meu pai Elias, minha irmã Raquel, meus sobrinhos Ewelín, Mateus e Pedro Enrique, pelos momentos de alegria.

A minha mãe e melhor amiga Nicéia, por me escutar pacientemente quando estava nervosa ou triste. Por toda amizade e exemplo de ser humano que me deu. Principalmente pelo amor incondicional que temos.

Ao Filipe, meu amor, por ter me animado quando estava cansada, dado amor quando me sentia a pior pessoa do mundo, ignorado quando falava o que não devia ou brigava por coisas banais e principalmente, por ter sido mais que um namorado para mim, se tornando fundamental na minha vida.

A Letícia, minha orientadora neste trabalho de Mestrado, pela paciência e disponibilidade para tirar minhas dúvidas. Por toda atenção, calma e carinho que sempre dedicou a mim e a este trabalho.

A Clésia, pela co-orientação e atenção indispensável neste trabalho. Por ser essa pessoa amável para todos do grupo GEAPA.

Aos coleguinhas do GEAPA, que tornaram esse trabalho mais agradável.

Ao Frank, pelas conversas muito proveitosas que me ajudaram a compreender melhor o meu trabalho e à sua disponibilidade ilimitada ao me socorrer quando estava perdida.

A Patrícia pelo auxílio com o programa STATISTIC e também pela amizade.

Aos técnicos da Infraestrutura Gustavo e Sandra, pela quantificação de Al em minhas infidáveis amostras, sem as quais este trabalho não estaria completo.

A todos os professores do Departamento de Química da UFMG que contribuíram para minha formação.

A CAPES pela bolsa e a FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Mas, como está escrito: As coisas que o olho não viu, e o ouvido não ouviu, e não subiram ao coração do homem, são as que Deus preparou para os que o amam.” 1 Coríntios 2 : 9.

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos procedimentos de pré-tratamento de amostras de ervas e raízes medicinais de elevado consumo nacional para determinação de elementos inorgânicos por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). As ervas investigadas foram: alfavaca, arnica, boldo, camomila, capim-cidreira, chá verde, espinheira-santa, quebra-pedra, além de gengibre. Foram analisadas duas marcas de cada planta (A e B), exceto para gengibre. Procedimentos brandos, rápidos e de baixo custo utilizando água, ácido diluído e solução simulada do suco gástrico foram avaliados e comparados com o procedimento de digestão total das amostras em forno de microondas com cavidade. Em todas as amostras, os elementos determinados foram Al, Cu, Fe, Mn e Zn. Os teores totais dos analitos, obtidos após o procedimento de digestão das amostras em forno de microondas com cavidade foram utilizados referência para avaliar a eficiência dos procedimentos de extração. O preparo das infusões das ervas medicinais na forma de chá foi realizado de forma convencional, aplicando o aquecimento condutivo e empregando um forno de microondas caseiro. A influência do tamanho de partículas na extração dos elementos foi avaliada no preparo da infusão das ervas, assim como a extração por meio de infusões sucessivas. A interação metal-sílica foi estudada realizando um procedimento de extração com HF 4,5 mol L⁻¹. A biodisponibilidade dos elementos no trato digestivo foi avaliada empregando-se uma solução composta por pepsina/ácido clorídrico, simulando o suco gástrico.

A concentração total dos elementos variou consideravelmente nas diferentes ervas e marcas, porém para o Cu, valores similares foram encontrados. Ferro foi o elemento presente em maior concentração em 82% das amostras, no entanto, percentualmente foi o elemento menos extraído na infusão. Exceto para chá verde, a infusão de todas as ervas apresentou maior concentração de Mn, demonstrando a fraca interação desse metal com a matriz orgânica. O estudo estatístico empregando o teste de Pearson mostrou interações nas concentrações totais de Cu e Zn determinados nas amostras. O estudo da análise por componentes principais (PCA) e análise por agrupamento hierárquico (HCA) para os dados da digestão das amostras em

forno de microondas com cavidade e chá preparado em microondas caseiro tornaram possível a formação de grupos contendo plantas com características semelhantes na distribuição dos elementos determinados. A extração dos elementos após a infusão das ervas com tamanho de partículas menor que 63 µm foi maior quando o preparo do chá foi realizado em microondas caseiro, mostrando a maior eficiência do aquecimento com radiação microondas comparado ao aquecimento condutivo. Na infusão sucessiva, a primeira infusão foi a mais significativa na extração de todos os elementos e Mn foi o único elemento a ser quantificado até a última infusão. O procedimento empregando a solução simulada do suco gástrico apresentou teores maiores para todos os elementos em todas as ervas, quando comparado ao preparo na forma de infusão. A extração com HF aumentou os teores percentuais de todos os elementos, comparado à infusão e ao suco gástrico, exceto para Zn em gengibre, com solução simulada do suco gástrico. No procedimento empregando a solução diluída de HF, Fe foi o elemento percentualmente mais extraível, quando comparado à infusão. No geral, a eficiência de extração dos procedimentos empregados foi: HF diluído > suco gástrico simulado > infusão em microondas caseiro > infusão convencional. Os resultados encontrados possibilitam o estabelecimento de um perfil nutricional e toxicológico preliminar das ervas medicinais analisadas.

ABSTRACT

It was evaluated in this work sample pretreatment procedures for tea herbal of high national consumption as basil, arnica, boldo, chamomile, lemon grass, green tea, holy thorn, break stone and ginger. It was investigated two types of each plant (A and B), except for ginger. Mild, fast and cheap procedures using water infusion, dilute acid solution and simulated gastric juice were evaluated and compared with a microwave-assisted acid digestion procedure using closed vessels. Analytes quantification (Al, Cu, Fe, Mn and Zn) were performed by flame atomic absorption spectrometry - FAAS. The total content of analytes obtained after total digestion was used to evaluate the efficiency of the extraction procedures. Tea infusion was prepared in a conventional way and homemade microwave oven. Particle size influence on elements extraction was examined in the infusion, as well as in the successive infusions. Metal-silica interaction was studied using 4.5 mol L^{-1} HF solution and elements bioavailability in the digestive tract through the simulation of gastric juice.

Total contents were different for herbs and types, but similar values were found for Cu in the A and B medicinal herbs. Iron presented the highest concentration in 82% of the samples. However, in percentage, it was the element less extracted in the infusion. Manganese presented the highest concentration in all infusions, except for green tea. This aspect can demonstrate the weak metal interaction with the organic matrix. Statistical analysis by Pearson's test showed the interaction in the total concentrations of Cu and Zn. Principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering analysis (HCA) for the data obtained after microwave-assisted sample digestion procedure and tea infusion in the domestic microwave showed groups according to element composition similarities. The infusion using particle size $<63 \mu\text{m}$ presented high percent values when the procedure was developed in the domestic microwave, because the efficiency of microwave radiation compared to traditional conductive heating. The first successive infusion was the most significant in the elements extraction and Mn was the only element to be measured until the sixth and final infusion. The gastric juice simulation presented values higher than infusion. HF extraction increased the percentage of all elements, compared to

infusion and gastric juice simulation, except for Zn in ginger herb extracted with gastric juice simulation. In the HF extraction procedure, the highest extraction percent values were observed for Fe, indicating the strong interaction of this element with the silica sample. Extraction efficiency of the procedures was: diluted HF > simulated gastric juice > infusion. The study provided information that can be used as nutritional and toxicological profiles of the tea herbs investigated.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1. Representação da molécula de água (polarizada) a um campo eletromagnético. (A) alinhamento das moléculas com o campo. (B) desordem térmica ocasionada pela alteração do campo eletromagnético [58]......	18
FIGURA 2.2. Representação esquemática da migração iônica. Adaptado de [59].	19
FIGURA 2.3. Aquecimento condutivo: corrente de convecção e aquecimento por radiação microondas: absorção direta da energia. Adaptado de [59].	20
FIGURA 2.4. Desenho esquemático de um forno de microondas com frascos fechados fixados no rotor, sob a ação do espalhamento homogêneo de microondas [59]......	23
Figura 3.1. Forno de microondas com cavidade, Milestone, modelo ETHOS 1.	31
Figura 4.1. Curvas para Alumínio em água e em meio a matriz, obtidas por FAAS.	41
Figura 4.2. Curvas para Cobre em água e em meio à matriz, obtidas por FAAS.	41
Figura 4.3. Curvas para Ferro em água e em meio a matriz, obtidas por FAAS.	41
Figura 4.4. Curvas para Manganês em água e em meio a matriz, obtidas por FAAS.	42
Figura 4.5. Curvas para Zinco em água e em meio a matriz, obtidas por FAAS.	42
FIGURAS 4.6. Amostras após digestão total em forno de microondas: a) Análise por Agrupamentos Hierárquicos (HCA); b) Gráfico de loadings PC1 <i>versus</i> PC3; c) gráfico dos escores das PC1 <i>versus</i> PC3 obtido do teor de metais nas ervas; d) Gráfico de loadings PC1 <i>versus</i> PC2 e) gráfico dos escores das PC1 <i>versus</i> PC2.....	48
FIGURA 4.7. Infusão convencional e em microondas caseiro de boldo, chá verde, capim-cidreira e camomila com granulometria maior e menor que 63 µm para determinação dos analitos por FAAS. a) teor de Al; b) teor de Cu; c) teor de Fe; d) teor de Mn; e) teor de Zn.	54
FIGURA 4.8. Infusão convencional e em microondas caseiro de alfavaca, arnica, espinheira-santa e gengibre quebra-pedra com determinação dos analitos por FAAS. a) teor de Cu; b) teor de Fe; c) teor de Mn; d) teor de Zn..	55

FIGURAS 4.9. Infusão em microondas caseiro de ervas com tamanho de partícula < 63 µm: a) Agrupamentos Hierárquicos (HCA); b) Gráfico de loadings; c) gráfico dos escores das PC1 *versus* PC2 obtido do teor de metais nas ervas..... 59

FIGURA 4.10. Concentração dos analitos presente no resíduo da infusão e infusão sucessiva, para tamanhos de partículas > e < 63 µm a) concentração de Al; b) concentração de Cu; c) concentração de Fe; d) concentração de Mn; e) concentração de Zn..... 68

FIGURA 4.11. Concentração total dos analitos, disponíveis na infusão convencional e suco gástrico a) concentração de Al; b) concentração de Cu; c) concentração de Fe; d) concentração de Mn; e) concentração de Zn. 70

FIGURA 4.12. Eficiência de extração (%) para Al, Fe, Cu, Mn e Zn após diferentes procedimentos de preparo das amostras. 76

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1. Parâmetros instrumentais utilizados na determinação de Al, Cu, Fe, Mn e Zn por F AAS.....	29
TABELA 3.2. Nome científico das ervas e raiz empregadas neste trabalho e descrição das partes utilizadas.	30
TABELA 3.3. Programa do forno de microondas para digestão das ervas medicinais.	31
TABELA 4.1. Parâmetros das curvas de calibração em HNO_3 2,0 mol L^{-1} obtidas por FAAS.	39
TABELA 4.2. Parâmetros das curvas de calibração em solução simulada do suco gástrico, obtidas por FAAS.	39
TABELA 4.3. Parâmetros das curvas de calibração em água, obtidas por FAAS.	40
TABELA 4.4. Parâmetros das curvas de calibração em HF 4,5 mol L^{-1} , obtidas por FAAS.....	40
TABELA 4.5. Limites de detecção e quantificação de Al, Cu, Fe, Mn e Zn para diferentes procedimentos de extração (média; n =10).	43
TABELA 4.6. Concentração de Al, Cu, Fe, Mn e Zn no material de referência certificado após digestão em microondas fechado com cavidade – MW cavidade (média \pm desvio padrão; n = 3).	44
TABELA 4.7. Precisão dos procedimentos de infusão (água) e digestão em forno microondas fechado com cavidade (HNO_3 2.0 mol L^{-1}) para a determinação de Al, Cu, Fe, Mn e Zn, (n = 7).	45
TABELA 4.8. Teor de Al, Cu, Fe, Mn e Zn obtido após digestão em forno de MW cavidade e determinação por FAAS (média \pm desvio padrão; n = 3)	46
TABELA 4.9 Teste de Pearson para a relação entre a concentração total dos elementos nas amostras.	52
TABELA 4.11. Porcentagem de metais extraídos através da infusão sucessiva para tamanho de partícula > 63 μm , em procedimento convencional.	63
TABELA 4.12. Porcentagem de metais extraídos através da infusão sucessiva para tamanho de partícula < 63 μm , em procedimento convencional.	64
TABELA 4.13. Porcentagem de metais extraídos através da infusão sucessiva para tamanho de partícula > 63 μm , em microondas caseiro.....	65

TABELA 4.14. Porcentagem de metais extraídos através da infusão sucessiva para tamanho de partícula < 63 µm, em microondas caseiro.....	66
TABELA 4.15 Porcentagem dos elementos obtidos na solução extratora do suco gástrico e no sólido restante, comparado ao teor total	75
TABELA A.1. Concentração dos metais disponíveis na infusão convencional, para tamanho de partícula < 63 µm.....	96
TABELA A.2. Concentração dos metais disponíveis na infusão em microondas caseiro, para tamanho de partícula < 63 µm.	97
TABELA A.3. Concentração dos metais disponíveis na infusão convencional, para tamanho de partícula > 63 µm.....	98
TABELA A.4. Concentração dos metais disponíveis na infusão em microondas caseiro, para tamanho de partícula > 63 µm.	98
TABELA A.5. Concentração dos metais disponíveis nas infusões sucessivas em procedimento convencional para tamanho de partícula > 63 µm.	99
TABELA A.6. Concentração dos metais extraídos nas infusões sucessivas em procedimento convencional para tamanho de partícula < 63 µm.	100
TABELA A.7. Concentração dos metais extraídos nas infusões sucessivas em microondas caseiro para tamanho de partícula > 63 µm.....	101
TABELA A.8. Concentração dos metais extraídos nas infusões sucessivas em microondas caseiro para tamanho de partícula < 63 µm.....	102
TABELA A.9. Biodisponibilidade de Fe, Cu, Zn, Mn, e Al através da simulação do suco gástrico.	103
TABELA A.10 Concentração dos elementos determinados no sólido restante da extração com solução simulada do suco gástrico	104
TABELA A.11. Concentração dos elementos extraídos com HF 4,5 mol L ⁻¹ ..	104

ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de absorção atômica (Atomic absorption spectrometry)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
h	Desvio padrão relativo
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama (Flame atomic absorption spectrometry)
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (Graphite furnace atomic absorption spectrometry)
HCA	Análise por agrupamento hierárquico (Hierarchical cluster analysis)
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Inductively coupled plasma optical emission spectrometry)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MW	Microondas (microwave)
MW cavidade	Forno de microondas com cavidade
NIST	Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia dos Estados Unidos (National Institute Standard Technology)
PCA	Análise por componentes principais (Principal component analysis)
SBAN	Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição
SRM	Material de referência certificado (Standard reference material)
SUS	Sistema Único de Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Plantas medicinais.....	2
1.2 Objetivos.....	5
1.2.1 Objetivo geral.....	5
1.2.2 Objetivos específicos.....	6
2. Revisão bibliográfica	7
2.1 Constituintes inorgânicos em amostras de ervas e raízes medicinais.....	8
2.2 Preparo de amostra.....	10
2.2 Metodologias de extração.....	12
2.2.1 Extração de elementos traços com água: infusão e infusão sucessiva.....	12
2.2.2 Extração de elementos traços com ácido fluorídrico (HF).....	14
2.2.3 Biodisponibilidade de elementos empregando solução simulada de suco gástrico.....	16
2.3 Princípios do aquecimento por radiação microondas.....	17
2.3.1 Preparo de amostra assistido por radiação microondas.....	20
3. Parte Experimental	27
3.1. Reagentes e soluções.....	27
3.2 Equipamentos.....	28
3.3 Preparo das amostras.....	29
3.4 Procedimentos experimentais.....	30
3.4.1 Digestão das amostras em forno de microondas com cavidade.....	30
3.4.2 Infusão das ervas medicinais.....	32
3.4.3 Infusão sucessiva das ervas medicinais.....	33
3.4.4 Extração com solução simulada do suco gástrico para avaliação da biodisponibilidade dos elementos.....	34
3.4.5 Extração com HF 4,5 mol L ⁻¹	35
3.4.6 Parâmetros da curva de calibração - Linearidade.....	35
3.4.7 Avaliação do efeito de matriz nas infusões sucessivas.....	35
3.4.8 Limites de detecção e quantificação.....	36
3.4.9 Estudo da exatidão com material de referência certificado.....	36
3.4.10 Análise da precisão.....	37

4. Resultados e discussão	39
4.1 Parâmetros da curva de calibração - Linearidade	39
4.2 Estudo do efeito de matriz nas infusões sucessivas.....	40
4.3 Limites de detecção e quantificação	42
4.4 Estudo da exatidão com material de referência certificado.....	43
4.5 Análise da precisão.....	44
4.6 Digestão das ervas medicinais em forno de microondas fechado com cavidade	45
4.6.1 Análise por Agrupamentos Hierárquicos (HCA), Análise por Componentes Principais (PCA) e teste de Pearson para o teor dos analitos obtidos após digestão em forno de microondas com cavidade.....	47
4.7 Infusões das ervas medicinais	52
4.7.1 HCA e PCA para o teor dos analitos obtido após infusão das ervas medicinais em microondas caseiro para tamanho de partícula < 63 µm... 58	
4.8 Infusões sucessivas das ervas medicinais	61
4.9 Biodisponibilidade dos elementos após extração empregando solução simulada de suco gástrico.	70
4.10 Extração de Al, Cu, Fe, Mn e Zn com HF 4,5 mol L ⁻¹ em ervas medicinais e comparação dos diferentes procedimentos de extração.....	75
5. Conclusão	81
6. Referências Bibliográficas	84
Anexos	95

Capítulo 1.

Introdução

1. Introdução

1.1 Plantas medicinais

O chá é uma das bebidas mais populares e antigas do mundo [1]. Primeiramente, foi preparado a partir das folhas da planta e utilizado pelos chineses como medicamento e mais tarde, como bebida [2]. Seu consumo tem se expandido ao longo dos últimos 5.000 anos, ocupando cerca de 2,7 milhões de hectares de terras cultiváveis no mundo. Apresenta mais de 3.000 variedades de espécies disponíveis, muita das quais com características únicas, como alto teor de cafeína [3].

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), grande parte da população utiliza as plantas como medicamento. Cerca de 70 a 80% da população mundial faz uso de fitoterápicos para doenças mais brandas [4].

Atualmente, o ministério da saúde e a OMS incentivam o consumo de fitoterápicos, evidenciando a importância dessa fonte como alternativa aos medicamentos alopáticos. Nota-se que, gradualmente, a população nacional vem ampliando seu acesso aos medicamentos fitoterápicos através do SUS (Sistema Único de Saúde) [5].

A utilização das ervas medicinais no Brasil incentiva a valorização da cultura popular além de movimentar em milhões a economia brasileira, que se justifica pela diversidade do solo brasileiro, que proporciona a maior variedade mundial medicinal-aromática. No entanto, ainda faltam dados técnicos (especificações de matéria prima nativa e exportada) que garantam a qualidade de muitos produtos dificilmente rastreados [5].

A ANVISA por meio da Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº.277, de 22 de setembro de 2005 através do regulamento para café, cevada, chá, erva mate e produtos solúveis, propôs: “chá é o produto de uma parte de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não, constante de Regulamento Técnico para o Preparo de chás. O produto pode ser adicionado de aroma e/ou especiaria para conferir aroma e/ou sabor. Excluem-se deste regulamento os produtos

obtidos de espécies vegetais com finalidade medicamentosa e ou terapêutica” [6].

O uso da palavra chá é originalmente utilizado para a infusão da *camellia sinensis* (chá verde). A classificação é feita de acordo com o grau de fermentação a que a planta é submetida antes de estar disponível para o consumo. O maior consumo é da forma fermentada ou chá preto. No entanto, a forma não fermentada ou chá verde e a forma semifermentada ou chá oolong são muito populares em alguns países como China e Japão, onde as folhas verdes também são usadas como hortaliças. A forma descafeinada é obtida pela mistura do chá preto ou verde com um solvente orgânico, que dissolve a cafeína, tornando possível sua remoção [7]. No entanto, popularmente e também nesse trabalho, considerara-se a infusão de todas as espécies terapêuticas como chá.

A composição química das plantas medicinais é extremamente complexa, no geral possuem de 85 a 90% de água e a matéria seca é constituída aproximadamente de 44,5% de carbono, 42,5% de oxigênio, 6,5 % de hidrogênio, 2,5% de nitrogênio, 1,9 % de potássio, 1,0% de cálcio, 0,3 % de enxofre, 0,2% de fósforo e 0,2% de magnésio [8]. É constituída ainda por aminoácidos, proteínas, vitaminas, enzimas e microelementos como o B, Cl, Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Mo, Na, Si e Zn, que são essenciais para o desenvolvimento das plantas e atuam em diversas atividades metabólicas do homem. Alguns compostos encontrados principalmente na forma de alcalóides, tanino, compostos fenólicos, terpenóides, saponinas, glicosídeos e polissacarídeos estão associados aos efeitos terapêuticos das plantas medicinais [9].

A proporção de constituintes orgânicos e inorgânicos encontrados nas ervas e ingeridos pelo homem na forma de cápsulas e/ou chá é responsável pela sua aplicação medicinal e varia com o tipo de planta, a forma de beneficiamento, a parte da planta utilizada e com as características do plantio, como teor de matéria orgânica e pH do solo [10].

Neste trabalho, foram investigadas oito ervas medicinais e o gengibre. A seguir serão apresentadas algumas características populares associadas a estas amostras.

A arnica (*Solidago microglossa*) é conhecida pela sua eficácia no combate a infecções na pele, hematomas e dores musculares [11]. Seus constituintes bioativos compreendem uma mistura complexa de ácidos fenólicos e flavonóides, que possuem atividade antiinflamatória e desempenham um papel importante como antioxidantes e antibacterianos [12].

O chá verde (*Camellia sinensis*) é formado por vários compostos químicos, sendo os principais pertencentes ao grupo dos polifenóis (catequinas e flavonóides), alcalóides (cafeína, teobromina, teofilina), óleos voláteis, polissacarídeos, aminoácidos, lipídeos e vitaminas (principalmente vitamina C). Os polifenóis são responsáveis pela atividade antioxidante do chá verde, que é recomendado para o fortalecimento de dentes e ossos, estimulação do sistema imunológico, além da atividade anticancerígena, como inibidor do crescimento tumoral. No Brasil, ficou difundido devido à associação com propriedades emagrecedoras [13].

A camomila (*Matricaria recutita*, L) é formada por vários compostos biologicamente ativos como cumarinas e lactonas sesquiterpênicas, além de flavonóides. Embora tenha sido utilizada para fins medicinais, é cada vez maior o seu uso diário como calmante brando. Também apresenta moderada atividade antimicrobiana e antioxidante. Recentes pesquisas mostram seu potencial como antiinflamatório [14-15].

Estudos sobre os constituintes químicos do boldo (*Peumus boldo Molina*) revelam que essa erva é constituída de taninos, óleos essenciais, flavonóides como quercetina e também alcalóides, entre outros, reconhecidos como componentes ativos da erva. O boldo é indicado contra doenças hepáticas, dor de cabeça, congestão nasal, flatulências e principalmente para tratamento do aparelho digestivo, sendo utilizado em medicamentos homeopáticos [16].

A Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) é uma erva medicinal muito utilizada como analgésico, antiinflamatório, principalmente contra doenças do aparelho digestivo, como úlceras. Atua sobre as fermentações anormais do intestino, normalizando as funções gastrointestinais. A presença de metabólitos fenólicos, taninos, flavonóides e triterpenos poderiam justificar o uso da erva como medicamento devido às atividades biológicas desses grupos [17].

Alfavaca (*Occimum basilicum L*) é constituída principalmente por flavonóides e óleos essenciais como compostos bioativos. É utilizada para diversas perturbações no organismo como dor de cabeça, tosse, diarreia, náuseas, disfunções renais, além de ser utilizada amplamente na indústria alimentícia como agente flavorizante [18-19].

Quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*) é conhecida por tratar diversas enfermidades, principalmente hepatite. Também tem atividade antitumoral, anticarcinogênica e antiviral, tendo como principais moléculas bioativas os flavonóides, glicosilados e taninos [20].

O gengibre (*Zingiber officinalis*) é amplamente utilizado como tempero, além de ser consumido com intuito medicinal, contra reumatismo, constipação, doenças do sistema nervoso, gengivite, asma e dor de dente, dentre outros. Entre os muitos componentes presentes no gengibre temos os monoterpenóides, sesquiterpenóides e gingerol, que são uma série homóloga de fenóis [21-22].

Outra erva analisada e de uso comum pela população é o capim-cidreira ou capim limão (*Cymbopogon citratus Stapf*), que se destaca pelo consumo contra perturbações digestivas, evitando a ocorrência de espasmos nessa região, hipertensão, ação carminativa (auxilia a eliminação de gases do corpo), ação tranquilizante, antiinflamatório e antioxidante, além de ser utilizado em essências e aromatizantes. Os taninos, flavonóides, compostos glicosilados e ácidos fenólicos são seus principais constituintes, responsáveis por suas características fitoterápicas [23].

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo geral a determinação de Al, Cu, Fe, Mn e Zn por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) em ervas e raízes medicinais após diferentes procedimentos de pré-tratamento das amostras.

1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o teor total dos analitos após digestão em forno de microondas com cavidade;
- Comparar os procedimentos de pré-tratamento das amostras na eficiência de extração dos analitos;
- Avaliar os procedimentos de extração empregando água, HF diluído 4,5 mol L⁻¹ e solução simulada do suco gástrico para a extração dos analitos;
- Estudar a influência do tamanho de partículas das amostras de chás para a extração dos elementos na infusão;
- Estudar a extração dos elementos na infusão sucessiva nas amostras de chá verde e arnica;
- Estabelecer a similaridade das amostras em relação aos elementos presentes, aplicando tratamentos estatísticos como teste de Pearson, Análise por Agrupamentos Hierárquicos (HCA) e Análise por Componentes Principais (PCA).

Capítulo 2.

Revisão Bibliográfica

2. Revisão bibliográfica

2.1 Constituintes inorgânicos em amostras de ervas e raízes medicinais

Além dos compostos bioativos, os constituintes inorgânicos presentes nas ervas medicinais também auxiliam no bom funcionamento do organismo. No entanto, esses teores devem ser analisados para eliminar o risco de contaminação por quantidades tóxicas de algum elemento.

Lésniewicz *et al.* determinaram a biodisponibilidade e os teores totais de macro e micro-nutrientes em ervas medicinais polonesas [24]. Os autores apresentaram as faixas de ingestão diária recomendada e tolerável para uma série de elementos investigados, baseados em recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) para homens e mulheres adultos. Para Al, o valor máximo tolerável é de 70.000 µg/dia; a concentração recomendada de Cu é de 900 - 1.000 µg/dia com tolerância de até 10.000 µg/dia; para Fe 8.000 - 18.000 µg/dia com tolerância de até 45.000 µg/dia; para Mn 1.800 - 2.300 µg/dia com tolerância de até 11.000 µg/dia e para Zn 8.000 -11.000 µg/dia com tolerância de até 40.000 µg/dia.

O Fe está presente de 3 a 5 g em um indivíduo adulto, sendo 2000 mg na hemoglobina e 8 mg na composição enzimática. A absorção desse mineral depende do teor ingerido diariamente, da fonte alimentar e de outros minerais ingeridos concomitantemente. Embora esteja presente em quantidades pequenas no organismo, este elemento é indispensável para diversas atividades metabólicas, como o transporte de oxigênio. A deficiência de Fe no organismo provoca várias perturbações, sendo a mais comum anemia [25]. Teores elevados de ferro estão associados principalmente a distúrbios genéticos, porém podem ser fruto de uma administração excessiva por transfusões, automedicação ou até mesmo diagnósticos equivocados de anemia. Em excesso, o Fe produz espécies reativas de oxigênio levando ao estresse oxidativo, sendo acumulado principalmente no fígado, baço e coração, causando perda de funções, conhecida como hemocromatose [26-28].

Aproximadamente 45% do Cu consumido na dieta são absorvidos pelo homem. Após sua absorção, ele é conduzido para o fígado e posteriormente

para os tecidos extra-hepáticos, sendo um microelemento fundamental para a manutenção do organismo. Participa da mobilização do Fe para a síntese da hemoglobina e sua deficiência pode causar vários distúrbios como anemia, leucopenia (redução do número de leucócitos no sangue), neutropenia (redução do número de neutrófilos), hiporuricemia (falta de ácido úrico) e retardo no crescimento. Porém, teores elevados podem ser prejudiciais causando diarreia, náuseas, vômito, cirrose, anemia e bronquite [29].

O Zn é o segundo microelemento mais abundante no corpo (cerca 3 g em um adulto), presente nos tecidos, órgãos e fluidos corporais. O Zn não é armazenado em nosso organismo, por isso é importante a ingestão diária desse elemento, essencial para o desenvolvimento humano [30]. Ele possui algumas funções semelhantes às do cobre, como a participação na constituição de enzimas e funções imunológicas específicas, como as relacionadas ao crescimento, desenvolvimento e reprodução [31]. Em média, 10 a 40% do Zn ingerido na alimentação é absorvido e sua deficiência pode provocar falta de apetite, retardo no crescimento, lesões cutâneas, entre outros. Em contrapartida, em concentrações elevadas, a toxicidade de Zn provoca náusea, vômitos, cefaléia e deficiência de cobre [29]. A presença de outros elementos como Fe, Ca e Cd influencia a absorção de Zn pelo organismo. Indivíduos submetidos a dietas ricas em Fe tendem a apresentar deficiência de Zn, principalmente quando são submetidos a tratamentos prolongados de anemia [32]. Porém, fica claro que a deficiência de Zn também ocorre quando outros elementos são ingeridos em quantidades superiores à encontrada em uma dieta normal [33].

O Mn é um elemento essencial para o bom desenvolvimento do organismo, sendo necessário para o metabolismo de proteínas e gorduras. Atua na regulação de açúcar no sangue, na diminuição de radicais livres e na utilização de vitaminas B1 e E, além de ser cofator para uma variedade de enzimas cerebrais [34]. Apesar da sua essencialidade, o Mn é um neurotóxico quando presente em teores elevados. Sua toxicidade causa alterações de humor, agitação, depressão, dificuldade de processar informações e também sintomas parkinsonianos, como tremores e rigidez corporal entre outros [35].

O Al, ao contrário dos demais elementos analisados, não é considerado essencial para o organismo [36], por isso sua análise foi realizada com intuito

de determinar a presença ou não da toxicidade desse elemento ao consumir as ervas medicinais. Concentrações elevadas desse elemento afetam diversos processos bioquímicos e estudos mostram a ligação desse elemento com doenças degenerativas e doença de Alzheimer [37]. A presença de Al na dieta é normalmente baixa comparada aos teores oriundos de medicamentos como analgésicos e antiácidos [38]. Algumas plantas, como o chá verde tem uma grande tolerância ao Al, sendo uma fonte de exposição do homem ao metal [37]. A facilidade de absorção de Al pela espécie *Camellia sinensis* também foi observada no presente trabalho pelos elevados teores deste metal encontrados no chá verde.

A última década assistiu a um aumento significativo no uso da fitoterapia, devido à minimização dos efeitos colaterais produzido pelos remédios alopáticos. Esse aumento contribui para a ingestão de minerais essenciais e tóxicos. Porém, o estudo detalhado sobre a toxicologia das plantas consumidas não cresceu na mesma proporção [39]. Conseqüentemente torna-se relevante o estudo sobre a caracterização química e toxicológica de plantas medicinais, que são consumidas em sua maioria na forma de chás, com intuito de criar um perfil do alimento ingerido pela população, visando o uso seguro e racional de plantas medicinais.

2.2 Preparo de amostra

A confiabilidade de qualquer resultado analítico depende dos procedimentos empregados na análise. O pré-tratamento da amostra deve ser realizado com atenção, uma vez que os elementos de interesse não devem sofrer qualquer alteração no seu teor, oriundos de contaminação ou perdas analíticas.

Em geral, um procedimento de análise química pode ser dividido em distintas etapas descritas abaixo:

- definição do problema: é a primeira etapa do planejamento, onde se estabelece a informação desejada da análise;
- escolha do método: após a definição do problema, o método pode ser escolhido visando sempre à eficiência, simplicidade, menor custo e rapidez;

- amostragem: retirar uma parte representativa do todo que se deseja analisar;
- preparo da amostra: esta etapa pode envolver diversos procedimentos que incluem tratamentos físicos e químicos como moagem, secagem, diluições, pré-concentração, extração, dentre outras. Busca-se sempre conciliar o preparo da amostra com o objetivo do trabalho e a técnica de análise;
- calibração: obtenção de resultados através da comparação com padrões preparados;
- medição: obtenção de dados através de medidas na amostra com a técnica apropriada;
- avaliação dos resultados: interpretar os resultados obtidos e certificar-se da veracidade desses resultados realizando a avaliação da exatidão, preferencialmente com material de referência certificado;
- ação: utilizar os resultados obtidos para agir em relação ao problema inicial.

Após a amostragem representativa, o preparo da amostra é a etapa que pode gerar maior porcentagem de erro nos resultados encontrados [40].

O preparo depende do estado que a amostra é recebida e baseia-se nas necessidades de homogeneização, dissolução da amostra sólida em uma solução passível de quantificação para a maioria das técnicas, separação de interferentes e pré-concentração de analitos [41].

A dissolução da amostra sólida corresponde à decomposição da matriz orgânica, tornando o analito de interesse disponível em uma solução homogênea e com o mínimo de interferentes. A decomposição pode ser total ou parcial envolvendo processos de digestão ou extração dos analitos antes da medida de suas concentrações. Essa etapa pode consumir até 61% do tempo total gasto no procedimento analítico, sendo responsável por até 30% do erro total da análise [42].

Vários procedimentos são utilizados com esse objetivo, no entanto o preparo almejado por todo químico analítico visa conciliar eficiência com pequena quantidade de reagentes utilizados, simplicidade do método, baixo tempo de análise, confiabilidade dos resultados pela minimização de perdas e contaminação e utilização de procedimentos seguros para o analista e o meio ambiente.

Exceto para os chás de algumas ervas que já são comercializados, as ervas medicinais encontram-se *in natura*, secas ou tostadas. Em geral, é necessário procedimentos de secagem, moagem e extração antes da etapa de quantificação dos analitos.

Alguns trabalhos relatam a quantificação de elementos em plantas medicinais sem o pré-tratamento da amostra, utilizando diferentes técnicas, entre elas, ativação neutrônica [43], espectrometria de fluorescência de raios-X [44] e espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) [45].

Essas técnicas apresentam algumas limitações como: agregar maior custo de equipamento e manutenção, ser mais influenciada por interferentes em baixas concentrações, dificuldade na inserção da amostra de forma homogênea e representativa [44], além de serem menos comuns em laboratórios de rotina quando comparadas à espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS).

Dessa forma, o preparo de amostras, com diferentes procedimentos de extração, associado à análise por FAAS é utilizado em diversas metodologias que visam à análise de constituintes inorgânicos em amostras de plantas medicinais.

2.2 Metodologias de extração

2.2.1 Extração de elementos traços com água: infusão e infusão sucessiva.

Visando maior proximidade da forma pela qual as ervas medicinais são consumidas pela população, a extração com água na forma de infusão é amplamente utilizada para caracterizar a disponibilidade de elementos no chá [1].

Fung et al. [46] determinaram Al em chá verde (*Camellia sinensis*). Nesse trabalho os autores submeteram a planta seca a dois procedimentos de infusão para quantificação do sobrenadante por espectrometria de absorção atômica (AAS). No primeiro procedimento, as amostras (1% m/v) foram submetidas a infusões periódicas com água a 100°C durante 5 minutos. As infusões foram repetidas cinco vezes no mesmo resíduo. O segundo procedimento constou da infusão contínua da planta (1% m/v) com água a 100°C por diferentes tempos: 5, 30, 60, 120 e 360 minutos. O experimento mostrou que o Al é mais extraído nas infusões sucessivas do que na infusão contínua da planta. Em geral, na infusão sucessiva a maior concentração de Al foi detectada na primeira infusão. Na segunda infusão o teor diminuiu mais bruscamente e mantém um declínio progressivo nas demais.

Basgel e Erdemoglu [47] determinaram quatorze elementos em ervas consumidas para fins medicinais na Turquia. Dentre os elementos quantificados, foram determinados os teores de Al, Cu, Fe, Mn e Zn por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Os autores analisaram três marcas diferentes de camomila (*Matricaria chamomile L.*). No procedimento de infusão, 25 ml de água a 95°C foram adicionados em 0,500 g da erva e a extração foi conduzida por 30 minutos. Os analitos. Os resultados mostraram que embora a camomila seja rica principalmente em Fe, a porcentagem extraída pelo procedimento de infusão foi a menor (1,61%), depois do Al (0,63%). Esses resultados estão em conformidade com os teores obtidos neste trabalho.

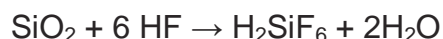
Malik et al. [14] determinaram micro e macroelementos em infusões de trinta e uma amostras de plantas estimulantes (café e chá), incluindo flores de camomila (*Matricaria recutita L*) e quatro marcas de folhas de chá verde (*Camellia sinensis*). Os elementos Al, Cu, Fe, Mn e Zn foram quantificados por ICP OES. As infusões foram preparadas adicionando-se água fervente em bquer contendo 1 g da amostra. Decorrido o tempo da extração, a infusão foi filtrada e os elementos quantificados. Entre os elementos citados, Al, Fe e Mn apresentaram teores elevados nas amostras de chá verde e camomila, após o procedimento de calcinação. Porém, o Fe foi o elemento menos extraível pelo procedimento de infusão, sendo os teores mais elevados determinados para Al, Mn e Zn.

Kalny et al. determinaram Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn em plantas medicinais amplamente consumidas na Polônia. A infusão das ervas foi realizada com 3,0 a 5,0 g das ervas em contato com 150,0 ml de água deionizada fervente. A extração foi conduzida por 20 minutos. Os elementos foram determinados no sobrenadante e no sólido remanescente da infusão por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS). Zinco e Ni foram os elementos mais extraídos na infusão. Cromo, Cd e Pb apresentaram teores abaixo do limite de quantificação do método. Os autores destacaram que o procedimento de infusão simulando a forma de preparo caseiro não disponibiliza elementos essenciais em concentrações significativas para o organismo, como o Fe [48].

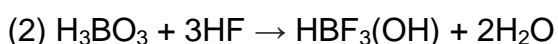
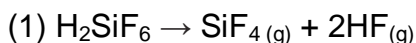
2.2.2 Extração de elementos traços com ácido fluorídrico (HF)

A utilização do ácido fluorídrico (HF) na etapa de extração de analitos é um recurso utilizado principalmente quando as amostras analisadas possuem alto teor de silicatos como minérios, solos, rochas e mesmo em amostras botânicas.

O ácido fluorídrico é um ácido fraco, não oxidante. No entanto, consegue disponibilizar o analito de interesse para o meio reacional devido à sua natureza complexante [49]:



Após a dissolução, muitos métodos de determinação requerem a remoção de HF para evitar danos ao equipamento ou para ressolubilizar fluoretos. Esta remoção pode ocorrer pelo aquecimento do ácido fluorossilícico (1) ou com a adição do ácido bórico (2,3). O aquecimento do ácido fluorossilícico pode causar perdas de elementos mais voláteis como As, B, Se, Sb, Ge, Cr, Re, Os e Ru. Dessa forma, a adição do ácido bórico torna a análise segura quando esses elementos estão em estudo [49].



A quantificação de elementos em equipamentos que contenham peças de vidro borossilicato ou quartzo torna necessário o procedimento descrito anteriormente, para que essas peças não sejam atacadas pelo HF [50].

Frequentemente, o HF é utilizado em combinação com outros ácidos, como HNO_3 ou HClO_4 . Essa mistura ácida é empregada para garantir a quantificação total dos metais, após a remoção de compostos de silício da solução de estudo.

Melo et al. [51] determinaram os teores de K e Mg na fração areia de solos do triângulo mineiro. A concentração total dos elementos foi determinada após procedimento de digestão com uma mistura ácida composta de HF, H_2SO_4 e HNO_3 concentrados, sob aquecimento. Os autores citam a importância da utilização do ácido fluorídrico na decomposição total de silicatos.

Hoening e Kersabiec [45], em estudo de preparo de amostra para a determinação elementar por espectrometria de absorção atômica fizeram referência a utilização de misturas ácidas contendo ácido fluorídrico para a solubilização completa de elementos em amostras de tecido vegetal. Os autores atribuem a importância da adição do HF ao fato da matriz inorgânica de plantas geralmente conter compostos silicatados. No entanto, para análises de rotina, procedimentos de digestão utilizando a mistura composta por ácido nítrico e peróxido de hidrogênio produzem resultados satisfatórios.

Estudos de mineralização de plantas citam várias formas de preparo de amostra para determinações espectrométricas [52]. Segundo os autores, os procedimentos de digestão utilizam rotineiramente a mistura composta por HNO_3 e H_2O_2 . Porém, procedimentos empregando HF até a secura antes do ataque com outros ácidos são essenciais para a determinação de amostras silicatadas, como plantas. O silício presente nas plantas geralmente encontra-se formando complexos com outros elementos. A análise de resíduos sólidos da decomposição de material vegetal apresenta principalmente Al, Fe, e B, sendo, portanto, fundamental a utilização do HF para a determinação desses elementos ligados a silicatos.

2.2.3 Biodisponibilidade de elementos empregando solução simulada de suco gástrico

O estudo das plantas medicinais vai além da descrição de seus constituintes orgânicos e inorgânicos. Atualmente, busca-se relacionar os micro e macroelementos presentes na planta com sua biodisponibilidade para o homem. Dessa forma é possível ter o consumo seguro e manipular fármacos fitoterápicos com teores exatos dos nutrientes desejados.

Segundo a Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição (SBAN), biodisponibilidade é “o grau de aproveitamento de nutrientes específicos contidos nos alimentos, tomando como referência o conteúdo total (100%) do princípio nutritivo considerado” [53].

Lésniewicz et al. [24] estudaram medicamentos poloneses fitoterápicos para a determinação de elementos traços e sua biodisponibilidade por ICP OES. Alumínio, Cu, Fe, Mn e Zn foram determinados após procedimento de digestão total em forno de microondas com cavidade empregando HNO₃ concentrado e H₂O₂ 30% (v/v). A análise de biodisponibilidade foi realizada com adição de 15 ml da solução simulada do suco gástrico, composta por 1,6g de pepsina, 0,3g de NaCl e 3,5 ml de HCl 37%, avolumado para 500 ml a 0,3 g do medicamento. A porcentagem de extração variou com o elemento e a amostra analisada. Os extratores HCl (0,1M) e solução do suco gástrico foram mais eficientes do que a água, para todos os analitos e amostras. Manganês e Zn apresentaram maior eficiência de extração, em torno de 50%. Alumínio apresentou baixos teores, enquanto que Fe apresentou variação de 3 a 25% e Cu de 10 a 18 %.

Flaten [37] realizou uma extensa revisão sobre o Al em chá verde (*Camellia sinensis*). A biodisponibilidade desse elemento foi avaliada em procedimento de extração por infusão com água e empregando soluções simuladas do suco gástrico e intestinal. A planta foi escolhida por sua elevada capacidade de acumular Al. Para a digestão gástrica, infusões foram misturadas com o suco gástrico simulado (pepsina a 1% em 0,15 M de NaCl acidificado a pH igual a 1,8 com HCl). O pH da mistura foi ajustado para 2,2 com HCl antes da incubação, conduzida a 37 °C por 1 h. O estudo mostrou que a concentração de Al varia de 1 a 6 mg/L na erva analisada. No entanto, a

biodisponibilidade do Al presente no chá não difere muito de outras fontes alimentares presentes na dieta humana.

Elless et al. [54] estudaram a possibilidade de plantas comestíveis reforçadas com minerais serem utilizadas como suplemento alimentar. A dose diária recomendada de 250 mg para a planta e um comprimido para as vitaminas foram utilizadas com solução extratora do suco gástrico (1 g de pepsina dissolvido em 50,0 ml de HCl 0,1 mol/L). Inicialmente as amostras foram homogeneizadas com 15 ml de água e o pH ajustado para 2 com HCl 5,0 mol/L. Posteriormente, 0,75 ml da solução extratora foi adicionada mantendo a incubação a 37°C sob agitação, com variação no tempo de extração. Ferro, Mn e Zn foram determinados por ICP OES. Os resultados mostraram que as plantas enriquecidas podem ser utilizadas como fonte de suplemento nutricional. As ervas enriquecidas apresentaram biodisponibilidade dos elementos em torno de 50%, superior aos medicamentos analisados. Os autores citam a importância do suco estomacal para a digestão dos elementos e da solubilidade desses analitos no suco intestinal para que ocorra sua absorção.

As referências citadas mostram a importância do estudo da biodisponibilidade de nutrientes essenciais para o homem e disponíveis em ervas medicinais, as quais podem ser fontes seguras desses elementos após o mapeamento de seus constituintes.

2.3 Princípios do aquecimento por radiação microondas

A radiação microondas é definida como a faixa do espectro magnético com comprimento de onda entre 0,1 e 100 cm, com correspondente frequência de 300 MHz a 300 GHz. De acordo com o regulamento da Comissão Federal de Comunicação e das Leis Internacionais de Rádio, apenas quatro frequências são permitidas para áreas industriais e científicas: 915 ± 25 ; 2450 ± 13 ; 5800 ± 75 e 22125 ± 125 MHz. Dessas, 2450 ± 13 MHz é a mais utilizada em fornos de microondas caseiro e comercial [55-56].

A energia microondas é uma radiação eletromagnética não ionizante e sua absorção depende fundamentalmente do fator de dissipação da amostra, $\tan \delta$, definido pela razão entre o fator de perda (ϵ'') e a constante dielétrica (ϵ').

$$\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$$

- **$\tan \delta$** = habilidade do material em absorver a energia microondas, convertendo a energia eletromagnética em calor;
- **ϵ''** = eficiência da molécula na conversão da energia microondas em calor;
- **ϵ'** = habilidade da amostra em se opor ao caminho das microondas.

A absorção da energia microondas provoca movimento das espécies em solução pela migração de íons e rotação de dipolo, causadas pela alteração do campo magnético sem interferir na estrutura molecular. A ocorrência desses dois processos é responsável pelo aquecimento da solução. Dessa forma fica claro que, para que haja aquecimento, é necessário a presença de moléculas polares ou íons em solução [55].

As moléculas que possuem momento de dipolo induzido ou permanente, quando submetidas ao campo eletromagnético tendem a se alinhar com o campo elétrico gerado (FIGURA 2.1), e quando esse é removido ocorre a relaxação dielétrica, ou seja, as moléculas tendem a retornar ao seu estado não alinhado, dissipando a energia absorvida na forma de calor [57]. Esse fenômeno chamado rotação de dipolo depende do tempo de relaxação da amostra, que por sua vez depende da temperatura e viscosidade do meio.

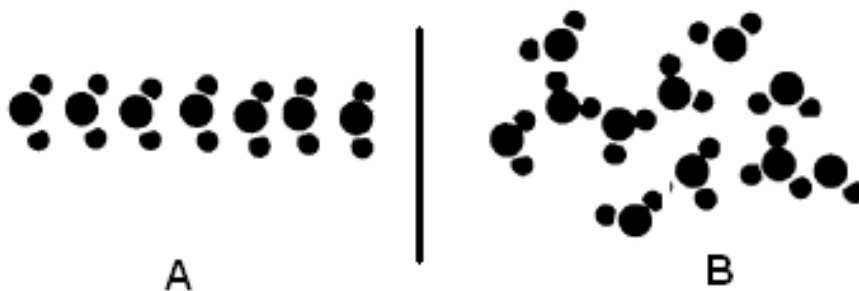


FIGURA 2.1. Representação da molécula de água (polarizada) a um campo eletromagnético. (A) alinhamento das moléculas com o campo. (B) desordem térmica ocasionada pela alteração do campo eletromagnético [58].

A migração iônica consiste no movimento dos íons dissolvidos na solução após sua interação com o campo magnético oscilante da radiação eletromagnética. Os íons se deslocam produzindo um fluxo de corrente (FIGURA 2.2), cujo movimento sofre resistência de outras espécies que possuem fluxo oposto. Essa resistência resulta em perda do tipo I^2R (produção de calor), provocando o aumento da temperatura do meio nas vizinhanças de cada íon que migra. O movimento dos íons aumenta à medida que a temperatura também aumenta, provocando um efeito do tipo “avalanche” [59].

Todos os íons contribuem para o processo de aquecimento que depende da sua concentração e mobilidade no meio. A mobilidade depende do tamanho, carga e condutividade do íon, e também da temperatura [59].

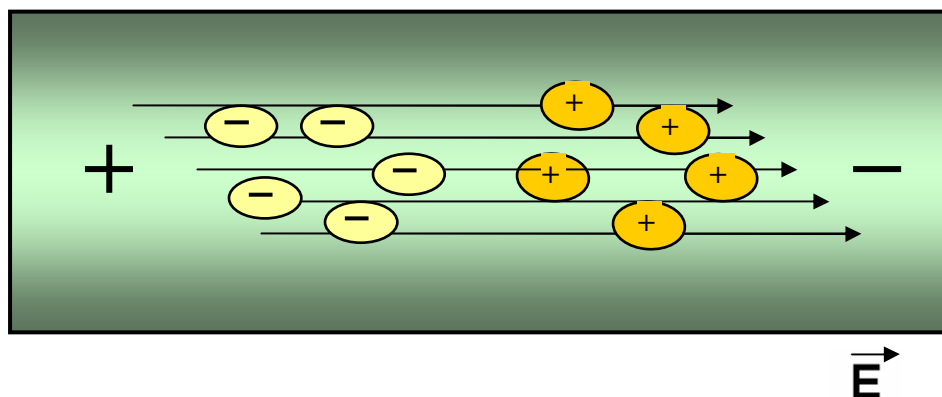


FIGURA 2.2. Representação esquemática da migração iônica. Adaptado de [59].

Uma importante característica do aquecimento por radiação microondas é a absorção direta da energia pelo material a ser aquecido, sendo necessário à utilização de recipientes transparentes às microondas. O contrário ocorre no aquecimento convencional (chama, chapa aquecedora e fornos convencionais), onde a energia é transferida para a solução através de correntes de convecção, condução e radiação de calor da superfície do material. [60]

A FIGURA 2.3 ilustra o parágrafo anterior.

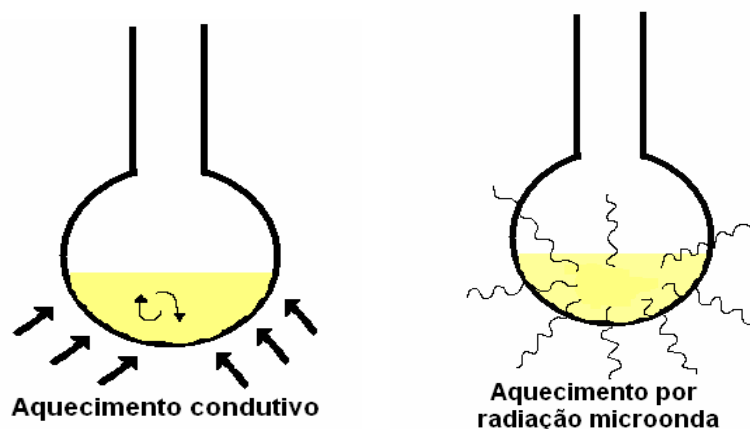


FIGURA 2.3. Aquecimento condutivo: corrente de convecção e aquecimento por radiação microondas: absorção direta da energia. Adaptado de [59].

Como principais características do aquecimento por radiação microondas, têm-se [56]:

- aquecimento diretamente no núcleo do substrato;
- aplicação homogênea de calor na amostra;
- aquecimento na ausência de contato, havendo transferência de energia com rapidez;
- auto nível de segurança e automação;
- aplicação em diversos tipos de amostras com diferentes objetivos (secagem, digestão total e parcial, dentre outras), dependendo dos reagentes utilizados, potência, temperatura e tipo de forno microondas.

2.3.1 Preparo de amostra assistido por radiação microondas

A busca de novos procedimentos analíticos no preparo de amostra tem sido um dos grandes propulsores da pesquisa na área de Química Analítica nos últimos anos. Dentro desse contexto, ocorreu a popularização do uso da radiação microondas para fins de pré-tratamento da amostra [61].

O desenvolvimento da tecnologia microondas ocorreu principalmente durante a II Guerra Mundial. Os fornos de microondas começaram a ser utilizados para aquecimento de alimentos na década de 50, e nos anos 80 esse tipo de energia passou a ser empregado em laboratórios de química para várias finalidades, como secagem de amostras, sínteses, extração de compostos orgânicos e mineralização de amostras [57].

Em 1975, Abu-Samra et al. relataram a utilização de fornos de microondas caseiros no tratamento de amostras biológicas antes da análise elementar. Desde então, muitos métodos de dissolução foram desenvolvidos e aplicados em diversas matrizes [61]. Em 1983, Matthes et al. descreveram uma rápida dissolução de amostras minerais utilizando o forno de microondas caseiro. A radiação microondas foi usada para aquecer a amostra e a mistura ácida contida em garrafas de policarbonato. Quando o experimento foi repetido apresentou grande potencial, porém os frascos empregados eram inadequados para as condições rigorosas empregadas, tornando o mesmo de baixa segurança para o analista [61]. Tentativas como essa, motivaram o aperfeiçoamento dos frascos utilizados, os quais devem primar pela segurança e eficiência do procedimento, tendo como principais características:

- transparente a radiação microondas;
- quimicamente inerte;
- resistente ao ataque ácido;
- capaz de suportar altas temperaturas e pressões;
- de tamanho razoável para suprir a demanda analítica;
- ser facilmente aberto e fechado para uso em laboratório, sem perder a segurança operacional.

Os fornos de microondas, como um todo, foram aperfeiçoados para o uso em laboratório, dispondo atualmente de sensores para a medida e controle de temperatura e pressão. Eles apresentam algumas características

específicas como capacidade operacional, porém procedimentos com reagentes usuais (principalmente: HNO_3 , HCl e H_2O_2 ; e em alguns casos H_2SO_4 , H_3PO_4 e HF) podem ser implementados de forma eficaz em quaisquer desses equipamentos [62].

Dentre as principais vantagens da utilização do forno microondas no tratamento de amostras em relação aos procedimentos convencionais destaca-se a redução do volume de reagentes e resíduos gerados, diminuição no tempo gasto na etapa de preparo e minimização de contaminação e perdas de analito [63]. Essas características possibilitam melhorar a exatidão e precisão dos resultados obtidos.

Atualmente, existem dois tipos de fornos de microondas comerciais destinados ao uso em laboratório: forno de microondas com cavidade (alta pressão) e forno de microondas com radiação focalizada (pressão atmosférica), sendo o primeiro de uso mais frequente, apesar de ambos apresentarem vantagens dependendo do objetivo da análise [64].

O preparo de amostra com radiação focalizada se caracteriza pela digestão praticamente a pressão ambiente em frascos semiabertos, com a radiação focalizada no recipiente reacional através de um guia de ondas. Ele utiliza sistema de purga dos gases gerados pela digestão, comumente empregando ácidos concentrados [62]. Dentre as vantagens da utilização desses fornos temos a múltipla adição de reagentes, aplicação de diferentes procedimentos simultâneos e a possibilidade de trabalhar com massas elevadas (>1 g). A utilização de matrizes com alto teor de matéria orgânica no sistema com cavidade (fechado) poderia causar uma elevação abrupta de pressão proveniente de reações em cadeia durante a digestão da amostra. Como principal desvantagem desse tipo de forno, aponta-se o grande volume de ácidos concentrados empregados na maioria dos métodos [62,65].

Fornos de microondas com cavidade (alta pressão) são constituídos, fundamentalmente de magnetron, guia para microondas, distribuidor de ondas, cavidade, frasco de reação e rotor com frascos reacionais constituídos de politetrafluoretileno (PTFE), PTFE quimicamente modificado (TFM) ou perfluoroalcoxi (PFA), como ilustrado na FIGURA 2.4.

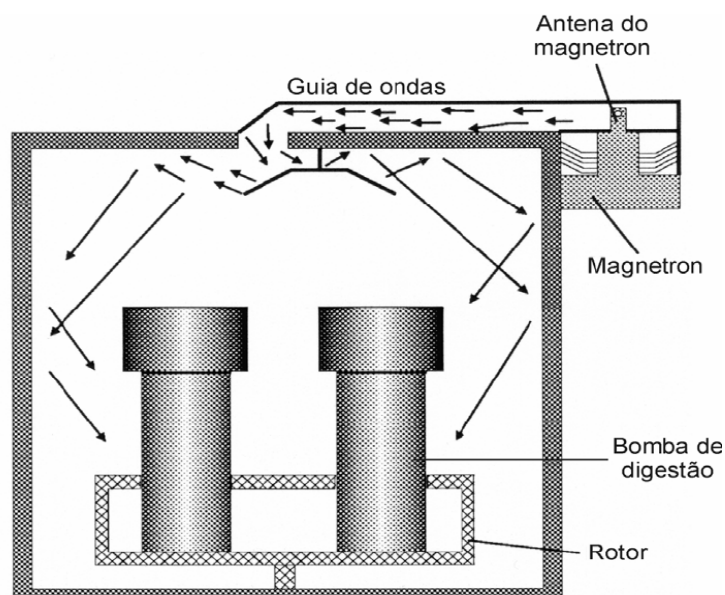


FIGURA 2.4. Desenho esquemático de um forno de microondas com frascos fechados fixados no rotor, sob a ação do espalhamento homogêneo de microondas [59].

A radiação oriunda do magnetron é conduzida à cavidade através do guia de microondas. Essa é dispersa em direções específicas com o auxílio do distribuidor, gerando uma melhor radiação na zona próxima ao centro da cavidade. Graças ao rotor (bandeja rotatória), a radiação é distribuída de forma homogênea sobre os frascos reacionais [66].

O uso de recipientes fechados durante o procedimento de digestão gera um aumento no ponto de ebulição dos ácidos, decorrente da elevação da pressão no frasco reacional. Essa característica torna as dissoluções mais vigorosas e eficientes, além de promover a redução do tempo gasto nessa etapa. A redução de reagentes utilizados e a minimização da possibilidade de contaminação também são pontos positivos na utilização do sistema pressurizado, assim como a confiabilidade dos voláteis quantificados nas amostras empregando esse tipo de sistema [61,66].

Soylak et al. desenvolveram um procedimento de digestão em forno de microondas fechado com cavidade para a determinação de zinco, cobre e níquel em amostras de chá por FAAS. O modelo fatorial 2^3 foi utilizado para avaliar as condições experimentais, envolvendo a composição da mistura de ácidos (CMA), a potência de microondas (MP) e o tempo de radiação (RT),

com RT e MP relativos à última etapa de programação do forno de microondas, que foi de 15 minutos. O procedimento empregando 0,2 g de amostra com 6 ml de HNO₃, 2 ml de H₂O₂, 550 W de potência em 8 minutos de radiação apresentou o melhor resultado, sendo recomendado para a análise de Cu, Zn e Ni em amostras de chá. Após estudo de precisão e exatidão, o método foi considerado adequado e aplicado em várias amostras de ervas da Turquia. [67].

Costa et al. [68] avaliaram a influência da utilização de fornos de microondas com frascos fechados (alta pressão) e abertos (radiação focalizada) na quantificação de As, Cd, Pb, Se, e Zn em amostras de invertebrados marinhos (ostras, mexilhões e moluscos). As determinações foram realizadas por ICP OES após procedimento de digestão das amostras em ambos os fornos de microondas. A quantificação dos analitos utilizando o sistema de radiação focalizada apresentou teores que variaram de 64 a 83, 32 a 53, 12 a 44, e 65 a 96% respectivamente para As, Cd, Pb e Se, evidenciando perdas por volatilização de alguns elementos em matrizes complexas, como invertebrados marinhos. Os teores de As, Cd, e Zn obtidos após digestão conduzida em forno de microondas com cavidade mostraram concordância com os valores certificados a 95 % de confiança, aplicando-se teste t-Student. Chumbo e Se ficaram abaixo do limite de detecção.

Araújo et al [69], avaliaram a eficiência da decomposição de plantas em forno de microondas com cavidade para determinação de Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, S e Zn por ICP OES. Nesse estudo foram fixados a massa de 2,5 mg da amostra, o volume em 1,0 ml de H₂O₂ 30% (v/v) e o volume em 2 ml de HNO₃ com variação na concentração em 2,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 14,0 mol L⁻¹. A eficiência da digestão foi determinada pelos teores do carbono residual em cada análise. Os valores obtidos foram de 6,9% com HNO₃ concentrado e variações de 10,3 a 11,3% com a utilização das demais concentrações do ácido. As concentrações dos analitos não diferenciaram significativamente dentre as amostras decompostas com diferentes concentrações ácidas, mostrando que o teor de carbono residual não influenciou a quantificação. Dois materiais de referência, folhas de espinafre NIST 1570 e farelo de milho NIST 8433 foram utilizados para avaliar a exatidão do método.

As referências citadas mostram como a utilização de fornos de microondas tem se difundido em laboratório de análise, em etapas de pré-tratamento das amostras. Os resultados obtidos em procedimentos com forno de microondas já são utilizados como padrão para outros procedimentos de análise [24].

Capítulo 3.

Parte Experimental

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico:

- Pepsina de mucosa gástrica de suínos, Sigma - Aldrich[®], P7000, Alemanha;
- Peróxido de hidrogênio H₂O₂ 30% m/v, d=1,11 g ml⁻¹, MM = 34,01 g mol⁻¹, Merck, Darmstadt, Alemanha;
- Ácido nítrico HNO₃ 65% m/m, d= 1,40 g ml⁻¹, MM = 63,01 g mol⁻¹, Merck, Darmstadt, Alemanha;
- Ácido clorídrico HCl 37% m/m, d= 1,19 g ml⁻¹, MM = 36,45 g mol⁻¹, Merck, Darmstadt, Alemanha;
- Ácido fluorídrico HF 40% m/v, d= 1,13 g ml⁻¹, MM = 20,0 g mol⁻¹ Merck, Darmstadt, Alemanha;
- Cloreto de potássio KCl, MM = 74,55 g mol⁻¹, Synth, Diadema, São Paulo, Brasil;
- Cloreto de sódio, NaCl, MM = 58,44 g mol⁻¹, Synth, Diadema, São Paulo, Brasil.

Todas as soluções foram preparadas com água purificada pelo sistema Milli-Q[®] e acondicionadas em frascos de polietileno. Curvas analíticas de Al, Cu, Fe, Mn e Zn foram preparadas a partir de soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Germany) obedecendo a faixa linear de cada elemento: Al (0-100 mg L⁻¹), Cu (0-1,6 mg L⁻¹), Fe (0-3,0 mg L⁻¹), Mn (0-0,6 mg L⁻¹) e Zn (0-0,75 mg L⁻¹). Para a quantificação de cada elemento, as curvas analíticas foram construídas no meio extrator avaliado, ou seja: água, HF 4,5 mol L⁻¹, HNO₃ 2,0 mol L⁻¹ e solução simuladora do suco gástrico (1,6 g de pepsina; 0,3

g de NaCl e 3,5 ml de HCl 37%, avolumado para 500 ml). Para a determinação de Al adicionou-se as soluções KCl 1% m/v antes da quantificação por FAAS.

3.2 Equipamentos

- Purificador de água Milli-Q[®], Millipore, modelo Direct-Q 3, Water Purification System, Ma, EUA;
- Moinho criogênico Spex Sample Prep 6770, MA,EUA;
- Estufa TECNAL, modelo TE 394/1, estufa com circulação e renovação de ar, São Paulo, Brasil;
- Espectrômetro de Absorção Atômica Perkin-Elmer, modelo AAnalyst 200, equipado com sistema de correção de fundo por lâmpada de deutério, Norwalk, CT, EUA;
- Espectrômetro de Absorção Atômica VARIAN, modelo AA240FS, equipamento com sistema de correção de fundo por lâmpada de deutério; Mulgrave, Austrália;
- Forno de microondas fechado com cavidade, Milestone, modelo ETHOS 1 – Advanced Microwave Digestion System, Itália;
- Lâmpadas de cátodo oco para Cu, Fe, Mn, Zn, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, EUA;
- Lâmpadas de cátodo oco para Al, HITTACHI, Japão;
- pHmetro Marte, MB – 10; São Paulo, Brasil;
- Incubadora de bancada digital Shaker sem refrigeração com precisão de 0,2 °C, CIENTEC, modelo CT-712, digital, São Paulo, Brasil;

- Chapa aquecedora com agitador magnético, TECNAL, modelo TE-0851, São Paulo, Brasil;
- Balança Analítica, SHIMADZU, modelo AX 200; São Paulo, Brasil;
- Forno de microondas caseiro, Panasinic; São Paulo, Brasil;
- Centrífuga FANEM[®], Excelsal II, modelo BL 206, São Paulo, Brasil;
- Frascos de centrífuga de Polipropileno (15 e 50,0 ml), marca Corning.

Os parâmetros instrumentais utilizados para a determinação dos elementos Al, Cu, Fe, Mn e Zn por F AAS são apresentados na TABELA 3.1. Todas as medidas seguiram as recomendações do fabricante, sendo ajustada a altura da fenda e o fluxo das amostras.

TABELA 3.1. Parâmetros instrumentais utilizados na determinação de Al, Cu, Fe, Mn e Zn por F AAS.

Parâmetros	Al	Cu	Fe	Mn	Zn
Comprimento de onda (nm)	309,30	324,75	248,33	279,48	213,86
Fenda (nm)	0,5	2,7/0,8	1,8/1,35	1,8/0,6	2,7/1,8
Óxido nitroso (L min ⁻¹)	11,0	-	-	-	-
Ar (L min ⁻¹)	-	10,0	10,0	10,0	10,0
Acetileno (L min ⁻¹)	7,55	2,5	2,5	2,5	2,5

3.3 Preparo das amostras

As amostras utilizadas neste trabalho foram adquiridas no Mercado Central da cidade de Belo Horizonte, Minas Gerais. As ervas e a raiz foram escolhidas em função do grande consumo pela população local. Todas as ervas foram adquiridas em embalagens fechadas e discriminadas em relação às partes da planta. As amostras de chá verde, camomila, capim cidreira e boldo foram adquiridas em sache, porém em todos os procedimentos os

saches foram abertos para a utilização do sólido. O gengibre, única raiz analisada foi adquirida *in natura*

Estudaram-se nove plantas diferentes e duas marcas de cada planta (A e B), com exceção de gengibre. As ervas medicinais estudadas são descritas na TABELA 3.2. As amostras foram previamente secas em estufa a 60°C até massa constante. Após a secagem, as ervas foram submetidas ao processo de moagem em moinho criogênico, para garantir o tamanho de partícula inferior a 63 µm. A moagem foi realizada sem prévia separação das partes das ervas, com intuito de preservar a forma que a planta é consumida pela população.

Os procedimentos de digestão em microondas com cavidade, extração com HF e o estudo de biodisponibilidade dos analitos foram realizados apenas com plantas cujas partículas foram inferiores a 63 µm, sendo o estudo granulométrico (> e < 63 µm) aplicado na infusão e infusão sucessiva das ervas medicinais.

TABELA 3.2. Nome científico das ervas e raiz empregadas neste trabalho e descrição das partes utilizadas.

Ervas	Nome científico	Parte da planta analisada
Alfavaca	<i>Occimum basilicum</i>	Folhas e talos
Arnica	<i>Solidago microglossa</i>	Folhas, talos e flor
Boldo	<i>Pneumus boldo Molina</i>	Folhas
Camomila	<i>Matricaria recutita, L</i>	Capítulos florais
Capim-cidreira	<i>Cymbopogon citratus Stapf</i>	Folhas
Chá verde	<i>Camellia sinensis</i>	Folhas e talos
Espinheira-santa	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Folhas e talos
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>	Raiz
Quebra-pedra	<i>Phyllanthus niruri</i>	Folhas e talos

3.4 Procedimentos experimentais

3.4.1 Digestão das amostras em forno de microondas com cavidade.

O procedimento de digestão das amostras em forno de microondas com cavidade (Figura 3.1), iniciou-se com a tentativa da utilização de HNO₃ diluído

50% v/v e também de misturas de HNO₃ diluído com HCl concentrado na proporção 6:1. No entanto, os resultados obtidos não foram satisfatório para todas as amostras. Arnica, quebra-pedra e capim-cidreira apresentaram maior dificuldade de digestão, dentre as demais ervas.

A digestão total das amostras foi alcançada com a adição de 7,0 ml de HNO₃ concentrado em cerca de 200 mg da amostra (tamanho de partícula <63 µm) pesada em frasco de polipropileno. A mistura foi mantida em repouso durante 30 minutos, com adição de 1,0 ml de H₂O₂ 30% m/v antes do sistema ser fechado e levado ao forno de microondas nas condições descritas na TABELA 3.3.

TABELA 3.3. Programa do forno de microondas para digestão das ervas medicinais.

Etapas	Ptência (W)	t rampa (min)	T (°C)	t patamar (min)
1	750	10	200	-
2	750	-	200	20
Ventilação	0	0	30	-



Figura 3.1. Forno de microondas com cavidade, Milestone, modelo ETHOS 1.

Ao final do procedimento de digestão as amostras permaneceram em repouso por mais 40 minutos até total resfriamento. Após esse período, os frascos foram abertos e as soluções transferidas para frascos de polipropileno com o volume ajustado para 50,0 ml.

Os elementos Al, Cu, Fe, Mn e Zn foram quantificados por espectrometria de absorção atômica com chama FAAS e os dados obtidos foram estudados empregando-se a Análise por Componentes Principais (PCA), Análise por Agrupamento hierárquico (HCA) e teste de Pearson, utilizando o software STATISTICA, versão 6.0.

3.4.2 Infusão das ervas medicinais

A infusão das ervas medicinais foi realizada para avaliar a concentração de elementos essenciais e tóxicos presentes nos chás e disponível para o consumo humano. A forma de preparo do chá pela população é um fator importante que foi considerado. A infusão preparada com adição de água em ebulição sobre a erva foi denominada como convencional e o preparo do chá em microondas caseiro foi denominado como microondas caseiro. As amostras foram submetidas ao procedimento de moagem antes da infusão para garantir o tamanho de partícula inferior a 63 µm.

O preparo da infusão convencional foi realizado pesando-se cerca de 0,500 g da erva em frasco de polipropileno com posterior adição de 50,0 ml de água Mili-Q[®] em ebulição nos frascos. Essa mistura foi homogeneizada e mantida em repouso durante 2 minutos antes da centrifugação a 3500 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi retirado para quantificação dos elementos por FAAS.

No preparo da infusão em microondas caseiro pesou-se 0,500 g das ervas em béquer com posterior adição de 50,0 ml de água Mili-Q[®]. A mistura homogeneizada foi levada ao microondas caseiro durante 2 minutos e transferida para frascos de polipropileno para centrifugação a 3500 rpm durante 20 minutos. O sobrenadante foi retirado para quantificação dos elementos por FAAS. Frascos contendo apenas água foram submetidos aos procedimentos descritos para serem utilizados como branco analítico. Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

Os sólidos restantes das infusões de arnica, chá verde e gengibre em microondas caseiro foram secos e digeridos de acordo com o procedimento descrito em 3.4.1, para a quantificação dos elementos. As ervas foram

escolhidas por apresentarem características diferentes entre elas, como a facilidade de extração dos analitos com água.

A influência do tamanho de partícula da amostra na disponibilidade dos analitos é outro fator importante que também foi analisado. Amostras de boldo, camomila, chá verde e capim-cidreira foram escolhidas por tornarem o estudo granulométrico representativo, uma vez que este engloba ervas de fácil digestão como chá verde e também amostras de difícil digestão como capim cidreira. O preparo do chá foi realizado de forma convencional e em microondas caseiro, da maneira descrita anteriormente, porém utilizando as ervas na forma adquirida para consumo (saches) com tamanho granular > 63 μm .

Os dados obtidos da infusão das plantas medicinais em microondas caseiro para tamanho de partículas < 63 μm foram avaliados por PCA e HCA. O estudo estatístico foi aplicado a essas amostras por apresentarem maior teor dos elementos determinados.

3.4.3 Infusão sucessiva das ervas medicinais

Com intuito de avaliar a capacidade de extração sucessiva dos elementos, foram realizadas infusões sucessivas em água nas amostras de arnica (A e B) e chá verde (A e B) para diferentes tamanhos de partículas (> e < do que 63 μm). As infusões sucessivas foram realizadas de forma convencional e em microondas caseiro.

Para a infusão convencional cerca de 2,00 g das ervas foram pesadas em frascos de polipropileno com adição de 50,0 ml de água quente (em ebulição). A extração foi conduzida durante cinco minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante retirado. Repetiu-se o procedimento com o sólido restante da infusão por mais cinco vezes.

A infusão utilizando microondas caseiro ocorreu com o aquecimento durante cinco minutos (não contínuo) da mistura composta por cerca de 2,00 g das ervas com 50,0 ml de água. As amostras foram centrifugadas a 3500 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante foi retirado para quantificação dos

analitos. Repetiu-se o procedimento com o sólido restante da infusão por mais cinco vezes.

A determinação dos elementos em sucessivas infusões tornou necessária a utilização de uma massa de amostra superior à empregada anteriormente para o estudo de extração dos elementos com água (infusão). Esse acréscimo na massa ocorreu em função do objetivo da análise, o qual era a determinação dos analitos até a sexta e última etapa da infusão sucessiva, além de mostrar que nem todo o analito facilmente disponível nas amostras é retirado na infusão realizada em etapa única. O aumento da massa influenciou no acréscimo do tempo de extração de 2 para 5 minutos, uma vez que o volume de água utilizado na extração permaneceu igual.

O sólido restante após as extrações sucessivas em água foi levado à estufa a 60°C até massa constante. Após seca, a amostra foi submetida ao procedimento de digestão total em forno de microondas com cavidade, utilizando o procedimento de digestão descrito anteriormente em **3.4.1**.

Os elementos Al, Cu, Fe, Mn e Zn foram quantificados por FAAS no sobrenadante e no resíduo, que foi posteriormente submetido à digestão.

3.4.4 Extração com solução simulada do suco gástrico para avaliação da biodisponibilidade dos elementos.

A biodisponibilidade dos elementos foi determinada utilizando-se como extrator uma solução simulada do suco gástrico (1,6 g de pepsina, 0,3 g de NaCl e 3,5 ml de HCl 37% m/m, avolumado para 500 ml).

Foram adicionados 30,0 ml da solução extratora sobre 0,500 g da amostra contida em erlenmeyer. A mistura erva e suco gástrico foi fechada e incubada a 37 °C com agitação a 200 rpm por 1 hora. Após esse período, as soluções foram transferidas para frascos de polipropileno e centrifugadas a 3500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi separado para quantificação de Al, Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS.

Para as amostras de arnica, quebra-pedra capim-cidreira e gengibre, os elementos foram quantificados no sólido restante da extração com suco gástrico. A concentração resultante do somatório obtido no procedimento de extração e no sólido foi comparada com o teor total obtido após digestão em

forno de microondas com cavidade. A digestão do sólido restante ocorreu de forma similar à apresentada em 3.4.1 após sua secagem em estufa a 60°C.

3.4.5 Extração com HF 4,5 mol L⁻¹

As amostras de arnica (A e B), capim-cidreira (A e B), gengibre e quebra-pedra (A e B) foram submetidas ao procedimento de extração com HF 4,5 mol L⁻¹ (20% v/v) para avaliar principalmente a forma como o elemento Fe está ligado a matriz silicatada. As ervas foram escolhidas por apresentarem características distintas entre si, tornando o estudo mais representativo: arnica, capim-cidreira, e quebra-pedra concentração de Fe total elevada e baixa concentração disponível na infusão. Já o gengibre apresentou a maior porcentagem de extração de Fe na infusão dentre todas as ervas medicinais estudadas.

Pesou-se 0,500 g das ervas em frasco de polipropileno que permaneceu em contato com 50,0 ml de HF 4,5 mol L⁻¹. Essa solução foi mantida em banho-maria a 60°C durante 30 minutos. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm durante 20 minutos e o sobrenadante foi retirado para a quantificação de Al, Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS.

O procedimento de extração aplicado utilizou massa de amostra similar ao procedimento de extração com água, porém apesar do extrator utilizado ser mais forte, as condições experimentais foram mais brandas. Dessa forma, torna-se relevante o acréscimo no tempo de extração com HF diluído.

3.4.6 Parâmetros da curva de calibração - Linearidade

O coeficiente de correlação linear (R) foi empregado para checar a linearidade das curvas de calibração externa nos diferentes meios extratores, para garantir a faixa de concentração na qual a reta pode ser utilizada como modelo matemático, produzindo resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração dos analitos.

3.4.7 Avaliação do efeito de matriz nas infusões sucessivas

As figuras de mérito foram determinadas seguindo as recomendações do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – INMETRO [70], exceto os limites de detecção e quantificação.

As infusões sucessivas apresentaram soluções turvas no final das extrações, principalmente na primeira extração. Para avaliar a ocorrência do efeito de matriz foram preparadas duas curvas para calibração externa, em triplicata. A primeira curva foi construída com o analito de interesse adicionado ao branco (água). A segunda curva de calibração externa foi realizada adicionando o analito a uma mistura contendo 5 ml de branco da amostra com 5 ml do sobrenadante da primeira etapa da extração sucessiva. A concentração média das triplicatas foi plotada em gráficos para analisar a ocorrência do efeito de matriz, comparando a inclinação das retas em água e água + matriz.

3.4.8 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados seguindo as recomendações da IUPAC (International Union of Applied and Applied chemistry) [71]. Os limites foram determinados pela análise de 10 brancos independentes nos diferentes meios extratores (água, HNO_3 2,0 mol L⁻¹, HF 4,5 mol L⁻¹ e solução simulada do suco gástrico).

3.4.9 Estudo da exatidão com material de referência certificado

A determinação de analitos após a digestão das amostras em forno de microondas com cavidade é um método estabelecido na literatura e foi escolhido como referência neste trabalho.

Para verificar a exatidão do método empregado, analisaram-se os teores de Al, Cu, Fe, Mn e Zn no material de referência certificado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, NIST SRM 1547, folhas de pêssego.

Pesou-se 200 mg do material certificado diretamente nos frascos reacionais do microondas e adicionaram-se 7,0 ml de HNO_3 concentrado. A mistura foi mantida em repouso durante 30 minutos. Após esse período, 1,0 ml de H_2O_2 30% m/v foi adicionado e a digestão foi conduzida em forno de microondas com cavidade, empregando o mesmo programa utilizado na

digestão das ervas medicinais, TABELA 3.3. As amostras foram transferidas para frascos de polipropileno e os analitos foram quantificados por FAAS.

3.4.10 Análise da precisão

A precisão do método de digestão em forno de microondas com cavidade e extração com água (infusão) foi determinada avaliando-se a repetitividade, sendo este o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas do mesmo mensurado, efetuadas sob as mesmas condições de medição pelo mesmo operador em um curto espaço de tempo [70]. Para isso, os analitos foram quantificados em sete padrões independentes em cada concentração (ponto baixo, médio e alto). Os padrões foram preparados em branco de reagente, sendo água para o procedimento de infusão e HNO_3 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ para o procedimento de digestão em forno de microondas. A precisão foi expressa em porcentagem pelo desvio padrão relativo (DPR) das leituras.

Capítulo 4.

Resultados e discussão

4. Resultados e discussão

4.1 Parâmetros da curva de calibração - Linearidade

Os parâmetros das curvas de calibração analítica para Al, Cu, Fe, Mn e Zn em diferentes meios extratores (água, HNO_3 2,0 mol L^{-1} , HF 4,5 mol L^{-1} e solução simulada do suco gástrico) estão descritas nas TABELAS 4.1 a 4.4. A linearidade das curvas de calibração para todos os extratores e analitos foi checada tanto de forma visual no momento das medidas, como também pelo coeficiente de correlação linear das curvas (R). Em todas as curvas obteve-se o valor médio do coeficiente de correlação linear $R > 0,99$, sendo a maioria com $R > 0,999$. Dessa forma a reta foi considerada um modelo matemático adequado para esse estudo, onde o sinal do equipamento é diretamente proporcional a concentração dos analitos quantificados.

TABELA 4.1. Parâmetros das curvas de calibração em HNO_3 2,0 mol L^{-1} obtidas por FAAS.

Parâmetros	Alumínio	Cobre	Ferro	Manganês	Zinco
Coef. (R)	0,9994	0,9990	0,9996	0,9986	0,9982
Inclinação	0,0059	0,1412	0,0710	0,1013	0,4137
Intercepto	0,0009	0,0003	0,0012	-0,0014	0,0017

TABELA 4.2. Parâmetros das curvas de calibração em solução simulada do suco gástrico, obtidas por FAAS.

Parâmetros	Alumínio	Cobre	Ferro	Manganês	Zinco
Coef. (R)	0,9994	0,9998	0,9999	0,9992	0,9997
Inclinação	0,0070	0,1346	0,0675	0,1230	0,4891
Intercepto	0,0008	0,0031	0,0014	0,0002	0,0078

TABELA 4.3. Parâmetros das curvas de calibração em água, obtidas por FAAS.

Parâmetros	Alumínio	Cobre	Ferro	Manganês	Zinco
Coef. (R)	0,9994	0,9992	0,9991	0,9994	0,9997
Inclinação	0,0065	0,1365	0,0689	0,1081	0,4219
Intercepto	0,0008	0,0046	0,0029	-0,0002	0,0026

TABELA 4.4. Parâmetros das curvas de calibração em HF 4,5 mol L⁻¹, obtidas por FAAS.

Parâmetros	Alumínio	Cobre	Ferro	Manganês	Zinco
Coef. (R)	0,9994	0,9990	0,9996	0,9994	0,9993
Inclinação	0,0059	0,1361	0,0653	0,1287	0,4309
Intercepto	0,0012	0,0008	-0,0005	0,0014	0,0018

4.2 Estudo do efeito de matriz nas infusões sucessivas.

As FIGURAS 4.1 a 4.5 mostram as curvas de calibração para Al, Cu, Fe, Mn e Zn, respectivamente preparadas em água e na mistura água + sobrenadante da primeira extração da infusão sucessiva (matriz). A diferença entre a inclinação das curvas: em água e em meio à matriz não foi significativa para nenhum dos analitos depois de aplicado o teste t-Student a 95 % de confiança, mostrando que a matriz não interfere na determinação dos analitos, ou seja, não ocorreu efeito de matriz. Essa característica é facilmente observada pelas figuras abaixo, onde as curvas estão praticamente se sobrepondo. A similaridade das curvas tornou possível a utilização da curva em meio aquoso, para a quantificação dos analitos presentes na infusão e na infusão sucessiva.

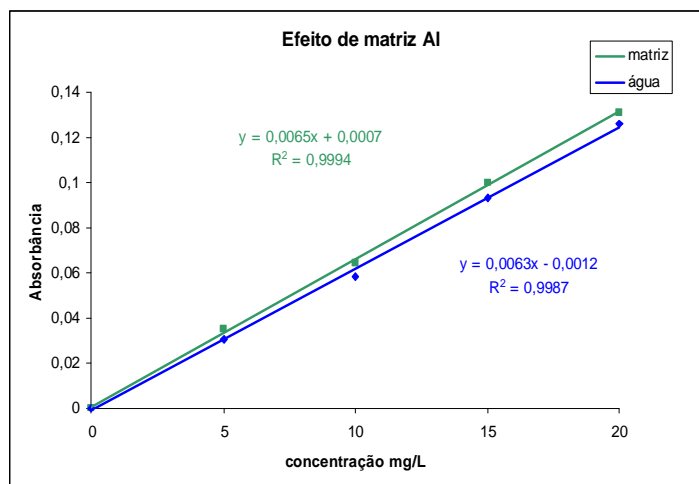


Figura 4.1. Curvas para Alumínio em água e em meio a matriz, obtidas por FAAS.

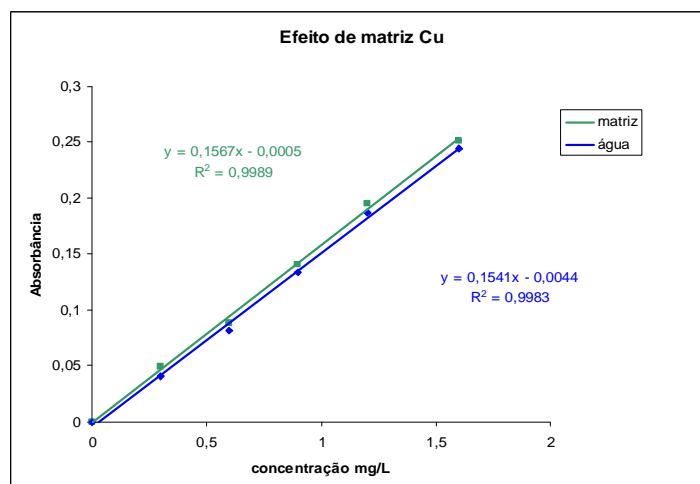


Figura 4.2. Curvas para Cobre em água e em meio à matriz, obtidas por FAAS.

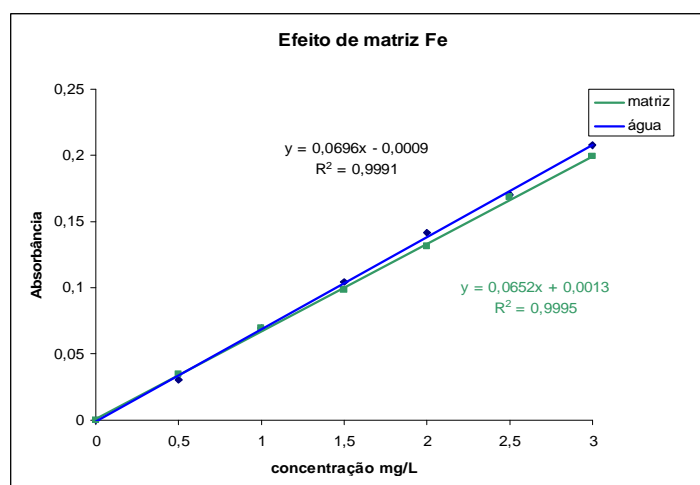


Figura 4.3. Curvas para Ferro em água e em meio a matriz, obtidas por FAAS.

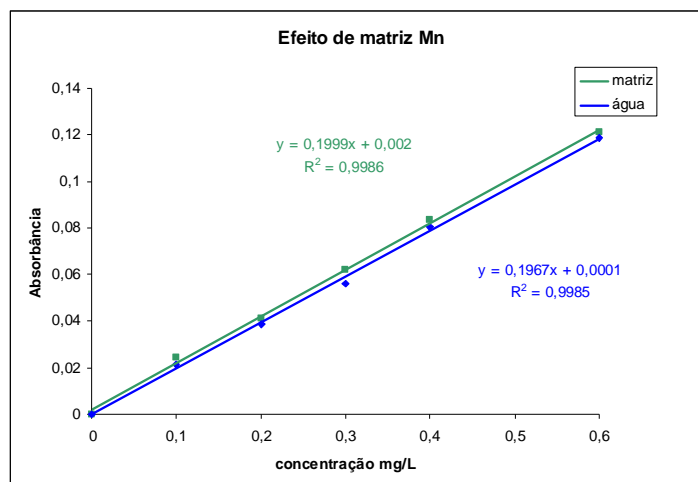


Figura 4.4. Curvas para Manganês em água e em meio a matriz, obtidas por FAAS.

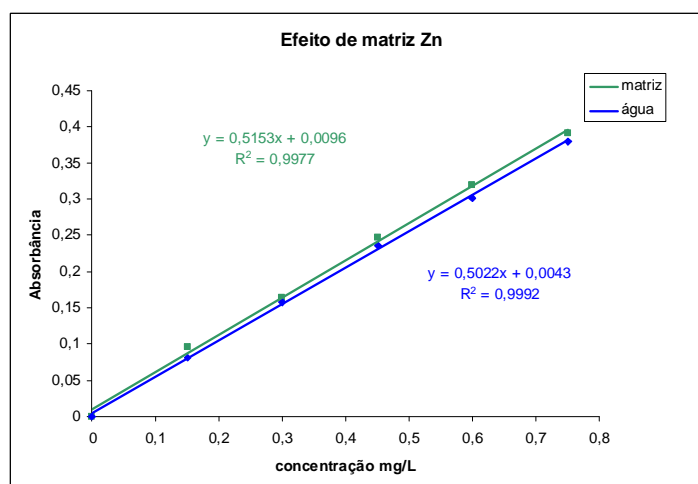


Figura 4.5. Curvas para Zinco em água e em meio a matriz, obtidas por FAAS.

4.3 Limites de detecção e quantificação

A TABELA 4.5 apresenta os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para Al, Cu, Fe, Mn e Zn nos diferentes procedimentos de extração avaliados para a determinação dos analitos em ervas medicinais.

Os cálculos para obtenção do LD e LQ foram realizados segundo a IUPAC, utilizando as equações abaixo:

$$LD = 3x \frac{s}{m} \quad \text{e} \quad LQ = 10x \frac{s}{m}$$

Onde: s = média dos desvios das leituras de 10 brancos independentes
 m = inclinação da curva de calibração.

TABELA 4.5. Limites de detecção e quantificação de Al, Cu, Fe, Mn e Zn para diferentes procedimentos de extração (média; n =10).

	Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ	LD	LQ
MW cavidade	3,02	10,1	0,40	1,33	1,00	3,20	1,20	4,10	0,80	2,66
Infusão convencional	0,80	2,67	0,38	1,27	0,45	1,50	0,52	1,73	0,41	1,37
Infusão microondas	0,92	3,07	0,52	1,73	0,83	2,77	0,41	1,37	0,38	1,27
HF	2,40	8,00	0,15	0,50	0,46	1,53	0,85	2,83	0,10	0,33
Suco gástrico	3,80	12,6	0,36	1,20	0,67	2,23	1,9	6,33	0,61	2,03

Pela TABELA 4.5 nota-se a variação dos limites de detecção e quantificação com o meio utilizado. Limites maiores foram encontrados para os procedimentos de digestão da amostra em microondas com cavidade (HNO_3 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$) e para a extração com solução simulada do suco gástrico. Em compensação, os menores limites foram determinados para o procedimento de infusão (água). Os valores elevados obtidos para o LQ e LD de alguns procedimentos devem-se a composição do meio, o qual contém ácidos, NaCl e pepsina, no caso do suco gástrico. Os reagentes, apesar de apresentarem concentrações baixas dos elementos determinados, podem influenciar na determinação dos limites.

Outro fator importante é que brancos independentes contendo apenas água tendem a apresentar a serem mais reprodutíveis, comparado à brancos construídos com ácidos e/ou outros reagentes.

4.4 Estudo da exatidão com material de referência certificado

O material de referência certificado (folhas de pêssigo, NISTSRM 1547) foi utilizado para avaliar a exatidão do método de quantificação total dos analitos nas ervas medicinais, após digestão em forno de microondas com cavidade. As folhas de pêssigo foram submetidas ao procedimento proposto e os teores encontrados e certificados são apresentados na TABELA 4.6.

TABELA 4.6. Concentração de Al, Cu, Fe, Mn e Zn no material de referência certificado após digestão em microondas fechado com cavidade – MW cavidade (média \pm desvio padrão; n = 3).

	Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Valores certificados	249 \pm 8	3,7 \pm 0,4	218 \pm 14	98 \pm 3	17,9 \pm 0,4
Valores encontrados	241 \pm 3	3,6 \pm 0,1	211 \pm 4	97 \pm 2	17,5 \pm 0,2

A TABELA 4.6 mostra que as concentrações obtidas para Al, Cu, Fe, Mn e Zn estão em concordância com os valores do material de referência certificado a 95 % de confiança, aplicando-se o teste *t* de Student.

Assim, pode-se concluir que o procedimento de digestão em forno de microondas com cavidade apresenta resultados exatos dos analitos determinados a 95 % de confiança, mostrando não haver perdas significativas por volatilização ou contaminação desses elementos.

Os teores totais dos analitos obtidos nas ervas medicinais após digestão em forno microondas com cavidade foram utilizados como referência (100 %), para avaliar a eficiência dos extratores, água, HF e solução simulada do suco gástrico.

4.5 Análise da precisão

A precisão do método de digestão em forno de microondas com cavidade e extração com água (infusão) foi determinada por meio da repetitividade do método. Os resultados são apresentados na TABELA 4.7 e foram expressos pelo desvio padrão relativos (DPR %) da leitura de sete padrões em cada concentração.

TABELA 4.7. Precisão dos procedimentos de infusão (água) e digestão em forno microondas fechado com cavidade (HNO_3 2,0 mol L^{-1}) para a determinação de Al, Cu, Fe, Mn e Zn, (n = 7).

Elemento	Água		HNO_3 2,0 mol L^{-1}	
	mg/L	DPR %	mg/L	DPR %
Al	2,0	1,3	2,0	1,2
	10,0	1,8	10,0	0,8
	18,0	1,2	18,0	1,3
Cu	0,1	5,9	0,1	4,0
	0,5	2,6	0,5	2,7
	1,0	2,5	1,0	1,7
Fe	0,5	5,9	0,5	3,4
	1,5	2,6	1,5	3,2
	2,5	3,2	2,5	3,1
Mn	0,1	4,7	0,1	5,1
	0,3	3,2	0,3	3,4
	0,5	3,8	0,5	4,1
Zn	0,2	3,1	0,2	3,0
	0,4	2,6	0,4	2,5
	0,6	2,2	0,6	2,2

Os resultados apresentados na TABELA 4.7 mostram não haver dispersão nas concentrações dos analitos. Os valores encontrados apresentaram DPR < 5 % para quase todas as concentrações. Exceções foram encontradas para Fe em água na concentração de 0,5 mg L^{-1} e para Mn em HNO_3 2,0 mol L^{-1} e Cu em água, ambos a 0,1 mg L^{-1} . Os pontos que apresentaram desvio maior estão próximos ao LQ do método, portanto, mais susceptível a pequenas variações da análise. Quando a concentração do elemento a ser determinada é menor, pequenas variações tornam-se mais significativas [72].

4.6 Digestão das ervas medicinais em forno de microondas fechado com cavidade

A TABELA 4.8 apresenta os teores obtidos para os elementos Al, Cu, Fe, Mn e Zn após o procedimento de digestão das ervas medicinais em forno de microondas com cavidade (MW cavidade) e determinação por FAAS. Para as determinações de Al, KCl 1% m/v foi adicionado às soluções como supressor de ionização. A adição de K⁺ aumenta a concentração de Al no estado fundamental e, conseqüentemente, a sensibilidade e confiabilidade da medida.

TABELA 4.8. Teor de Al, Cu, Fe, Mn e Zn obtido após digestão em forno de MW cavidade e determinação por FAAS (média ± desvio padrão; n = 3)

Amostras	Al (µg g ⁻¹)	Cu (µg g ⁻¹)	Fe (µg g ⁻¹)	Mn (µg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)
Boldo A	419 ± 13	6,63 ± 0,29	625 ± 11	82,8 ± 4,1	16,3 ± 1,8
Boldo B	< LD	7,76 ± 0,46	173 ± 5	58,2 ± 2,1	9,62 ± 1,10
Chá verde A	1077 ± 26	14,3 ± 0,99	102 ± 1	495 ± 6	37,3 ± 0,4
Chá verde B	1112 ± 17,46	13,7 ± 0,8	177 ± 6	105 ± 2,6	37,7 ± 0,6
Capim-cidreira A	193 ± 7	4,45 ± 0,30	410 ± 9	96,1 ± 2,9	20,7 ± 0,8
Capim-cidreira B	161 ± 4	5,69 ± 0,34	391 ± 19	118 ± 12	22,5 ± 1,7
Camomila A	< LD	10,9 ± 0,7	201 ± 4,5	104 ± 2	55,2 ± 2,5
Camomila B	151 ± 1	16,0 ± 0,3	180 ± 3	68,6 ± 1,9	51,3 ± 0,4
Quebra-pedra A	1777 ± 14	6,36 ± 0,02	1641 ± 44	106 ± 1	17,5 ± 0,06
Quebra-pedra B	640,1 ± 4,8	5,85 ± 0,33	935 ± 20	175 ± 4	32,7 ± 0,6
Alfavaca A	803 ± 19	16,9 ± 1,5	632 ± 16	93,0 ± 2,2	24,9 ± 0,6
Alfavaca B	793 ± 6	14,9 ± 0,3	635 ± 13	52,2 ± 3,8	16,9 ± 1,3
Arnica A	259 ± 2	11,8 ± 1,9	1370 ± 24	963 ± 18	35,1 ± 0,8
Arnica B	208 ± 13	11,7 ± 1,1	2058 ± 72	767 ± 31	33,7 ± 1,8
Espinheira-santa A	< LD	4,15 ± 0,27	284 ± 4,5	599 ± 10	11,5 ± 0,1
Espinheira-santa B	< LD	4,07 ± 0,24	236 ± 5	615 ± 20	10,8 ± 0,03
Gengibre	< LD	7,64 ± 0,74	65,4 ± 1,1	67,3 ± 1,4	8,99 ± 0,15

Pela Tabela 4.8 nota-se que o teor total dos elementos nas ervas medicinais segue a tendência de distribuição a seguir: Fe > Al e Mn > Zn > Cu. Kara [73] observou a mesma tendência após quantificação dos analitos em várias ervas medicinais, incluindo camomila, chá verde e capim-cidreira. Essa distribuição das ervas não é uma regra, visto que os teores de Mn foram superiores aos teores de Fe no chá verde A, espinheira-santa e gengibre; assim como Al apresentou maior concentração que Fe em chá verde, alfavaca e quebra-pedra A.

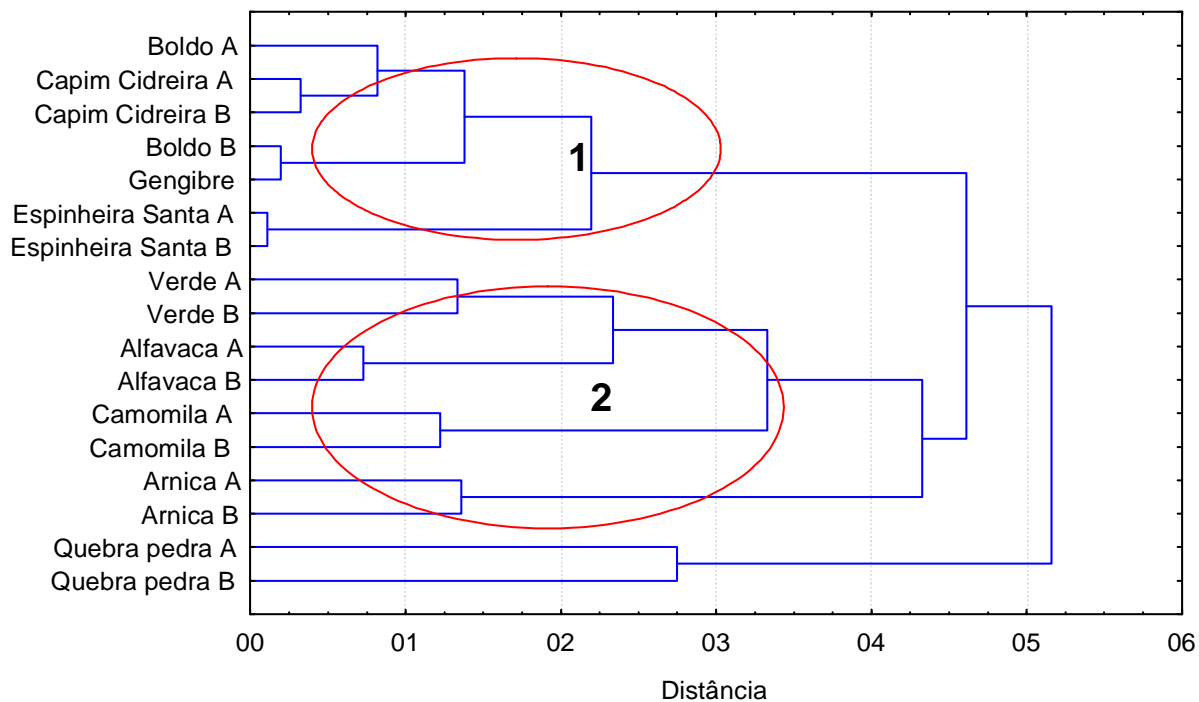
O teor elevado de Al presente em chá verde (*Camellia sinensis* L.) está de acordo com a literatura, onde a erva é citada como uma das 25 famílias de plantas a apresentar tolerância ao metal, acumulando Al em suas folhas [37, 74]. Lésnieswicz et al. [24] destacam a maior concentração de Al, Fe e Mn comparado ao teor de Cu e Zn após quantificação em ervas e medicamentos poloneses. Entre os elementos estudados, vários trabalhos também destacam a menor concentração de Cu em materiais vegetais [14,24].

A concentração dos analitos apresentou grande variação dentre as ervas analisadas e variação menor quando comparadas marcas diferentes da mesma espécie, mas para Cu, valores similares foram encontrados nas marcas A e B das ervas medicinais. O tipo de solo utilizado, a forma de plantio e de armazenamento da planta e a idade das plantas são algumas das justificativas para a variação dos analitos entre ervas da mesma espécie (A e B) [10].

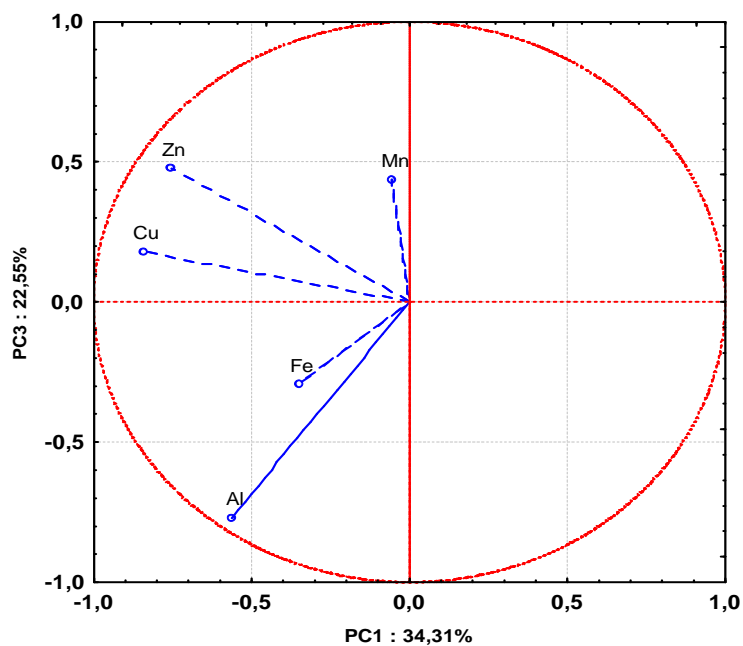
4.6.1 Análise por Agrupamentos Hierárquicos (HCA), Análise por Componentes Principais (PCA) e teste de Pearson para o teor dos analitos obtidos após digestão em forno de microondas com cavidade.

Os resultados obtidos pelo procedimento de digestão em forno de microondas com cavidade foram analisados utilizando-se os métodos de HCA e PCA e são apresentados nas FIGURAS 4.6a - 4.6e. Esse estudo teve como finalidade agrupar por similaridade as ervas com relação a sua composição elementar.

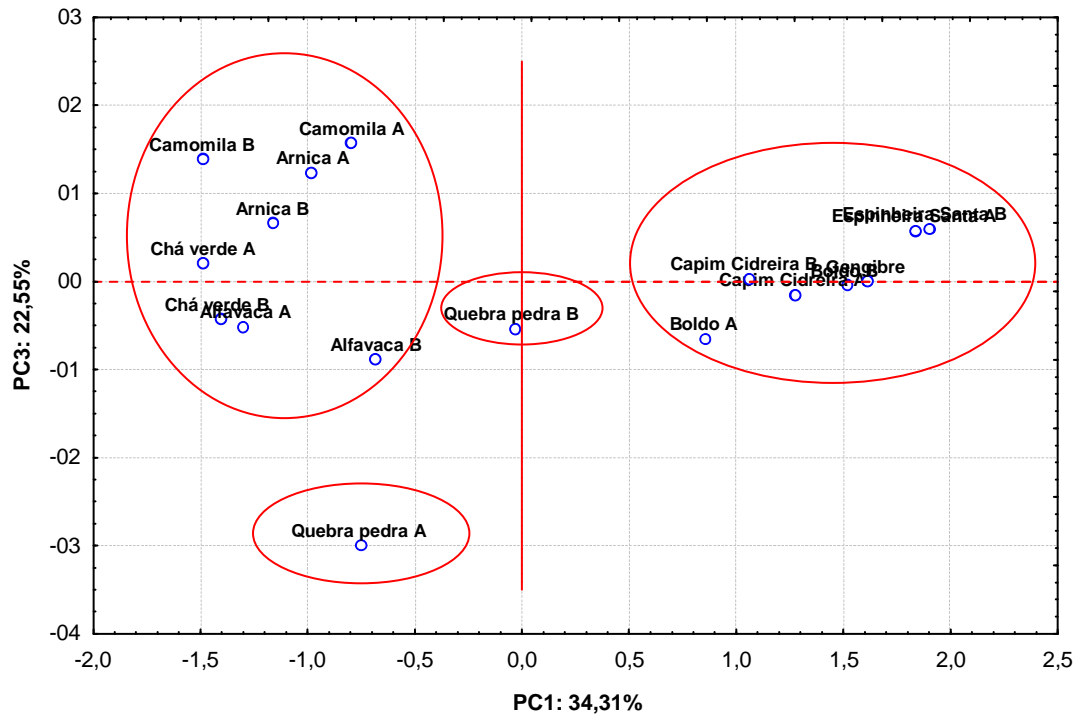
Dendrograma para Amostras
Agrupamento Completo
Distância Euclidiana



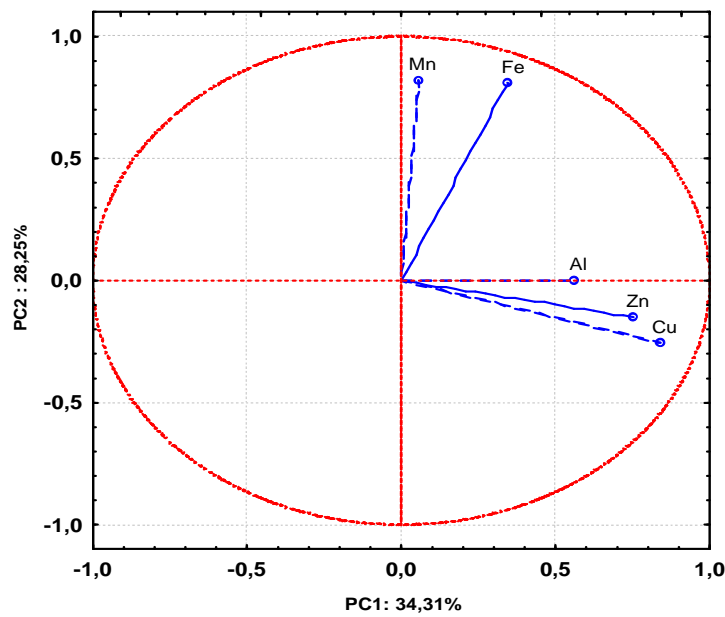
a)



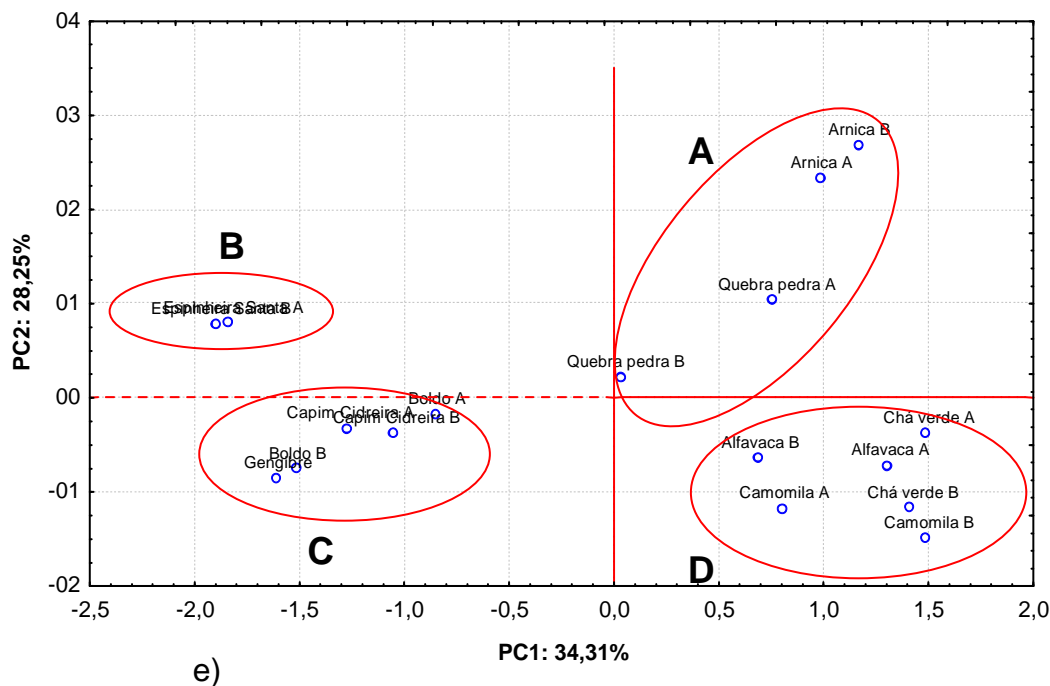
b)



c)



d)



FIGURAS 4.6. Amostras após digestão total em forno de microondas: a) Análise por Agrupamentos Hierárquicos (HCA); b) Gráfico de loadings PC1 versus PC3; c) gráfico dos escores das PC1 versus PC3 obtido do teor de metais nas ervas; d) Gráfico de loadings PC1 versus PC2 e) gráfico dos escores das PC1 versus PC2.

As FIGURAS 4.6 foram analisadas com o auxílio da TABELA 4.8, onde consta o teor dos metais obtido nas ervas medicinais pelo procedimento de digestão. Na FIGURA 4.6a nota-se o agrupamento das ervas em dois grandes grupos:

- 1 – plantas medicinais com baixo teor total de Cu e Zn.
- 2 – plantas medicinais com alto teor total de Cu e Zn.

Como pode ser visto na FIGURA 4.6a, a amostra de quebra-pedra não pertence efetivamente a nenhum dos grupos formados. O comportamento de quebra-pedra foi distinto das demais amostras, o que pode ser melhor observado na FIGURA 4.6c, onde a amostra aparece separada das demais. Esta erva caracteriza-se por baixa concentração de Cu e alta concentração de Zn. Porém, dentro dos grupos 1 e 2 existem particularidades entre algumas ervas que não foram consideradas, como o alto teor de Fe e Mn presente em arnica e quebra-pedra. Buque de rosas.

As FIGURAS 4.6d e 4.6e mostram os resultados de PCA após digestão em forno de microondas com cavidade. As duas primeiras PC's explicam 62,56% da variância total dos resultados obtidos na digestão total das ervas com PC1 igual 34,31% e PC2 igual a 28,25%. Quatro componentes principais explicaram 90% da variância.

Pela FIGURA 4.6d nota-se que as variáveis concentração de Cu e Zn foram as mais significativas para a PC1, com o Cu sendo a variável mais significativa. Para PC2, Mn e Fe foram as variáveis mais significativas. O teor de Al, foi menos significativo para as PC's, não tendo significância para PC2. Esse resultado é decorrente da baixa concentração de Al em algumas amostras, não sendo possível sua quantificação.

A FIGURA 4.6e mostra a formação de quatro subgrupos procedentes dos grupos 1 e 2 da FIGURA 4.6a, onde tem-se os grupos a seguir:

A – arnica A e B e quebra-pedra A e B, sendo as ervas medicinais que apresentaram a maior concentração de Fe dentre as ervas analisadas e também teor elevado de Mn;

B – espinheira-santa A e B, ficando próxima do grupo C por apresentar baixos teores de Cu e Zn. Porém, essas amostras apresentam altos teores de Mn, superiores aos encontrados nas amostras de boldo, capim cidreira e gengibre;

C – boldo A e B, capim-cidreira A e B e gengibre, agrupando-se pela semelhança do baixo teor de Cu e Zn;

D – chá verde A e B, camomila A e B e alfavaca A e B, agrupando-se principalmente pelo alto teor de Cu. Concentrações elevadas de Al presente nessas ervas também auxiliaram, de forma menos expressiva, o agrupamento.

É notório que todas as ervas da mesma espécie e marcas diferentes ficaram agrupadas, apesar das variações encontradas entre elas.

O teste de Pearson, apresentado na TABELA 4.9 mostra a relação entre os elementos quantificados nas amostras.

TABELA 4.9 Teste de Pearson para a relação entre a concentração total dos elementos nas amostras.

	Al ($\mu\text{g/g}$)	Cu ($\mu\text{g/g}$)	Fe ($\mu\text{g/g}$)	Mn ($\mu\text{g/g}$)	Zn ($\mu\text{g/g}$)
Al ($\mu\text{g/g}$)	1	0,3	0,32	-0,2	0,07
Cu ($\mu\text{g/g}$)		1	0,01	-0,05	<u>0,57</u>
Fe ($\mu\text{g/g}$)			1	0,43	0,05
Mn ($\mu\text{g/g}$)				1	0,06
Zn ($\mu\text{g/g}$)					1

Nota-se na TABELA 4.9 que apenas a relação do teor Zn e Cu é significativa na distribuição total dos analitos nas amostras, esse resultado também é observado na Figura 4.6b. O valor encontrado de $p = 0,57$ mostra que plantas que possuem alto teor de Cu geralmente apresentam elevado teor de Zn. Resultado semelhante foi encontrado para o HCA, com a formação de dois grandes grupos, conforme descrito anteriormente.

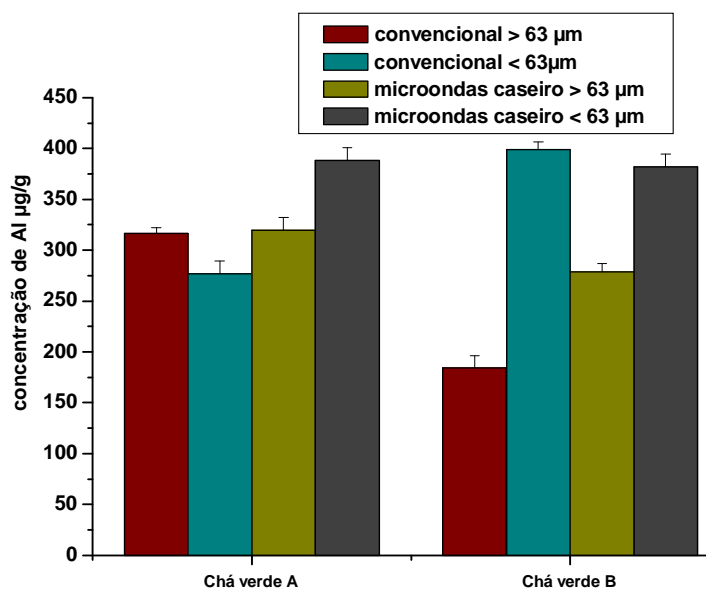
Santos et al. [75] encontram interação negativa entre Cu e Zn presente em plantas. No entanto, o experimento foi realizado com doses elevadas de um elemento no solo e baixa concentração do outro. Os autores descrevem que sob essas condições, um elemento afeta a absorção do outro pela planta. Porém, quando a adição de Cu e Zn é realizada em pequenas doses, esse efeito não acontece.

4.7 Infusões das ervas medicinais

Procedimentos de extração mais brandos, onde não é exigida a destruição total da matriz podem ser aplicados dependendo do interesse da análise. Extrações utilizando água ou ácidos diluídos apresentam resultados satisfatórios na determinação de elementos em ervas medicinais [37,76], além de fornecer informações que complementam os resultados obtidos com a digestão total das amostras. A infusão das ervas medicinais foi realizada simulando a forma de preparação pela população. As TABELAS A.1 a A.4, em **anexo**, apresentam a concentração dos elementos presente nas infusões.

Amostras de boldo, chá verde, capim-cidreira e camomila foram submetidas à infusão convencional e em microondas caseiro, em tamanhos de partículas maiores e menores que 63 μm e os resultados obtidos para Al, Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS são apresentados nas FIGURAS 4.7a - 4.7e. Essas amostras foram escolhidas para o estudo granulométrico e por isso foram quantificadas em tamanhos diferentes de partículas, como justificado em 3.4.2.

Amostras de quebra-pedra, alfavaca, arnica e espinheira-santa com tamanho de partículas inferiores a 63 μm foram submetidas à infusão convencional e em microondas caseiro e os resultados obtidos para Cu, Fe, Mn, Zn e são apresentados na FIGURA 4.8a – 4.8d. A quantificação de Al não foi possível por estar abaixo do LQ do método.



a)

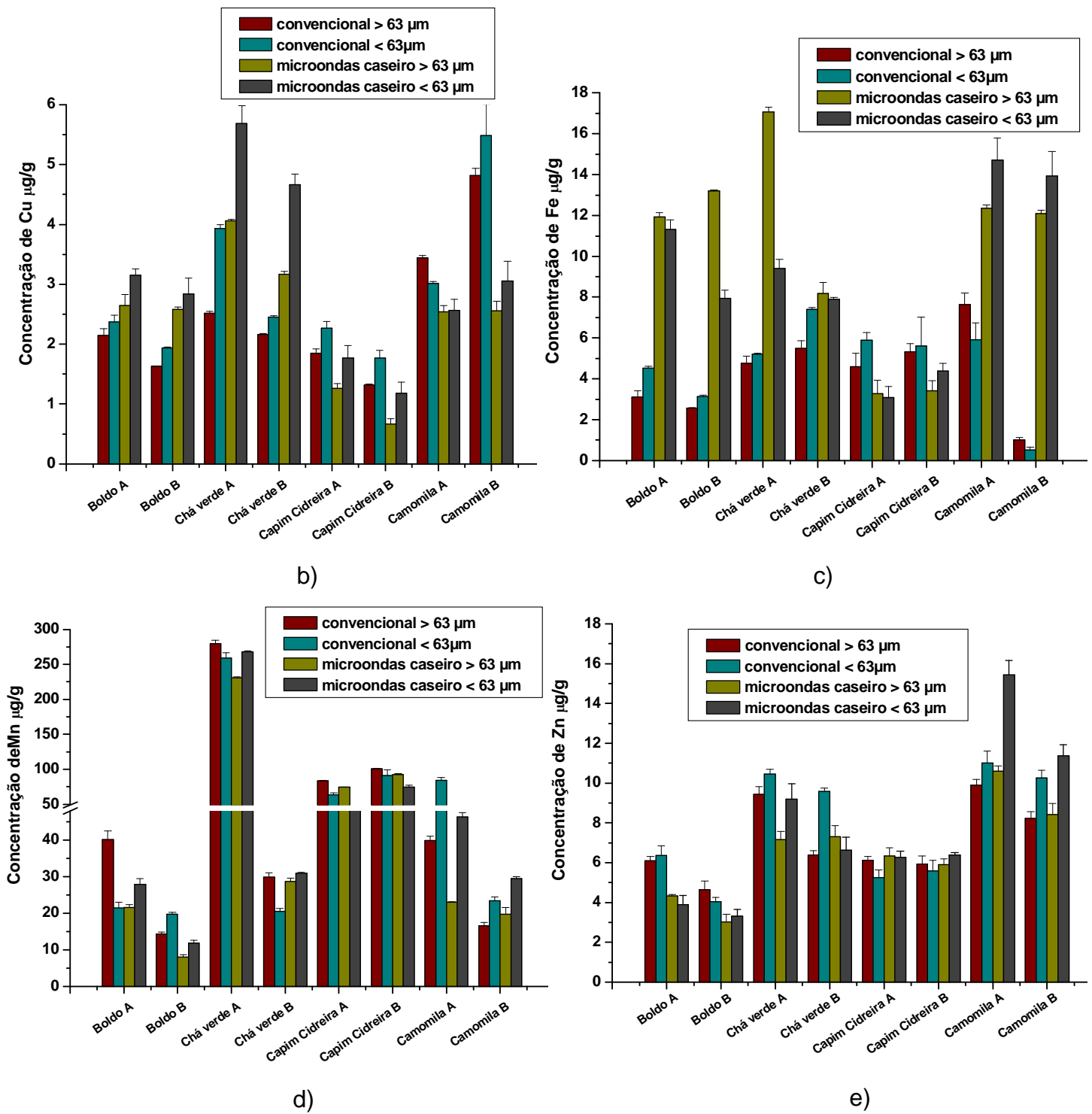


FIGURA 4.7. Infusão convencional e em microondas caseiro de boldo, chá verde, capim-cidreira e camomila com granulometria maior e menor que 63 μm para determinação dos analitos por FAAS. a) teor de Al; b) teor de Cu; c) teor de Fe; d) teor de Mn; e) teor de Zn.

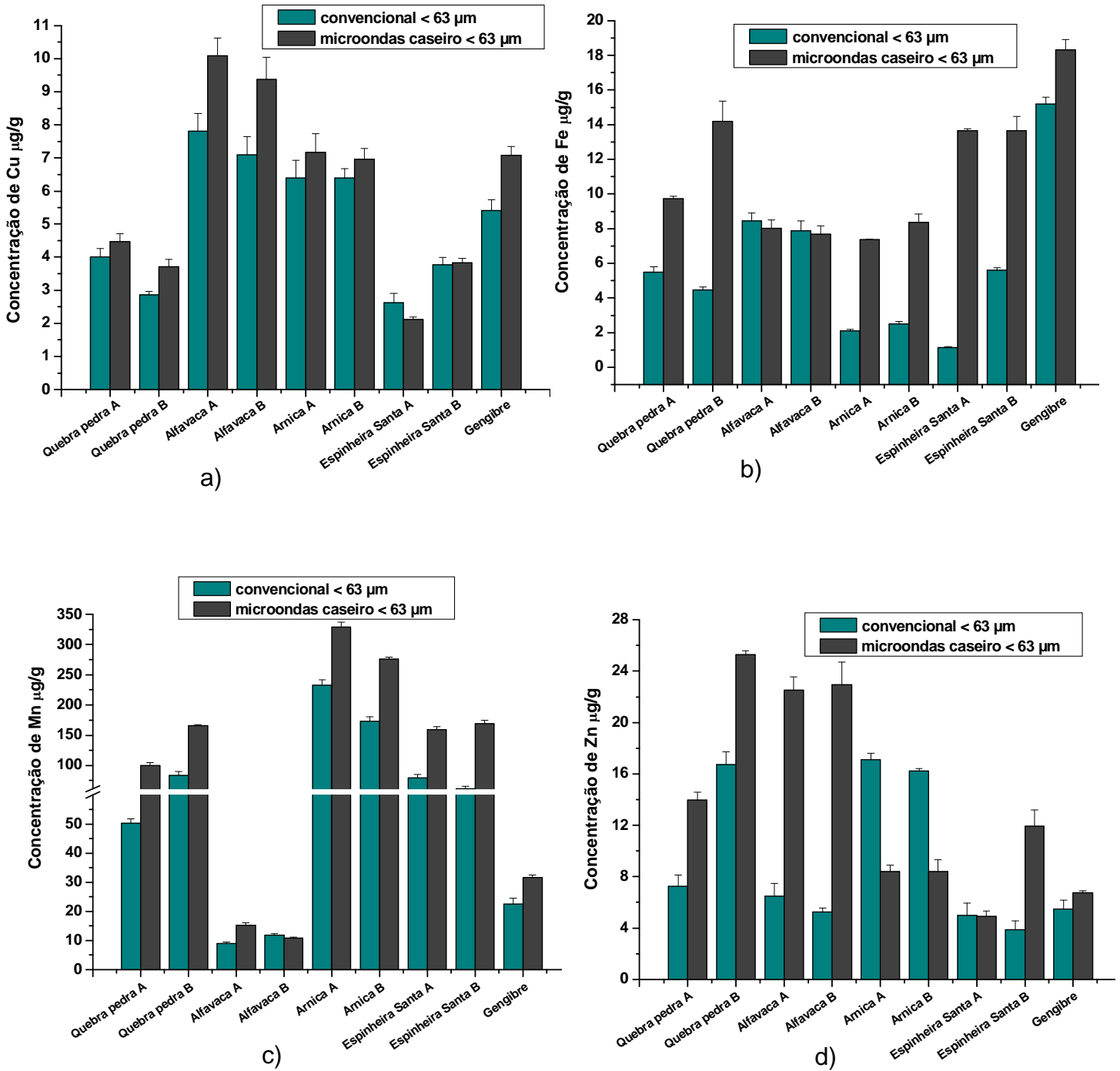


FIGURA 4.8. Infusão convencional e em microondas caseiro de alfavaca, arnica, espinheira-santa e gengibre quebra-pedra com determinação dos analitos por FAAS. a) teor de Cu; b) teor de Fe; c) teor de Mn; d) teor de Zn.

Pelas FIGURAS 4.7a – 4.7e e 4.8a – 4.8d, nota-se que houve grande variação na extração dos analitos no procedimento de infusão. Este resultado era esperado, em decorrência da diferença do teor total dos analitos presente

nas ervas e também pela interação desses analitos com a matriz da amostra. O desvio padrão relativo foi inferior a 8 % em todas as triplicatas realizadas, sendo a maioria inferior a 5%. O resultado confirma a boa precisão do método aplicado.

Assim como no teor total, a concentração de Cu disponível na infusão foi similar em ervas de marcas diferentes (A e B). A infusão de todas as ervas analisadas apresentou maior concentração de Mn (16 a 330 µg/g) em relação aos demais elementos, exceto para chá verde que apresentou maior concentração de Al (277-400 µg/g). Esse resultado é decorrente da fraca interação do Mn com a matriz, sendo que o mesmo não ocorre com os demais elementos [77]. As folhas de chá são mencionadas como fonte Mn, um elemento essencial para microorganismos e animais superiores, incluindo o homem [9]. Portanto, considerando o consumo de quatro xícaras de chá de arnica diariamente, pode-se alcançar a ingestão de até 2,6 mg/dia de Mn, considerando o preparo médio de chás, com 2g da erva.

O chá das ervas analisadas não apresentou concentração de Al passível de quantificação, exceto para chá verde, onde o Al foi determinado na infusão convencional e em microondas caseiro para tamanho de partícula maior e menor que 63 µm. Vale ressaltar que, juntamente com quebra-pedra A, o chá verde apresentou a maior concentração de Al após a digestão das ervas (Tabela 4.8). Porém, a mineralização das amostras em forno de microondas com cavidade mostrou que o chá verde é uma erva facilmente digerida e que com menor teor de sílica, sendo possível sua digestão com ácido diluído. Diferentemente do chá verde, quebra-pedra apresentou visualmente alto teor de sílica, sendo uma erva de difícil digestão. Portanto, esse resultado confirma a presença de Al fortemente ligado à matriz silicatada das ervas medicinais [77].

A extração de Cu na infusão variou de 11 a 94%, com maioria das ervas entre 20 e 60%. Espinheira-santa e gengibre foram as ervas com maior percentual de Cu extraído. A infusão de chá verde disponibilizou de 16 a 36% do teor total de Al contido na erva. Manganês apresentou extração de 9 a 95% na infusão, sendo para maioria das ervas extraído com teores que variaram entre 30 a 70%. O chá de quebra-pedra preparado em forno de microondas caseiro com tamanho granular inferior a 63 µm apresentou maior extração de

Mn, superior a 94%. A infusão disponibilizou de 16 a 75% do teor de Zn presente nas ervas, com maioria entre 20 a 40%.

Proporcionalmente, o ferro foi o elemento menos extraído na infusão quando comparado ao teor total dos analitos obtidos pelo procedimento de digestão. A extração de Fe variou de 23 a 28% em gengibre, 3 a 17% em chá verde e nas demais ervas de 0,3 a 8%. A maior concentração do ferro foi obtida no chá do gengibre, preparado em microondas caseiro e de forma convencional, respectivamente em $\mu\text{g/g}$: $18,31 \pm 0,60$ e $15,18 \pm 0,42$. Capim-cidreira, quebra-pedra e principalmente arnica, apesar de possuírem alta concentração de ferro total, apresentaram baixa concentração de ferro disponível na infusão, decorrente da forte interação do analito com a matriz [77].

O estudo sobre a forma de preparo do chá representado nas FIGURAS 4.7a – 4.7e e 4.8a – 4.8d mostrou que a concentração dos analitos e principalmente de ferro presente no chá é maior quando a infusão das ervas ($< 63 \mu\text{m}$) é preparado em microondas caseiro. Esse resultado mostra a maior eficiência da radiação microondas na transferência de energia, quando comparado com o aquecimento condutivo. A radiação microondas alcança as amostras diretamente, obtendo-se um aquecimento mais homogêneo e com maior transferência de energia [78]. No entanto, nenhuma tendência foi observada para o preparo do chá em ervas com tamanho de partícula $> 63 \mu\text{m}$. Esse resultado provavelmente é decorrência do estado da amostra, a qual não passou pela moagem e, portanto, a homogeneidade da amostra era menor, podendo haver pequena diferença na composição analisada. Ressalta-se então, que a homogeneidade da amostra, garantida por menores tamanhos de partículas após a moagem criogênica, é um fator relevante na extração de elementos inorgânicos.

Pelas FIGURAS 4.7a – 4.7e, nota-se que o tamanho de partícula não influenciou significativamente na extração dos analitos, quando avaliamos uma única forma de preparo, como exemplo a infusão convencional, para ervas maiores e menores do que $63 \mu\text{m}$. A exceção foi encontrada para o teor de ferro extraído na infusão de forma convencional (FIGURA 4.8b), onde a eficiência na extração do ferro foi maior quando o chá foi preparado com

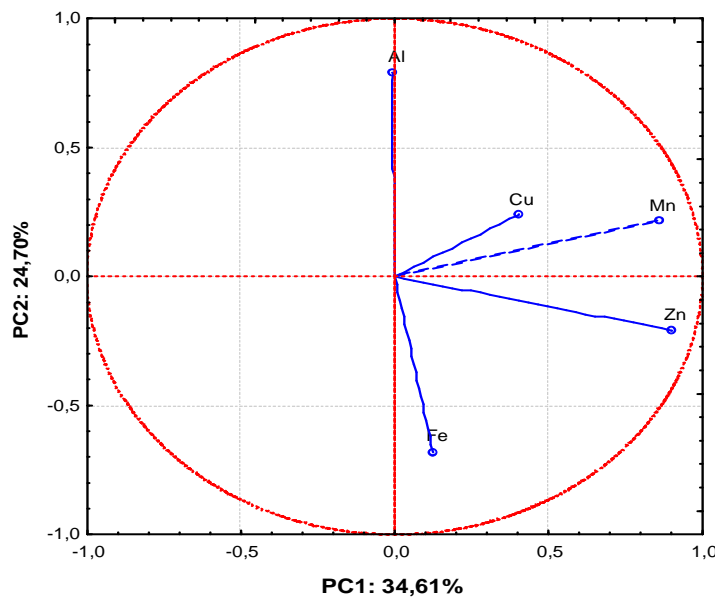
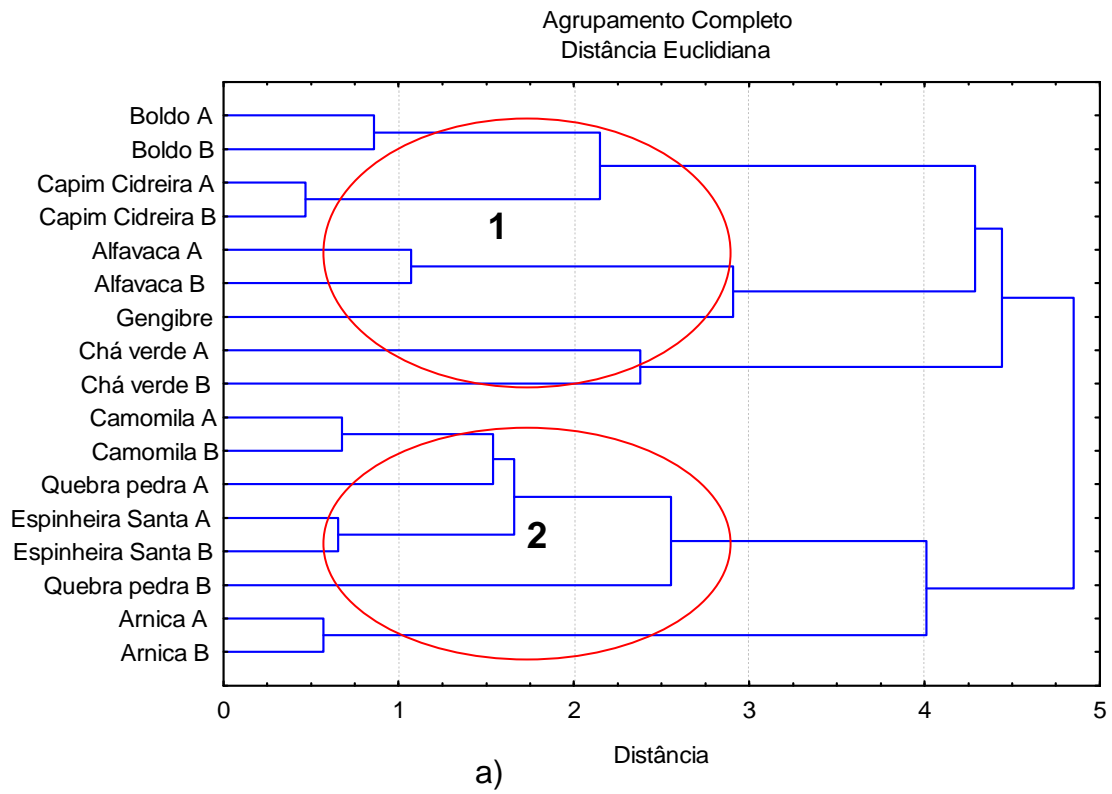
plantas em menor granulometria. O mesmo efeito não ocorre quando o preparo é realizado em microondas caseiro.

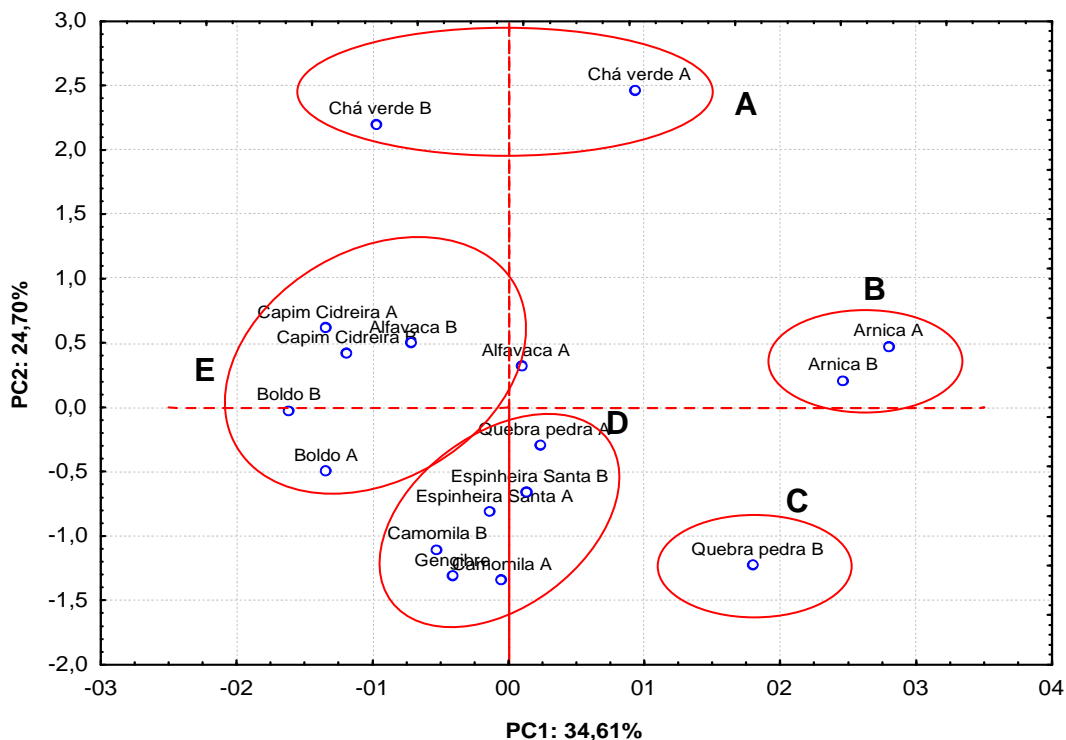
O preparo do chá de forma convencional e em microondas caseiro disponibiliza os analitos em concentrações inferiores às consideradas tóxicas, sendo de até 70.000 µg/dia para Al, 10.000 µg/dia para Cu, 45.000 µg/dia para Fe, 11.000 µg/dia para Mn e 40.000 µg/dia para Zn, considerando que o consumo diário de uma xícara de chá corresponde a aproximadamente 2,0 g das ervas analisadas [24]. Os resultados da infusão mostram que o chá das ervas podem ser consumidos como fonte de microelementos essenciais para o organismo, sendo fonte principalmente de Mn. Embora o chá verde contenha concentrações de Al abaixo dos valores tóxicos, quantidades elevadas do chá podem ser prejudiciais para pessoas com deficiência renal, uma vez que o Al é excretado principalmente pela urina e, em pessoas com esta deficiência, pode ocorrer o acúmulo deste metal no organismo, causando sérias disfunções [37].

O sólido restante da infusão de chá verde e arnica em microondas caseiro foi submetido ao procedimento de digestão descrito anteriormente em (3.4.1) e os analitos foram quantificados por FFAS. Esse procedimento foi aplicado apenas a essas amostras por serem as mesmas submetidas à sucessivas infusões realizadas no decorrer desse trabalho.

4.7.1 HCA e PCA para o teor dos analitos obtido após infusão das ervas medicinais em microondas caseiro para tamanho de partícula < 63 µm.

Os resultados obtidos após a infusão das ervas medicinais em microondas caseiro com tamanho de partícula inferior a 63 µm foram analisados utilizando-se os métodos de HCA e PCA e são apresentados nas FIGURAS 4.9a - 4.9c. Os valores obtidos em microondas caseiro para tamanho granular inferior a 63 µm a foram escolhidos para esse estudo por apresentarem maiores concentrações dos analitos.





c)

FIGURAS 4.9. Infusão em microondas caseiro de ervas com tamanho de partícula < 63 μm : a) Agrupamentos Hierárquicos (HCA); b) Gráfico de loadings; c) gráfico dos escores das PC1 versus PC2 obtido do teor de metais nas ervas.

As FIGURAS 4.9 foram analisadas com o auxílio dos dados obtidos da infusão das ervas em microondas caseiro, apresentados nas FIGURAS 4.7a – 4.7e e 4.8a – 4.8d para tamanho de partículas < 63 μm .

Pela Figura 4.9a nota-se que, exceto para quebra-pedra, as ervas da mesma espécie se agruparam em relação ao teor de analitos disponíveis após infusão em microondas caseiro. A diferença encontrada para quebra-pedra pode ser explicada por prováveis variações nas condições de plantio, por serem amostras de marcas diferentes.

Na FIGURA 4.9a, o agrupamento hierárquico das ervas medicinais, apresenta formação de dois grandes grupos, separados principalmente pelo teor de Zn e Mn:

- 1 – plantas com baixo teor de Zn e/ou Mn disponível na infusão em microondas;
- 2 – plantas com alto teor de Zn e/ou Mn disponível na infusão em microondas.

Nas FIGURAS 4.9b e 4.9c as duas primeiras PC's explicam 59,31% da variância total dos resultados obtidos após infusão das ervas medicinais, com PC1 igual 34,61% e PC2 24,70%. A explicação de mais de 90% da variância é alcançada com o modelo, incluindo o estudo até PC4.

Na FIGURA 4.9b nota-se que os teores de Mn e Zn foram as variáveis mais significativas na PC1 e Fe na PC2. A concentração de Al teve peso apenas na PC2, uma vez que ele foi determinado apenas na infusão de chá verde.

A FIGURA 4.9c mostra a formação de quatro subgrupos procedentes dos grupos 1 e 2 da FIGURA 4.9a, onde tem-se os grupos a seguir:

A – chá verde A e B, agrupadas pela concentração de Al, sendo a única espécie a apresentar concentração de Al no chá acima do LQ do método. As ervas ficaram em quadrantes separados em função da marca A apresentar teor elevado de Mn, enquanto que a marca B, apresentou baixo teor.

B – arnica A e B, agrupadas por apresentarem a maior concentração de Mn disponível no chá das ervas;

C – Quebra-pedra B, separada pela concentração elevada de Zn;

D – quebra-pedra A, espinheira-santa A e B, camomila A e B e gengibre agrupadas pelo alto teor de Fe. Quebra-pedra B apresentou alto teor de Fe e não foi agrupada em D, pois o teor de Zn foi mais significativo.

E – Capim-cidreira A e B, boldo A e B e alfavaca A e B, agrupadas pela baixa concentração de Mn e Zn. Alfavaca A ficou um pouco distante do restante das ervas do grupo por apresentar concentração de Zn mais elevada.

Tratamentos estatísticos são amplamente utilizados para correlacionar variáveis e suas componentes principais [79] tornando possível a formação do perfil de diversas amostras, como plantas medicinais.

4.8 Infusões sucessivas das ervas medicinais

As TABELAS A.5 – A.8, em **anexo**, apresentam o resultado da concentração de Al, Cu, Fe, Mn e Zn obtidos na infusão sucessiva dos chás verde e arnica. As infusões foram realizadas de forma convencional e em microondas caseiro com tamanho de partículas > e < 63 µm. Os analitos

quantificados no extrato (sólido restante das sucessivas infusões) também são apresentados nas tabelas.

As amostras de arnica e chá verde foram escolhidas por apresentarem características distintas, como a porcentagem de Fe e Al extraído com água. O chá verde apresentou altos teores de Al e Fe, enquanto a arnica não. Dessa forma, o estudo realizado pode representar comportamentos distintos.

Nota-se pelas TABELAS A.5 – A.8 que a concentração dos elementos obtido do somatório: infusões sucessivas + sólido restante das infusões sucessivas está em conformidade com o teor obtido na digestão das amostras (TABELA 4.8). Dessa forma, o procedimento aplicado que engloba a extração dos analitos através de infusões sucessivas e determinação dos elementos no sólido restante, proporciona uma determinação dos analitos próxima a 100%.

A porcentagem de extração obtida para as infusões sucessivas é apresentada nas TABELAS 4.11 – 4.14.

TABELA 4.11. Porcentagem de metais extraídos através da infusão sucessiva para tamanho de partícula > 63 µm, em procedimento convencional.

	Al %	Cu %	Fe %	Mn %	Zn %
1ª Chá verde A	31	22	3,4	45	27
2ª Chá verde A	12	3,5	0,80	12	4,6
3ª Chá verde A	9,4	3,1	0,47	6,5	3,5
4ª Chá verde A	7,2	-	0,37	5,0	3,3
5ª Chá verde A	3,9	-	-	2,3	2,9
6ª Chá verde A	2,2	-	-	1,6	-
1ª Chá verde B	19	13	4,7	16	18
2ª Chá verde B	6,9	3,2	0,82	4,2	4,4
3ª Chá verde B	4,0	2,0	0,22	2,9	2,6
4ª Chá verde B	3,1	2,0	0,22	2,3	1,8
5ª Chá verde B	2,5	1,7	-	1,8	1,7
6ª Chá verde B	2,0	-	-	1,5	1,7
1ª Amica A	-	31	0,19	23	30,0
2ª Amica A	-	7,1	0,07	6,4	7,0
3ª Amica A	-	4,5	0,05	5,3	5,0
4ª Amica A	-	-	0,03	2,9	3,3
5ª Amica A	-	-	0,03	2,3	2,8
6ª Amica A	-	-	-	1,8	2,2
1ª Amica B	-	31	0,16	17	24
2ª Amica B	-	7,8	0,06	5,0	5,9
3ª Amica B	-	6,5	0,05	4,4	4,9
4ª Amica B	-	5,7	0,03	3,9	3,9
5ª Amica B	-	4,7	-	2,9	2,5
6ª Amica B	-	3,3	-	2,3	1,6

TABELA 4.12. Porcentagem de metais extraídos através da infusão sucessiva para tamanho de partícula < 63 µm, em procedimento convencional.

	Al %	Cu %	Fe %	Mn %	Zn %
1ª Chá verde A	32	25	5,1	44	25
2ª Chá verde A	6,9	2,4	0,46	10	4,8
3ª Chá verde A	3,2	1,6	0,32	6,1	3,0
4ª Chá verde A	-	-	-	2,4	1,9
5ª Chá verde A	-	-	-	2,1	-
6ª Chá verde A	-	-	-	1,6	-
1ª Chá verde B	36	14,22	5,1	20	24
2ª Chá verde B	6,8	2,03	0,84	4,3	4,8
3ª Chá verde B	4,4	-	0,48	3,3	3,3
4ª Chá verde B	-	-	0,48	2,2	1,8
5ª Chá verde B	-	-	0,20	1,1	-
6ª Chá verde B	-	-	0,17	0,82	-
1ª Arnica A	-	40	0,23	27	36
2ª Arnica A	-	10	0,08	6,5	8,7
3ª Arnica A	-	7,6	0,07	5,5	6,7
4ª Arnica A	-	6,4	0,05	3,3	4,0
5ª Arnica A	-	3,8	0,04	1,3	3,1
6ª Arnica A	-	1,7	-	0,85	2,5
1ª Arnica B	-	50	0,19	23	39
2ª Arnica B	-	9,8	0,05	11,0	11
3ª Arnica B	-	6,6	0,03	3,9	5,6
4ª Arnica B	-	5,0	0,02	1,8	2,9
5ª Arnica B	-	2,6	-	1,4	2,2
6ª Arnica B	-	-	-	1,1	-

TABELA 4.13. Porcentagem de metais extraídos através da infusão sucessiva para tamanho de partícula > 63 µm, em microondas caseiro.

	Al %	Cu %	Fe %	Mn %	Zn %
1ª Chá verde A	39	25	6,2	42	22
2ª Chá verde A	12	5,4	1,0	12	8,4
3ª Chá verde A	4,6	3,8	0,68	4,7	3,3
4ª Chá verde A	2,0	2,7	-	3,2	1,9
5ª Chá verde A	-	0,72	-	2,6	1,1
6ª Chá verde A	-	-	-	1,4	0,82
1ª Chá verde B	30	16	6,5	25	30
2ª Chá verde B	12	3,7	2,5	6,8	11
3ª Chá verde B	4,2	2,1	1,1	3,5	3,8
4ª Chá verde B	2,0	1,0	0,74	2,2	1,6
5ª Chá verde B	-	0,67	-	1,1	0,94
6ª Chá verde B	-	-	-	0,69	-
1ª Arnica A	-	35	0,34	24	35
2ª Arnica A	-	5,0	0,13	5,8	7,4
3ª Arnica A	-	3,2	-	3,3	4,8
4ª Arnica A	-	1,1	-	1,9	3,5
5ª Arnica A	-	0,64	-	1,4	2,7
6ª Arnica A	-	-	-	0,72	2,1
1ª Arnica B	-	41	0,24	29	40
2ª Arnica B	-	8,7	0,06	9,6	8,6
3ª Arnica B	-	6,6	-	4,4	5,0
4ª Arnica B	-	5,3	-	2,0	4,0
5ª Arnica B	-	0,66	-	1,7	2,6
6ª Arnica B	-	-	-	1,2	2,1

TABELA 4.14. Porcentagem de metais extraídos através da infusão sucessiva para tamanho de partícula < 63 µm, em microondas caseiro.

	Al %	Cu %	Fe %	Mn %	Zn %
1ª Chá verde A	37	34	5,8	47	26
2ª Chá verde A	13	9,5	1,2	12	5,5
3ª Chá verde A	2,1	6,7	0,76	4,9	2,7
4ª Chá verde A	-	5,1	0,19	3,8	1,6
5ª Chá verde A	-	0,62	0,14	2,9	1,2
6ª Chá verde A	-	-	0,03	2,1	0,60
1ª Chá verde B	39	28	5,8	24	30
2ª Chá verde B	11	5,8	1,6	8,0	8,7
3ª Chá verde B	1,9	4,7	1,0	2,5	4,9
4ª Chá verde B	-	1,5	0,82	1,2	1,5
5ª Chá verde B	-	0,97	0,64	0,89	0,94
6ª Chá verde B	-	0,51	0,55	0,72	-
1ª Arnica A	-	52	0,50	35	46
2ª Arnica A	-	7,6	0,12	6,6	7,1
3ª Arnica A	-	6,0	0,10	2,9	4,2
4ª Arnica A	-	3,0	0,08	2,0	3,6
5ª Arnica A	-	1,9	0,05	1,6	3,0
6ª Arnica A	-	-	-	1,24	2,3
1ª Arnica B	-	47	0,39	36	49
2ª Arnica B	-	10	0,08	12	8,7
3ª Arnica B	-	6,4	0,05	4,8	4,7
4ª Arnica B	-	4,0	-	2,3	4,2
5ª Arnica B	-	1,5	-	1,7	3,1
6ª Arnica B	-	0,92	-	1,3	2,8

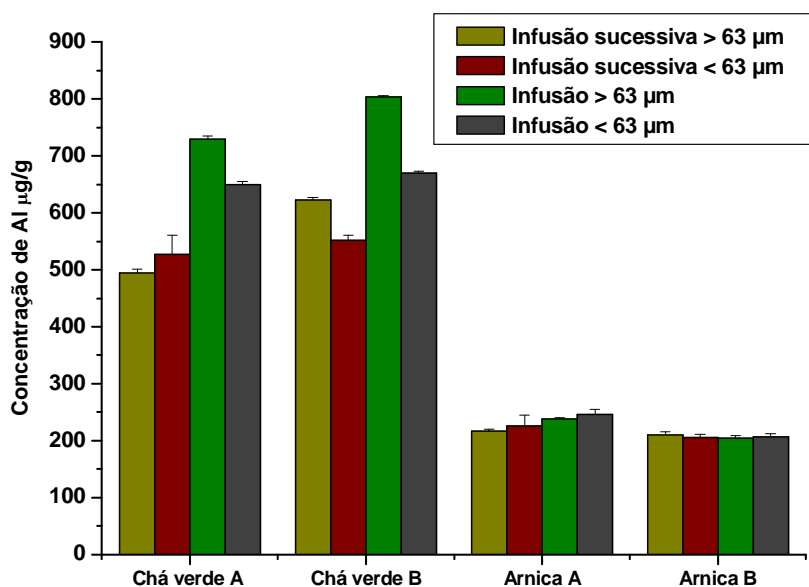
Percebe-se nas TABELAS 4.11 – 4.14 que a porcentagem de extração de todos os elementos é muito superior na primeira infusão. Na segunda infusão o teor diminui bruscamente e mantém um declínio progressivo nas demais infusões, 3ª a 6ª. Esses resultados estão de acordo com dados da literatura [7, 46] que apresentam a primeira infusão como a mais significativa na solubilização dos elementos.

Assim como na infusão em uma única etapa, o ferro também foi o elemento menos extraído na infusão sucessiva das ervas. Para arnica, o somatório do teor de ferro extraído nas seis infusões sucessivas foi inferior a 1 % da concentração total obtida (extraído + restante no sólido) e para chá verde inferior a 9%. Manganês foi único elemento quantificado em todas as infusões, apresentando concentração acima do LQ do método, mesmo na sexta infusão.

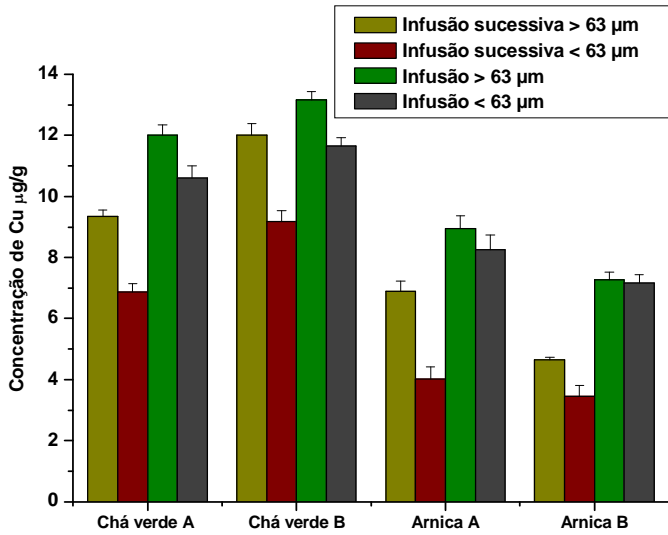
Percentualmente, Cu e Zn foram os elementos mais extraídos nas sucessivas infusões de arnica, com valores de Cu entre 43 e 75% e Zn de 58 a 73%. No entanto, em chá verde Mn e Al apresentaram a maior porcentagem de extração dentre os elementos quantificados, sendo de 43 a 67% para Al e de 30 a 70% para Mn.

O chá verde mostrou-se novamente como uma fonte de Al, um metal tóxico relacionado à doenças neurológicas. A forma como o Al está presente na infusão está diretamente relacionada com a capacidade de absorção do elemento pelo organismo. Para chá verde, o Al na primeira infusão está associado a compostos orgânicos de alta massa molecular e de difícil absorção [80]. Portanto, o consumo do chá verde deve ser realizado com cautela por pessoas que apresentam deficiência renal.

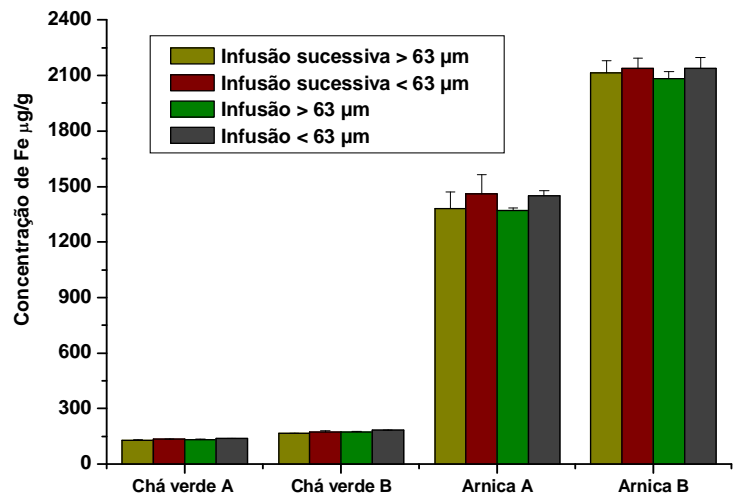
O teor de Al, Cu, Fe, Mn e Zn quantificado por FAAS no resíduo da infusão e no resíduo da infusão sucessiva de chá verde e arnica, em microondas caseiro são apresentados nas FIGURAS 4.10a – 4.10e.



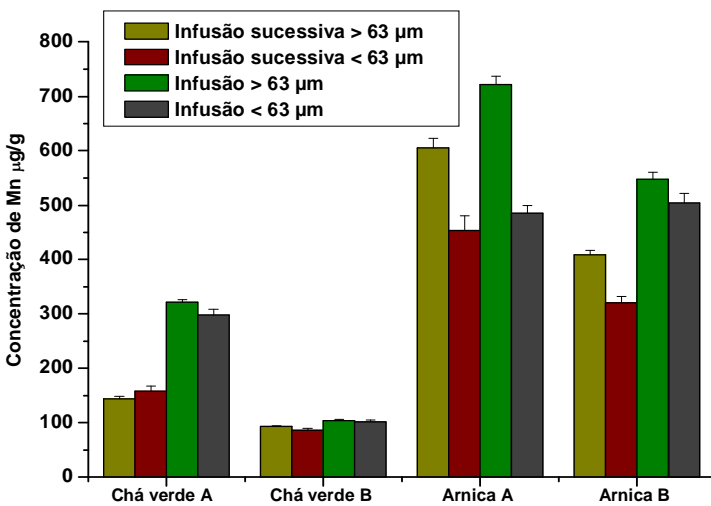
a)



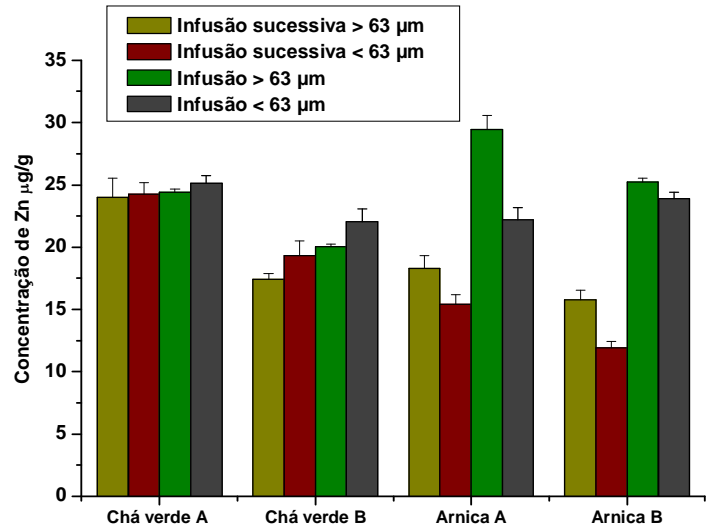
b)



c)



d)



e)

FIGURA 4.10. Concentração dos analitos presente no resíduo da infusão e infusão sucessiva, para tamanhos de partículas > e < 63 µm a) concentração de Al; b) concentração de Cu; c) concentração de Fe; d) concentração de Mn; e) concentração de Zn.

Nas FIGURAS 4.10a – 4.10e nota-se que, em geral, a digestão dos resíduos das infusões sucessivas apresentaram teores menores dos elementos quando comparados aos teores encontrados para a infusão em uma única etapa.

O resultado apresentado na FIGURA 4.10a era esperado, visto que Al não foi quantificado na infusão e na infusão sucessiva de arnica. Com isso, a diferença encontrada no resíduo da infusão e da infusão sucessiva foi pequena, inferior a 8% para arnica A e menor que 3 % para arnica B. No entanto, no chá verde a infusão sucessiva de Al foi expressiva, com variação entre o teor do resíduo da infusão e infusão sucessiva entre 18 a 32%.

Pela FIGURA 4.10b nota-se que ocorre variação na concentração de Cu no resíduo da infusão comparado ao resíduo da infusão sucessiva. Dessa forma é possível concluir que as infusões sucessivas foram expressivas na extração de Cu, o qual apresenta percentuais altos de extração em todas as etapas, quando comparado aos demais elementos. Para arnica, diferenças entre 24 a 51% no teor de Cu foi encontrado para os resíduos. Em chá verde a variação foi de 8 a 43%.

O ferro foi o elemento que sofreu menor variação no resíduo das infusões (simples e sucessiva), como pode ser visto na FIGURA 4.10c. Esse resultado está de acordo com a baixa extração do metal em água. A primeira infusão é a que efetivamente retira o Fe da amostra, sendo responsável, em média, por 50% do total de Fe extraído nas infusões sucessivas para arnica e 80% para o chá verde.

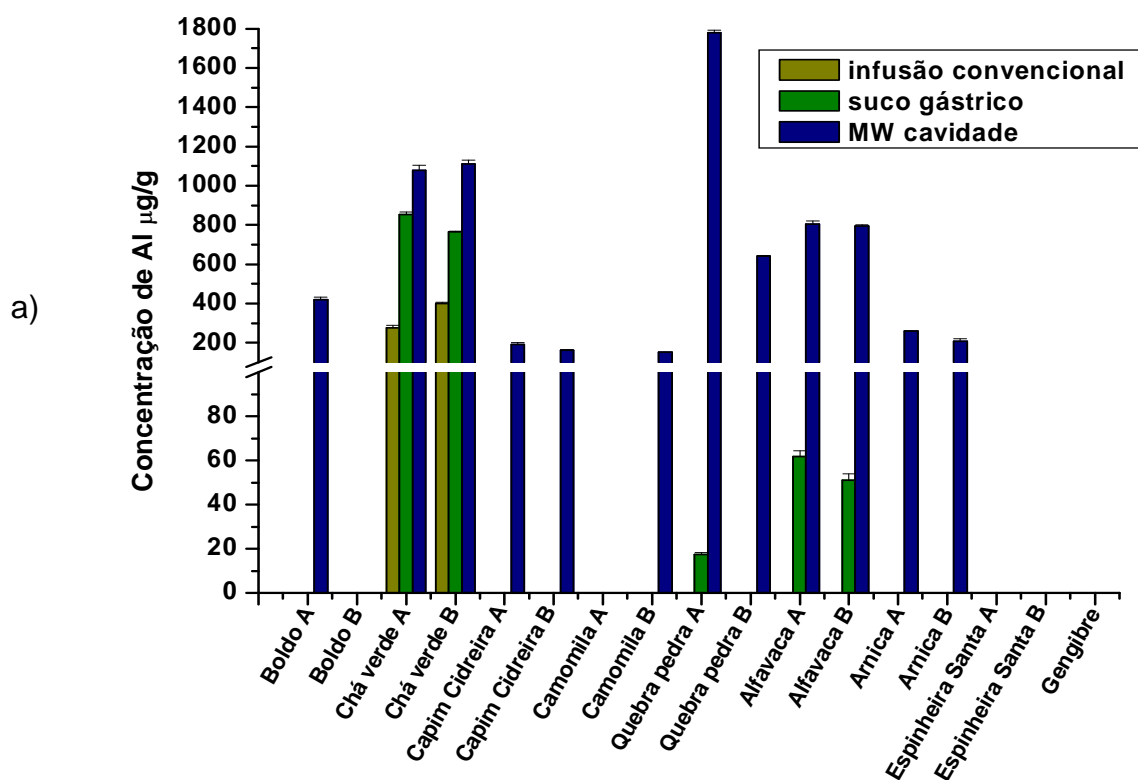
Na FIGURA 4.10d pode-se ressaltar a influência da infusão sucessiva na extração de Mn em Arnica (A e B) e principalmente em chá verde A. A diferença entre os resíduos da infusão e infusão sucessivas foram de 6 a 36% em arnica e em torno de 50% para chá verde A. No entanto, o mesmo não ocorre para chá verde B que apresenta menor concentração e disponibilidade do elemento, da 2^o a 6^o infusão e diferença entre os resíduos em torno de 10%.

Na FIGURA 4.10e observa-se que a extração de Zn após a infusão sucessiva é mais eficiente em arnica quando comparado ao chá verde. A diferença do teor de Zn no resíduo da infusão e infusão sucessiva de arnica A e B é notória. A mesma diferença não ocorre de forma tão expressiva em chá verde, valendo ressaltar que a concentração de Zn em arnica é superior à concentração presente no chá verde, tornando o elemento mais susceptível a sucessivas infusões.

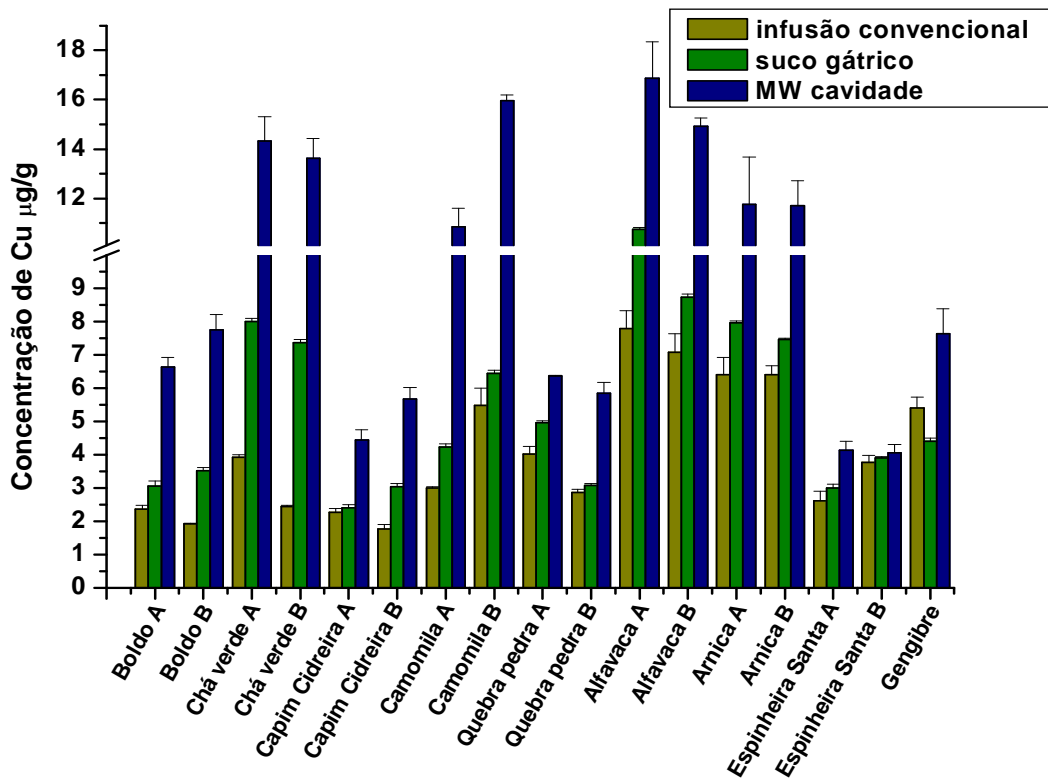
4.9 Biodisponibilidade dos elementos após extração empregando solução simulada de suco gástrico.

A biodisponibilidade dos analitos foi determinada empregando um procedimento de extração com uma solução simulada do suco gástrico. O resultado obtido para as concentrações de Al, Cu, Fe, Mn e Zn são expostos na TABELAS A.9, apresentada no **anexo**.

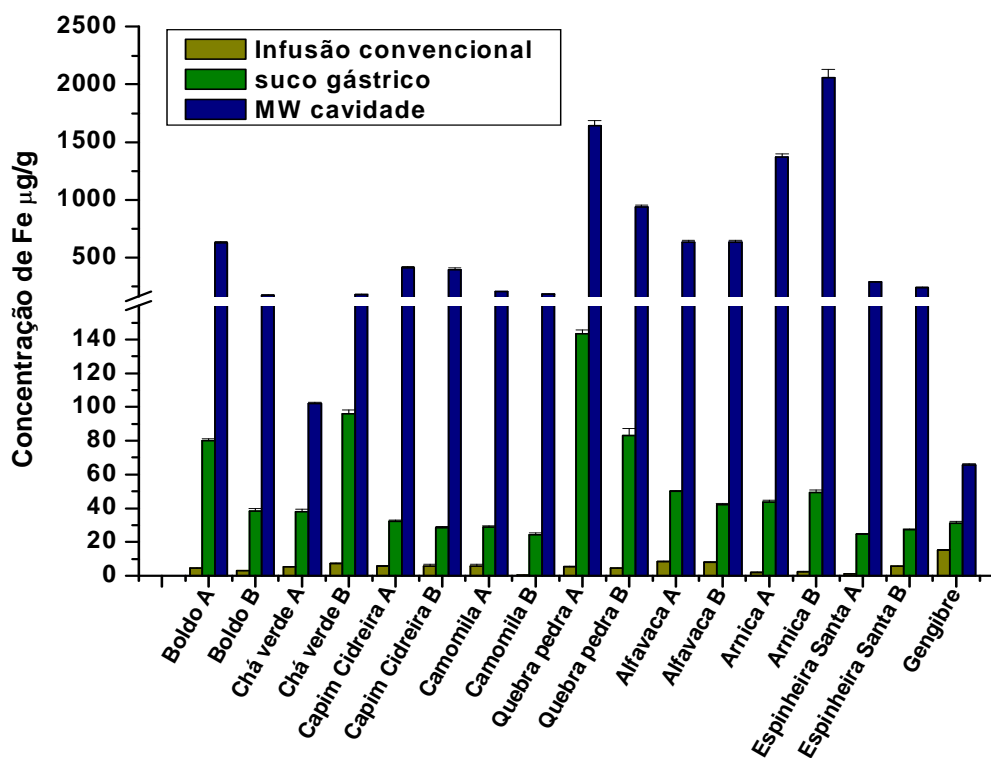
A FIGURA 4.11a – 4.11e apresenta o teor total dos analitos, a concentração disponível na infusão convencional das ervas e na solução simulada do suco gástrico. Dessa forma é possível determinar os analitos nas ervas medicinais *in natura*, na forma de chá e avaliar a disponibilidade dos analitos no trato digestivo. A determinação das ervas na forma sólida no trato digestivo, simula a concentração dos analitos disponível no estômago quando as ervas são consumidas em cápsulas [54].



b)



c)



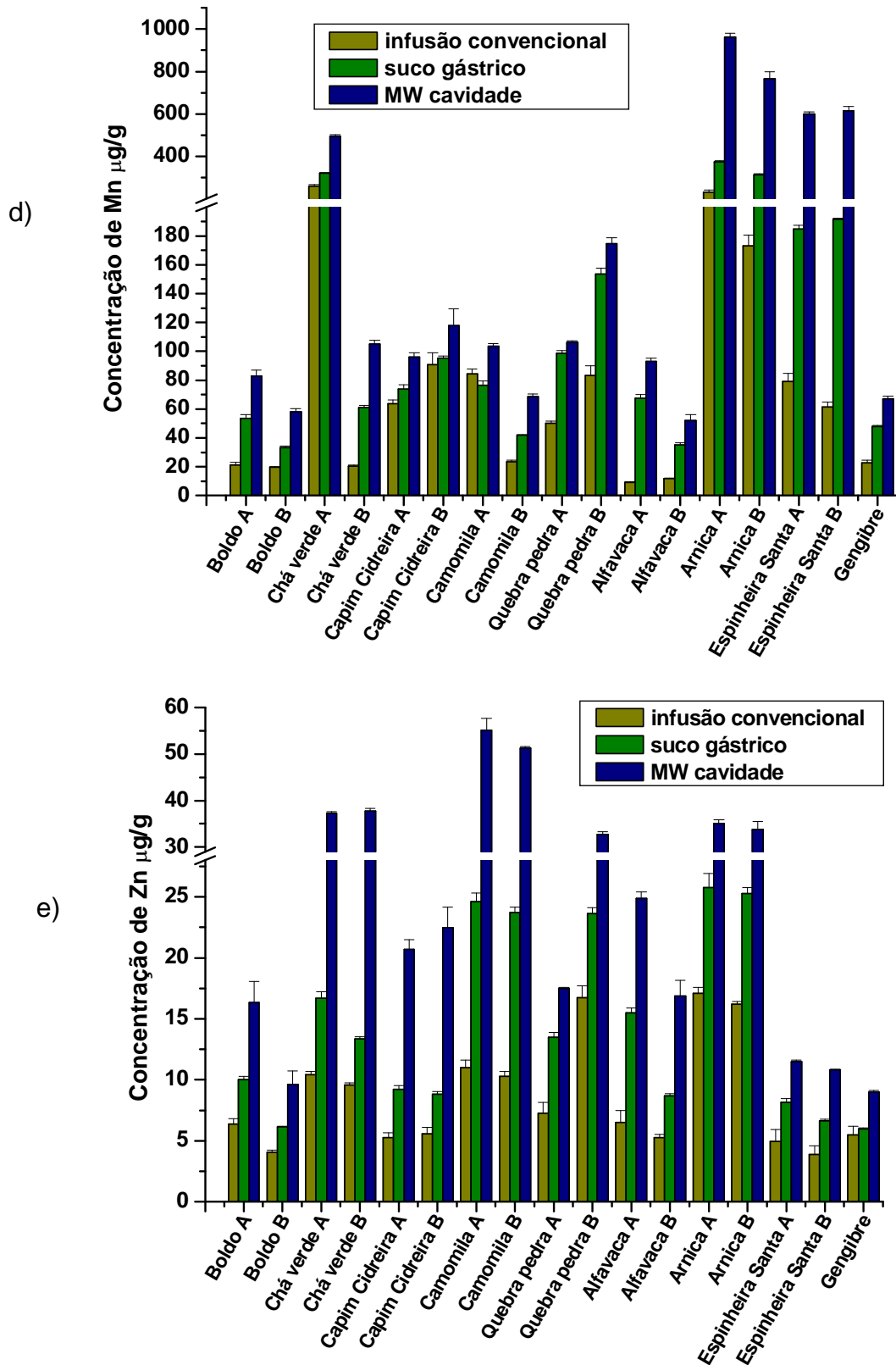


FIGURA 4.11. Concentração total dos analitos, disponíveis na infusão convencional e suco gástrico a) concentração de Al; b) concentração de Cu; c) concentração de Fe; d) concentração de Mn; e) concentração de Zn.

Nas FIGURAS 4.11a – 4.11e nota-se que as concentrações de todos os elementos biodisponíveis empregando-se a solução simulada do suco gástrico é superior quando comparada às concentrações dos analitos disponíveis na infusão das ervas medicinais, com exceção da concentração de Cu em gengibre e de Mn em camomila A. Dessa forma, conclui-se que os micronutrientes são absorvidos em maior concentração quando as ervas medicinais são consumidas em cápsula, comparado ao consumo na forma de chá. Isso porque a concentração dos metais disponível no chá é inferior à concentração disponível no trato intestinal quando as ervas são consumidas na forma sólida.

Na FIGURA 4.11a, observa-se que o teor de Al biodisponível foi quantificado em chá verde e também em quebra-pedra A e alfavaca A e B, plantas que apresentaram teor de Al abaixo do LQ na infusão. Estudos utilizando o suco gástrico como solução extratora de Al em chá verde mostraram que praticamente todo metal presente na infusão é solúvel no estômago, no entanto, menos de 1% do Al oriundo da alimentação é absorvido pelo organismo [37,81]. O maior percentual de Al presente no chá verde encontra-se complexado a moléculas de grande massa molecular, portanto, menos bioacessível para absorção gastrointestinal [37].

Dentre os elementos quantificados, o Fe apresentou o maior acréscimo no teor extraído com solução simulada do suco gástrico, comparado ao teor extraído na infusão. Esse resultado está de acordo com dados da literatura [24]. A forte interação do Fe com a matriz o torna pouco disponível na infusão, por isso a utilização de um extrator mais forte aumenta significativamente o percentual extraído, quando comparado a água. A disponibilidade do elemento aumentou de 5 a 26 vezes para a maioria das ervas, exceto para gengibre onde o aumento foi de 2 vezes. Para camomila B o aumento foi de cerca de 47 vezes quando a solução simuladora do suco gástrico foi utilizada.

A FIGURA 4.11c mostra que o chá de gengibre apresentou os mais altos teores de ferro (15 a 18 $\mu\text{g/g}$). Porém, o quebra-pedra na forma sólida, quando submetido ao procedimento de extração com a solução simulada do suco gástrico, apresentou os maiores teores desse metal, variando de 83 a 103 $\mu\text{g/g}$.

Pela FIGURA 4.11d nota-se que a maior variação na disponibilidade de Mn foi determinada em alfavaca A, com aumento de 700% em relação ao teor

presente na infusão. Para as demais ervas o aumento no teor de Mn extraído com solução gástrica foi semelhante ao de Cu e Zn. Acréscimos de 103 a 300% foram notados na biodisponibilidade desses elementos comparado ao disponível na infusão.

Zinco e Cu são elementos essenciais para atividades metabólicas, como constituinte de enzimas e hormônios [31]. Andrade et al. [82] em estudo de especiação de Fe, Cu e Zn em ervas medicinais citam que os elementos são encontrados nas ervas principalmente nas formas iônicas, carbonatos e ligados a compostos orgânicos. Complexos orgânicos contendo metais são mais facilmente absorvidos pelo organismo [83].

A maior disponibilidade dos analitos é resultado da atividade enzimática da pepsina e também da diminuição do pH, entre 6 e 7 na água e igual a 1,3 medido na solução de pepsina utilizada. Este valor de pH está dentro da faixa de 1,0 – 3,5 da secreção gástrica humana [84]. No entanto, os valores obtidos com o suco gástrico superestimam a bioacessibilidade (metal solúvel no intestino para absorção) por não considerar todo o caminho percorrido pelos elementos, que inclui o abaixamento do pH na fase intestinal (em torno de 7,5) [37, 54, 85]. Apesar disso, o teste *in vitro* simulando as condições físico-químicas do trato digestivo foi útil para avaliar a eficiência de extração estomacal.

Os sólidos restantes da extração com suco gástrico de arnica, quebra-pedra, capim-cidreira e gengibre foram submetidos à digestão em forno de microondas com cavidade e os teores obtidos são apresentados na TABELA A.10, em **anexo**. O somatório da concentração dos elementos disponível no suco gástrico e restante no sólido dessas amostras foi comparado com a concentração total obtida na digestão direta em microondas com cavidade. Os valores são apresentados, em porcentagem, na TABELA 4.15.

Esse estudo foi realizado para garantir que as amostras mantiveram-se íntegras no decorrer da análise, assegurando a veracidade dos resultados obtidos com o procedimento aplicado. Para Al, Cu e Fe a diferença entre o total e o somatório variou de 1 a 9%. Diferenças maiores, de até 14% foram encontradas para Mn e Zn. Esses resultados são considerados satisfatórios para os procedimentos aplicados, que envolvem várias etapas e dissoluções.

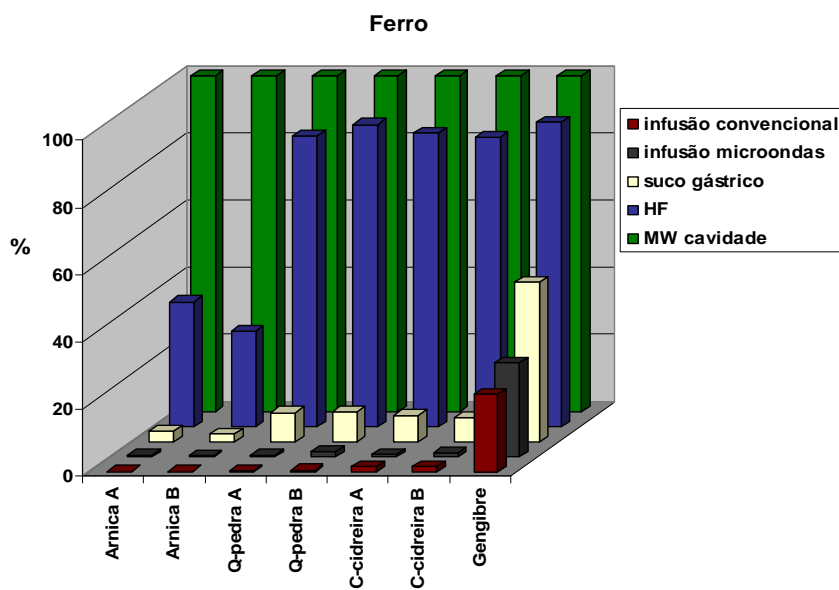
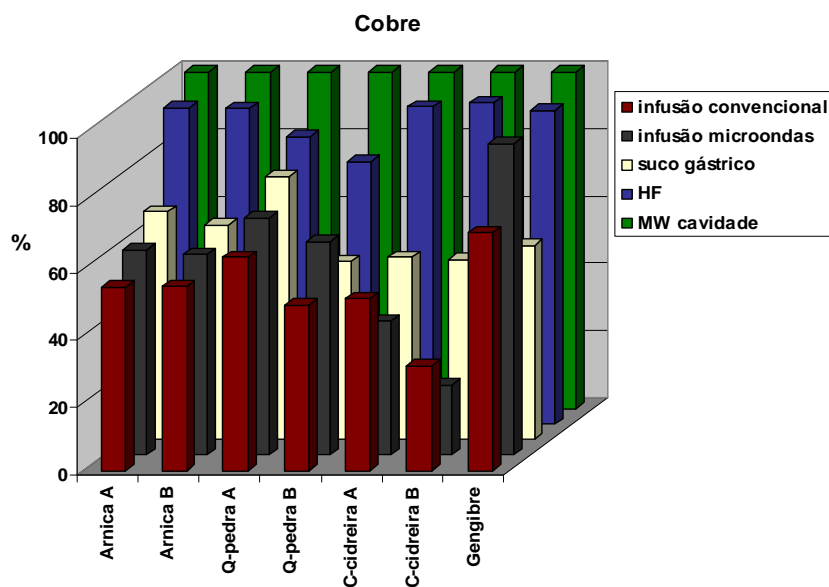
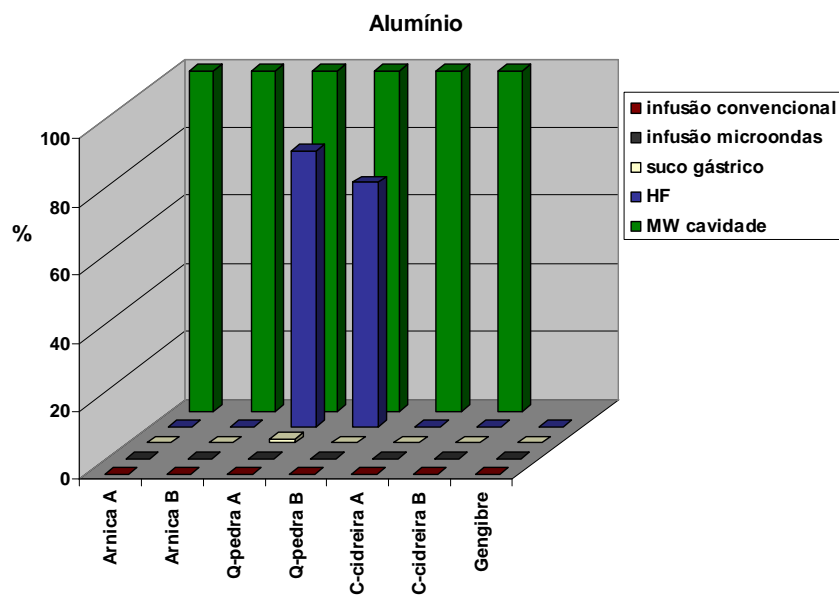
TABELA 4.15 Porcentagem dos elementos obtidos na solução extratora do suco gástrico e no sólido restante, comparado ao teor total

	Al %	Cu %	Fe %	Mn %	Zn %
Arnica A	93,8	94,0	107,7	86,1	88,3
Arnica B	103,3	91,3	102,4	89,9	90,6
Quebra pedra A	99,0	105,7	109,2	108,0	99,6
Quebra pedra B	97,6	102,8	106,0	97,9	97,5
Capim Cidreira A	94,6	97,8	108,0	88,6	86,3
Capim Cidreira B	96,8	93,8	104,5	88,5	85,7
Gengibre	-	92,8	109,3	87,4	99,2

4.10 Extração de Al, Cu, Fe, Mn e Zn com HF 4,5 mol L⁻¹ em ervas medicinais e comparação dos diferentes procedimentos de extração

O procedimento de extração dos metais com ácido fluorídrico diluído (4,5 mol L⁻¹) foi aplicado à arnica, capim-cidreira, quebra-pedra e gengibre para tentar avaliar a interação metal-sílica. A natureza complexante do HF permite a formação de complexos com a sílica presente nas ervas, disponibilizando os metais para o meio extrator [49]. Como discutido em 3.4.5 as ervas foram escolhidas principalmente por apresentarem características distintas na disponibilidade de ferro quantificado na infusão, tornando o estudo representativo na totalidade das amostras. Os resultados para concentração de Al, Cu, Fe, Mn, e Zn extraídos com HF são apresentados na TABELA A.11, em **anexo**.

A eficiência de extração, em %, para todos os procedimentos é apresentada nas FIGURAS 4.12, assumindo como 100% a concentração dos elementos obtida pelo procedimento de digestão em microondas com cavidade.



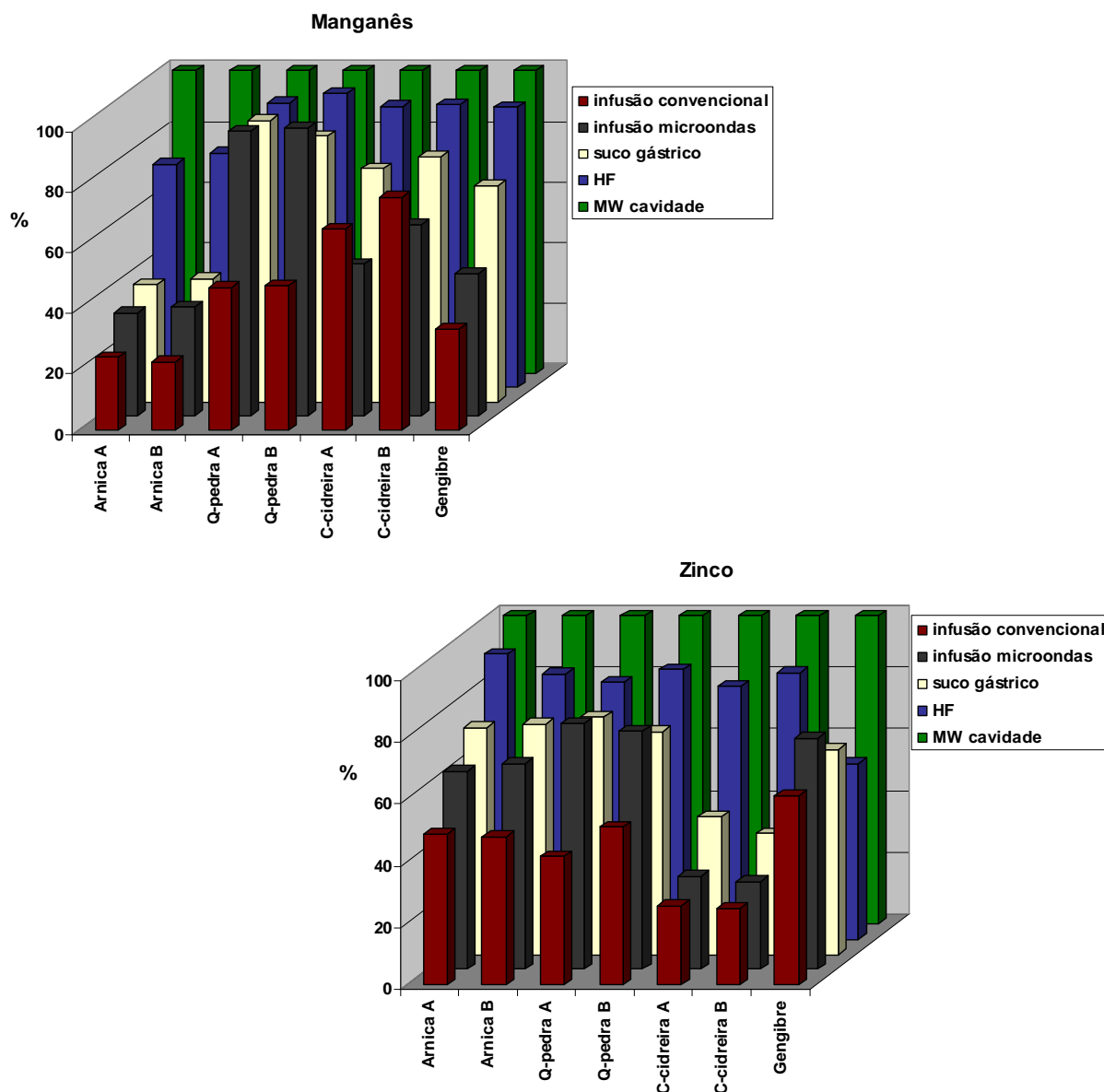


FIGURA 4.12. Eficiência de extração (%) para Al, Fe, Cu, Mn e Zn após diferentes procedimentos de preparo das amostras.

Os resultados obtidos após os procedimentos de infusão e simulação do suco gástrico foram amplamente discutidos anteriormente em 4.7.1 e 4.9 respectivamente, portanto, neste momento será explorada principalmente a influência do HF diluído na disponibilidade dos analitos.

Nas FIGURAS 4.12 nota-se que a eficiência de extração dos analitos, no geral segue a ordem: HF > suco gástrico > infusão em microondas caseiro > infusão convencional.

Algumas exceções foram encontradas, como o teor de Cu em gengibre e de Cu, Zn e Mn em quebra pedra B, que foram superiores quando a infusão foi preparada em microondas caseiro, comparado ao procedimento de extração com solução gástrica.

A extração com HF diluído aumentou a disponibilidade de Cu e Zn em quebra-pedra e gengibre comparada à infusão, mas arnica e capim-cidreira foram as que apresentaram maior acréscimo na extração desses elementos. A eficiência de extração de Cu e Zn em arnica aumentou em média 35%. Para Zn, em capim-cidreira, o aumento médio foi de 55%. Em capim cidreira, o aumento médio para o Cu foi de 45% e 65%, para a amostra A e B, respectivamente.

Para Mn o aumento, na eficiência de extração foi de 45 a 55% para a maioria das análises. Dentre os elementos, os valores mais significativos foram encontrados na quantificação de ferro extraído com HF comparado aos teores da infusão. Em arnica o incremento na eficácia de extração foi de 28 a 37%, em gengibre de 63 % e em quebra-pedra e capim-cidreira os valores foram acrescidos de 86 a 90%.

Para a infusão de Quebra-pedra (A e B) o Al não foi quantificado pela técnica de FAAS. No entanto, a utilização do HF diluído extraiu entre 72 e 81% de Al, quando comparado com os valores obtidos após digestão em forno de microondas com cavidade.

Esses resultados mostram que a interação de Cu, Mn e Zn com a matriz é menor comparada a interação de Fe e Al. Wieteska et al. em estudo de métodos de preparo para a determinação de elementos em plantas, testa diferentes procedimentos de extração e digestão da amostra. Nesse trabalho os autores comparam procedimentos com e sem a adição prévia do HF. Os resultados mostraram que para a determinação de teores totais de Ca, Zn, Mg, Cu, Pb e Cd, a adição de HF é desnecessária. Porém, a determinação do teor total de Fe e Al só foi obtida em procedimentos que utilizavam o HF. Os autores concluem que HF decompõem compostos Al-silício, liberando o Al para a solução de estudo. O HF solubiliza compostos de Fe de difícil dissolução, não necessariamente silicatos [86]. Dessa forma, conclui-se que procedimentos utilizando o ácido fluorídrico são úteis para garantir a solubilização de Al e Fe ligados à matriz silicatada e também à compostos de difícil solubilização.

Os procedimentos de extração propostos neste trabalho apresentaram dados significativos sobre a concentração de elementos essenciais e tóxicos, presentes em plantas medicinais e disponíveis para o homem. Procedimentos brandos de preparo de amostras são uma alternativa a procedimentos de digestão total, pois fornecem informações nutricionais.

Capítulo 5.
Conclusão

5. Conclusão

O estudo realizado para a determinação de elementos essenciais e tóxicos (Al, Cu, Fe, Mn e Zn) em ervas medicinais utilizando diferentes estratégias de pré-tratamento da amostra, como a digestão em forno de microondas com cavidade, infusão convencional, infusão em microondas caseiro, infusão sucessiva, extração com HF diluído e biodisponibilidade na solução simulada do suco gástrico, mostrou que a eficiência na extração dos analitos depende do meio extrator, da amostra e da interação de cada elemento com a matriz.

Os resultados obtidos para os diversos meios extratores sugerem que amostras e marcas distintas de plantas medicinais apresentam diferentes teores de Al, Fe, Mn e Zn. Cobre foi o elemento que apresentou maior similaridade entre as marcas (A e B) para todas as ervas medicinais e em todos os tratamentos de preparo das amostras.

O estudo por HCA separou as ervas em dois grandes grupos, quando foi aplicado aos dados da digestão total. O primeiro composto por ervas com baixo teor total de Cu e Zn (boldo, capim-cidreira, espinheira-santa e gengibre) e o outro, composto por ervas com alto teor total de Cu e Zn (alfavaca, arnica, camomila, chá verde e quebra-pedra).

A infusão em microondas caseiro foi mais eficiente que a convencional, quando o chá foi preparado com ervas de menores tamanho de partículas. O resultado é decorrente da melhor transferência de energia da radiação microondas, comparada ao aquecimento condutivo. A infusão das ervas mostrou que o gengibre, única raiz avaliada, foi a principal fonte de ferro, comparado aos demais chás.

Os dados gerados através da infusão fornecem informações nutricionais que permitem sugerir a ingestão de chá diariamente como uma fonte de Mn, um microelemento essencial para diversas atividades metabólicas. Altos teores de Al foram encontrados no chá verde, sendo sugerida cautela no seu consumo à pacientes com insuficiência renal.

O resultado obtido a partir da infusão sucessiva mostrou que a primeira infusão foi a mais significativa na extração dos analitos, na segunda infusão o

teor diminui bruscamente e mantém um declínio progressivo nas demais infusões, 3ª a 6ª. Assim como na infusão em uma única etapa, o Fe foi o elemento menos extraído na infusão sucessiva e o Mn foi o único elemento quantificado até a sexta e última infusão.

Os dados obtidos na extração com HF diluído demonstraram a forte interação de Fe e Al com a matriz, comparado aos demais elementos.

A solução simulada de suco gástrico apresentou os maiores teores extraíveis, depois da solução diluída de HF. Porém, estes resultados fornecem uma estimativa dos valores que são disponíveis ao trato digestivo quando as ervas são consumidas.

Os diversos procedimentos demonstraram que o Mn é o elemento mais facilmente extraído nos chás, com exceção do chá verde. Nas infusões, o Fe foi o elemento menos disponível em todas as ervas e o Al foi quantificado apenas na infusão do chá verde.

A eficiência de extração dos procedimentos investigados seguiu a ordem: microondas fechado > HF diluído > suco gástrico > infusão.

Os procedimentos de extração são uma alternativa aos drásticos procedimentos de digestão. Esses procedimentos são caracterizados pelo baixo custo, menor tempo de preparo e maior simplicidade, gerando resultados com boa precisão e exatidão.

Capítulo 6.

Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

- [1] YEMANE, M.; CHANDRAVANSI, B. S & WONDIMU, T. “Levels of essential and non-essential metals in leaves of the tea plant (*Camellia sinensis* L.) and soil of Wushwush farms, Ethiopia.” *Food Chemistry*, v. 107, p. 1236, 2008.
- [2] EDEN, T.; “The development of tea culture”. *Longman, London*, p. 1, 1958.
- [3] MONDAL, T. K.; BHATTACHARYA, A.; LAXMIKUMARAN, M & AHUJA, P. S. “Recent advances of tea (*Camellia sinensis*) biotechnology”. *Journal of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, v. 76, p 195, 2004
- [4] OMS- – Organização mundial de saúde
“Traditional Medicine”. Revisado em dezembro de 2008. Disponível em: www.OMS.int/mediacentre/factsheets, acessada em: 12/11/2009.
- [5] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA) Brasília, 20 de abril de 2006 - 15h30 Apresentações sobre fitoterápicos e plantas medicinais. Disponível em: WWW.anvisa.gov.com.br, acessada em: 10/05/2009.
- [6] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância sanitária (ANVISA) Brasília, 22 de setembro de 2005. Disponível em: WWW.anvisa.gov.com.br, acessado em: 20/11/2009.
- [7] MEHRA, A & BAKER, C.L. “Leaching and bioavailability of aluminium, copper and manganese from tea (*Camellia sinensis*)”. *Food Chemistry*, v. 100, p. 1456, 2007.
- [8] YAMASHITA, C. I. “Estudo sobre os constituintes inorgânicos presentes em diferentes espécies da planta medicinal do gênero *Casearia* coletada em

regiões distintas da Mata Atlântica”. São Paulo. *Instituto de Pesquisas energéticas e nucleares*. Dissertação de mestrado. 2006.

[9] KUMAR, A.; NAIR, A. G. C.; REDDY, A. V. R & GARG, A. N. “Availability of essential elements in Indian and US tea brands”. *Food Chemistry*, v. 89, p. 441, 2005.

[10] JIN, C. W.; DU, S. T.; ZHANG, K & LIN, X.; Y. “Factors determining copper concentration in tea leaves produced at Yuyao County, China”. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 2054, 2008.

[11] DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H & REIS, M. S. “Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest”. *Fitoterapia*, v. 73, p. 69, 2002.

[12] MARTINS, M. D.; MARQUES, M. M.; BUSSADORI, S. K.; FERRARI, M. R. A.; PAVESI, V. C. S.; WADT, N, S & FERNANDES, K. P. “Citotoxicidade in vitro de extratos de arnica brasileira (*solidago microglossa*) e arnica paulista (*porophyllum ruderale*)”. *Conscientiae Saúde*, v. 8, p. 99, 2009.

[13] SHARANGI, A. B. “Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.) – A review”. *Food Research International* , v. 42, p 529, 2009.

[14] MALIK , J.; SZAKOVÁ, J.; DRABEK, O.; BALIK, J & KOKOSKA, L. “Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions”. *Food Chemistry*, v. 111, p. 520, 2008.

[15] SVEHLIKOVA, V.; BENNETT, R. N.; MELLON, F.A.; NEEDS, P. W.; PIACENTE, S.; KROON, P. A & BAO, Y. “ Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* [L.] Rauschert)”. *Phytochemistry*, v. 65, p.2323, 2004.

- [16] HERNAN, S & BRUCE, K. "Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development". *Pharmacological Research*, v. 29, p. 1, 1994.
- [17] JORGE, R. M.; LEITE, J. P.V.; OLIVEIRA, A. B & TAGLIATI, C. A. "Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*". *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, p.93, 2004.
- [18] TELCI, I.; BAYRAM, E.; YILMAZ, G & AVCI, B.; "Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.)". *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 34, p. 489, 2006.
- [19] GRAYER, R. J.; BRYAN, S. E.; VEITCH, N. C.; GOLDSTONE, F. J.; PATON, A & WOLLENWEBER, E. " External flavones in sweet basil, *Ocimum basilicum* and related taxa". *Phytochemistry*, v. 43, p. 1041, 1996.
- [20] HARISH, R & SHIVANANDAPPA, T. "Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*". *Food Chemistry*, v. 95, p. 180, 2006.
- [21] ALI, B. H.; BLUNDEN, G.; TANIRA, M. O & NEMMAR, A. "Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe): A review of recent research". *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p 409, 2008.
- [22] BRYER, E. "A Literature Review of the Effectiveness of Ginger in Alleviating Mild-to-Moderate Nausea and Vomiting of Pregnancy". *Journal of Midwifery & Women's Health*, v. 50, 2005.
- [23] FIGUEIRINHA. A.; PARANHOS, A.; PÉREZ-ALONSO, J. J; SANTOS-BUELGA, C & BATISTA, M. T. "Cymbopogon citratus leaves: Characterisation of flavonóides by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols". *Food Chemistry*, v. 110, p. 718, 2008.

[24] LÉSNIEWICZ, A.; JAWORSKA, K & ZYRNICKI, W. "Macro- and micro-nutrients and their bioavailability in polish herbal medicaments". *Food Chemistry*, v. 99, p. 670, 2006.

[25] HAMDAOUI, M. H.; CHABCHOUB, S & HÉDHILI, A. "Iron bioavailability and weight gains to iron-deficient rats fed a commonly consumed Tunisian meal bean seeds ragout' with or without beef and with green or black tea decoction". *Journal of Trace Element in Medicine and Biology*, v. 17, p. 159, 2003.

[26] VALENTI, L.; GUIDO, M.; DONGIOVANNI, P.; CREMONESI, L.; FRACANZANI, A.L & FARGION, S. "Ferroportin-1 in the recurrence of hepatic iron overload after liver transplantation". *Digestive and Liver Disease*, v. 41, p.17, 2009.

[27] DEUGNIER, Y.; BRISSOT, P & LORÉAL, O. "Iron and the liver: Update 2008". *Journal of Hepatology*, v. 48, p 113, 2008.

[28] NATOLI, M.; FELSANI. A.; FERRUZZA, S.; SAMBUY, Y. CANALI, R & SCARINO, M. L. "Mechanisms of defence from Fe(II) toxicity in human intestinal Caco-2 cells". *Toxicology in Vitro*, v. 23, p. 1510, 2009.

[29] ANDRADE, E. C. B.; ALVES, S. P & TAKASE, I. "Avaliação do uso de ervas medicinais como suplemento nutricional de ferro, cobre e zinco". *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 25, p. 591, 2005.

[30] ZALEWSKI, P. D.; TRUONG-TRAN, AI Q.; GROSSER, D.; JAYARAM, L.; MURGIA, C & RUFFIN, R. E. " Zinc metabolism in airway epithelium and airway inflammation: basic mechanisms and clinical targets. A review". *Pharmacology & Therapeutics*, v. 105, p. 127, 2005.

[31] TOMAT, A. L.; COSTA, M. A.; GIRGULSKY, L. C.; VEIRAS, L.; EISSTAUB A. R.; INSERRA, F.; BALASZCZUK, A. M & ARRANZ ,C. T. "Zinc deficiency during growth: Influence on renal function and morphology". *Life Sciences*, v. 80, p. 1292, 2007.

[32] PEDROSA, L. F. C & COZZOLINO, S. M. F.; “Efeito da suplementação com ferro na biodisponibilidade de zinco em uma dieta regional do nordeste do Brasil”. *Revista Saúde Pública*, v. 27, 1993.

[33] VALBERG, L. S.; FLANAGAN, P. R & CHAMBERLAIN, M. J.; “Effects of iron, tin, and copper on zinc absorption in humans”; *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 40, p. 536, 1984.

[34] MICHALKE, B. “Manganese speciation using capillary electrophoresis–ICP-mass spectrometry”. *Journal of Chromatography A*, v. 1050, p. 69, 2004.

[35] ASCHNER, M.; GUILARTE, T. R.; SCHNEIDER, J. S & ZHENG, W. “Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity”. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 221, p. 131, 2007.

[36] GARCIA, S. C.; GIODA, A & NASCIMENTO, B. D. “O problema da contaminação na determinação de traços de alumínio.” *Química Nova*, v. 20, 407-411.

[37] FLATEN, T. P. “Aluminium in tea concentrations, speciation and bioavailability”. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 228, p. 385, 2002.

[38] DOMINGO, J. L. “Reproductive and Developmental Toxicity of Aluminum: A Review”. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 17, p. 515, 1995.

[39] AJASA, A M. O.; BELLO, M. O.; IBRAHIM, A. O.; OGUNWANDE, I. A & OLAWORE, N. O.; “Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants of Nigeria”; *Food Chemistry*, v. 85, p. 67, 2004.

[40] MARKERT, B. “Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices”. *The Science of the Total Environment*, v. 176, p. 45, 1995.

- [41] QUEVAUVILLER, P. H. "Conclusions of the workshop - improvements of trace element determinations in plant matrices". *The Science of the Total Environment*, v.176, p. 141, 1995.
- [42] OLIVEIRA, E. "Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends". *Journal of the Brazilian Chemical society*, v. 14, No. 2, p. 174, 2003.
- [43] YAMASHITA, C.I.; SAIKI, M.; VASCONCELLOS, M.B.A & SERTIÉ, J.A.A. "Characterization of trace elements in Casearia medicinal plant by neutron activation analysis". *Applied Radiation and Isotopes*, v. 63, p. 841, 2005.
- [44] MARGUÍ, E.; HIDALGO, M & QUERALT, I. "Multielemental fast analysis of vegetation samples by wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry: Possibilities and drawbacks". *Spectrochimica Acta Part B*, v. 60, p. 1363, 2005.
- [45] HOENING, M & KERSABIEC, A. M. "Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status". *Spectrochimica Acta Part B*, v. 51, p. 1297, 1996.
- [46] FUNG, K. F.; ZHANG, Z. Q.; WONG, J. W. C & WONG, M. H. "Aluminium and fluoride concentrations of three tea varieties growing at Lantau Island, Hong Kong". *Environmental Geochemistry and Health*, v. 25, p. 219, 2003.
- [47] BASGEL, S & ERDEMOGLU, S. B. "Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey". *Science of the Total Environment*, v. 359, p. 82, 2006.
- [48] KALNY, P.; FIJALEK, Z.; DASZCZUK, A & Ostapczuk, P.; "Determination of selected microelements in polish herbs and their infusions"; *Science of the Total Environment*, v. 381, p. 99, 2007.
- [49] VIEIRA, E. C; KAMOGAWA, Y. M.; LEMOS, S. G.; NÓBREGA, A. J & NOGUEIRA, A. R. A. "Decomposição de amostras de solos assistida por

radiação microondas: estratégias para evitar formação de fluoretos insolúveis”. *Revista Brasileira de Ciências do solo*, v. 29, p. 547-553, 2005.

[50] SANDRONI, V.; SMITH, C. M.M & DONOVAN, A.; “Microwave digestion of sediment, soils and urban particulate matter for trace metal analysis”; *Talanta*, v. 60, p. 715, 2003.

[51] MELO V. F.; RIBEIRO A. N.; MASCHIO P. A.; CORRÊA G. F. & LIMA V. C. “Mineralogia e formas de potássio e magnésio em diferentes classes de pesos e tamanhos da fração areia de solos do triângulo”. *Revista Brasileira de Ciências do solo*, v. 28, p. 219-231, 2004.

[52] HOENING, M.; NHENTENRIJK, S.; VASSILEVA, E & QUEVAUVILLER, PH. “Critical discussion on the need for an efficient mineralization procedure for the analysis of plant material by atomic spectrometric methods”. *Analytica Chimica Acta*, v. 358, p. 85, 1998.

[53] Sociedade Brasileira de Nutrição (SBAN). Reprodução da cartilha Política Nacional de Alimentação e nutrição, Ministério da Saúde, Brasília/ DF-2003. Disponível em: www.sban.com.br/glossario, acessada em: 29/08/2009.

[54] ELLESS, M. P.; BLAYLOCK, MI. J.; HUANG, J. W & CHRISTOPHER, G. D. “Plants as a natural source of concentrated mineral nutritional supplements”. *Food Chemistry*, v. 71, p. 181, 2000.

[55] ARRUDA, M. A. Z & SANTELLI, R. E. “Mecanização no preparo de amostras por microondas: o estado da arte”. *Química Nova*, v. 20, p. 638, 1997.

[56] MAGALHÃES, R. S.; LIMA, R. M. F & SOUZA, H. A. “O uso de microondas para determinação de umidade de bauxita”. *Revista Escola de Minas*, v. 56, p. 255, 2003.

- [57] ROSINI, F.; NASCENTES, C. C. & NÓBREGA, J. A. “Experimentos didáticos envolvendo radiação microondas”. *Química Nova*, v. 27, p. 1012, 2004.
- [58] BARBOZA, A. C. R. N.; CRUZ, C. V. M. S.; GRAZIANI, M. B.; LORENZETTI, M. C. F & SABADINI, E. “Aquecimento em forno de microondas / desenvolvimento de alguns conceitos fundamentais”. *Química Nova*, v. 24, p. 901, 2001.
- [59] NOGUEIRA, A. R.; FLORES, E. M. M.; KRUG, F. G.; KNAPP, G.; NÓBREGA, J. A & BARIN, J. S. Capítulo cinco do livro de métodos de decomposição de amostras. Apostila disponível em: www.web.cena.usp.br/apostilas/krug/Microondas, acessada: 12/10/2009.
- [60] THOSTENSON, E. T & CHOU, T. W. “Microwave processing: fundamentals and applications”. *Composites: Part A*, v. 30, p. 1055, 1999.
- [61] SMITH, F. E & ARSENAULT, E. A. “Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry”. *Talanta*, v. 43, p. 1207, 1996.
- [62] Grupo de Análise instrumental aplicada (GAIA) Departamento de Química Universidade Federal de São Carlos e Embrapa Pecuária Sudeste. “Preparo de amostras por radiação microondas: uma compilação de procedimentos da literatura”. Disponível em: www.ufscar.br/dq-gaia/images_2007/Procedimentos.pdf, acessada em: 15/10/2009.
- [63] QUARESMA, M. C. B.; CASSELLA, R. J.; GUARDIÃ, M. de La; SANTELLI, R. E.; “Rapid on-line sample dissolution assisted by focused microwave radiation for silicate analysis employing flame atomic absorption spectrometry: iron determination”; *Talanta*, v. 62, p. 807, 2004.
- [64] 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*, v. 57, p. 1855, 2002.

[65] COSTA, L.M.; SILVA, F.V.; GOUVEIA, S.T.; NOGUEIRA, A. R. A & NÓBREGA, J.A. “Focused microwave-assisted acid digestion of oils: an evaluation of the residual carbon content”. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 56, p. 1981, 2001.

[66] SORIANO, S. “Avaliação de diferentes estratégias para o tratamento de amostras de suplementos multivitamínicos/multiminerais visando a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS”. Niterói. *Universidade Federal Fluminense*. Dissertação de mestrado, 2006.

[67] SOYLAK, M.; TUZEN, M.; SOUZA, A. S.; KORN M. G. A & FERREIRA S. L. C. “Optimization of microwave assisted digestion procedure for the determination of zinc, copper and nickel in tea samples employing flame atomic absorption spectrometry”. *Journal of Hazardous Materials*, v. 149, p. 264, 2007.

[68] COSTA, L. M.; SANTOS, D. C. M. B.; HATJE. V.; NÓBREGA, J. A & KORN, M. G. A. “Focused-microwave-assisted acid digestion: Evaluation of losses of volatile elements in marine invertebrate samples”. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 22, p. 238, 2009.

[69] ARAÚJO, G. C.L.; GONZALEZA, 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*, v. 57, p. 2121, 2002.

[70] Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial *INMETRO*. Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos. (2006), revisado (2007).

[71] www.iupac.org, acessada em fevereiro de 2010.

[72] SKOOG, D. A. “Princípios de análise instrumental”. Quinta Ed., editora Bookman.

- [73] KARA, D. "Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis". *Food Chemistry*, v. 114, p. 347. 2009.
- [74] STREET, R.; DRÁBEK, O.; SZÁKOVÁ, J & MLÁDKOVÁ, L. "Total content and speciation of aluminium in tea leaves and tea infusions". *Food Chemistry*, v. 104, p. 1662, 2007.
- [75] SANTOS, H. C.; FRAGA, V. S.; RAPOSO, R. W. C & PEREIRA, W. E.; "Cu e Zn na cultura do sorgo cultivado em três classes de solos"; *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 13, p. 125, 2009.
- [76] Ozcan, M. M.; Unver, A.; Uçar, T & Arslan, D. "Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction". *Food Chemistry*, v. 106, p. 1120, 2008.
- [77] ODEGÅRD, K. E & LUND, W. "Multi-element Speciation of tea infusion using cation-exchange separation and size-exclusion chromatography in combination with Inductively coupled plasma mass". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, v. 12, p. 403-408, 1997.
- [78] KINGSTON, H. M. & HASWELL, S.J. "Microwave-Enhanced Chemistry: Fundamentals, Sample Preparation and Applications, primeira ed., *American Chemical Society, Washington*, 1997.
- [79] BORUVCK, L.; VACEK, O.; JEHLICKA, J.; "Principal component analysis as a tool to indicate the origin of potentially toxic elements in soils"; *Geoderma*, v. 128, p. 289, 2005.
- [80] FRENCH, P.; GARDNER, M. J.; GUNN, A. M.; "Dietary aluminium and alzheimer's disease". *Food chemistry toxicology*, v. 27, p. 495, 1989.
- [81] MOGHADDAM, M. A.; MAHVI, A. H.; ASGARI, A. R.; YONESIAN, M.; JAHED, G. H.; NAZMARA, S. H.; "Determination of aluminum and zinc in

Iranian consumed tea”; *Environmental monitoring assessment*, v. 144, p. 23, 2008.

[82] ANDRADE, E. C. B.; ALVES, S. P.; TAKASE, I.; “Extração sequencial de cobre, ferro e zinco em ervas medicinais”; *Ciência e Tecnologia de Alimentos*; v. 25, p. 844, 2005.

[83] ANDRADE, E. C. B.; TEODORO, A. J. ; TAKASE, I.; “Determinação dos teores de zinco em diferentes extratos de hortaliças dos tipos A e B”; *Ciência e Tecnologia de Alimentos*; v. 25, p. 265, 2005.

[84] GUYTON, A. C. “Tratado de Fisiologia Médica”. Oitava Ed., Universidade de Medicina do Mississippi, 1991.

[85] BOSSO, S. T. & ENZWEILER, J. “Ensaio para determinar a (bio)disponibilidade de Chumbo em solos contaminados: revisão”. *Química Nova*, v. 31, No. 2, p. 394, 2008.

[86] WIETESKA, E.; ZIÓEK, A & DRZEWIŃSKA, A. “Extraction as a method for preparation of vegetable sample for determination of trace metals by atomic absorption spectrometry”. *Analytica Chimica Acta*, v. 330, p. 251, 1996.

Anexos

TABELA A.1. Concentração dos metais disponíveis na infusão convencional, para tamanho de partícula < 63 µm.

	Al (µg g ⁻¹)	Cu (µg g ⁻¹)	Fe (µg g ⁻¹)	Mn (µg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)
Boldo A	< LQ	2,37 ± 0,11	4,53 ± 0,08	21,4 ± 1,5	6,37 ± 0,48
Boldo B	< LQ	1,93 ± 0,02	3,14 ± 0,06	19,7 ± 0,6	4,03 ± 0,23
Chá verde A	277 ± 13	3,93 ± 0,07	5,20 ± 0,07	259 ± 8	10,4 ± 0,2
Chá verde B	399 ± 7	2,45 ± 0,03	7,41 ± 0,08	20,5 ± 0,8	9,59 ± 0,16
Capim Cidreira A	< LQ	2,27 ± 0,11	5,88 ± 0,38	63,7 ± 2,5	5,25 ± 0,40
Capim Cidreira B	< LQ	1,77 ± 0,13	5,62 ± 1,40	90,9 ± 8,3	5,58 ± 0,53
Camomila A	< LQ	3,01 ± 0,04	5,93 ± 0,83	84,3 ± 3,6	11,0 ± 0,6
Camomila B	< LQ	5,48 ± 0,52	0,52 ± 0,13	23,5 ± 1,0	10,3 ± 0,4
Quebra pedra A	< LQ	4,02 ± 0,24	5,49 ± 0,30	50,2 ± 1,5	7,26 ± 0,89
Quebra pedra B	< LQ	2,87 ± 0,11	4,46 ± 0,17	83,2 ± 6,9	16,7 ± 1,0
Alfavaca A	< LQ	7,80 ± 0,54	8,45 ± 0,45	8,98 ± 0,55	6,48 ± 0,98
Alfavaca B	< LQ	7,09 ± 0,56	7,88 ± 0,56	11,8 ± 0,4	5,26 ± 0,29
Arnica A	< LQ	6,40 ± 0,53	2,12 ± 0,08	232 ± 9	17,1 ± 0,5
Arnica B	< LQ	6,40 ± 0,27	2,52 ± 0,14	173 ± 8	16,2 ± 0,2
Espinheira Santa A	< LQ	2,62 ± 0,29	1,15 ± 0,06	79,1 ± 5,6	4,96 ± 0,96
Espinheira Santa B	< LQ	3,77 ± 0,23	5,60 ± 0,15	61,3 ± 3,6	3,89 ± 0,69
Gengibre	< LQ	5,40 ± 0,34	15,2 ± 0,4	22,5 ± 2,0	5,51 ± 0,68

TABELA A.2. Concentração dos metais disponíveis na infusão em microondas caseiro, para tamanho de partícula < 63 µm.

	Al (µg g ⁻¹)	Cu (µg g ⁻¹)	Fe (µg g ⁻¹)	Mn (µg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)
Boldo A	< LQ	3,15 ± 0,11	11,3 ± 0,5	27,8 ± 1,65	3,89 ± 0,48
Boldo B	< LQ	2,84 ± 0,26	7,96 ± 0,40	11,9 ± 0,8	3,32 ± 0,33
Chá verde A	388 ± 12	5,69 ± 0,30	9,40 ± 0,47	268 ± 1	9,20 ± 0,76
Chá verde B	382 ± 13	4,66 ± 0,18	7,91 ± 0,08	31,0 ± 0,3	6,64 ± 0,65
Capim Cidreira A	< LQ	1,76 ± 0,22	3,09 ± 0,54	48,2 ± 0,7	6,26 ± 0,32
Capim Cidreira B	< LQ	1,18 ± 0,18	4,39 ± 0,39	74,6 ± 2,78	6,38 ± 0,12
Camomila A	< LQ	2,56 ± 0,18	14,7 ± 1,1	46,4 ± 1,1	15,4 ± 0,7
Camomila B	< LQ	3,05 ± 0,33	13,9 ± 1,2	29,5 ± 0,6	11,4 ± 0,6
Quebra pedra A	< LQ	4,48 ± 0,24	9,73 ± 0,12	100 ± 5	14,0 ± 0,6
Quebra pedra B	< LQ	3,71 ± 0,23	14,2 ± 1,1	166 ± 1	25,3 ± 0,3
Alfavaca A	< LQ	10,1 ± 0,5	8,02 ± 0,50	15,2 ± 0,8	11,9 ± 1,3
Alfavaca B	< LQ	9,37 ± 0,67	7,67 ± 0,50	10,8 ± 0,3	4,91 ± 0,40
Arnica A	< LQ	7,17 ± 0,57	7,38 ± 0,02	329 ± 9	22,5 ± 1,0
Arnica B	< LQ	6,96 ± 0,33	8,35 ± 0,51	276 ± 4	22,5 ± 1,8
Espinheira Santa A	< LQ	2,13 ± 0,06	13,7 ± 0,1	159 ± 5	8,39 ± 0,53
Espinheira Santa B	< LQ	3,84 ± 0,14	13,7 ± 0,8	169 ± 6	8,39 ± 0,91
Gengibre	< LQ	7,07 ± 0,27	18,3 ± 0,6	31,6 ± 0,9	6,75 ± 0,14

TABELA A.3. Concentração dos metais disponíveis na infusão convencional, para tamanho de partícula > 63 µm.

	Al (µg g ⁻¹)	Cu (µg g ⁻¹)	Fe (µg g ⁻¹)	Mn (µg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)
Boldo A	< LQ	2,15 ± 0,11	3,11 ± 0,31	40,2 ± 2,4	6,11 ± 0,20
Boldo B	< LQ	1,63 ± 0,01	2,57 ± 0,01	14,4 ± 0,4	4,65 ± 0,44
Chá verde A	317 ± 5	2,51 ± 0,04	4,75 ± 0,38	280 ± 5	9,43 ± 0,41
Chá verde B	185 ± 11	2,16 ± 0,02	5,50 ± 0,37	29,9 ± 1,1	6,39 ± 0,21
Capim					
Cidreira A	< LQ	1,85 ± 0,07	4,60 ± 0,65	83,3 ± 1,1	6,12 ± 0,21
Capim					
Cidreira B	< LQ	1,31 ± 0,02	5,32 ± 0,40	100 ± 1	5,93 ± 0,42
Camomila A	< LQ	3,44 ± 0,04	7,63 ± 0,58	39,9 ± 1,2	9,89 ± 0,30
Camomila B	< LQ	4,82 ± 0,12	1,02 ± 0,10	16,5 ± 0,9	8,23 ± 0,33

TABELA A.4. Concentração dos metais disponíveis na infusão em microondas caseiro, para tamanho de partícula > 63 µm.

	Al (µg g ⁻¹)	Cu (µg g ⁻¹)	Fe (µg g ⁻¹)	Mn (µg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)
Boldo A	< LQ	2,65 ± 0,18	11,9 ± 0,2	21,6 ± 0,8	4,33 ± 0,07
Boldo B	< LQ	2,58 ± 0,05	13,2 ± 0,03	7,97 ± 0,64	3,03 ± 0,37
Chá verde A	320 ± 13	4,06 ± 0,03	17,1 ± 0,2	231 ± 1	7,17 ± 0,41
Chá verde B	278 ± 9	3,17 ± 0,05	8,18 ± 0,54	28,7 ± 0,9	7,30 ± 0,57
Capim					
Cidreira A	< LQ	1,26 ± 0,08	3,28 ± 0,66	74,1 ± 0,5	6,35 ± 0,41
Capim					
Cidreira B	< LQ	0,663 ± 0,093	3,41 ± 0,50	92,1 ± 1,4	5,90 ± 0,30
Camomila A	< LQ	2,54 ± 0,10	12,3 ± 0,2	23,1 ± 0,1	10,6 ± 0,3
Camomila B	< LQ	2,56 ± 0,16	12,1 ± 0,2	19,8 ± 1,8	8,41 ± 0,56

TABELA A.5. Concentração dos metais disponíveis nas infusões sucessivas em procedimento convencional para tamanho de partícula > 63 µm.

	Al (µg g ⁻¹)	Cu (µg g ⁻¹)	Fe (µg g ⁻¹)	Mn (µg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)
1ª Verde A	362 ± 6	2,57 ± 0,10	4,05 ± 0,06	260 ± 17	8,97 ± 0,12
2ª Verde A	143 ± 6	0,411 ± 0,008	0,944 ± 0,042	66,6 ± 1,6	1,51 ± 0,01
3ª Verde A	109 ± 11	0,358 ± 0,020	0,555 ± 0,015	37,8 ± 3,4	1,16 ± 0,02
4ª Verde A	83,3 ± 9,4	< LD	0,435 ± 0,052	28,8 ± 0,5	1,09 ± 0,01
5ª Verde A	45,5 ± 5,0	< LD	< LD	13,6 ± 0,9	0,714 ± 0,004
6ª Verde A	25,0 ± 0,9	< LD	< LD	8,99 ± 1,08	< LD
Extrato	389 ± 16	8,34 ± 1,26	112 ± 3	163 ± 5	19,4 ± 1,2
Total	1156	11,7	118	579	32,8
1ª Verde B	215 ± 10	2,21 ± 0,09	8,75 ± 0,14	21,7 ± 1,0	6,40 ± 0,20
2ª Verde B	77,4 ± 1,3	0,534 ± 0,071	1,55 ± 0,16	5,58 ± 0,26	1,61 ± 0,15
3ª Verde B	45,3 ± 0,8	0,330 ± 0,009	0,420 ± 0,029	3,83 ± 0,19	0,943 ± 0,030
4ª Verde B	34,7 ± 1,6	0,324 ± 0,028	0,409 ± 0,093	2,99 ± 0,09	0,870 ± 0,065
5ª Verde B	27,8 ± 0,8	0,284 ± 0,012	0,399 ± 0,025	2,40 ± 0,16	0,609 ± 0,011
6ª Verde B	22,2 ± 0,4	< LD	0,379 ± 0,012	2,05 ± 0,03	0,613 ± 0,005
Extrato	702 ± 2	12,8 ± 0,7	176 ± 4	94,5 ± 2,8	25,3 ± 1,1
Total	1125	16,5	188	133	36,3
1ª Arnica A	< LD	3,55 ± 0,09	2,50 ± 0,14	201 ± 5	12,1 ± 0,7
2ª Arnica A	< LD	0,813 ± 0,041	0,864 ± 0,027	56,4 ± 3,3	2,87 ± 0,03
3ª Arnica A	< LD	0,507 ± 0,046	0,623 ± 0,038	47,0 ± 2,2	2,06 ± 0,02
4ª Arnica A	< LD	< LD	0,409 ± 0,027	25,1 ± 1,0	1,35 ± 0,07
5ª Arnica A	< LD	< LD	0,329 ± 0,024	19,9 ± 1,2	1,14 ± 0,09
6ª Arnica A	< LD	< LD	< LD	16,0 ± 0,7	0,895 ± 0,082
Extrato	261 ± 3	6,51 ± 0,35	1304 ± 53	515 ± 20	20,6 ± 1,9
Total	261	11,4	1309	881	41,0
1ª Arnica B	< LD	3,53 ± 0,11	3,22 ± 0,06	134 ± 5	9,73 ± 0,54
2ª Arnica B	< LD	0,880 ± 0,016	1,16 ± 0,11	38,9 ± 2,4	2,42 ± 0,15
3ª Arnica B	< LD	0,739 ± 0,020	0,911 ± 0,062	34,2 ± 2,1	2,00 ± 0,17
4ª Arnica B	< LD	0,645 ± 0,008	0,688 ± 0,040	30,0 ± 0,8	1,60 ± 0,03
5ª Arnica B	< LD	0,528 ± 0,079	0,463 ± 0,007	22,5 ± 2,5	1,03 ± 0,05
6ª Arnica B	< LD	0,369 ± 0,006	0,395 ± 0,012	17,8 ± 1,3	0,669 ± 0,049
Extrato	207 ± 10	4,61 ± 0,76	1976 ± 82	497 ± 23	23,4 ± 0,8
Total	207	11,3	1982	774	40,9

TABELA A.6. Concentração dos metais extraídos nas infusões sucessivas em procedimento convencional para tamanho de partícula < 63 µm.

	Al (µg g ⁻¹)	Cu (µg g ⁻¹)	Fe (µg g ⁻¹)	Mn (µg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)
1ª Verde A	354 ± 3	3,62 ± 0,26	6,29 ± 0,47	247 ± 4	9,59 ± 0,39
2ª Verde A	75,6 ± 4,2	0,380 ± 0,010	0,569 ± 0,100	56,9 ± 3,7	1,86 ± 0,12
3ª Verde A	35,1 ± 1,5	0,250 ± 0,017	0,399 ± 0,049	34,4 ± 1,6	1,15 ± 0,21
4ª Verde A	< LD	< LD	< LD	13,7 ± 1,4	0,718 ± 0,202
5ª Verde A	< LD	< LD	< LD	11,9 ± 1,4	< LD
6ª Verde A	< LD	< LD	< LD	8,90 ± 1,31	< LD
Extrato	633 ± 11	11,8 ± 1,4	115 ± 3	189 ± 9	25,2 ± 0,6
Total	1097	16,1	123	562	38,5
1ª Verde B	414 ± 7	2,09 ± 0,08	8,75 ± 0,56	29,2 ± 0,7	8,98 ± 0,44
2ª Verde B	77,6 ± 5,0	0,298 ± 0,003	1,45 ± 0,40	6,23 ± 0,19	1,81 ± 0,15
3ª Verde B	50,3 ± 1,9	< LD	0,822 ± 0,008	4,75 ± 0,23	1,26 ± 0,01
4ª Verde B	< LD	< LD	0,818 ± 0,009	3,17 ± 0,21	0,682 ± 0,146
5ª Verde B	< LD	< LD	0,342 ± 0,026	1,63 ± 0,10	< LD
6ª Verde B	< LD	< LD	0,297 ± 0,027	1,20 ± 0,04	< LD
Extrato	601 ± 3	12,3 ± 0,7	160 ± 3	100 ± 3	25,3 ± 0,1
Total	1143	14,7	172	146	38,0
1ª Arnica A	< LD	5,55 ± 0,13	3,07 ± 0,21	248 ± 7	16,7 ± 0,2
2ª Arnica A	< LD	1,46 ± 0,01	1,06 ± 0,10	58,8 ± 2,6	4,03 ± 0,15
3ª Arnica A	< LD	1,06 ± 0,08	0,874 ± 0,033	49,6 ± 2,7	3,10 ± 0,13
4ª Arnica A	< LD	0,889 ± 0,004	0,701 ± 0,012	29,8 ± 1,0	1,85 ± 0,05
5ª Arnica A	< LD	0,535 ± 0,050	0,484 ± 0,050	12,0 ± 1,0	1,42 ± 0,06
6ª Arnica A	< LD	0,242 ± 0,018	< LD	7,64 ± 0,38	1,15 ± 0,02
Extrato	247 ± 0,3	4,25 ± 0,28	1336 ± 37	496 ± 22	17,7 ± 1,9
Total	247	14,0	1342	902	46,0
1ª Arnica B	< LD	5,85 ± 0,14	3,94 ± 0,27	174 ± 8	16,0 ± 0,5
2ª Arnica B	< LD	1,15 ± 0,02	0,938 ± 0,153	83,3 ± 6,3	4,50 ± 0,10
3ª Arnica B	< LD	0,782 ± 0,030	0,596 ± 0,014	29,2 ± 1,9	2,33 ± 0,26
4ª Arnica B	< LD	0,589 ± 0,024	0,376 ± 0,028	13,5 ± 1,1	1,23 ± 0,04
5ª Arnica B	< LD	0,312 ± 0,049	< LD	10,8 ± 0,5	0,917 ± 0,114
6ª Arnica B	< LD	< LD	< LD	8,39 ± 1,09	< LD
Extrato	265 ± 4	3,12 ± 0,04	2074 ± 134	438 ± 21	16,6 ± 0,7
Total	265	11,8	2080	757	41,5

TABELA A.7. Concentração dos metais extraídos nas infusões sucessivas em microondas caseiro para tamanho de partícula > 63 µm.

	Al (µg g ⁻¹)	Cu (µg g ⁻¹)	Fe (µg g ⁻¹)	Mn (µg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)
1ª Verde A	446 ± 17	3,82 ± 0,13	8,63 ± 0,54	236 ± 4	8,66 ± 0,16
2ª Verde A	141 ± 6	0,810 ± 0,032	1,42 ± 0,18	67,3 ± 1,7	3,26 ± 0,12
3ª Verde A	53,6 ± 4,4	0,580 ± 0,040	0,948 ± 0,029	26,1 ± 1,6	1,27 ± 0,09
4ª Verde A	23,3 ± 1,2	0,400 ± 0,062	< LD	17,8 ± 0,9	0,724 ± 0,033
5ª Verde A	< LD	0,108 ± 0,021	< LD	14,7 ± 1,1	0,433 ± 0,009
6ª Verde A	< LD	< LD	< LD	7,95 ± 0,40	0,315 ± 0,014
Extrato	494 ± 7	9,35 ± 0,20	128 ± 4	144 ± 5	22,0 ± 1,5
Total	1157	15,1	139	560	38,7
1ª Verde B	351 ± 2	2,53 ± 0,09	12,0 ± 0,2	33,7 ± 1,4	9,78 ± 0,80
2ª Verde B	138 ± 7	0,593 ± 0,041	4,57 ± 0,23	9,23 ± 0,37	3,54 ± 0,35
3ª Verde B	50,0 ± 1,4	0,326 ± 0,031	2,00 ± 0,24	4,82 ± 0,63	1,25 ± 0,38
4ª Verde B	23,3 ± 1,2	0,152 ± 0,012	1,36 ± 0,28	2,94 ± 0,61	0,521 ± 0,070
5ª Verde B	< LD	0,105 ± 0,029	< LD	1,45 ± 0,15	0,308 ± 0,025
6ª Verde B	< LD	< LD	< LD	0,938 ± 0,032	< LD
Extrato	622 ± 5	12,0 ± 0,4	164 ± 2	92,9 ± 1,6	17,4 ± 0,5
Total	1185	15,7	184	136	32,8
1ª Arnica A	< LD	4,50 ± 0,26	4,70 ± 0,60	234 ± 6	14,8 ± 0,5
2ª Arnica A	< LD	0,635 ± 0,031	1,80 ± 0,06	55,6 ± 3,6	3,10 ± 0,31
3ª Arnica A	< LD	0,408 ± 0,051	< LD	32,2 ± 1,6	2,00 ± 0,16
4ª Arnica A	< LD	0,140 ± 0,037	< LD	18,6 ± 1,2	1,47 ± 0,06
5ª Arnica A	< LD	0,081 ± 0,01	< LD	13,8 ± 0,3	1,11 ± 0,06
6ª Arnica A	< LD	< LD	< LD	6,96 ± 0,43	0,892 ± 0,040
Extrato	201 ± 3	6,89 ± 0,32	1381 ± 88	605 ± 19	18,3 ± 1,0
Total	201	12,7	1388	966	41,7
1ª Arnica B	< LD	5,14 ± 0,36	5,03 ± 0,53	231 ± 5	16,9 ± 1,0
2ª Arnica B	< LD	1,09 ± 0,087	1,25 ± 0,05	75,2 ± 2,2	3,60 ± 0,19
3ª Arnica B	< LD	0,825 ± 0,074	< LD	34,4 ± 1,3	2,12 ± 0,13
4ª Arnica B	< LD	0,662 ± 0,024	< LD	15,8 ± 0,3	1,67 ± 0,13
5ª Arnica B	< LD	0,082 ± 0,008	< LD	13,0 ± 0,7	1,09 ± 0,02
6ª Arnica B	< LD	< LD	< LD	9,02 ± 0,35	0,899 ± 0,034
Extrato	210 ± 6	4,65 ± 0,08	2113 ± 67	409 ± 8	15,8 ± 0,8
Total	210	12,5	2120	787	42,1

TABELA A.8. Concentração dos metais extraídos nas infusões sucessivas em microondas caseiro para tamanho de partícula < 63 µm.

	Al (µg g ⁻¹)	Cu (µg g ⁻¹)	Fe (µg g ⁻¹)	Mn (µg g ⁻¹)	Zn (µg g ⁻¹)
1ª Verde A	414 ± 11	5,29 ± 0,36	8,38 ± 0,45	275 ± 5	9,92 ± 0,13
2ª Verde A	148 ± 4	1,48 ± 0,07	1,78 ± 0,04	69,1 ± 2,1	2,11 ± 0,02
3ª Verde A	23,7 ± 1,2	1,07 ± 0,04	1,10 ± 0,12	28,7 ± 0,9	1,03 ± 0,07
4ª Verde A	< LD	0,801 ± 0,115	0,276 ± 0,038	21,8 ± 1,3	0,630 ± 0,047
5ª Verde A	< LD	0,096 ± 0,0140	0,196 ± 0,010	16,6 ± 1,0	0,478 ± 0,025
6ª Verde A	< LD	< LD	0,045 ± 0,004	12,0 ± 0,8	0,231 ± 0,023
Extrato	527 ± 34	6,87 ± 0,27	133 ± 3,6	158 ± 9	24,3 ± 0,9
Total	1112	15,6	144	581	38,7
1ª Verde B	446 ± 7	4,52 ± 0,14	11,1 ± 0,2	33,4 ± 0,8	10,5 ± 0,2
2ª Verde B	123 ± 1	0,922 ± 0,046	3,00 ± 0,13	11,0 ± 0,4	3,08 ± 0,15
3ª Verde B	21,6 ± 0,5	0,753 ± 0,028	1,92 ± 0,04	3,39 ± 0,28	1,74 ± 0,14
4ª Verde B	< LD	0,233 ± 0,026	1,57 ± 0,07	1,70 ± 0,10	0,541 ± 0,012
5ª Verde B	< LD	0,153 ± 0,011	1,22 ± 0,03	1,23 ± 0,08	0,334 ± 0,020
6ª Verde B	< LD	0,080 ± 0,007	1,05 ± 0,04	0,991 ± 0,016	< LD
Extrato	551 ± 10	9,19 ± 0,34	172 ± 8	85,8 ± 3,5	19,3 ± 1,2
Total	1141	15,9	192	138	35,5
1ª Arnica A	< LD	7,00 ± 0,27	7,30 ± 0,11	319 ± 9	20,5 ± 0,8
2ª Arnica A	< LD	1,02 ± 0,03	1,78 ± 0,01	59,6 ± 1,1	3,21 ± 0,18
3ª Arnica A	< LD	0,807 ± 0,057	1,51 ± 0,01	26,5 ± 0,8	1,91 ± 0,13
4ª Arnica A	< LD	0,410 ± 0,056	1,13 ± 0,03	17,8 ± 0,7	1,60 ± 0,08
5ª Arnica A	< LD	0,262 ± 0,044	0,809 ± 0,047	14,2 ± 0,1	1,34 ± 0,02
6ª Arnica A	< LD	< LD	< LD	11,2 ± 0,4	1,02 ± 0,04
Extrato	226 ± 19	4,01 ± 0,20	1450 ± 106	453 ± 27,4	15,4 ± 0,8
Total	226	13,5	1471	902	45,0
1ª Arnica B	< LD	5,53 ± 0,26	8,38 ± 0,45	272 ± 6	21,6 ± 0,2
2ª Arnica B	< LD	1,17 ± 0,04	1,78 ± 0,04	87,5 ± 1,8	3,80 ± 0,06
3ª Arnica B	< LD	0,744 ± 0,073	1,10 ± 0,12	35,9 ± 0,7	2,07 ± 0,03
4ª Arnica B	< LD	0,470 ± 0,034	< LD	17,0 ± 0,3	1,82 ± 0,07
5ª Arnica B	< LD	0,176 ± 0,020	< LD	13,1 ± 1,0	1,37 ± 0,09
6ª Arnica B	< LD	0,108 ± 0,013	< LD	9,70 ± 0,39	1,22 ± 0,05
Extrato	216 ± 5	3,46 ± 0,35	2140 ± 53	321 ± 12	11,9 ± 0,6
Total	216	11,7	2151	756	43,8

TABELA A.9. Biodisponibilidade de Fe, Cu, Zn, Mn, e Al através da simulação do suco gástrico.

	Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Boldo A	< LQ	$3,07 \pm 0,15$	$80,2 \pm 0,9$	$53,5 \pm 2,8$	$10,0 \pm 0,3$
Boldo B	< LQ	$3,53 \pm 0,09$	$38,3 \pm 1,5$	$33,3 \pm 1,1$	$6,12 \pm 0,09$
Chá Verde A	854 ± 12	$8,00 \pm 0,10$	$37,9 \pm 1,5$	320 ± 2	$16,7 \pm 0,5$
Chá verde B	764 ± 6	$7,36 \pm 0,11$	$96,1 \pm 2,1$	$61,3 \pm 1,4$	$13,3 \pm 0,2$
Capim Cidreira A	< LQ	$2,41 \pm 0,09$	$32,2 \pm 0,7$	$73,9 \pm 3,0$	$9,23 \pm 0,31$
Capim Cidreira B	< LQ	$3,04 \pm 0,11$	$28,4 \pm 0,9$	$95,4 \pm 1,2$	$8,81 \pm 0,24$
Camomila A	< LQ	$4,24 \pm 0,09$	$28,7 \pm 0,9$	$76,5 \pm 3,1$	$24,6 \pm 0,7$
Camomila B	< LQ	$6,44 \pm 0,11$	$24,4 \pm 0,9$	$41,9 \pm 0,5$	$23,7 \pm 0,5$
Quebra pedra A	$17,5 \pm 0,9$	$4,97 \pm 0,06$	143 ± 2	$98,8 \pm 1,6$	$13,5 \pm 0,4$
Quebra pedra B	< LQ	$3,09 \pm 0,06$	$83,1 \pm 4,0$	153 ± 4	$23,6 \pm 0,5$
Alfavaca A	$61,7 \pm 2,7$	$10,8 \pm 0,7$	$50,0 \pm 0,6$	$67,7 \pm 2,3$	$15,5 \pm 0,4$
Alfavaca B	$51,1 \pm 3,0$	$8,74 \pm 0,09$	$42,2 \pm 0,6$	$35,3 \pm 1,4$	$8,66 \pm 0,21$
Arnica A	< LQ	$7,97 \pm 0,06$	$43,8 \pm 1,0$	$374 \pm 4,3$	$25,8 \pm 1,1$
Arnica B	< LQ	$7,46 \pm 0,05$	$49,4 \pm 1,4$	312 ± 5	$25,2 \pm 0,5$
Espinheira Santa A	< LQ	$3,00 \pm 0,13$	$24,7 \pm 0,4$	185 ± 2	$8,13 \pm 0,33$
Espinheira Santa B	< LQ	$3,90 \pm 0,05$	$27,2 \pm 0,4$	191 ± 1	$6,65 \pm 0,11$
Gengibre	< LQ	$4,40 \pm 0,11$	$31,2 \pm 1,0$	$48,0 \pm 0,6$	$5,96 \pm 0,10$

TABELA A.10 Concentração dos elementos determinados no sólido restante da extração com solução simulada do suco gástrico

	Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Arnica A	243 \pm 4	3,00 \pm 0,17	1432 \pm 47	455 \pm 7	5,17 \pm 0,24
Arnica B	215 \pm 5	3,24 \pm 0,05	2059 \pm 61	377 \pm 9	5,29 \pm 0,5
Quebra pedra A	1743 \pm 3	1,75 \pm 0,04	1073 \pm 43	16,0 \pm 0,03	3,94 \pm 0,27
Quebra pedra B	625 \pm 3	3,58 \pm 0,07	908 \pm 10	17,5 \pm 0,3	8,27 \pm 0,43
Capim Cidreira A	182 \pm 1	1,94 \pm 0,02	264 \pm 22	11,2 \pm 0,4	8,60 \pm 0,02
Capim Cidreira B	156 \pm 3	2,29 \pm 0,06	245 \pm 7	8,97 \pm 0,11	10,4 \pm 0,1
Gengibre		2,69 \pm 0,01	40,3 \pm 2,5	10,8 \pm 0,2	2,95 \pm 0,15

TABELA A.11. Concentração dos elementos extraídos com HF 4,5 mol L⁻¹.

	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Zn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Capim Cidreira A	358 \pm 4	4,19 \pm 0,03	17,0 \pm 0,6	89,2 \pm 1,6	< LD
Capim Cidreira B	338 \pm 5	5,43 \pm 0,16	19,4 \pm 0,1	110, \pm 3	< LD
Arnica A	510 \pm 8	11,06 \pm 0,02	32,4 \pm 0,8	710 \pm 10	< LD
Arnica B	588 \pm 5	11,0 \pm 0,15	29,0 \pm 0,8	594 \pm 6	< LD
Quebra pedra A	1420 \pm 6	5,43 \pm 0,04	14,6 \pm 0,5	100 \pm 4	1439 \pm 45
Quebra pedra B	842 \pm 40	4,56 \pm 0,23	28,6 \pm 0,6	170 \pm 3	459 \pm 27
Gengibre	59,4 \pm 1,8	8,11 \pm 0,47	5,1 \pm 0,2	62,3 \pm 2,8	< LD