

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**DEYSE DE BRITO MARTHE**

**DETERMINAÇÃO DE Al, Cu, Fe, Pb E Zn EM AMOSTRAS DE  
ALCACHOFRA E CATUABA POR ESPECTROMETRIA  
DE ABSORÇÃO ATÔMICA**

**BELO HORIZONTE**  
**2011**

**UFMG/ICEX/DQ 844<sup>a</sup>**

**D. 483<sup>a</sup>**

**DEYSE DE BRITO MARTHE**

**DETERMINAÇÃO DE Al, Cu, Fe, Pb e Zn EM AMOSTRAS DE  
ALCACHOFRA E CATUBA POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO  
ATÔMICA**

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

**Belo Horizonte**

**2011**

Marthe, Deyse de Brito

M377d Determinação de Al, Cu, Fe, Pb e Zn em amostras de  
2011 alcachofra e catuaba por espectrometria de absorção  
atômica . / Deyse de Brito Marthe. 2011.

D

xiv; 88 f. : il

Orientadora: Letícia Malta Costa

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

Bibliografia p. 80-88

1. Química analítica - Teses 2. Metais - Teses  
3. Alcachofra - Teses 4. Catuaba - Teses I. Costa,  
Letícia Malta, Orientadora II. Título.

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3499-5732  
FAX: 031 - 3499-5700  
E-MAIL: ppqquimic@zeus.qui.ufmg.br



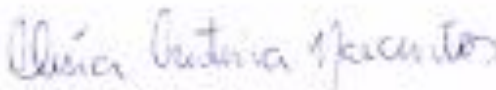
**"Determinação de Al, Cu, Fe, Pb e Zn em Amostras de Alcachofra e Catuaba  
por Espectrometria de Absorção Atômica"**

**Deyse de Brito Marthe**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Prof. Leticia Malta Costa - Orientadora  
UFMG

  
Prof. Josianne Nicácio Silveira  
UFMG

  
Prof. Clésia Cristina Nascentes  
UFMG

Belo Horizonte, 18 de fevereiro de 2011.

*A Deus,  
Aos meus pais, Eloiza e Carlos,  
e ao meu irmão Jefferson,*

*Com amor,  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Por toda a minha vida, agradeço a Deus por ser o meu tudo. A Ele rendo o meu louvor pelas bênçãos e graças que alcancei durante todo o período de estudo, escrita e experimento. Com Ele tive a confiança de que tudo posso naquilo que Ele preparou para mim.

Sou imensamente grata pelos meus pais, Eloiza e Carlos, e meu irmão, Jefferson, que sempre me apoiaram com as palavras de força, carinho. Muito obrigada pelo incentivo e compreensão constante.

Agradeço a toda minha família, em especial aos tios Fernando e Cida, agradeço pelo carinho e apoio.

Em especial, a professora Letícia Malta Costa pela oportunidade, confiança, incentivo, ensinamentos transmitidos, pela dedicada orientação e, sobretudo, pela amizade.

Agradeço a todos os professores integrantes do GEAPA e a Universidade Federal de Minas Gerais, particularmente ao Departamento de Química, que contribuiu para a realização deste trabalho.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa e pela FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Agradeço aos funcionários Gustavo e Sandra da infraestrutura pelos serviços prestados.

A todos os amigos do laboratório – GEAPA: Frank, Joane, Júlia, Leonel, Lívia, Luciano, Leila, Rita, Priscila, Silvéria, e Weverson, pelo auxílio, amizade e agradável convívio.

Agradeço a Aline e a Patrícia, pelas conversas, ensinamentos e principalmente pelos cuidadosos e fundamentais suporte no desenvolvimento desse trabalho.

As amigas Fernanda, Juliana, Natália e Tássia pela paciência e carinho. Agradeço às amigas da república: Cristiane e Hosane.

Expresso meus agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram com a realização do presente estudo.

## RESUMO

Plantas medicinais são empregadas como meio de cura, prevenção e tratamento de doenças por parte da população mundial. Para garantir a segurança, a eficácia e o controle de qualidade destes fitoterápicos, é necessário não somente conhecer os seus efeitos sobre a saúde humana, mas também, é importante analisar a composição mineral destes produtos. A presença de metais nas plantas pode ser justificada por diversos fatores, como atividades antrópicas, tipo de espécie vegetal e condições geoclimáticas, que dependem da concentração destes no solo. No entanto, o acúmulo de íons metálicos nestes organismos possivelmente apresentará um caráter de toxicidade à saúde humana. Neste trabalho, foram analisados folhas, extratos, cápsulas, comprimidos e bebidas originados a partir da alcachofra (*Cynara scolymus L.*) e da catuaba (*Trichilia catigua*). A determinação de alumínio, chumbo, cobre, ferro e zinco nestas amostras foi realizada por espectrometria de absorção atômica com chama e com forno de grafite, utilizando digestão em forno de micro-ondas com cavidade, análise direta e disponibilidade empregando uma solução simulada do suco gástrico como diferentes estratégias de pré-tratamento da amostra. Para a digestão das folhas de alcachofra por radiação micro-ondas foram avaliados o efeito de algumas variáveis, como mistura ácida, tempo e temperatura, através de um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, com ponto central. O método de digestão otimizado e a análise direta de amostras líquidas, para alcachofra e catuaba, foram aplicadas nas amostras e alguns destes resultados obtidos comparados com a disponibilidade dos elementos no trato digestivo. Os teores totais dos analitos, obtidos após o procedimento de digestão das amostras em forno de micro-ondas com cavidade foram utilizados como valores de referência para avaliar a eficiência dos demais procedimentos propostos. A exatidão do método de digestão por radiação por micro-ondas foi avaliada ao aplicar o procedimento na folha de tomate (NIST SRM 1573 a), sendo que os resultados obtidos foram concordantes com os valores certificados a 95% de confiança. A concentração total dos elementos variou consideravelmente nas diferentes marcas, porém para cobre e zinco nas amostras de catuaba em pó, foram encontrados valores similares. Alumínio e ferro foram os elementos presentes

em maiores concentrações em grande parte das amostras. Porém, após avaliação da disponibilidade, é possível levantar a hipótese de que estes dois elementos estariam pouco disponíveis nas amostras investigadas. Dentre os metais investigados nas amostras de alcachofra e catuaba, os teores encontrados estão dentro dos limites permitidos para o consumo.



## ABSTRACT

Medicinal plants are used to prevention and treatment of diseases by the population. To ensure the safety, efficiency and quality control of herbal medicines, it is necessary to know its effects on human health, and also provide the mineral composition of these plants. The elements in plants can be explained by several factors, such as geological and climatic conditions that depend on their concentration in soil, human activities and type of plant species. However, the accumulation of metal ions possibly will be related to toxicity to the human body. In this work, it was analyzed leaves, extracts, tablets, capsules, and beverages from artichoke (*Cynara scolymus L.*) and catuaba (*Trichilia catigua*). The determination of aluminum, lead, copper, iron and zinc in these samples was realized by atomic absorption spectrometry with flame or graphite furnace after different strategies for sample pretreatment: microwave-assisted acid digestion, direct analysis and availability experiments using a solution that simulated gastric juice. A 2<sup>3</sup> full factorial design with central point was applied to study the effect of some variables, such as acid mixture, time and temperature in the digestion of artichoke leaves in the cavity-microwave oven. The digestion procedure was optimized and direct analysis of liquid samples for catuaba and artichoke were realized. Some results obtained after microwave acid digestion were compared to those obtained with the availability of elements in the digestive tract. Total concentrations, after microwave acid digestion were used as reference values to evaluate the efficiency of other proposed procedures. A NIST SRM 1573a was used to check the accuracy. Results were in agreement to the certificate values at 95% confidence level. The total concentration ranged considerably, but for copper and zinc in the catuaba power samples, the values were similar. Aluminium and iron were present in higher concentrations in most samples. For liquid samples, availability tests showed higher concentrations, when compared to the direct determination. However, after availability experiments, it was possible to figure out that these elements are not readily available in the samples investigated. For the metals investigated in the samples, the contents are within the limits allowed for consumption.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1. Gráficos de Pareto obtidos pelo planejamento fatorial completo $2^3$ para alumínio, ferro e zinco.....	34
Figura 4.2. Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo $2^3$ , considerando as respostas em conjunto. ....	35
Figura 4.3. Gráfico da interação mistura ácida e temperatura obtidos pelo planejamento fatorial completo $2^3$ , considerando todas as respostas em conjunto.....	36
Figura 4.4. Gráfico da interação mistura ácida e tempo obtidos pelo planejamento fatorial completo $2^3$ , considerando todas as respostas em conjunto.....	37
Figura 4.5. Gráfico da interação tempo e temperatura obtidos pelo planejamento fatorial completo $2^3$ , considerando todas as respostas em conjunto.....	37
Figura 4.6. Gráfico dos escores da primeira e segunda componente principal dos dados obtidos pelo planejamento fatorial $2^3$ . ....	37
Figura 4.7. Gráfico dos pesos da primeira e segunda componente principal dos dados obtidos pelo planejamento fatorial $2^3$ .....	39
Figura 4.8. Intensidade relativa dos elementos nas condições experimentais.	41
Figura 4.9. Perfil dos dos sinais analíticos dos modificadores selecionados para as análises em digeridos de alcachofra por GF AAS: (a) nióbio para a determinação de cobre (b) sem modificador permanente chumbo. ....	44
Figura 4.10. Perfil dos sinais analíticos dos modificadores selecionados para as análises em extratos de alcachofra por GF AAS: (a) zircônio para a determinação de cobre (b) irídio para chumbo.....	46
Figura 4.11. Perfil do sinal analítico dos modificadores selecionados para as análises de chumbo em extratos de alcachofra por GF AAS: irídio como permanente e paládio em solução.....	47
Figura 4.12. Perfil dos picos usando os modificadores selecionados para as análises em digeridos de catuaba por GF AAS: (a) nióbio para a determinação de cobre (b) paládio em solução para chumbo.....	53

Figura 4.13. Curvas de calibração em meio ácido e ajuste de matriz das amostras de extrato de alcachofra (análise direta) para a) alumínio e b) zinco.....	59
Figura 4.14. Curvas de calibração em meio ácido e ajuste de matriz das amostras de folha e cápsula de alcachofra para a) cobre e b) chumbo. ....	60
Figura 4.15. Curvas de calibração em meio ácido e ajuste de matriz das amostras de bebida (análise direta) e digeridos de pó de catuaba para a) chumbo e b) alumínio.....	61
Figura 4.16. Concentração de alumínio nas amostras de alcachofra pelo método de digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado.....	71
Figura 4.17. Concentração de cobre nas amostras de alcachofra após digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado.....	73
Figura 4.18. Concentração de cobre nas amostras de catuaba em pó após digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado. ....	74
Figura 4.19. Concentração de chumbo nas amostras de alcachofra após digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado. ....	74
Figura 4.20. Concentração de ferro nas amostras de alcachofra após digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado.....	76
Figura 4.21. Concentração de ferro em amostras de catuaba em pó após digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado. ....	76
Figura 4.22. Concentração de zinco em amostras de alcachofra após digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado.....	77
Figura 4.23. Concentração de zinco em amostras de catuba em pó após digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado. ....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Parâmetros instrumentais utilizados na determinação de Al, Cu, Fe, Pb e Zn.....	19
Tabela 3.2. Programa de temperatura do GF AAS utilizado para tratamento da plataforma do tubo de grafite com modificadores permanentes....	20
Tabela 3.4. Programa de aquecimento para a digestão de folhas de alcachofra por micro-ondas com cavidade .....	22
Tabela 3.5. Planejamento fatorial $2^3$ completo com ponto central (n=3) .....	23
Tabela 3.6. Programa de temperatura do GF AAS utilizado para a seleção do modificador permanentes para quantificação de cobre e chumbo em amostras de alcachofra .....	25
Tabela 3.7. Programa de temperatura do forno de grafite usado para a otimização das análises das amostras de alcachofra para a determinação de cobre e chumbo. ....	26
Tabela 3.8. Programa de aquecimento e ventilação do procedimento de digestão por micro-ondas com cavidade.....	27
Tabela 3.9. Programa de temperatura do GF AAS utilizado para a seleção do modificador permanentes para quantificação de cobre e chumbo em amostras de catuaba.....	28
Tabela 3.10. Programa de temperatura do forno de grafite usado na otimização das análises das amostras de catuaba para a determinação de cobre e chumbo por GF AAS .....	29
Tabela 4.1. Respostas médias ( $\mu\text{g/g}$ ) dos experimentos realizados no planejamento fatorial $2^3$ completo para alumínio, ferro e zinco.....	33
Tabela 4.2 Modificadores permanentes avaliados na determinação de cobre e chumbo em digeridos de alcachofra por GF AAS .....	43
Tabela 4.3. Modificadores permanentes avaliados na determinação de cobre e chumbo em extratos de alcachofra por GF AAS.....	43
Tabela 4.4. Absorbâncias obtidas na otimização da temperatura de pirólise para análise de cobre em digeridos e extratos de alcachofra por GF AAS .....	48

Tabela 4.5. Absorbâncias obtidas na otimização da temperatura de pirólise para análise de chumbo em digeridos e extratos de alcachofra por GF AAS .....	49
Tabela 4.6. Absorbâncias obtidas na otimização da temperatura de atomização para análise de cobre em digeridos e extratos de alcachofra por GF AAS .....	49
Tabela 4.7. Absorbâncias obtidas na otimização da temperatura de atomização para análise de chumbo em digeridos e extratos de alcachofra por GF AAS.....	48
Tabela 4.8. Condições ótimas de análise para as determinações de cobre e chumbo em digeridos e extratos de alcachofra empregando GF AAS .....	50
Tabela 4.9. Modificadores permanentes avaliados na determinação de cobre e chumbo em digeridos de catuaba por GF AAS .....	52
Tabela 4.10. Modificadores permanentes avaliados na determinação de cobre e chumbo em bebidas de catuaba por GF AAS .....	54
Tabela 4.11. Absorbâncias integradas obtidas para otimização da temperatura de pirólise para análise de cobre em digeridos e bebidas de catuaba e GF AAS .....	55
Tabela 4.12. Absorbâncias obtidas para otimização da temperatura de pirólise para análise de chumbo em digeridos e bebidas de catuaba em GF AAS.....	54
Tabela 4.13. Absorbâncias obtidas para otimização da temperatura de atomização para análise de cobre em digeridos e bebidas de catuaba por GF AAS .....	56
Tabela 4.14. Absorbâncias obtidas para otimização da temperatura de atomização para análise de chumbo em digeridos e bebidas de catuaba por GF AAS .....	57
Tabela 4.15. Condições ótimas de análise para as determinações de cobre e chumbo em digeridos e bebidas de catuaba empregando GF AAS .....	57
Tabela 4.16. Coeficientes de correlação linear das curvas (R) de calibração em meio ácido e solução simulada de suco gástrico.....	60

Tabela 4.17. Limites de detecção e quantificação obtidos para as amostras de alcachofra e catuba digeridas e analisadas diretamente.....	61
Tabela 4.18. Coeficientes de variação (%) do intraensaio (r) (n = 7) e interensaio (p) (n = 28) obtidos para as amostras de digeridas alcachofra.....	64
Tabela 4.19. Coeficientes de variação (%) do intraensaio (r) (n = 7) e interensaio (p) (n = 28) obtidos para as amostras de catuaba .....	64
Tabela 4.20. Resultados para a avaliação da exatidão nos digeridos obtidos com o material de referência certificado (SRM NIST 1573a – folha de tomate) (n=3).....	65
Tabela 4.21. Resultados das concentrações de Al, Cu, Fe, Pb e Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) obtidas pela digestão das amostras de alcachofra (n = 3) .....	66
Tabela 4.22. Resultados das concentrações de Al, Cu, Fe, Pb e Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) obtidas pela digestão das amostras de catuaba em pó (n=3) .....	67
Tabela 4.23. Resultados obtidos ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de Al, Cu, Fe, Pb e Zn obtidas pelas análises diretas .....	69
Tabela 4.24. Resultados das concentrações obtidas pela extração de Al, Cu, Fe, Pb e Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) empregando uma solução de suco gástrico simulado nas amostras de alcachofra (n = 3).....	70
Tabela 4.25. Resultados das concentrações obtidas pela extração de Al, Cu, Fe, Pb e Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) empregando uma solução de suco gástrico simulado nas amostras de catuaba em pó (n = 3) .....	71

## SIGLAS E ACRÔNIMOS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>F AAS</b>	Espectrometria de absorção atômica com chama ( <i>Flame atomic absorption spectrometry</i> )
<b>FS F AAS</b>	Espectrômetria de absorção atômica com chama em modo sequencial ( <i>Fast sequential flame atomic absorption spectrometry</i> )
<b>GF AAS</b>	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite ( <i>Graphite furnace atomic absorption spectrometry</i> )
<b>ICP OES</b>	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado ( <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> )
<b>INMETRO</b>	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
<b>IUPAC</b>	União Internacional de Química Pura e Aplicada ( <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
<b>LD</b>	Limite de detecção
<b>LQ</b>	Limite de quantificação
<b>NIST</b>	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia ( <i>National Institute Standard Technology</i> )
<b>PC</b>	Componentes principais ( <i>Principal component</i> )
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>SRM</b>	Material de referência certificado ( <i>Standard Reference Material</i> )
<b>OMS (WHO)</b>	Organização Mundial de Saúde ( <i>World Health Organization</i> )

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>4</b>
2.1. Objetivo geral.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
<b>3. Revisão bibliográfica</b> .....	<b>5</b>
3.1. Composição de ervas e plantas medicinais.....	5
3.2. Contaminantes.....	8
3.3. A alcachofra e a catuaba.....	11
3.4. Preparo de amostras.....	13
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>18</b>
3.1 Reagentes e materiais.....	18
3.2 Instrumentação.....	18
3.3. Tratamento dos tubos de grafite.....	20
3.4. Alcachofra.....	21
3.4.1. Amostragem.....	21
3.4.2. Desenvolvimento de um método para a digestão das amostras de folhas de alcachofra em forno de micro-ondas com cavidade.....	21
3.4.3. Tratamento de extratos de alcachofra para análise.....	23
3.4.4. Otimização das condições de análise dos digeridos e soluções de extratos por F AAS.....	24
3.4.5. Otimização das condições de análise dos digeridos e soluções de extratos por GF AAS.....	24
3.5. Catuaba.....	26
3.5.1. Amostragem.....	26
3.5.2. Método para a digestão de catuaba em pó em forno de micro-ondas com cavidade.....	26
3.5.3. Tratamento de bebidas de catuaba para análise direta.....	27
3.5.4. Otimização das condições de análise dos digeridos e soluções de bebidas de catuaba por F AAS.....	27
3.5.5. Otimização das condições de análise dos digeridos e soluções de bebidas de catuaba por GF AAS.....	28
3.6. Avaliação da disponibilidade dos elementos.....	30



3.7. Validação dos métodos analíticos .....	30
3.7.1. Avaliação do efeito de matriz .....	30
<b>4. Resultados e discussão.....</b>	<b>32</b>
4.1. Alcachofra.....	32
4.1.1. Desenvolvimento de método para a digestão das amostras em forno de micro-ondas com cavidade .....	32
4.1.2. Otimização das condições de análise para determinação de cobre e chumbo em digeridos e soluções de extratos de alcachofra por GF AAS	42
4.2. Catuaba .....	51
4.2.1. Otimização das condições de análise para determinação de cobre e chumbo em amostras de digeridos e bebidas de catuaba por GF AAS....	51
4.3. Validação dos métodos para análises de alumínio, cobre, chumbo, ferro e zinco em amostras de alcachofra e catuaba.....	58
4.3.1. Avaliação de efeito de matriz .....	58
4.3.2. Linearidade .....	62
4.3.3. Limite de detecção e limite de quantificação .....	63
4.3.4. Precisão .....	64
4.3.5. Exatidão .....	65
4.4. Avaliação dos resultados de Al, Cu, Fe, Pb e Zn nas amostras de alcachofra e catuaba digeridas por aquecimento assistido por radiação micro-ondas.....	65
4.5. Avaliação dos resultados de Al, Cu, Fe, Pb e Zn nas soluções de extrato de alcachofra e de bebida de catuaba.....	68
4.6. Avaliação da disponibilidade dos elementos empregando solução simulada do suco gástrico .....	69
<b>5. Conclusão .....</b>	<b>79</b>
<b>6. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>80</b>

## 1. Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization, WHO, 2005*) fitoterápicos são definidos como medicamentos derivados ou preparados a partir de plantas com fins terapêuticos que trazem algum benefício para a saúde humana. São materiais que contêm ou não ingredientes processados, podendo ser de uma ou mais espécies.

Estes medicamentos são caracterizados pelo conhecimento da sua eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos das possibilidades e hipóteses referentes aos conhecimentos tradicionais de utilização, documentações em publicações ou ensaios clínicos (Brasil, 2004).

Entretanto, as plantas medicinais ou as suas partes obtidas após processos de colheita, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada, não são registrados como medicamentos fitoterápicos. No Brasil, os chás preparados destes produtos são caracterizados como alimentos (Brasil, 2004a).

Portanto, dependendo da regulamentação aplicada para alimentos e medicamentos em cada país, uma única planta medicinal pode ser definida como alimento, alimento funcional, suplemento alimentar ou erva medicinal. Isto dificulta o conceito de fitoterápicos para o propósito de uma regulamentação de medicamentos. Por isso, é um desafio desenvolver e implementar a regulação dos medicamentos fitoterápicos. Estes desafios estão relacionados à regulamentação jurídica, avaliação da segurança e eficácia e ao controle de qualidade, acompanhamento e conhecimento sobre estes medicamentos (WHO, 2005), pois, evidências indicam que as plantas medicinais representam a forma mais difundida de medicação, apesar do aumento do número de drogas sintéticas produzidas (Barthwal, Nair e Kakkar, 2008).

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (Veiga Junior, Pinto e Maciel, 2005). Espera-se que a investigação

de fitoquímicos e seus potenciais de cura serão de grande importância no futuro. Diversas plantas contêm ingredientes biodinâmicos que foram comprovados como benéficos para a medicina a partir de testes clínicos e análises laboratoriais (Halberstein, 2005).

Atualmente, o uso e os possíveis efeitos dos medicamentos obtidos de plantas medicinais são intensamente investigados. Uma variedade de dados são coletados, processados e compilados após ensaios clínicos, testes bioquímicos, análises de relatos, observações de ervas tradicionais e procedimentos de preparo em diferentes culturas (Halberstein, 2005).

Em todo mundo, estima-se que existam aproximadamente 250 mil espécies de plantas. Apesar disto, somente 10% de toda flora mundial foram avaliadas cientificamente. Neste contexto, pode-se considerar a flora brasileira como uma das mais ricas fontes de novos produtos farmacêuticos, cosméticos e nutracêuticos, explicada pelo fato do Brasil ser um país que possui a maior biodiversidade do planeta (Brandão e Zanetti, 2008), detendo aproximadamente um terço da flora mundial (Yunes, Pedrosa e Filho, 2001).

Nesta perspectiva, o Brasil é um país privilegiado quanto ao crescimento da fitoterapia. No entanto, com relação ao mercado mundial, o Brasil não tem uma atuação destacada, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente. O estado de arte da maioria dos fitoterápicos fabricados atualmente pela indústria brasileira está fundamentado somente no uso popular das plantas sem nenhuma comprovação pré-clínica, nem clínica, não podendo, portanto, ser competitivo a nível nacional ou internacional (Yunes, Pedrosa e Filho, 2001).

Todos os fitoterápicos industrializados antes de serem comercializados, necessitam de garantir que sejam medicamentos de qualidade comprovada, alcançado através do controle de todo o processo de produção, em que são descritos as metodologias usadas, as análises quantitativa e qualitativa de componentes característicos das plantas, os resultados da prospecção fitoquímica ou perfil cromatográfico e o controle biológico. Com esses procedimentos, minimiza-se a exposição a produtos passíveis de contaminação e padroniza-se a quantidade e a forma certa que deve ser usada, permitindo uma maior segurança de uso (Brasil, 2004b; Carvalho et al., 2007).

---

No Brasil, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), aprovada através da Portaria Ministerial MS/GM nº 971 de 03 de maio de 2006 e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada através do Decreto nº 5.813 em 22 de junho de 2006, apresentam em suas diretrizes o incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento com relação ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos priorizando a biodiversidade do país. Estas medidas apontam para maior valorização e reconhecimento deste recurso terapêutico como alternativa para a população brasileira.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho é a determinação de alumínio, chumbo, cobre, ferro e zinco em amostras de alcachofra e catuaba por espectrometria de absorção atômica com chama e com forno de grafite, após a digestão assistida por radiação micro-ondas e a análise direta de amostras líquidas, comparando estes resultados com a disponibilidade dos elementos no trato digestivo a partir de uma solução que simula o suco gástrico.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Otimizar as condições instrumentais para a quantificação dos analitos;
- Avaliar os possíveis interferentes e efeitos causados pela matriz da amostra durante a quantificação dos analitos;
- Empregar ferramentas estatísticas de planejamento de experimentos e de tratamento dos dados;
- Validar as metodologias analíticas otimizadas para determinação de alumínio, cobre, chumbo, ferro e zinco em amostras de alcachofra e catuaba.
- Avaliar a disponibilidade de todos os elementos estudados;
- Comparar os resultados obtidos pela a digestão assistida por radiação micro-ondas e a análise direta de amostras líquidas com a disponibilidade dos elementos no trato digestivo a partir de uma solução que simula o suco gástrico.

### **3. Revisão bibliográfica**

#### **3.1. Composição de ervas e plantas medicinais**

Medicamentos naturais possuem ingredientes químicos bioativos de valor terapêutico, comprovado a partir de testes clínicos e análises laboratoriais (Halberstein, 2005).

Normalmente, de acordo com a consistência do material preparado e com a doença ou a condição do tratamento são escolhidas as formas de consumo dos medicamentos à base de plantas. O preparo das plantas medicinais pode ser realizado por diversos procedimentos. No processo de “infusão”, adiciona-se uma determinada quantidade do material finamente cortado ou picado, contendo folhas, caules, flores, raízes ou frutos, em água fervente durante alguns minutos. “Extrato/Essência” envolve uma prolongada fervura das partes maceradas dos vegetais, tais como ramos, galhos, cascas, sementes, raízes, ou a planta compactada. O vapor resultante da mistura é condensado. Ambos os procedimentos permitem a liberação e recuperação do princípio ativo das plantas, sendo que os extratos de plantas também podem ser processados ou refinados para produzir tinturas terapêuticas, xaropes, molhos, sprays orais, comprimidos, pó encapsulado e pastilhas. Materiais sólidos como cascas, gomas, frutos, raízes, e outros, também podem ser somente mastigados, ou seja, sem acréscimo de algum outro preparo (Halberstein, 2005).

Grande parte da comercialização de plantas medicinais é feita em farmácias e lojas de produtos naturais. Porém, geralmente esses materiais não possuem certificado de qualidade e são produzidas a partir de plantas cultivadas, o que descaracteriza a medicina tradicional que utiliza, quase sempre, plantas da flora nativa (Veiga Junior, Pinto e Maciel, 2005).

A segurança e a eficácia dos fitoterápicos estão intimamente correlacionadas com a qualidade dos materiais usados em suas produções. A qualidade do material, por sua vez, é determinada por fatores intrínsecos (genéticos) e externos (condições ambientais, cultivo e colheita,

armazenamento, transporte e estocagem) da planta. Em função dos diversos parâmetros envolvidos na produção de um fitoterápico, é difícil controlar a qualidade deste medicamento (WHO, 2005).

No entanto, o efeito terapêutico dessas plantas medicinais é baseado nos constituintes químicos presentes nas mesmas (Chan, 2003; Devi, Sarma e Kumar, 2008). É conhecida a importância de diversos elementos inorgânicos no tratamento de várias doenças. A absorção dos constituintes ativos presente nas plantas pode influenciar o funcionamento do sistema humano (Lamari et al., 2008).

Muitos elementos essenciais presentes em baixas concentrações têm papel importante no metabolismo e na composição das plantas medicinais, sendo também responsáveis pela formação de constituintes químicos ativos presentes de propriedades terapêuticas ou tóxicas (Desideri, Meli e Roselli, 2010). Muitos elementos são essenciais para as plantas, mas têm efeitos nocivos em concentrações excessivas (En et al., 2003). Portanto, os processos fisiológicos das plantas dependem fortemente destas concentrações.

Os níveis de nutrientes necessários não são fixos, podem variar dependendo da espécie, genótipo, condições de crescimento e partes de uma mesma planta. Atualmente, sabe-se que alguns elementos são necessários para o desenvolvimento das plantas. Destes, alguns são macronutrientes (C, N, O, H, K, Ca, Mg, S e P) e os outros elementos são definidos como micronutrientes (B, Cl, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni e Zn). Outros elementos podem ser essenciais para certas espécies de plantas cultivadas em ambientes específicos (Mesjaesz-Przubulowics e Przybylowicz, 2002).

Dentre todos os elementos presentes neste trabalho, destaca-se o alumínio, cobre, chumbo, ferro e zinco, determinados nas amostras de alcachofra e catuaba.

A toxicidade do alumínio é um dos principais fatores que limitam o crescimento e desenvolvimento das plantas em solos ácidos. As membranas plasmáticas das células, especialmente as membranas da raiz, são os locais em que há maior concentração deste elemento. A interação da principal forma tóxica, o  $Al^{3+}$ , com ligantes doadores de oxigênio como proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, resulta na inibição da divisão celular, da extensão

celular e do transporte. No entanto, o mecanismo de sua ação ainda é obscuro (Mossor-Pietraszewska, 2001).

O cobre é de extrema importância para a vida da planta. O cobre é essencial para a fotossíntese e para respiração mitocondrial, proteção do estresse oxidativo, metabolismo de carbono e nitrogênio. Também é necessário para a síntese da parede celular. Em condições fisiológicas, o cobre existe em dois estados de oxidação:  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , podendo intercâmbiar entre essas formas, sendo o cobre monovalente é instável. Este intercâmbio permite que cobre seja agente redutor ou oxidante. Entretanto, esta propriedade o torna potencialmente tóxico, pois os íons de cobre podem catalisar a produção de radicais livres, levando ao dano de proteínas, DNA e outras biomoléculas (Hänsch e Mendel, 2009).

O chumbo é um metal tóxico que, quando presente nas plantas, normalmente foi absorvido pelos vegetais pelo solo ou atmosfera. O seu efeito depende da concentração, tipo de sal formado e espécie envolvida. Embora os efeitos sejam mais acentuados em concentrações mais elevadas, em alguns casos concentrações menores podem estimular os processos metabólicos e afetar a germinação das sementes, o crescimento das mudas, a fotossíntese, e atividades enzimáticas (Patra et al., 2004).

O ferro está envolvido na fotossíntese, respiração mitocondrial, assimilação de nitrogênio, biossíntese de hormônios, na produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio. Até 80% do ferro celular é encontrado nos cloroplastos, o que é coerente com sua função principal no processo de fotossíntese (Hänsch e Mendel, 2009).

O zinco é um importante componente de enzimas, com a função de síntese protéica, produção de energia e manutenção da integridade estrutural das biomembranas. Mais de 1200 proteínas contém, se ligam ou transportam  $\text{Zn}^{2+}$ . O zinco desempenha papel importante no desenvolvimento de sementes, sendo que plantas com deficiência de zinco apresentam maturidade tardia (Hänscha e Mendel, 2009).

Diante as possibilidades dos elementos presentes, a análise quantitativa da composição mineral das plantas é importante, tanto nos estudos



básicos e aplicados sobre a planta, com o objetivo de conhecer seus efeitos potenciais à saúde em humana (Razic et al., 2005).

### **3.2. Contaminantes**

Há um crescente aumento na utilização de medicamentos complementares e alternativos, seja em países desenvolvidos ou em desenvolvimento. Seu uso é diverso e vem sendo praticado em todo o mundo. A segurança e a eficácia destes medicamentos, assim como o seu controle de qualidade tornou-se uma preocupação, tanto para as autoridades quanto para o público (WHO, 2005).

A dificuldade em demonstrar a qualidade das ervas medicinais é devido a erros de identificação das espécies, contaminações ou adulterações (Jordan, Cunningham e Marles, 2010). Em todo o mundo estão sendo desenvolvidas formas de padronizar o uso de fitoterápicos, porém ainda não há um consenso de quais medidas devem ser adotadas. A padronização e o controle de qualidade destes medicamentos são viáveis, mas difícil de concretizarem. A regulamentação destes medicamentos entre os países não é uniforme, pois a maneira em que são usados é variada (Sahoo, Manchikanti e Dey, 2010).

O uso destes medicamentos é realizado de forma indiscriminada e não leva em conta os possíveis efeitos colaterais, decorrentes do próprio princípio ativo e como dos contaminantes presentes na formulação. O papel dos elementos inorgânicos no metabolismo animal e vegetal é bem estabelecido, porém, o efeito e as influências destes compostos no organismo humano, quando viabilizados por fitoterápicos têm recebido pouca atenção. Em linhas gerais, os medicamentos fitoterápicos são apontados como isentos de efeitos adversos à saúde (Desideri, Meli e Roselli, 2010).

No entanto, ervas medicinais comercializadas não são isentas de efeitos colaterais. Ensaios clínicos controlados revelaram a possibilidade de ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis decorrentes do uso de medicamentos fitoterápicos. Problemas cardiovasculares, hepatotoxicidade e efeitos anticolinérgicos, levando a uma atividade visceral reduzida, quando

associado com medicamentos para tratamento de asma e retenção de água (Elvin-Lewis, 2001).

Estes efeitos adversos originados pelo consumo destas plantas podem estar relacionados a inúmeros fatores. Estes fatores podem incluir o uso de espécies erradas de plantas ou mal identificadas, adulteração, uso de medicamentos não declarados, contaminação com substâncias tóxicas ou perigosas, superdosagem, uso indevido e uso destes medicamentos concomitantemente com outros (WHO 2005; Jordan, Cunningham e Marles, 2010).

A incidência de relatos sobre reações adversas associadas às plantas medicinais é baixa, pois, os consumidores geralmente as consideram mais seguras e, assim, acreditam que seus sintomas não poderiam ser atribuídos ao uso desses produtos. Em diversas situações, o uso de um fitoterápico não é relatado para um profissional de saúde, mesmo quando o paciente é questionado (Hensrud, Engle e Scheitel, 1999). Somado a este fato, muitos pacientes pensam que estes medicamentos podem não ser aceito pelo seu médico (Busse et al., 2005).

Além disso, a avaliação toxicológica das plantas medicinais a partir da determinação da aplicabilidade dos fitoquímicos isolados é um desafio. A toxicidade de algumas destas plantas se correlaciona tanto com a planta inteira quanto com o seu extrato. (Jordan, Cunningham e Marles, 2010).

Muitas plantas podem acumular íons metálicos que possivelmente apresentam um caráter de toxidade ao organismo (Clemens, Palmgren e Krämer, 2002). Vale ressaltar que a composição elementar das plantas depende de vários fatores como condições geoclimáticas, atividades antrópicas e espécies vegetais, sendo assim, é imprescindível verificar a presença de metais pesados em cada planta medicinal (Barthwal, Nair e Kakkar, 2008), o que garante a qualidade do vegetal destinado ao consumo humano.

A presença de metais em ervas medicinais foi descrita em diversos trabalhos e a justificativa da presença destes elementos é variada. (Clemens, Palmgren e Krämer, 2002).

Maiga et al. (2005) investigaram a composição metálica de diversas plantas medicinais. O estudo demonstrou que as plantas medicinais podem ser

fonte de elementos essenciais (Fe, Zn, Cu, Ni e Mn), como também de metais tóxicos (Pb). No entanto, todos os valores encontrados foram inferiores aos níveis admissíveis pela OMS, demonstrando que, quando ingeridas, não trazem malefícios ao organismo humano.

Özcan e Akbulut (2007) determinaram a composição elementar de diversas ervas e observaram que plantas medicinais são fontes importantes de nutrientes e elementos essenciais. A composição da infusão das plantas medicinais foi relacionada com a quantidade presente no material de partida. Observou-se que os teores de metais tóxicos foram baixos tanto nas plantas quanto nos chás. Para o preparo das infusões, o tempo de 10 minutos foi suficiente para obter um chá rico em minerais.

Ernst (2002) revisou a literatura médica e relatou graves problemas de intoxicações, possivelmente associados com fitoterápicos de origem asiática, usados por grande parte da população mundial. No trabalho, são apontadas evidências que sugerem a contaminação de algumas ervas asiáticas por metais tóxicos ou medicamentos não declarados, sendo que a inclusão destes metais pode ter sido de cunho intencional. Arsênio, chumbo, cobre e mercúrio foram os metais predominantemente encontrados.

A adulteração envolve a substituição intencional com outra espécie vegetal ou adição intencional de uma substância com objetivo de aumentar o peso ou a potência do produto ou para diminuir seu custo (Sahoo, Manchikanti e Dey, 2010). Foram encontradas no mercado muitas ervas chinesas populares de preços elevados que, sendo escassas, foram substituídas por plantas inferiores ou ervas falsas (Chan, 2003). Por isso, é preciso encontrar formas de maximizar a segurança do consumidor (Ernst, 2002).

Os relatos em que trazem reações graves relacionadas ao uso de plantas indicam a necessidade de desenvolver normas técnicas na sua fabricação, com a orientação de regulamentar sua comercialização (Sahoo, Manchikanti e Dey, 2010).

### 3.3. A alcachofra e a catuaba

Neste trabalho foram analisados diferentes tipos de produtos originados a partir da alcachofra, como folhas, extratos, cápsulas e comprimidos.

A alcachofra (*Cynara scolymus L.*) é uma planta herbácea perene, pertencente à família *Compositae (Asteraceae)*. É uma flor rica em substâncias medicinais e é cultivada no Oriente Médio, Norte de África, América do Sul e nos Estados Unidos (Lattanzio et al., 2009). A sua cabeça é comestível e utilizada na culinária em todo o mundo (Coon e Ernst, 2003).

A alcachofra está descrita na Farmacopéia Brasileira 3ª edição (1977). Diante disso, as farmácias de manipulação no Brasil têm a permissão para manipular essa planta medicinal e, como também, os fitoterápicos delas originados, desde que sejam registrados (Brasil, 2004a).

Em alguns países, as folhas de alcachofra são consideradas um medicamento fitoterápico. São reconhecidas pelos seus efeitos benéficos contra queixas do fígado e por sua ação antioxidante. Em especial, a utilização do extrato de folhas está relacionada ao abaixamento do colesterol do sangue (Coon e Ernst, 2003; Gebhardt, 1997).

Esta planta tem um importante valor nutricional devido ao elevado conteúdo de compostos fenólicos bioativos, como flavonóides e cafeoilquínicos derivados, e também às grandes quantidades de inulina, fibras e minerais. A inulina é um carboidrato de baixa caloria, solúvel em água. Seus benefícios foram associados à função intestinal. Compostos fenólicos, especialmente os cafeoilquínicos, exercem efeitos benéficos no tratamento de doenças hepatobiliares, hiperlipidemia, hidropisia, reumatismo e metabolismo do colesterol. Estudos clínicos e pré-clínicos confirmam o potencial terapêutico deste produto. A alcachofra pode ser considerada a planta mais eficaz dentre as usadas na medicina popular contra problemas no fígado (Lattanzio et al., 2009).

Segundo Bundy et al. (2008), extratos de folhas de alcachofra foram usados com o objetivo de reduzir os níveis plasmáticos de lipídios, incluindo colesterol total. Para confirmar estas informações, foi avaliado o efeito da

alcachofra sobre os níveis plasmáticos de lipídios em adultos com hipercolesterolemia leve a moderada. Após 12 semanas de ingestão da alcachofra, ocorreu uma redução de colesterol total.

Apesar de ser tradicionalmente consumida em muitos países, na última década, a variedade imatura deste vegetal foi introduzida com sucesso no mercado internacional de alimentos. Com o objetivo de comparar a composição química e propriedades antioxidantes de alcachofras maduras e imaturas em estado bruto e após o cozimento, Lutz et al. (2010) realizaram uma análise química dos extratos aquosos e hidroalcoólicos para determinar o conteúdo de polifenóis totais, ácido caféico, ácido clorogênico e cinarina. A análise mostrou que as alcachofras imaturas constituem uma fonte de polifenóis antioxidantes, melhorada pela aplicação de tratamento térmico, pois houve um aumento de proteínas e lipídios, como também exibiram maiores capacidades de eliminação de radicais livres.

Outros estudos também confirmam o uso popular de alcachofra no tratamento de diversas doenças e, revelam que, a atividade terapêutica é, provavelmente, devida principalmente à estrutura dos fenóis, que podem funcionar com inibidores dos radicais livres (Lattanzio et al., 2009).

A catuaba também foi foco de estudo, sendo analisada como pó e como bebida alcoólica.

Antes do desenvolvimento da medicina moderna, muitos remédios naturais foram usados para o tratamento de doenças relacionadas ao sistema nervoso humano (Adams, Gmünder e Hamburger 2007). No Brasil a catuaba tem sido tradicionalmente usada como um estimulante do sistema nervoso central com propriedades "afrodisíacas". Uma a três xícaras de chá da raiz devem ser consumidas diariamente contra impotência sexual, fraqueza, agitação, nervosismo, neurastenia, memória fraca, esquecimento e insônia. As suas raízes normalmente são empregadas na forma de chá (Zanolari et al., 2005), mas também é possível encontrar o produto sob a forma de tinturas e cápsulas do vegetal moído.

Na Farmacopéia Brasileira (1959), a espécie de catuaba registrada para fins medicinais é a *Anemopaegma mirandum* (Bignoniaceae), sendo recomendado o uso das suas raízes. Desta forma esta espécie estabeleceu-se

como oficial, porém é escassa e extinta em algumas regiões. Na busca por alternativas, diversas espécies são comumente conhecidas e usadas como catuaba. A *Erythroxylum catuaba* é considerada uma descrição inadequada para a espécie. A identidade botânica correta pode ser *Erythroxylum Vacciniifolium* (Erythroxylaceae), *Anemopaegma mirandum* (Bignoniaceae) e *Trichilia catigua* (Meliaceae).

*Trichilia catigua* (Meliaceae) é amplamente comercializada no Brasil como catuaba. A *Trichilia catigua* também é conhecida como catiguá, catiguá vermelho, pau ervilha e catuaba do norte. Para a sua casca, também usada para fins medicinais, existem alguns estudos farmacológicos (Beltrame et al., 2006).

Vaz et al. (1997) comprovaram o uso de extratos alcóolicos e hidroalcóolicos de catuaba para a redução da dor, o que parece ser dependente da interação dos diversos princípios ativos presentes na planta, mas o mecanismo de ação ainda não está completamente esclarecido.

A partir de extratos hidroalcóolicos de quatro plantas medicinais, *Paullinia cupana* (guaraná; Sapindaceae), *Trichilia catigua* (catuaba; Meliaceae), *Zingiber officinalis* (gingibre; Zingiberaceae) e *Ptychopetalum olacoides* (muirapuama; Olacaceae), Antunes et al. (2001) avaliaram a eficiência deste medicamento contra impotência sexual. Os resultados mostraram que todas as espécies relaxaram os vasos arteriais relacionados com a ereção. Com exceção dos extratos de *T. catigua*, que provocaram um relaxamento prolongado, *P. Cupana*, *Z. officinalis* e *P. olacoides* causaram um relaxamento de curta duração.

### 3.4. Preparo de amostras

É grande o interesse no conhecimento da composição química dos vegetais. Aliado a todos os desenvolvimentos na área científica, as análises dessas matrizes vêm exigindo simplicidade, rapidez e baixo custo.

Vários métodos são sugeridos para determinar metais em amostras de alimentos, porém, o mais recomendado refere-se a digestão da amostra. Recentemente, a radiação micro-ondas vem sendo usada para a digestão

ácida como uma efetiva alternativa ao procedimento de digestão convencional (Bakkali et al., 2009).

Idealmente, um procedimento de digestão de uma amostra deve produzir resultados precisos e exatos. Em uma análise química, o tratamento da amostra pode envolver uma transformação substancial da espécie química de interesse em uma forma apropriada para a aplicação da técnica de determinação escolhida. A maneira de se decompor uma amostra para a análise depende da sua natureza, do analito que se quer determinar, assim como a sua concentração, do método de análise e, por fim, da precisão e exatidão desejada (Arruda e Santelli, 1997).

Planejamento, amostragem, preparação, medida instrumental do sinal analítico e avaliação dos resultados podem ser etapas da determinação de metais em amostras de plantas. Cada etapa está susceptível a erros. A dificuldade e a probabilidade do erro são mais evidenciadas na medida da concentração do elemento ou substância analisado. O erro analítico aumenta exponencialmente com a diminuição da concentração do analito. Além disso, a matriz pode interferir na determinação do elemento, comparado com uma solução na qual ela se encontra ausente, como também há um grande risco de contaminação da amostra através de um tratamento inadequado (Markert, 1995).

A etapa de preparação da amostra também representa uma grande fonte de erro em toda a sequência analítica. Dentre os vários procedimentos presentes nessa etapa, ou seja, lavagem, secagem, homogeneização e decomposição, ocorre a transformação das amostras para a futura análise instrumental. A lavagem do material costuma ser o primeiro procedimento do preparo da amostra, mas no trato de plantas, deve-se avaliar se é necessária a limpeza antes da análise química (Markert, 1995).

Na investigação de plantas que podem ser ingeridas, a superfície da amostra não deve ser limpa se estiver sendo determinado o analito total, pois se deve levar em conta que nem sempre os alimentos são lavados antes de serem ingeridos. Um procedimento que deve ser feito é de secagem do material com a finalidade de protegê-lo de se decompor durante a sua estocagem e de fornecer um valor constante, de referência, após a obtenção

da massa da amostra seca, ao contrário da massa da amostra fresca, que é difícil de ser quantificada (Markert, 1995).

Quanto ao preparo do material a ser analisado, segundo Bakkali et al. (2009), a digestão através de chapa de aquecimento ou bloco digestor são duas metodologias muito utilizadas para diferentes tipos de amostras de alimentos. No entanto, estes procedimentos apresentam desvantagens, tais como longo tempo de processamento da amostra e riscos consideráveis. Nos últimos anos, os fornos de micro-ondas vêm sendo utilizados para a digestão ácida dessas amostras como uma alternativa eficaz para os procedimentos de digestão clássica. A digestão ácida assistida por radiação micro-ondas é menos propensa à contaminação, minimiza perdas de analitos voláteis, utiliza pequenos volumes de ácidos e reduz o tempo de digestão, em relação aos métodos tradicionais. Essas características possibilitam melhorar a exatidão e precisão dos resultados obtidos.

Atualmente, existem dois tipos de sistemas comerciais: os fornos de micro-ondas com radiação focalizada e os fornos com cavidade, operando a pressão atmosférica e a alta pressão e temperatura, respectivamente. A digestão da amostra com radiação focalizada é realizada a pressão ambiente sob no recipiente reacional através de um guia de ondas. As temperaturas alcançadas durante a etapa de digestão da amostra ficam limitadas ao ponto de ebulição dos ácidos empregados. Porém, o emprego de fornos em recipientes fechados a alta pressão e temperatura permite um aumento no ponto de ebulição dos ácidos, devido a elevação da pressão dentro no frasco reacional, o que torna as digestões mais vigorosas e eficientes, promovendo a redução do tempo reacional. Como consequência, é possível reduzir o volume de reagentes e a possibilidade de contaminação é minimizada (Smith e Arsenault, 1997).

Soylak et al. (2007) determinaram zinco, cobre e níquel em amostras de chá após digestão em forno de micro-ondas com cavidade. As condições experimentais foram obtidas a partir de um planejamento fatorial envolvendo a composição da mistura oxidante, potência de micro-ondas e o tempo de radiação. Os melhores resultados foram obtidos com uso de 6,0 mL de HNO<sub>3</sub>, 2,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 550 W de potência em 8 minutos de radiação. Para os



elementos estudados, várias amostras de ervas da Turquia apresentaram níveis inferiores aos considerados tóxicos.

A eficiência da decomposição de plantas em forno de micro-ondas com cavidade foi avaliada por Araújo et al. (2002). Ao determinar Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, S e Zn por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), utilizando uma mistura reacional composta por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v) e diferentes concentrações de HNO<sub>3</sub>, a eficiência da digestão da digestão foi determinada pelos teores do carbono residual em cada solução digerida. As concentrações dos analitos não diferenciaram significativamente nos digeridos, mostrando que o teor de carbono residual não influenciou a quantificação.

Como objetivo de correlacionar os elementos traço e suas disponibilidades, Lésniewicz et al. (2006) estudaram medicamentos fitoterápicos, comparando os teores de metais com as exigências nutricionais e dose diária admissível. Após digestão em forno de micro-ondas com cavidade empregando ácido nítrico concentrado e peróxido de hidrogênio 30% (v/v), foram determinados alumínio, cobre, ferro, manganês e zinco. A simulação das condições de digestão alimentar no estômago foi realizada pela adição de 15,0 mL da solução extratora em 300 mg do fitoterápico. A solução extratora foi composta de 0,80 g L<sup>-1</sup> de pepsina, 0,15 g L<sup>-1</sup> de NaCl e 0,25% de HCl. O uso de ácido clorídrico tornou a solução extratora mais eficiente comparando com o uso de água. A porcentagem de extração variou com o elemento e a amostra analisada. No entanto, a maior eficiência de extração (mais de 40% para todas as amostras) foi observado para Ba, Ca, Mg, Mn, Sr e Zn. Os resultados mostraram que os medicamentos naturais à base de plantas podem ser considerados como fonte de minerais indispensáveis para o bom funcionamento do organismo humano.

Flaten (2002) estudou a espécie *Camellia sinensis* por ser uma planta com grande capacidade de acumular alumínio. A biodisponibilidade desse elemento foi avaliada em procedimento de extração por infusão com água e empregando soluções simuladas do suco gástrico e intestinal. As infusões foram misturadas com o suco gástrico simulado (pepsina a 1% em 0,15 M de NaCl acidificado a pH = 1,8 com HCl). Antes da incubação a 37 °C por 1 h, o

pH da mistura foi ajustado para 2,2 com HCl. A disponibilidade do alumínio presente no chá não diferiu de outras fontes alimentares.

Neste caso, a disponibilidade pode ser definida como a quantidade total de uma substância química presente que, dentro de um determinado intervalo de tempo, está disponível ou pode ser disponibilizado para absorção a partir da ingestão de alimentos (Peijnenburg e Jager, 2003).

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Reagentes e materiais

Os reagentes: ácido nítrico, ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio foram de grau analítico (Merck, Darmstadt, Alemanha). A água usada em todas as diluições foi purificada pelo sistema Milli-Q®.

As soluções de referência dos analitos usados para a calibração foram feitas a partir de diluições de soluções estoque de 1000,0 mg L<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich, EUA) obedecendo a faixa linear de cada elemento: alumínio (0,0 – 40,0 mg L<sup>-1</sup>), cobre (0 – 50,0 µg L<sup>-1</sup>), ferro (0 – 3,0 mg L<sup>-1</sup>), chumbo (0 – 100,0 µg L<sup>-1</sup>) e zinco (0 – 0,75 mg L<sup>-1</sup>) em separado, construídas no meio extrator avaliado.

Para todas as amostras que foram feitas determinações de alumínio, foi adicionado KCl (Synth, Brasil) 1,0 % m v<sup>-1</sup> antes de sua leitura.

A solução simuladora de suco gástrico (0,80 g L<sup>-1</sup> de pepsina, 0,15 g L<sup>-1</sup> de NaCl e 0,25% v v<sup>-1</sup> de HCl) foi preparada pela diluição de pepsina de mucosa gástrica de suínos (Sigma – Aldrich, EUA) e NaCl (Synth, Brasil) em meio ácido.

A modificação química permanente de cada tubo de grafite usados no espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) foi realizada pelo tratamento do tubo de grafite com solução de irídio, nióbio, tântalo, rutênio, ródio e zircônio 1000,0 mg L<sup>-1</sup> (Fluka, Buchs, Suíça). Como modificador químico em solução foi usado o paládio 1000,0 mg L<sup>-1</sup> (Ultra Scientific, EUA).

Foi preparada uma solução de limpeza do amostrador automático preparada contendo 0,1% (v/v) de Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Alemanha) em 0,2% v v<sup>-1</sup> de ácido nítrico foi usada para evitar entupimento do capilar do amostrador devido à adsorção do analito e da matriz.

#### 3.2 Instrumentação

As determinações de ferro e zinco foram realizadas no espectrômetro de absorção atômica com chama (F AAS) Perkin-Elmer AAnalyst 200 (Norwalk,

CT, EUA). O alumínio foi determinado em um espectrômetro de absorção atômica com chama em modo seqüencial (FS F AAS) Varian AA240FS (Mulgrave, Austrália), sendo ambos os espectrômetros equipados com um sistema de correção de fundo por lâmpada de deutério. Os parâmetros instrumentais utilizados para a determinação destes três elementos seguiram os recomendados pelo fabricante, sendo porém ajustados a altura da fenda e o fluxo de aspiração das amostras.

O espectrômetro de absorção atômica Perkin-Elmer AAnalyst 400 com forno de grafite (GF AAS), equipado com um sistema de correção de fundo por lâmpada de deutério, foi usado para a determinação de cobre e chumbo. O uso de modificador químico permanente ou em solução, temperatura de atomização e pirólise foram otimizados univariavelmente. As medidas foram baseadas em absorbâncias integradas. O volume injetado no tubo de grafite pelo amostrador automático (AS 800) foi de 20,0  $\mu\text{L}$ . O argônio (99,996% da White Martins, Brasil) foi usado como gás de purga. Em todas as análises, os tubos de grafite pirolíticos usados continham plataforma de L'Vov inserida.

Para todos os elementos analisados, as medidas foram obtidas por lâmpadas de catodo-oco (HCL). Os parâmetros instrumentais para os elementos estudados estão apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Parâmetros instrumentais utilizados na determinação de Al, Cu, Fe, Pb e Zn

Parâmetros	Al	Cu	Fe	Pb	Zn
Comprimento de onda (nm)	309,3	324,7	248,3	283,3	213,8
Fenda (nm)	0,5	2,7/0,8	1,8/1,35	2,7/1,05	2,7/1,8
Óxido nítrico ( $\text{L min}^{-1}$ )	11,0	-	-	-	-
Ar ( $\text{L min}^{-1}$ )	7,55	-	10,0	-	10,0
Acetileno ( $\text{L min}^{-1}$ )	-	-	2,5	-	2,5

A digestão ácida foi realizada no forno de micro-ondas com cavidade Milestone Ethos 1 (Soriso, Italy) com o máximo de pressão e potência de 30 bar e 750 W, respectivamente. A temperatura máxima e o tempo do programa de aquecimento foram avaliados.

A avaliação da disponibilidade dos elementos foi realizada pela agitação da mistura de amostra e solução simulado de suco gástrico a 37 °C na incubadora de bancada digital Shaker sem refrigeração com precisão de 0,2 °C, CIENTEC, modelo CT-12 (São Paulo, Brasil). Após esse procedimento, a mistura foi levada à centrífuga FANEM<sup>®</sup>, Excelsal II, modelo BL 206 (São Paulo, Brasil).

### 3.3. Tratamento dos tubos de grafite

O procedimento empregado neste trabalho foi descrito por Silva et al. (1998). Para cada modificador permanente (irídio, nióbio, tântalo, rutênio, ródio e zircônio), tubos de grafite com plataforma de L'Vov foram tratados independentemente com 500 µg de cada um. Para isso, foram aplicados sobre a plataforma 50,0 µL da solução 1000 mg L<sup>-1</sup> contendo o modificador e, em seguida, o tubo foi aquecido de acordo com programa de aquecimento descrito na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Programa de temperatura do GF AAS utilizado para tratamento da plataforma do tubo de grafite com modificadores permanentes

Temperatura/°C	Rampa/s	Patamar/s	Fluxo de ar/mL min <sup>-1</sup>
90	5	15	250
140	5	15	250
1000	10	10	250
2000	0	5	0
2000	1	10	250

Este procedimento foi repetido 10 vezes, de maneira que, ao final, foi obtido 500 µg de modificador depositado no tubo.

### **3.4. Alcachofra**

#### **3.4.1. Amostragem**

As amostras de alcachofra em folhas, extratos, cápsulas e comprimidos foram adquiridas no comércio local de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Foram estudadas seis marcas de folhas, três de extratos, quatro de cápsulas e uma marca de comprimido. As folhas, os conteúdos das cápsulas e os comprimidos foram previamente secos a 60 °C e moídos manualmente em almofariz de ágata. As amostras foram passadas em peneiras de diâmetro igual a 300 µm.

#### **3.4.2. Desenvolvimento de um método para a digestão das amostras de folhas de alcachofra em forno de micro-ondas com cavidade**

Inicialmente, foram empregados 6,0 mL de ácido nítrico concentrado juntamente com 2,0 mL de peróxido de hidrogênio como oxidantes para a digestão de 200 mg de folhas em forno de micro-ondas com cavidade. No entanto, os resultados obtidos não foram satisfatórios. As folhas não foram completamente digeridas, restando resíduos.

Dentre os diferentes tipos de amostras alcachofra analisadas, as folhas foram as mais difíceis de serem digeridas, por isso, com o intuito de desenvolver um método de determinação de metais em alcachofra, as condições experimentais para a digestão destas amostras foram avaliadas a partir de um planejamento fatorial completo  $2^3$  em triplicata com dois pontos centrais (PC). Este estudo envolveu os seguintes fatores: composição da mistura ácida, tempo de radiação e temperatura do micro-ondas em folhas da planta medicinal.

Nesta etapa, foram analisados somente alumínio, ferro e zinco, presentes em maiores concentrações nas amostras de alcachofra. Estes elementos foram quantificados por espectrometria de absorção atômica e os dados experimentais foram processados pelo software Statistica®. Os experimentos foram executados de maneira aleatória. Os níveis e os fatores estudados estão na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Fatores e níveis usados no planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>

Variáveis	Nível baixo (-)	Ponto Central	Nível alto (+)
Mistura ácida	HNO <sub>3</sub> 50% v v <sup>-1</sup>	7,0 mL HNO <sub>3</sub> / 1,0 mL H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	8,0 mL HNO <sub>3</sub>
Tempo (min)	10	20	30
Temperatura (°C)	180	200	220

Para avaliar os fatores do planejamento fatorial, 200,0 mg de folhas de alcachofra foram digeridas com um volume de 8,0 mL de solução ácida. Os brancos foram feitos da mesma forma. O programa de aquecimento empregado para o procedimento está descrito na Tabela 3.4.

Tabela 3.4. Programa de aquecimento para a digestão de folhas de alcachofra por micro-ondas com cavidade

Etapa	Rampa/min	Patamar/min	Temperatura/°C
1	10	-	a*
2	-	b*	a*
3	Ventilação até temperatura ambiente		

a, b\* variáveis avaliadas no planejamento fatorial

O fator referente à mistura ácida avaliou o uso de ácido nítrico concentrado (nível alto), diluído (nível baixo) e o uso de peróxido de hidrogênio e ácido nítrico concentrado (ponto central). Os níveis e fatores estudados estão descritos na Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Planejamento fatorial  $2^3$  completo com ponto central (n=3)

Fatores/ níveis			
Experimento	Mist. Ácida	t/ min	T/ °C
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9 (P.C.)	0	0	0

Após a execução dos programas de aquecimento, os digeridos foram diluídos para um volume final de 15,0 mL com água e armazenadas em frascos de polipropileno.

A melhor condição obtida para a digestão das folhas em forno de micro-ondas foi também aplicada nas amostras de extrato, cápsula e comprimido de alcachofra.

### 3.4.3. Tratamento de extratos de alcachofra para análise

Os extratos de alcachofra, além de terem sido digeridos em forno de micro-ondas por cavidade em meio ácido, também foram analisados após diluição em meio ácido, sem mais nenhum outro preparo. As amostras de extrato foram diluídas para que a solução analisada atingisse ao final 5% v v<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub>. Sendo assim, ao analisar 15,0 mL de solução, somente foram adicionados 1,20 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e o restante do volume foi completado com a amostra. Todas as soluções foram quantificadas diretamente por F AAS e GF AAS. A análise direta deve ser entendida como a introdução direta dos extratos de alcachofra, após adequada diluição, sem a prévia digestão da amostra no forno de micro-ondas.



#### **3.4.4. Otimização das condições de análise dos digeridos e soluções de extratos por F AAS**

Os digeridos e as soluções de extratos de alcachofra foram analisados por F AAS para a quantificação de alumínio, ferro e zinco. Para isso, inicialmente a lâmpada de de correção de fundo foi alinhada manualmente assim como a altura e inclinação horizontal do queimador. Em seguida foi verificada a estequiometria da chama, definida no manual dos equipamentos. Depois, o fluxo de aspiração da amostra foi otimizado a fim de obter um aumento da sensibilidade de resposta.

A energia da lâmpada foi verificada e o comprimento de onda adequado para a análise de cada elemento foi selecionado.

#### **3.4.5. Otimização das condições de análise dos digeridos e soluções de extratos por GF AAS**

A escolha do modificador permanente foi a etapa inicial da otimização das condições analíticas para que fosse analisado cobre e chumbo por GF AAS. Os diferentes tubos de grafites com plataforma de L'Vov foram tratados como descrito no item 3.3. Os programas de aquecimento, descritos na Tabela 3.6, foram usados sob as condições recomendadas pelo fabricante para as etapas de pirólise, atomização e limpeza. A partir do sinal de absorbância integrada foi possível selecionar o modificador que possibilitou uma maior resposta e melhor correção de fundo, comparado com um menor desvio de resposta para cada tipo de amostra: digerido obtido do planejamento fatorial descrito no item 3.4.2 e solução contendo um extrato no item 3.4.3.

Tabela 3.6. Programa de temperatura do GF AAS utilizado para a seleção do modificador permanente para quantificação de cobre e chumbo em amostras de alcachofra

Temperatura/°C		Rampa/s	Patamar/s	Fluxo de ar/mL min <sup>-1</sup>
Cobre	Chumbo			
100	90	5	15	250
140	140	5	15	250
1000	700	10	10	250
2300	1800	0	5	0
2600	2600	1	10	250

Ao selecionar o modificador permanente mais eficiente para as análises dos digeridos e soluções contendo extratos de alcachofra, foi possível avaliar o uso do paládio como modificador químico em solução.

Após a seleção dos modificadores, foram selecionados intervalos de temperatura de pirólise e atomização para cada analito a fim que fosse avaliada a melhor entre elas de forma univariada.

A temperatura de pirólise para as análises de cobre foi avaliada entre 800 e 1300 °C, usando a temperatura de pirólise em 2300 °C, recomendada pelo fabricante. Para o chumbo, a temperatura de pirólise foi avaliada entre 500 e 1000 °C e a temperatura de atomização de 1800 °C recomendada pelo fabricante.

Logo em que foram encontradas as temperaturas de pirólise que traziam melhores resultados para ambos os metais, foram estudadas as temperaturas de atomização. Variando a temperatura de 2100 °C a 2600 °C e 1500 °C a 2100 °C, para cobre e chumbo, respectivamente, foi possível obter as condições ótimas para as determinações destes dois metais em digeridos e extratos de alcachofra por GF AAS.

Portanto, durante a etapa de otimização para determinação de cobre e chumbo em amostras de alcachofra, foram avaliadas as temperaturas de pirólise e atomização univariavelmente. O programa de temperatura usado está apresentado na Tabela 3.7.

Tabela 3.7. Programa de temperatura do forno de grafite usado para a otimização das análises das amostras de alcachofra para a determinação de cobre e chumbo.

Etapas	Temperatura/°C	Rampa/s	Patamar/s	Fluxo de argônio/ mL min <sup>-1</sup>
Pré-secagem	100	5	20	250
Secagem	140	15	15	250
Pirólise	a	10	20	250
Atomização	b	0	5	0
Limpeza	2600	1	5	250
Resfriamento	20	1	10	250

a, b – variáveis otimizadas para ambos elementos.

### 3.5. Catuaba

#### 3.5.1. Amostragem

Amostras de cascas de catuaba em pó e a bebida alcoólica foram adquiridas no comércio local de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. Para este estudo, foram selecionadas cinco marcas de casca em pó e duas marcas da bebida. As cascas em pó foram secas a 60 °C e trituradas manualmente em almofariz de ágata. As amostras foram passadas por peneiras de diâmetro igual a 300 µm.

#### 3.5.2. Método para a digestão de catuaba em pó em forno de micro-ondas com cavidade

A programação desenvolvida para a digestão das amostras de alcachofra foi suficiente para gerar digeridos sem resíduos. Em tal procedimento, 200 mg de catuaba em pó foram digeridas com 8,00 mL de ácido nítrico 50% v v<sup>-1</sup>. Os brancos analíticos foram feitos da mesma forma. O programa de aquecimento para o procedimento é descrito pela Tabela 3.8.

Tabela 3.8. Programa de aquecimento e ventilação do procedimento de digestão por micro-ondas com cavidade

Etapa	Rampa/min	Patamar/min	Temperatura/°C
1	10	-	200
2	-	20	200
3	Ventilação até temperatura ambiente		

Os digeridos foram diluídos para um volume final de 15,0 mL com água e armazenados em frascos de polipropileno após a execução do programa de aquecimento.

### 3.5.3. Tratamento de bebidas de catuaba para análise direta

As bebidas de catuaba somente foram diluídas com a finalidade de que o teor alcoólico atingisse aproximadamente 3,5% v v<sup>-1</sup> e o meio fosse acidificado. Ao final o teor de ácido foi de 5% v v<sup>-1</sup>. A solução foi analisada diretamente por F AAS e GF AAS. A análise direta deve ser entendida como a introdução direta das bebidas de catuaba, depois de adequada diluição, sem a prévia digestão da amostra no forno de micro-ondas.

### 3.5.4. Otimização das condições de análise dos digeridos e soluções de bebidas de catuaba por F AAS

Para a quantificação de alumínio, ferro e zinco por F AAS, as condições de análise dos digeridos e as soluções de bebidas de catuaba foram avaliadas. A lâmpada de correção de fundo e a altura juntamente com a inclinação horizontal do queimador foram alinhadas manualmente. Também foi verificada a estequiometria da chama, definida no manual dos equipamentos. O fluxo de aspiração da amostra foi otimizado a fim de obter um aumento da sensibilidade de resposta. A energia da lâmpada foi verificada e o comprimento de onda adequado para a análise de cada elemento foi selecionado.

### 3.5.5. Otimização das condições de análise dos digeridos e soluções de bebidas de catuaba por GF AAS

A otimização das condições de análise de cobre e chumbo nos digeridos e nas soluções por GF AAS consistiu na escolha do melhor modificador permanente, na avaliação do uso de modificador químico em solução e na avaliação das temperaturas de pirólise e atomização.

Todo o procedimento foi semelhante ao realizado para a otimização das condições de análises nas amostras de alcachofra, descritas no item 3.4.5. Primeiramente, pelo uso de diferentes tubos de grafites com plataforma de L'Vov tratados como descrito no item 3.3, foram escolhidos os modificadores permanentes para as amostras digeridas e soluções de bebidas, em separado. O programa de aquecimento usado para esta finalidade é descrito na Tabela 3.9, sendo condições recomendadas pelo fabricante para as etapas de pirólise, atomização e limpeza.

Tabela 3.9. Programa de temperatura do GF AAS utilizado para a seleção do modificador permanente para quantificação de cobre e chumbo em amostras de catuaba

Temperatura/°C		Rampa/s	Patamar/s	Fluxo de ar/mL min <sup>-1</sup>
Cobre	Chumbo			
100	90	5	15	250
140	140	5	15	250
1000	700	10	10	250
2300	1800	0	5	0
2600	2600	1	10	250

O modificador permanente que possibilitou uma maior resposta e melhor correção de fundo, comparado com um menor desvio de resposta, foi selecionado verificando sinais de absorbância integrada obtida pelo uso de cada tubo. Após a seleção do modificador permanente mais eficiente, foi avaliado o uso do paládio como modificador químico em solução. Obtendo-se o

melhor resultado, foram selecionados intervalos de temperatura de pirólise e atomização para cada analito, avaliadas univariavelmente.

O programa de temperatura usado durante a etapa de otimização das temperaturas de pirólise e atomização para determinação de cobre e chumbo em amostras de catuaba está apresentado na Tabela 3.10.

Tabela 3.10. Programa de temperatura do forno de grafite usado na otimização das análises das amostras de catuaba para a determinação de cobre e chumbo por GF AAS

Etapas	Temperatura/°C	Rampa/s	Patamar/s	Fluxo de argônio/ mL min <sup>-1</sup>
Pré-secagem	100	5	20	250
Secagem	140	15	15	250
Pirólise	a	10	20	250
Atomização	b	0	5	0
Limpeza	2600	1	5	250
Resfriamento	20	1	10	250

a, b – variáveis otimizadas para ambos elementos.

No intervalo de 800 e 1300 °C foi avaliada a temperatura de pirólise para as análises de cobre, sendo a temperatura de pirólise 2300 °C, recomendada pelo fabricante. Para o chumbo, a temperatura de pirólise foi avaliada entre 500 e 1000 °C e a temperatura de atomização recomendada pelo fabricante de 1800 °C.

Depois que foram otimizadas as temperaturas de pirólise para ambos os metais, foram estudadas as temperatura de atomização. Variando a temperatura de 2100 °C a 2600 °C e 1500 °C a 2100 °C, para cobre e chumbo, respectivamente, foi possível obter as condições ótimas para as determinações destes dois metais em digeridos e soluções de bebidas de catuaba por GF AAS.

### 3.6. Avaliação da disponibilidade dos elementos

Uma solução simulada do suco gástrico (0,80 g L<sup>-1</sup> de pepsina, 0,15 g L<sup>-1</sup> de NaCl e 0,25% v v<sup>-1</sup> de HCl) foi usada como extrator para avaliar a disponibilidade dos elementos nas amostras sólidas. Para isso, foram adicionados 30,0 mL da solução extratora sobre 500 mg de folhas, cápsulas e comprimidos de alcachofra, como também de catuaba em pó, sendo cada marca e tipo em separado. A mistura de cada amostra com o suco gástrico foi fechada e, em seguida, incubada a 37 °C sob agitação a 200 rpm durante 1 hora. Após esse período, as misturas foram centrifugadas a 3500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi separado do resíduo sólido para que fossem quantificados os elementos estudados.

Os valores obtidos pelos métodos de digestão ácida em forno de micro-ondas por cavidade e análise direta foram comparados com os valores obtidos pela extração pela solução simulada do suco gástrico.

### 3.7. Validação dos métodos analíticos

Conforme recomendação do INMETRO (2007) e da IUPAC (2002), o método desenvolvido foi validado pelas seguintes figuras de mérito: efeito de matriz, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. Para o estudo de exatidão foi utilizado o material de referência certificado NIST SRM1573a (folha de tomate) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST, EUA).

#### 3.7.1. Avaliação do efeito de matriz

Os resultados obtidos de amostras fortificadas com quantidades conhecidas de um analito e os obtidos de soluções aquosas desse mesmo analito e nas mesmas concentrações podem ser comparados para determinar o efeito da matriz (Thompson, Ellison e Wood, 2002).

Assim, foi realizada uma comparação de inclinações das curvas de calibração construídas com o analito em meio ácido com inclinações das curvas construídas pelo método de ajuste de matriz. Nesse estudo, foram preparadas três curvas de calibração em meio ácido e três curvas por ajuste de matriz em um *pool* de cada tipo de amostras de alcachofra e catuaba, obedecendo a faixa linear de cada elemento: alumínio ( $0,0 - 40,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), cobre ( $0 - 50,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), ferro ( $0 - 3,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), chumbo ( $0 - 100,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) e zinco ( $0 - 0,75 \text{ mg L}^{-1}$ ) e foi descontado o valor de absorbância do branco. A partir das inclinações médias e dos respectivos desvios padrão foram aplicados os testes F e t-Student ao nível de confiança de 95%.



## **4. Resultados e discussão**

### **4.1. Alcachofra**

#### **4.1.1. Desenvolvimento de método para a digestão das amostras em forno de micro-ondas com cavidade**

Soylak e colaboradores (2007) usaram 6,0 mL de ácido nítrico concentrado juntamente com 2,0 mL de peróxido de hidrogênio como oxidantes para a digestão de folhas de chá em forno de micro-ondas com cavidade. Inicialmente, essas mesmas condições foi a estratégia usada para digerir as amostras de alcachofra. Foram digeridas 200 mg de folhas de alcachofra com um volume de 8,0 mL de solução ácida com o programa de aquecimento descrito na Tabela 3.4, sendo os níveis e fatores estudados estão descritos na Tabela 3.5. A pressão e potência máxima aplicadas foram 30 bar e 750 W, respectivamente.

Sob essas condições, as folhas não foram totalmente digeridas. A quantidade de resíduos foi alta em relação a quantidade inicial de amostra. Os resultados obtidos não foram satisfatórios.

Então, foram avaliadas as condições experimentais para o procedimento de digestão das folhas de alcachofra com um planejamento fatorial completo  $2^3$  com ponto central (PC) envolvendo os fatores: composição da mistura ácida, tempo de radiação e temperatura.

Após a execução do programa de aquecimento, observou-se que alguns dos digeridos apresentavam resíduos de material orgânico. Apesar dos pequenos tamanhos de partículas, alguns experimentos não foram suficientes para possibilitar a inexistência destes resíduos. Por isso, os fatores estudados foram avaliados de forma que, além de permitir melhor digestão, também fossem obtidos maiores concentrações dos metais analisados. As respostas médias dos experimentos estão apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Respostas médias ( $\mu\text{g/g}$ ) dos experimentos realizados no planejamento fatorial  $2^3$  completo para alumínio, ferro e zinco

Experimento	Al	Fe	Zn
1	1668	375,4	25,89
2	1194	434,6	29,78
3	1824	413,6	27,06
4	1741	409,2	37,05
5	1732	478,2	30,34
6	1927	435,2	34,79
7	1844	519,0	30,21
8	1854	443,7	21,86
PC	1969	451,5	21,35
1	1657	377,8	25,21
2	1182	432,8	29,46
3	1834	416,6	29,05
4	1750	421,3	39,11
5	1721	486,3	29,65
6	1937	429,1	33,75
7	1850	531,2	30,71
8	1859	425,3	23,27
PC	1960	489,3	20,43
1	1667	380,2	26,57
2	1190	457,2	27,99
3	1829	384,5	27,12
4	1749	446,0	39,96
5	1722	481,3	27,59
6	1938	430,3	33,99
7	1857	533,8	28,33
8	1853	426,2	21,57
PC	1965	466,9	20,38

Não houve uma única condição experimental ideal para todos os metais estudados. Para obter a significância dos três fatores analisados nos níveis estudados para a digestão das folhas de alcachofra foram obtidos gráficos de Pareto, a 95% de confiança, a partir dos valores de todas as replicatas, ilustrados na Figura 4.1.

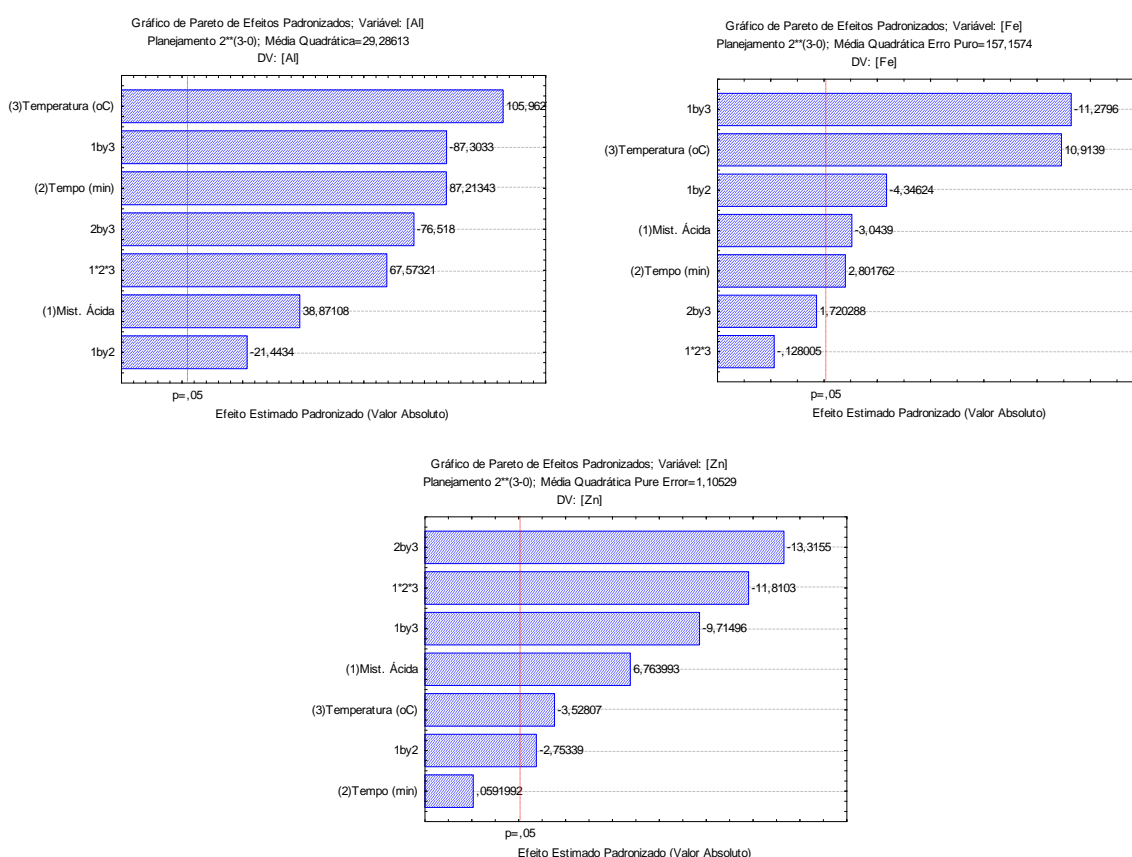


Figura 4.1. Gráficos de Pareto obtidos pelo planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> para alumínio, ferro e zinco.

Para a variável mistura ácida, os gráficos de Pareto mostraram a significância com efeito positivo para o alumínio e zinco, ou seja, para estes elementos, a digestão das folhas de alcachofra foi favorecida com o uso de ácido nítrico concentrado. Entretanto, para o ferro, o efeito significativo foi contrário, com uso de ácido diluído.

O tempo de radiação foi significativo para alumínio e ferro com efeito positivo. Para zinco, esta variável não foi significativa.

O terceiro fator estudado foi a temperatura. Este fator foi significativo e positivo para alumínio e ferro, indicando que o aumento da temperatura levaria a melhores resultados. No entanto, para zinco a situação foi invertida, ou seja, a temperatura foi significativa e negativa, indicando que uma diminuição da temperatura resultaria em aumento da concentração deste elemento.

Foi realizado também um estudo levando-se em consideração o efeito em conjunto de todas as respostas encontradas para as concentrações dos elementos investigados, ou seja, alumínio, ferro e zinco. O gráfico de Pareto da Figura 4.2 ilustra o resultado encontrado.

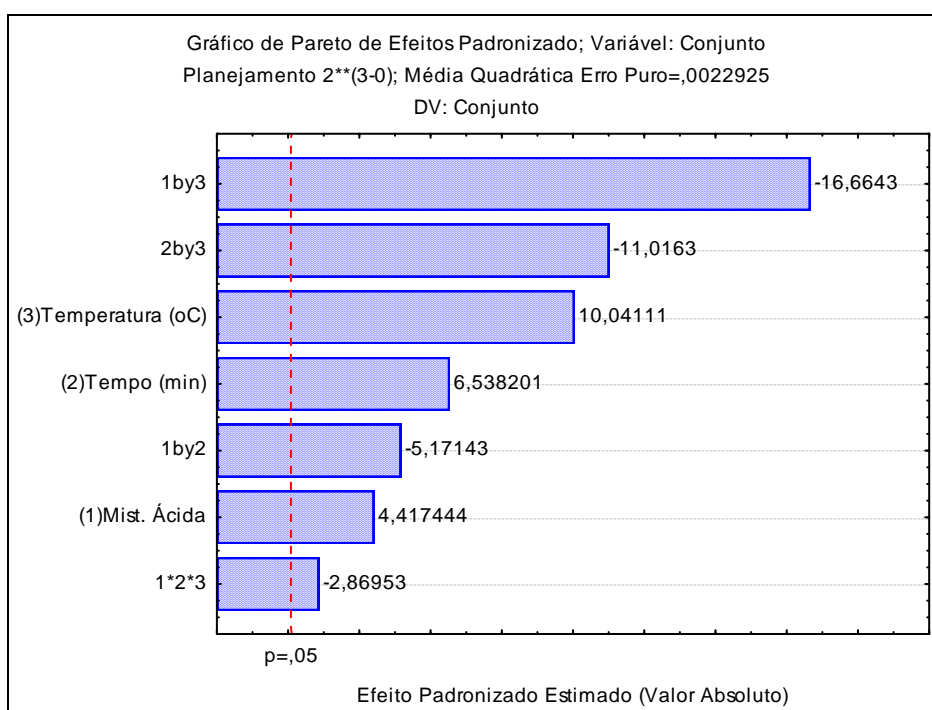


Figura 4.2. Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo  $2^3$ , considerando as respostas em conjunto.

Os efeitos principais: mistura ácida, tempo e temperatura foram significativos e positivos na análise em conjunto. Pela Figura nota-se que as interações mistura ácida e temperatura e tempo e temperatura foram significativas com efeitos negativos. A interação mistura ácida e tempo foi significativa com efeito negativo. Portanto, os gráficos de Pareto obtidos pelo planejamento fatorial mostraram que algumas interações de variáveis foram

significativas. Esses efeitos podem ser mais bem avaliados a partir de figuras geométricas.

Observando-se os efeitos das interações mistura ácida e temperatura, mistura ácida e tempo e tempo e temperatura, ilustrados na Figuras 4.3, 4.4, 4.5, pode-se fazer as seguintes considerações:

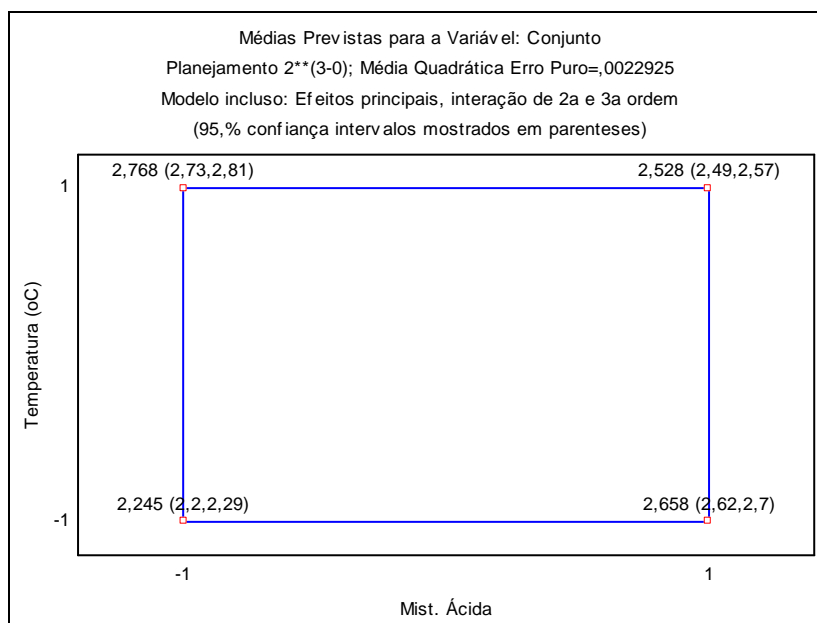


Figura 4.3. Gráfico da interação mistura ácida e temperatura obtidos pelo planejamento fatorial completo  $2^3$ , considerando todas as respostas em conjunto.

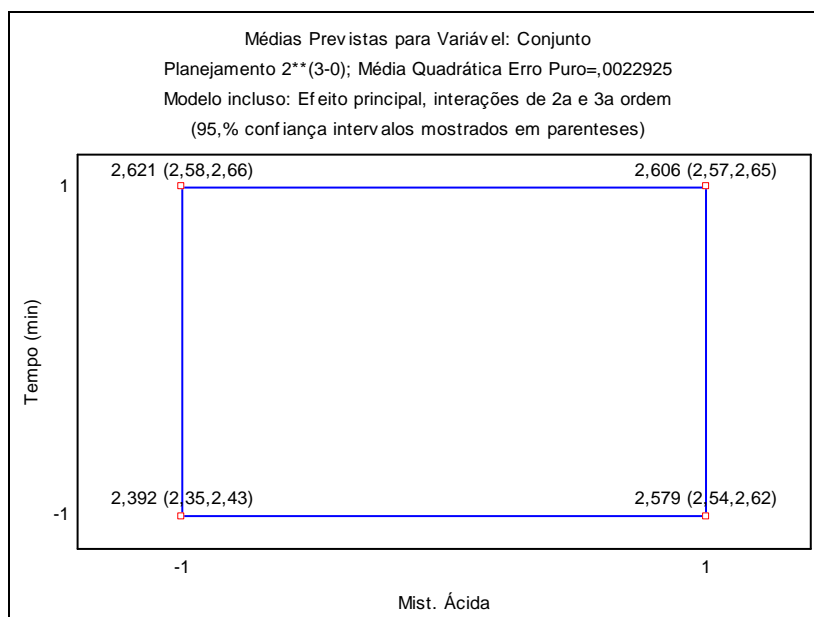


Figura 4.4. Gráfico da interação mistura ácida e tempo obtidos pelo planejamento fatorial completo  $2^3$ , considerando todas as respostas em conjunto.

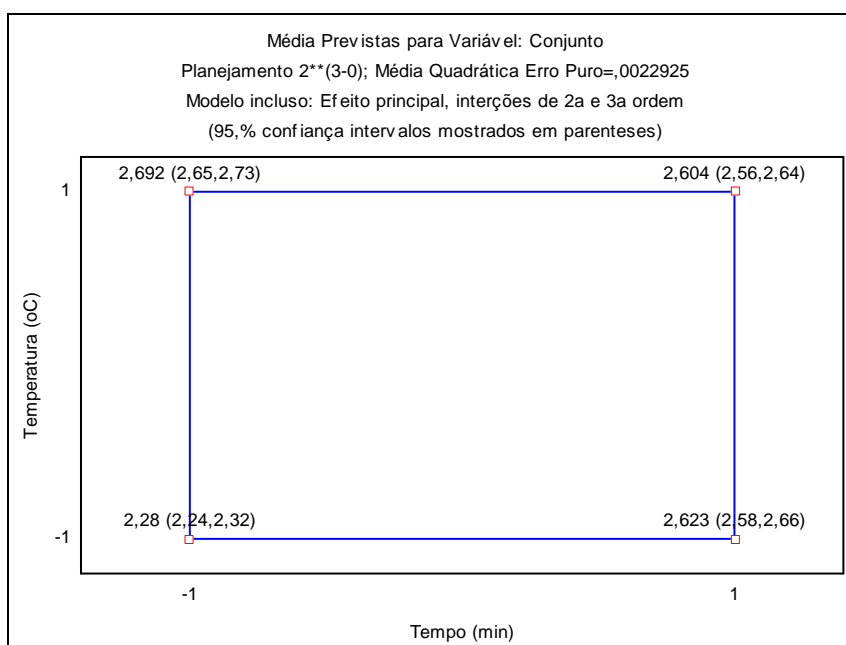


Figura 4.5. Gráfico da interação tempo e temperatura obtidos pelo planejamento fatorial completo  $2^3$ , considerando todas as respostas em conjunto.

A mistura ácida diluída e a temperatura em seu maior nível favorecem a obtenção de melhores digeridos, sendo que, o fator mistura ácida é o maior responsável por variações nas respostas. Também, associado com a utilização do ácido diluído, um maior tempo de digestão favorece a obtenção de maiores concentrações dos elementos investigados. Nota-se na Figura 4.5 que a diminuição das variáveis tempo e temperatura resulta em variações significativas.

Percebendo-se a maior significância da interação da variável mistura ácida com as demais variáveis, foi realizado um estudo multivariado com os experimentos do planejamento fatorial completo  $2^3$ . As concentrações obtidas foram usadas como uma matriz de dados nos métodos de análise exploratória por componentes principais. Esse método de avaliação estatística realiza um agrupamento de variáveis de acordo com suas semelhanças. O gráfico dos escores da componente principal 1 *versus* componente principal 2 é apresentado na Figura 4.6.

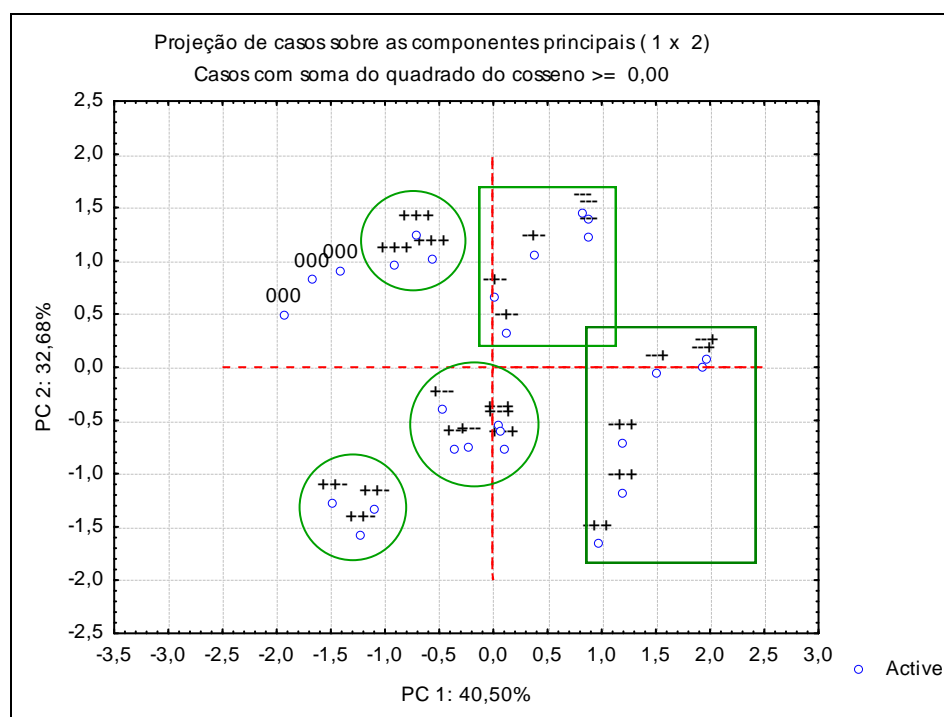


Figura 4.6. Gráfico dos escores da primeira e segunda componente principal dos dados obtidos pelo planejamento fatorial  $2^3$ .

As três componentes principais explicam 100% da variância total dos dados, com as duas primeiras PC's sendo responsável por 73,2% da variância explicada.

Pela Figura 4.6 dois grupos podem ser diferenciados: o grupo de pontos representando experimentos em que o fator mistura ácida foi empregado em seu nível negativo ( $\text{HNO}_3$  diluído) e em seu nível positivo ( $\text{HNO}_3$  concentrado). Os experimentos com o ácido concentrado estão à esquerda do gráfico (destacados pelos círculos), enquanto os experimentos empregando ácido diluído estão a direita (destacados pelos retângulos). Ocorre uma separação nítida dos agrupamentos em função da concentração do ácido empregado, indicando o peso dessa variável na obtenção dos resultados do planejamento. Analisando-se o gráfico dos pesos, apresentado na Figura 4.7, observa-se a formação de dois grupos, um composto Al e Fe e outro por Zn. Os dados apresentados no gráfico da Figura 4.6 juntamente com os apresentados no gráfico da Figura 4.7 podem sugerir que a digestão de Al e Fe em ácido concentrado leva a resultados quantitativos, enquanto que para Zn faz-se necessário o uso de ácido nítrico diluído.

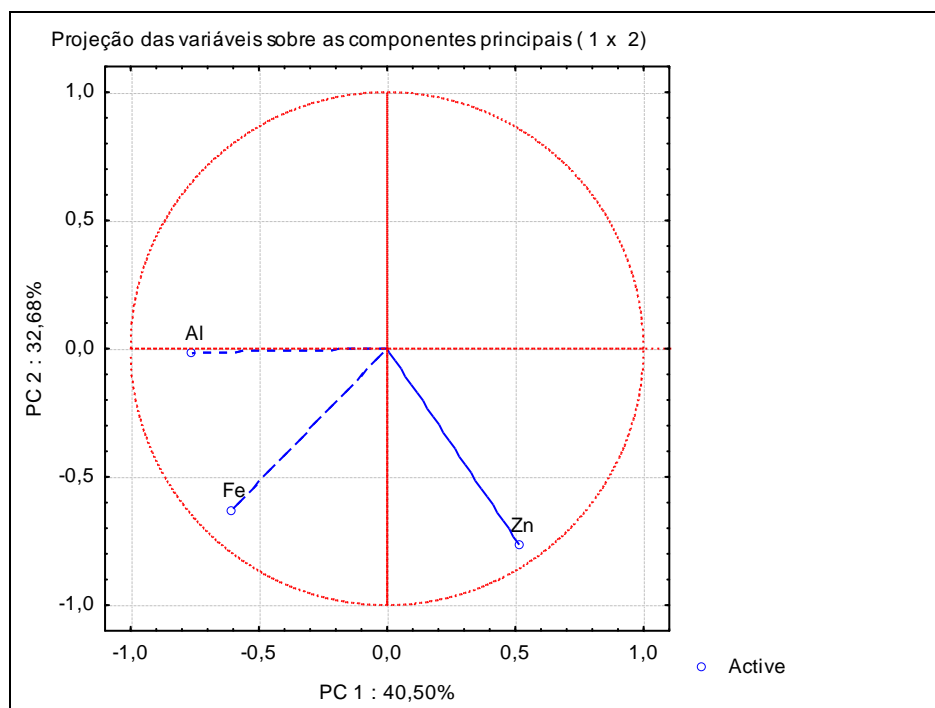


Figura 4.7. Gráfico dos pesos da primeira e segunda componente principal dos dados obtidos pelo planejamento fatorial  $2^3$ .



Porém, o objetivo do estudo foi o de estabelecer uma condição única de digestão que favorecesse a determinação de todos os elementos de interesse. Considerando todas as observações, foi estabelecido o uso de uma temperatura e tempo intermediários (200 °C e 20 min, respectivamente). Com relação à mistura ácida, optou-se pelo uso de ácido nítrico diluído.

O emprego de ácidos diluídos no processo de digestão é uma alternativa atraente, explicada pelo fato da água ser uma molécula de dipolo adequado para uma conversão eficiente de energia micro-ondas. Portanto, o uso de soluções diluídas implicaria em uma melhor eficiência do aquecimento por micro-ondas (Krug et al., 2006).

Desta forma, o processo de digestão foi realizado com 8,0 mL de ácido nítrico 50 % v/v, tempo de irradiação de 20 min e temperatura de 200 °C para a determinação não somente de alumínio, ferro e zinco, mas também de chumbo e cobre. Estes dois últimos elementos são dificilmente passivados (Krug et al., 2006), o que justifica o uso do ácido nítrico diluído como melhor condição de quantificação após o procedimento. Além disso, a utilização do ácido diluído favorece não só a digestão como também permite um maior tempo de uso do tubo de grafite nas análises.

Visualmente puderam-se obter digestões completas apenas com o ácido nítrico, ou seja, sem o uso de peróxido de hidrogênio. As intensidades relativas a cada experimento e analito, ilustrado pela Figura 4.8, confirmaram que o uso do peróxido de hidrogênio não resultou em resultados excepcionais quando comparado com o uso unicamente de ácido nítrico. Esse mesmo método foi aplicado para as outras amostras de alcachofra: cápsulas, extratos e comprimidos. A digestão dessas amostras foi completa.

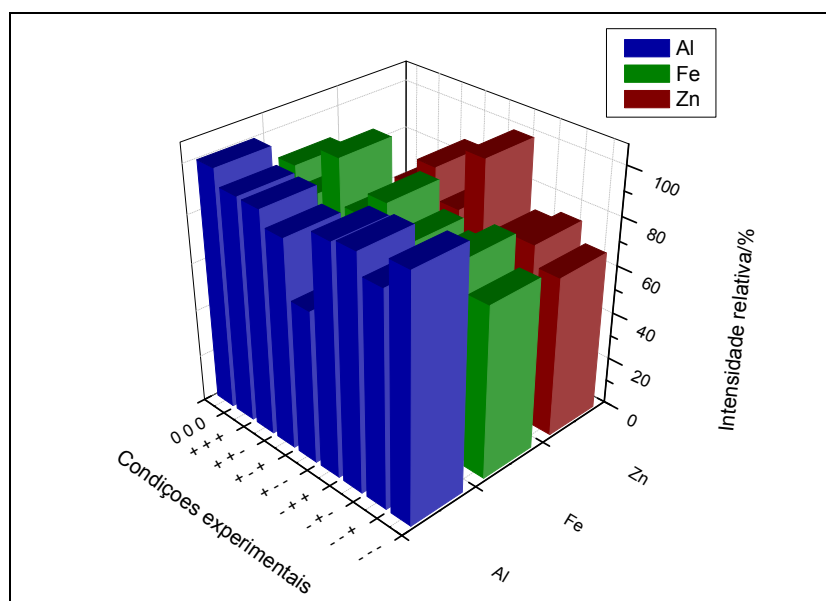


Figura 4.8. Intensidade relativa dos elementos nas condições experimentais.

Wu e colaboradores (1997) estudaram a digestão em micro-ondas fechado de materiais de referência certificados de plantas empregando ácido nítrico ou uma mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio para determinar 26 elementos e avaliar o potencial e as limitações do método. Os pesquisadores conseguiram resultados concordantes com os certificados empregando somente ácido nítrico, sem adição de peróxido de hidrogênio.

Segundo Araújo e colaboradores (2002), a digestão ácida de plantas por micro-ondas pode ser realizada em condições brandas. Com o objetivo de estabelecer a quantidade mínima de reagentes que poderiam ser utilizados para atingir a completa digestão de diferentes espécies de *Paspalum*, uma forrageira utilizada na alimentação animal, o volume total de reagentes foi mantida constante, mas a concentração de ácido nítrico variada. Experimentalmente, foi demonstrado que os materiais vegetais podem ser digeridos de maneira eficaz com ácidos diluídos em micro-ondas com cavidade. Altas temperaturas e pressão geraram a oxidação da matéria orgânica, mesmo em concentrações de ácido nítrico diluído, comprovados por dados obtidos por RMN, que permitiram uma melhor compreensão dos processos ocorridos durante a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas em recipientes fechados.

#### **4.1.2. Otimização das condições de análise para determinação de cobre e chumbo em digeridos e soluções de extratos de alcachofra por GF AAS**

Os dois elementos, cobre e chumbo, foram quantificados por espectrometria de absorção atômica por forno de grafite. O uso dessa técnica de quantificação é justificado pela baixa concentração destes analitos nas amostras de alcachofra. Diante disso, as condições de análise dos digeridos de folhas, cápsulas, extratos e comprimidos, assim como a análise direta dos extratos, foram otimizadas para obter a melhor intensidade, reprodutibilidade e correção de fundo.

Inicialmente, foram realizadas análises em triplicata para escolha do melhor modificador permanente, usando as condições recomendadas pelo fabricante para as etapas de pirólise e atomização. As temperaturas de pirólise e atomização empregadas para o cobre foram de 1000 e 2300 °C, respectivamente. Para o Pb, as temperaturas de pirólise e atomização empregadas foram de 700 e 1800 °C, respectivamente. As análises nos digeridos de alcachofra apresentaram concentração satisfatória dos analitos e, portanto, não foi necessária a adição de solução padrão nas amostras digeridas, porém, as amostras de extratos de alcachofra foram fortificadas com 50 µg L<sup>-1</sup> de chumbo.

Com o objetivo de minimizar o efeito das variações cinéticas no processo de atomização, foram obtidas as áreas de picos e não alturas de pico. Essas condições asseguram uma análise adequada, permitindo métodos mais sensíveis e com mínima interferência (Koirtyohann e Kaiser, 1982). A Tabela 4.2 apresenta os resultados obtidos para os diferentes modificadores permanentes avaliados para ambos os metais nas amostras dos digeridos de alcachofra. A partir desses resultados, foi possível observar que para as análises de cobre, o melhor modificador foi o nióbio. Para o chumbo, a melhor intensidade, com boa reprodutibilidade e correção de fundo, foi obtida com o tubo sem modificador permanente. A Figura 4.9 mostra os perfis dos picos obtidos para estes dois melhores resultados, os quais se apresentaram com rápido retorno a linha base.

Tabela 4.2 Modificadores permanentes avaliados na determinação de cobre e chumbo em digeridos de alcachofra por GF AAS

Modificador permanente	Cobre		Chumbo	
	Absorbância Integrada	Absorbância de Fundo	Absorbância Integrada	Absorbância de Fundo
Sem modificador	0,7540 ± 0,0035	0,0214	0,0984 ± 0,0036	0,0189
Irídio	0,5504 ± 0,0159	0,0381	0,0754 ± 0,0398	0,0396
Nióbio	1,1432 ± 0,0077	0,0256	0,0127 ± 0,0022	0,0068
Ródio	0,7266 ± 0,0469	0,0193	0,0553 ± 0,0024	0,0256
Rutênio	0,8476 ± 0,0208	0,0516	0,0893 ± 0,0086	0,0606
Tântalo	0,8776 ± 0,0159	0,0449	0,0715 ± 0,0399	0,0645
Titânio	0,8951 ± 0,0051	0,0183	0,0836 ± 0,0078	0,0377
Zircônio	0,3409 ± 0,0051	0,0302	0,0482 ± 0,0079	0,0489

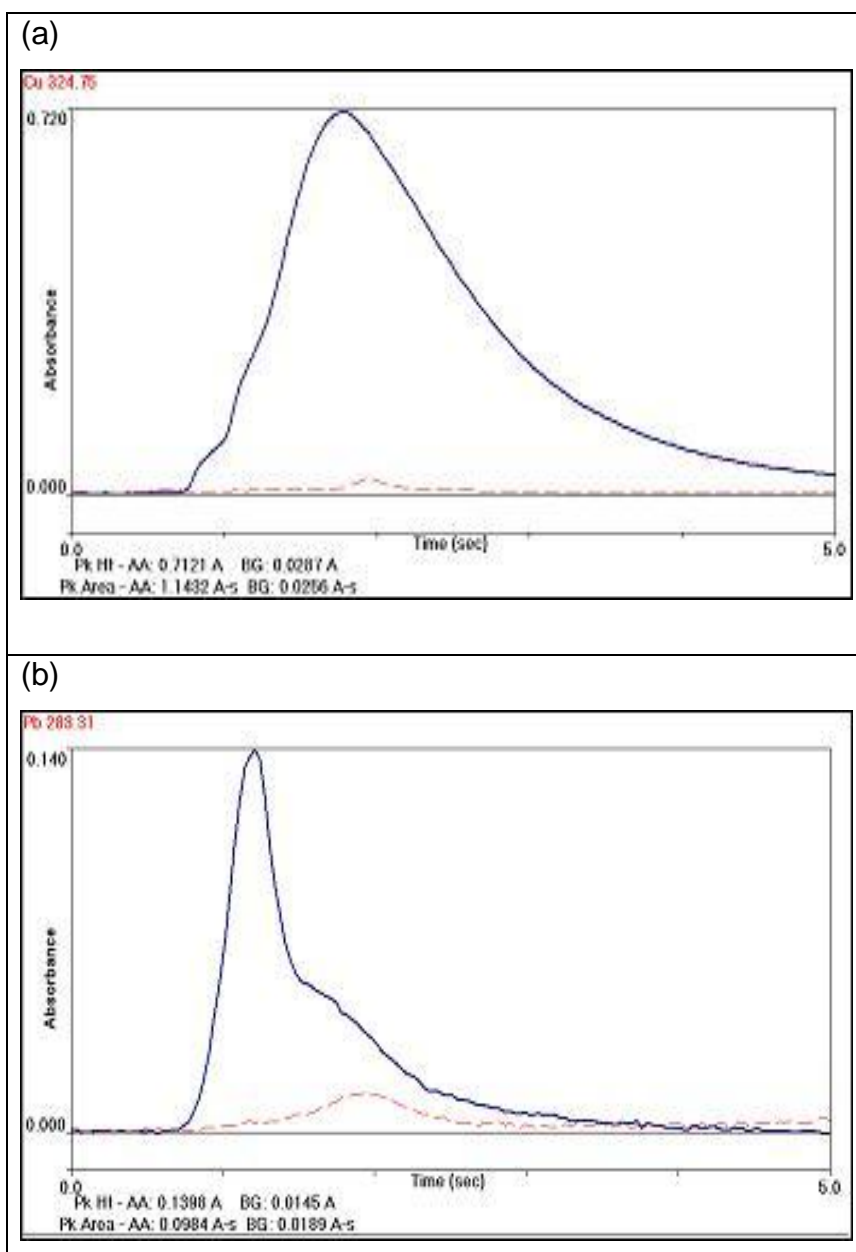


Figura 4.9. Perfil dos dos sinais analíticos dos modificadores selecionados para as análises em digeridos de alcachofra por GF AAS: (a) níobio para a determinação de cobre (b) sem modificador permanente chumbo.

A Tabela 4.3 apresenta os resultados obtidos para os diferentes modificadores permanentes avaliados para ambos os metais em extratos de alcachofra analisados diretamente. A Figura 4.10 mostra os perfis dos picos obtidos para estes dois melhores resultados. Nestas amostras, para as análises de cobre, o melhor modificador foi o zircônio, enquanto que para as análises de chumbo foi o irídio.

Tabela 4.3. Modificadores permanentes avaliados na determinação de cobre e chumbo em extratos de alcachofra por GF AAS

Modificador permanente	Cobre		Chumbo	
	Absorbância Integrada	Absorbância de Fundo	Absorbância Integrada	Absorbância de Fundo
Sem modificador	0,3214 ± 0,0116	0,1256	0,3298 ± 0,0029	0,1080
Irídio	0,2498 ± 0,0003	0,0866	0,5218 ± 0,0100	0,0119
Nióbio	0,4140 ± 0,0279	0,1310	0,2961 ± 0,0028	0,0904
Ródio	0,4382 ± 0,0030	0,1228	0,3219 ± 0,0140	0,0494
Rutênio	0,4063 ± 0,0062	0,1482	0,3013 ± 0,0440	0,0644
Tântalo	0,4779 ± 0,0095	0,1247	0,2914 ± 0,0350	0,0452
Titânio	0,4717 ± 0,0409	0,1064	0,2987 ± 0,0077	0,0639
Zircônio	0,6500 ± 0,0266	0,1089	0,4734 ± 0,0237	0,0468

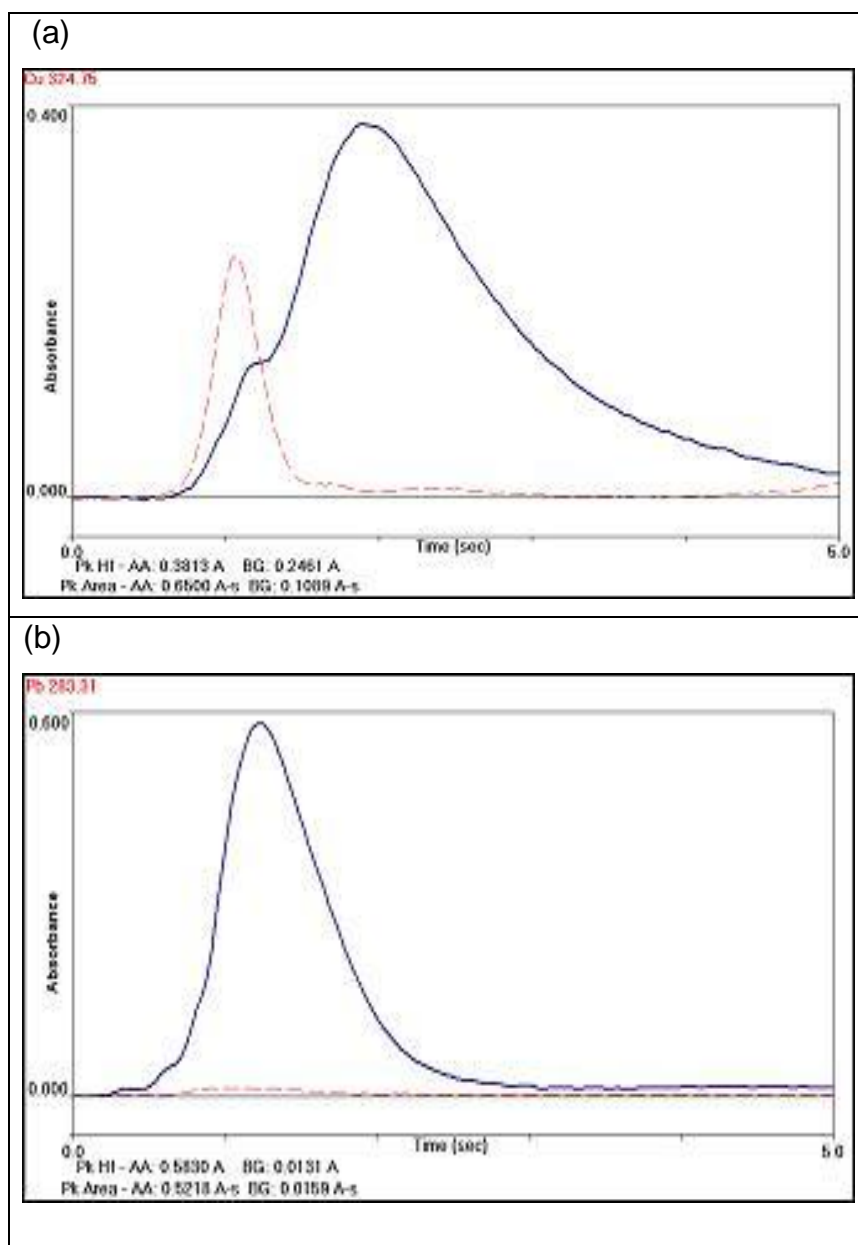


Figura 4.10. Perfil dos sinais analíticos dos modificadores selecionados para as análises em extratos de alcachofra por GF AAS: (a) zircônio para a determinação de cobre (b) irídio para chumbo.

Em relação à modificação química convencional, a permanente apresenta as seguintes vantagens (Ortner et al., 2002; Welz e Sperling, 1999) fácil e rápida obtenção da camada de modificador sobre a plataforma ou parede do forno de grafite, aumento de velocidade da análise, pois elimina o tempo de secagem do modificador se pré-injetado e a etapa de pipetagem do mesmo, atua como catalisador em matrizes complexas permitindo a análise de algumas matrizes diretamente sem nenhuma ou com mínima digestão prévia e, aumenta consideravelmente a vida útil do forno.

Além de avaliar o uso de modificador permanente nas amostras de digeridos e extratos de alcachofra, foi estudada a adição de paládio, como modificador químico em solução na determinação de chumbo e cobre. Este modificador em solução resultou em melhor eficiência somente para as análises de chumbo nas amostras de alcachofra digeridas, sendo o perfil do pico obtido mostrado na Figura 4.11.

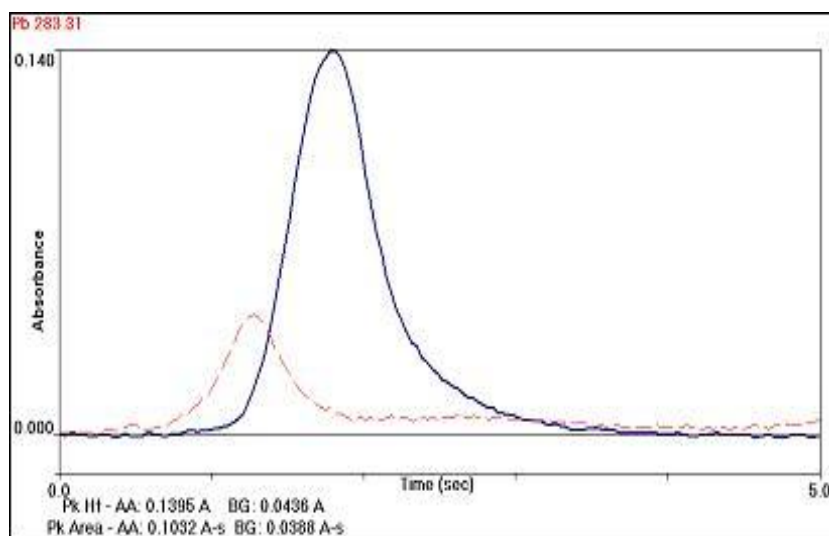


Figura 4.11. Perfil do sinal analítico dos modificadores selecionados para as análises de chumbo em extratos de alcachofra por GF AAS: irídio como permanente e paládio em solução.

Após terem sido selecionados os modificadores para serem usados nas análises para dos digeridos e extratos de alcachofra, foram avaliadas as temperaturas de pirólise e atomização univariavelmente, sendo que, a



temperatura de pirólise para a análise de cobre nos digeridos e extratos de alcachofra foi avaliada entre 800 e 1300 °C, usando a temperatura de atomização recomendada pelo fabricante (2300 °C). A Tabela 4.4 apresenta os valores médios de absorvâncias integradas (n = 3) obtidos na determinação de cobre em digeridos e extratos de alcachofra por GF AAS nas condições testadas.

Tabela 4.4. Absorvâncias obtidas na otimização da temperatura de pirólise para análise de cobre em digeridos e extratos de alcachofra por GF AAS

	Digeridos	Extrato
Temperatura/°C	Absorvância integrada	Absorvância integrada
800	1,083 ± 0,013	1,114 ± 0,004
900	1,148 ± 0,006	1,103 ± 0,009
1000	1,123 ± 0,008	1,143 ± 0,007
1100	1,157 ± 0,005	1,158 ± 0,013
1200	1,142 ± 0,002	1,118 ± 0,008
1300	1,133 ± 0,005	1,112 ± 0,017

Não houve aumento evidente nos valores de absorvância integrada nos digeridos e nos extratos de alcachofra, ao variar a temperatura de pirólise. O maior valor em ambos os casos foi de 1100 °C, temperatura fixada para a otimização da temperatura de atomização.

A temperatura de pirólise para a análise de chumbo nos digeridos e extratos de alcachofra foi avaliada entre 500 e 1000 °C, usando a temperatura de 1800 °C para a atomização, recomendada pelo fabricante.

Os valores de absorvância integrada indicados pela Tabela 4.5 correspondem à média das leituras feitas em triplicata da otimização da temperatura de pirólise para a análise de chumbo. Semelhante ao cobre, não houve aumento evidente nos valores de absorvância integrada nos digeridos e nos extratos de alcachofra quando foi variada a temperatura de pirólise. O melhor valor de absorvância integrada em ambos os casos foi de 700 °C, sendo assim, fixada para a otimização da temperatura de atomização.

Tabela 4.5. Absorbâncias obtidas na otimização da temperatura de pirólise para análise de chumbo em digeridos e extratos de alcachofra por GF AAS

	Digeridos	Extrato
Temperatura/°C	Absorbância integrada	Absorbância integrada
500	0,093 ± 0,002	0,473 ± 0,024
600	0,095 ± 0,001	0,474 ± 0,033
700	0,103 ± 0,007	0,515 ± 0,010
800	0,092 ± 0,005	0,460 ± 0,008
900	0,093 ± 0,002	0,451 ± 0,022
1000	0,094 ± 0,004	0,405 ± 0,016

A temperatura de atomização foi avaliada entre 2100 e 2600 °C para a análise de cobre nos digeridos e extratos de alcachofra. A Tabela 4.6 apresenta os valores médios de absorbâncias integradas (n = 3) obtidos na determinação de cobre em digeridos e extratos de alcachofra por GF AAS nas condições testadas.

Tabela 4.6. Absorbâncias obtidas na otimização da temperatura de atomização para análise de cobre em digeridos e extratos de alcachofra por GF AAS

	Digeridos	Extrato
Temperatura/°C	Absorbância integrada	Absorbância integrada
2100	1,089 ± 0,008	1,119 ± 0,003
2200	1,096 ± 0,005	1,118 ± 0,008
2300	1,123 ± 0,004	1,143 ± 0,007
2400	1,048 ± 0,005	1,114 ± 0,001
2500	1,014 ± 0,009	1,102 ± 0,003
2600	1,010 ± 0,004	1,109 ± 0,007

Não houve aumento evidente nos valores de absorbância integrada nos digeridos e nos extratos de alcachofra obtida ao variar a temperatura de atomização. O maior valor em ambos os casos foi de 2300 °C.

A temperatura de atomização para a análise de chumbo nos digeridos e extratos de alcachofra foi avaliada entre 1500 e 2100 °C. Os valores de

absorbância integrada mostrados na Tabela 4.7 correspondem à média das leituras feitas em triplicata na otimização. Semelhante ao cobre, não houve aumento evidente nos valores de absorbância integrada nos digeridos e nos extratos de alcachofra quando foi variada a temperatura atomização. A melhor absorbância nos extratos e digeridos foi na temperatura de 1600 °C. Em ambos os casos foi fixada essa temperatura como a de atomização.

Tabela 4.7. Absorbâncias obtidas na otimização da temperatura de atomização para análise de chumbo em digeridos e extratos de alcachofra por GF AAS

Temperatura/°C	Digeridos	Extrato
	Absorbância integrada	Absorbância integrada
1500	0,093 ± 0,006	0,464 ± 0,001
1600	0,103 ± 0,001	0,517 ± 0,002
1700	0,100 ± 0,002	0,508 ± 0,001
1800	0,103 ± 0,002	0,515 ± 0,010
2000	0,071 ± 0,002	0,426 ± 0,004
2100	0,062 ± 0,004	0,416 ± 0,008

Portanto, as condições ótimas de análises estabelecidas para as determinações de cobre e chumbo em digeridos e extratos de alcachofra empregando GF AAS estão apresentadas na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Condições ótimas de análise para as determinações de cobre e chumbo em digeridos e extratos de alcachofra empregando GF AAS

Variável otimizada	Cobre		Chumbo	
	Digeridos	Extratos	Digeridos	Extratos
Modificador permanente	Nióbio	Zircônio	Sem	Írídio
Modificador químico	Sem	Sem	Paládio	Sem
Temperatura de pirólise	1100 °C	1100 °C	700 °C	700 °C
Temperatura de atomização	2300 °C	2300 °C	1600 °C	1600 °C

## **4.2. Catuaba**

### **4.2.1. Otimização das condições de análise para determinação de cobre e chumbo em amostras de digeridos e bebidas de catuaba por GF AAS**

Da mesma forma que na alcachofra, o cobre e o chumbo foram quantificados por espectrometria de absorção atômica por forno de grafite devido a baixa concentração destes analitos nas amostras de catuaba analisadas.

As condições de análise de catuaba em pó digeridas e a análise direta das bebidas, foram otimizadas para obter a melhor intensidade, reprodutibilidade e correção de fundo.

Para escolha do melhor modificador permanente, foram realizadas análises em triplicata nas condições recomendadas pelo fabricante para as etapas de pirólise e atomização, sendo que, as empregadas para o cobre foram de 1000 e 2300 °C, respectivamente, enquanto as temperaturas empregadas para o chumbo foram de 700 e 1800 °C, respectivamente. As análises apresentaram concentração satisfatória do analito e, portanto, não foram fortificadas apesar das baixas absorbâncias encontradas.

As condições foram asseguradas ao obter as áreas dos picos e não as suas alturas. A Tabela 4.9 apresenta os resultados obtidos para os diferentes modificadores permanentes avaliados para ambos os metais nas amostras de catuaba digeridas.

Tabela 4.9. Modificadores permanentes avaliados na determinação de cobre e chumbo em digeridos de catuaba por GF AAS

Modificador permanente	Cobre		Chumbo	
	Absorbância Integrada	Absorbância de Fundo	Absorbância Integrada	Absorbância de Fundo
Sem modificador	0,6609 ± 0,0133	0,0299	0,0212 ± 0,0028	0,0031
Irídio	0,5362 ± 0,0136	0,0558	0,0151 ± 0,0014	0,0087
Nióbio	0,9924 ± 0,0058	0,0076	0,0046 ± 0,0019	0,0006
Ródio	0,6846 ± 0,0136	0,0066	0,0145 ± 0,0059	0,0001
Rutênio	0,7934 ± 0,0010	0,1153	0,0144 ± 0,0087	0,0030
Tântalo	0,9230 ± 0,0167	0,1024	0,0157 ± 0,0073	0,0075
Titânio	0,7357 ± 0,0020	0,0063	0,0087 ± 0,0039	0,0090
Zircônio	0,3115 ± 0,0051	0,0262	0,0115 ± 0,0065	0,0068

Para as análises de cobre o melhor modificador foi o nióbio e, para o chumbo, a melhor intensidade, boa correção de fundo e reprodutibilidade foi obtida com o tubo sem modificador permanente. No entanto, para melhorar o sinal obtido, foi estudada a adição de paládio como modificador químico em solução nas análises. Este modificador químico resultou em melhor eficiência somente para as análises dos digeridos de catuaba, sendo os perfis dos melhores sinais analíticos obtidos mostrados na Figura 4.12.

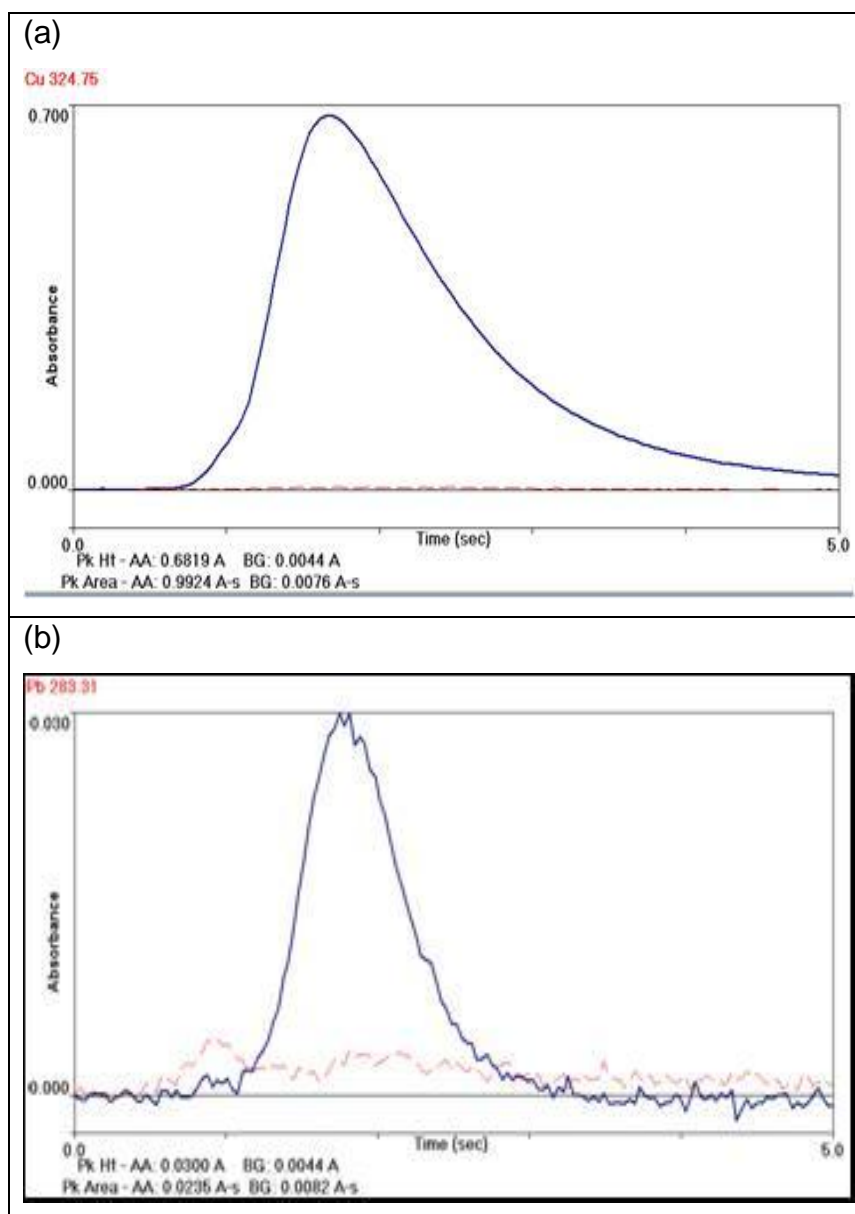


Figura 4.12. Perfil dos picos usando os modificadores selecionados para as análises em digeridos de catuaba por GF AAS: (a) nióbio para a determinação de cobre (b) paládio em solução para chumbo.

Para as análises de cobre em bebidas de alcachofra analisadas diretamente, o melhor modificador foi o titânio, enquanto que para as análises de chumbo foi o ródio. A Tabela 4.10 apresenta os resultados obtidos para os diferentes modificadores permanentes avaliados para a determinação de cobre e chumbo em amostras de bebidas de catuaba.

Tabela 4.10. Modificadores permanentes avaliados na determinação de cobre e chumbo em bebidas de catuaba por GF AAS

Modificador permanente	Cobre		Chumbo	
	Absorbância Integrada	Absorbância de Fundo	Absorbância Integrada	Absorbância de Fundo
Sem modificador	0,3799 ± 0,0064	0,1220	0,0047 ± 0,0037	1,0686
Írídio	0,2588 ± 0,0056	0,0033	0,0138 ± 0,0028	0,0168
Nióbio	0,3497 ± 0,0043	0,0113	0,0063 ± 0,0011	0,0556
Ródio	0,1437 ± 0,0040	0,0048	0,0265 ± 0,0009	0,0165
Rutênio	0,3588 ± 0,0071	0,10094	0,0092 ± 0,0029	0,0688
Tântalo	0,3859 ± 0,0021	0,0199	0,0617 ± 0,0496	1,0930
Titânio	0,4372 ± 0,0098	0,0088	0,0160 ± 0,0012	0,0763
Zircônio	0,3520 ± 0,0066	0,0089	0,0134 ± 0,0037	0,0423

Usando a temperatura de atomização recomendada pelo fabricante (2300 °C), a temperatura de pirólise para a análise de cobre nos digeridos e bebidas de catuaba foi avaliada entre 800 e 1300 °C. A Tabela 4.11 apresenta os valores de absorbância integrada indicados correspondem à média das leituras feitas em triplicata.

Tabela 4.11. Absorbâncias integradas obtidas para otimização da temperatura de pirólise para análise de cobre em digeridos e bebidas de catuaba e GF AAS

	Digeridos	Bebida
Temperatura/°C	Absorbância integrada	Absorbância integrada
800	0,967 ± 0,049	0,315 ± 0,041
900	0,968 ± 0,064	0,352 ± 0,018
1000	0,972 ± 0,058	0,330 ± 0,021
1100	0,978 ± 0,039	0,328 ± 0,060
1200	0,928 ± 0,057	0,224 ± 0,037
1300	0,939 ± 0,058	0,244 ± 0,079

O melhor sinal analítico nos digeridos foi de 1100 °C, enquanto que, para as bebidas foi de 900 °C, temperaturas fixada para a otimização da temperatura de atomização. Não houve aumento evidente dos outros valores de absorbâncias integradas nos digeridos e nas bebidas de catuaba obtidos ao variar a temperatura de pirólise.

A temperatura de pirólise para a análise de chumbo nos digeridos e bebidas de catuaba foi avaliada entre 500 e 1000 °C, usando a temperatura de 1800 °C para a atomização.

Os valores de absorbância integrada mostrados na Tabela 4.12 correspondem à média das leituras feitas em triplicata para a otimização da temperatura de pirólise. O melhor sinal analítico para as amostras digeridas e as bebidas foi de 700 °C, sendo assim, fixada para a otimização da temperatura de atomização.



Tabela 4.12. Absorbâncias obtidas para otimização da temperatura de pirólise para análise de chumbo em digeridos e bebidas de catuaba em GF AAS

	Digeridos	Bebida
Temperatura/°C	Absorbância integrada	Absorbância integrada
500	0,020 ± 0,001	0,013 ± 0,007
600	0,021 ± 0,004	0,011 ± 0,002
700	0,023 ± 0,009	0,023 ± 0,009
800	0,023 ± 0,003	0,022 ± 0,002
900	0,022 ± 0,002	0,023 ± 0,002
1000	0,022 ± 0,005	0,012 ± 0,007

A temperatura de atomização foi avaliada entre 2100 e 2600 °C para a análise de cobre nos digeridos e bebidas de catuaba. A Tabela 4.13 apresenta os valores de absorbância integrada correspondentes à média das leituras em triplicata feitas nestas condições.

Tabela 4.13. Absorbâncias obtidas para otimização da temperatura de atomização para análise de cobre em digeridos e bebidas de catuaba por GF AAS

	Digeridos	Bebida
Temperatura/°C	Absorbância integrada	Absorbância integrada
2100	0,909 ± 0,097	0,192 ± 0,015
2200	0,914 ± 0,009	0,209 ± 0,027
2300	0,918 ± 0,014	0,352 ± 0,018
2400	0,861 ± 0,126	0,263 ± 0,019
2500	0,842 ± 0,079	0,290 ± 0,092
2600	0,841 ± 0,017	0,237 ± 0,097

Para os digeridos e bebidas de catuaba foi fixada a temperatura de atomização de 2300 °C, como recomendado pelo fabricante.

Os valores de absorbâncias integradas indicados na Tabela 4.14 correspondem à média das leituras feitas em triplicata na otimização da temperatura de atomização para a análise de chumbo nos digeridos e bebidas

de catuaba que foi avaliada entre 1500 e 2100 °C. Semelhante ao cobre, não houve aumento evidente nos valores de absorvância integrada nos digeridos e nas bebidas de catuaba quando foi variada a temperatura de atomização.

Tabela 4.14. Absorbâncias obtidas para otimização da temperatura de atomização para análise de chumbo em digeridos e bebidas de catuaba por GF AAS

Temperatura/°C	Digeridos	Bebida
	Absorbância integrada	Absorbância integrada
1500	0,013 ± 0,007	0,028 ± 0,011
1600	0,024 ± 0,001	0,028 ± 0,001
1700	0,024 ± 0,001	0,022 ± 0,002
1800	0,023 ± 0,002	0,023 ± 0,009
2000	0,019 ± 0,004	0,011 ± 0,002
2100	0,018 ± 0,007	0,010 ± 0,002

Os melhores valores para digeridos e bebidas foram atingidos na temperatura de 1600 °C. Em ambos os casos foi fixada essa temperatura como a de atomização.

Portanto, as condições ótimas de análises estabelecidas para as determinações de cobre e chumbo em digeridos e bebidas de catuaba empregando GF AAS estão apresentadas na Tabela 4.15.

Tabela 4.15. Condições ótimas de análise para as determinações de cobre e chumbo em digeridos e bebidas de catuaba empregando GF AAS

Variável otimizada	Cobre		Chumbo	
	Digeridos	Bebidas	Digeridos	Bebidas
Modificador permanente	Nióbio	Titânio	Sem	Ródio
Modificador químico	Sem	Sem	Paládio	Sem
Temperatura de pirólise	1100 °C	900 °C	700 °C	700 °C
Temperatura de atomização	2300 °C	2300 °C	1600 °C	1600 °C

### **4.3. Validação dos métodos para análises de alumínio, cobre, chumbo, ferro e zinco em amostras de alcachofra e catuaba**

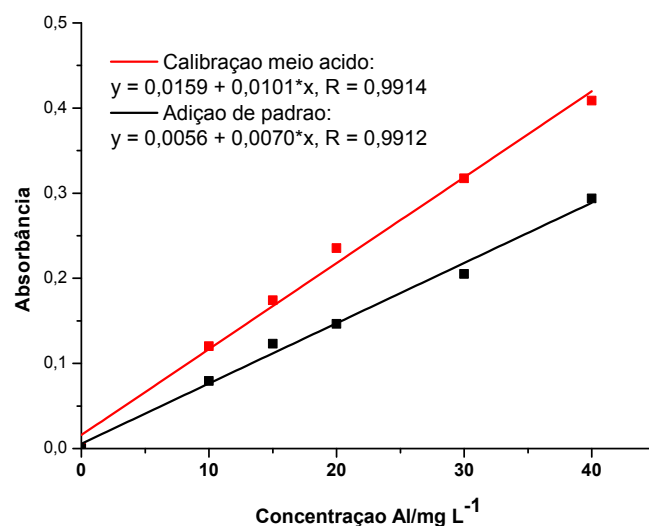
#### **4.3.1. Avaliação de efeito de matriz**

Para avaliar o efeito da matriz na determinação dos analitos, foi realizada uma comparação de inclinações das curvas de calibração construídas com o analito em meio ácido com inclinações das curvas construídas pelo método de ajuste de matriz. As avaliações para alumínio, ferro e zinco, foram realizadas por F AAS, enquanto cobre e chumbo foram realizadas por GF AAS.

Com os valores das inclinações médias e os respectivos desvios padrão foram aplicados os testes F e t de Student ao nível de 95% de confiança para avaliar a presença de efeito de matriz nas análises. Os valores dos parâmetros t e F calculados indicaram que houve diferença significativa entre as inclinações das curvas de calibração obtidas em meio aquoso e por ajuste de matriz. As Figuras 4.13 a 4.15 apresentam os resultados onde foram encontrados efeitos de matriz.

Para as amostras onde o efeito de matriz não foi detectado, optou-se pela construção da curva analítica no mesmo meio do digerido, fazendo-se um ajuste das condições experimentais.

## a) Amostra de extrato de alcachofra (análise direta)



## b) Amostra de extrato de alcachofra (análise direta)

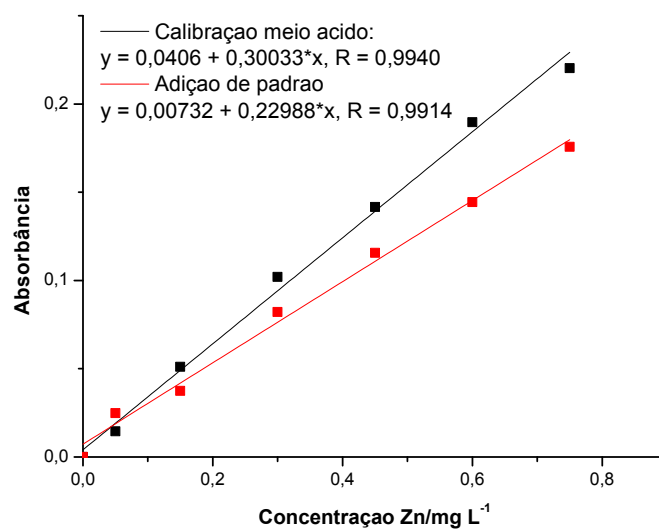
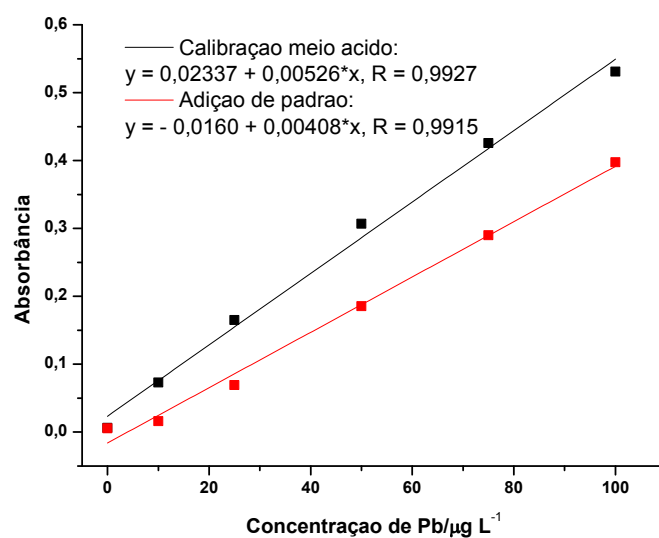


Figura 4.13. Curvas de calibração em meio ácido e ajuste de matriz das amostras de extrato de alcachofra (análise direta) para a) alumínio e b) zinco.

## a) Folha de alcachofra



## b) Cápsula de alcachofra

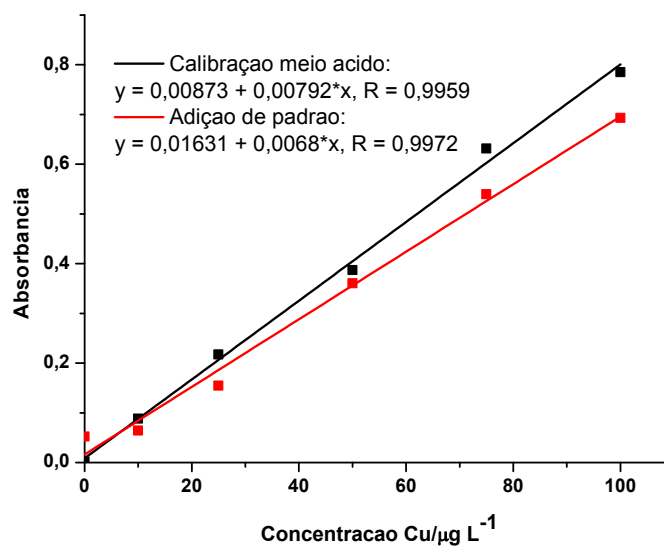
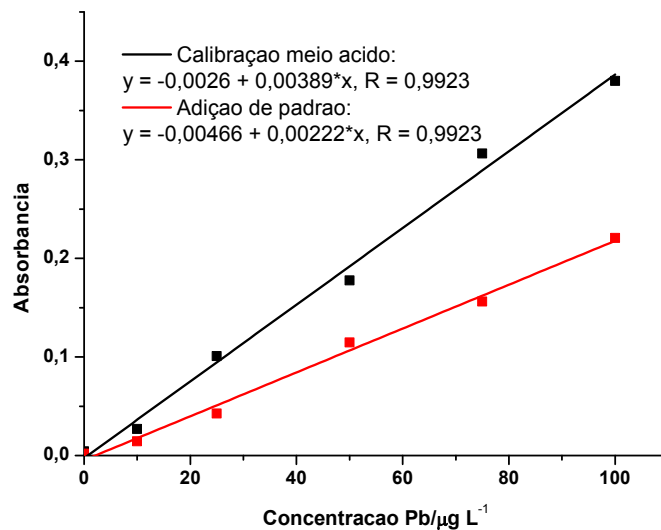


Figura 4.14. Curvas de calibração em meio ácido e ajuste de matriz das amostras de folha e cápsula de alcachofra para a) cobre e b) chumbo.

## a) Bebida de catuaba (análise direta)



## b) Catuaba em pó

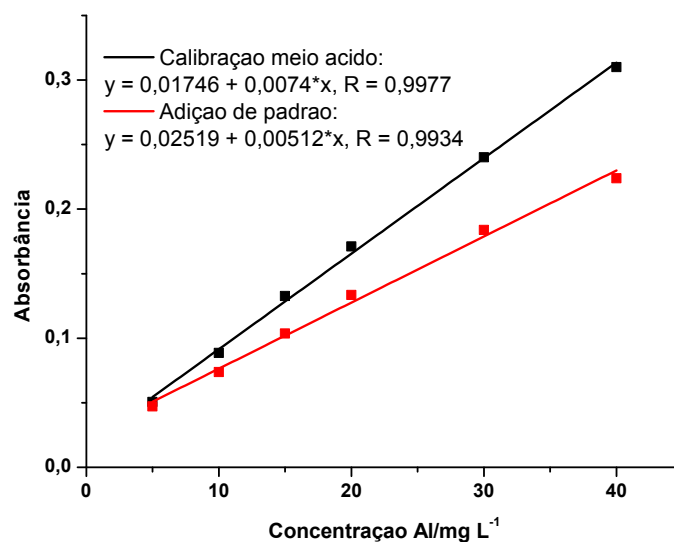


Figura 4.15. Curvas de calibração em meio ácido e ajuste de matriz das amostras de bebida (análise direta) e digeridos de pó de catuaba para a) chumbo e b) alumínio.

Para as demais determinações não foram detectados efeitos de matriz. Para Al em extrato de alcachofra (análise direta) e digeridos de catuaba em pó foi observado efeito de matriz. Também foi observado efeito de matriz nas análises de cobre em cápsula de alcachofra. Para chumbo o efeito de matriz foi detectado em digeridos de folha de alcachofra e em bebida de catuaba (análise direta). Com relação ao zinco, houve efeito de matriz nos extratos de alcachofra (análise direta). Para as demais análises dos elementos não foram observados efeito de matriz.

Assim, para determinar os elementos em que o efeito de matriz foi pronunciado, foram empregadas as curvas de ajuste de matriz.

#### 4.3.2. Linearidade

A linearidade das curvas foi avaliada pelo coeficiente de correlação linear das curvas (R). As curvas para o alumínio, cobre, chumbo, ferro e zinco foram preparadas em diferentes meios (ácido, solução simulada de suco gástrico e ajuste de matriz). Os coeficientes de correlação das curvas em meio ácido e da solução simulado de suco gástrico estão descritas na Tabela 4.16, e das curvas de ajuste de matriz estão descritas na Figura 4.13 a 4.15.

Tabela 4.16. Coeficientes de correlação linear das curvas (R) de calibração em meio ácido e solução simulada de suco gástrico

Coeficientes	Alumínio	Cobre	Chumbo	Ferro	Zinco
Calibração meio ácido	0,9977	0,9959	0,9927	0,9996	0,9980
Suco gástrico	0,9990	0,9978	0,9959	0,9989	0,9997

Em todas as curvas de calibração, inclusive as obtidas após ajuste de matriz (Figuras 4.13 a 4.15), obteve-se um coeficiente de correlação linear,  $R > 0,99$ , e, portanto, as curvas de calibração apresentaram linearidade adequada.

### 4.3.3. Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados a partir da determinação de 10 replicatas independentes do branco analítico. De acordo com o IUPAC (2002), o limite de detecção (LOD) foi calculado pela equação 1.1:

$$LOD = \frac{s_a * 3}{IC} \quad (1.1)$$

onde,  $s_a$  é o desvio padrão das 10 replicatas do branco e  $IC$  é a inclinação da curva de calibração. O limite de quantificação (LOQ) foi calculado pela equação 1.2:

$$LOQ = \frac{s_a * 10}{IC} \quad (1.2)$$

Os valores obtidos são apresentados na Tabela 4.17.

Tabela 4.17. Limites de detecção e quantificação obtidos para as amostras de alcachofra e catuba digeridas e analisadas diretamente

Amostra	Al		Cu		Pb		Fe		Zn	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Digeridos ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	17,31	57,69	0,29	0,97	0,17	0,58	16,76	55,85	1,35	4,51
Extrato de alcachofra (direta) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	3,17	10,5	0,18	0,60	0,21	0,69	4,33	14,42	0,69	2,29
Bebida de catuaba (direta) ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	102,3	340,9	0,11	0,38	0,98	3,26	134,2	447,4	6,85	22,83
Disponibilidade ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	8,65	28,8	0,05	0,19	0,42	1,42	6,18	20,60	1,96	6,55

Pela Tabela 4.17 percebe-se que os limites de detecção e quantificação variaram dependendo do meio utilizado. Os maiores limites foram encontrados para os procedimentos de digestão da amostra em micro-ondas com cavidade, com exceção para o Pb.



#### 4.3.4. Precisão

Para avaliar a precisão em relação à repetibilidade (intraensaio), foram analisadas 7 replicatas independentes de uma mesma amostra, sob as mesmas condições. A precisão intermediária (interensaio) foi avaliada com 7 replicatas analisadas pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, sob as mesmas condições de uso, em diferentes dias (1 dia, 1 semana e 1 mês). Os valores dos coeficientes de variação obtidos na avaliação da repetibilidade e da precisão intermediária para as amostras digeridas de alcachofra e catuaba são mostrados na Tabela 4.18 e 4.19.

Tabela 4.18. Coeficientes de variação (%) do intraensaio (r) (n = 7) e interensaio (p) (n = 28) obtidos para as amostras de digeridas alcachofra

Amostra	Al (%)		Cu (%)		Pb (%)		Fe (%)		Zn (%)	
	r	P	r	P	r	p	r	p	r	p
Digeridas	2,4	4,4	4,4	4,9	2,9	4,2	4,6	4,5	2,9	4,2

Tabela 4.19. Coeficientes de variação (%) do intraensaio (r) (n = 7) e interensaio (p) (n = 28) obtidos para as amostras de catuaba

Amostra	Al (%)		Cu (%)		Pb (%)		Fe (%)		Zn (%)	
	r	P	r	P	r	p	r	p	r	p
Digeridas	4,5	3,9	4,5	4,2	4,4	4,5	4,2	4,6	4,8	4,9
Bebida (direta)	3,6	2,7	4,2	3,8	4,9	3,6	3,3	3,1	3,4	3,8

Não foram obtidos os coeficientes de variação para os extratos de alcachofra analisados diretamente. As análises destas amostras resultaram em sinais analíticos abaixo do limite de detecção obtido para o método, não sendo possível, portanto, realizar os intra e interensaios.

As Tabelas 4.18 e 4.19 demonstram que os coeficientes de variação obtidos foram menores que 5% para as determinações de alumínio, cobre, chumbo, ferro e zinco. Diante disso, foi possível concluir que os métodos propostos apresentam uma boa precisão. Os resultados indicam concordância das medidas para as análises das amostras de alcachofra e catuaba.

#### 4.3.5. Exatidão

A exatidão dos métodos analíticos desenvolvidos por F AAS e GF AAS para determinação de alumínio, cobre, chumbo, ferro e zinco nas amostras digeridas foi avaliada pela análise do material de referência certificado (SRM NIST 1573a - folha de tomate). Para avaliar a diferença entre o valor obtido e o valor certificado, foi aplicado o teste de hipótese. Os valores obtidos estão descritos na Tabela 4.20.

Tabela 4.20. Resultados para a avaliação da exatidão nos digeridos obtidos com o material de referência certificado (SRM NIST 1573a – folha de tomate) (n =3)

Elemento	Valor certificado	Valor obtido	t <sub>calculado</sub>
Alumínio	598,00 ± 12,00	596,4 ± 2,2	0,230
Cobre	4,7 ± 0,14	4,719 ± 0,068	0,211
Chumbo	-	0,407 ± 0,035	-
Ferro	368,00 ± 7,00	369,7 ± 1,2	0,418
Zinco	30,90 ± 0,70	30,08 ± 0,64	1,497

O valor do índice t-Student tabelado é igual a 2,920, a 95% de confiança. Pode-se concluir que os resultados são significativamente iguais ao nível de 95% de confiança. Dessa forma, o método de digestão proposto para amostras de plantas apresenta exatidão adequada.

#### 4.4. Avaliação dos resultados de Al, Cu, Fe, Pb e Zn nas amostras de alcachofra e catuaba digeridas por aquecimento assistido por radiação micro-ondas

A partir das observações do planejamento fatorial realizado para avaliar as condições de digestão das amostras de alcachofra, foi estabelecido o uso de 8,0 mL de ácido nítrico 50 % v/v, tempo de irradiação de 20 min e temperatura de 200 °C. Para as amostras de catuaba em pó foram usadas as

mesmas condições. As Tabelas 4.21 e 4.22 apresentam os resultados obtidos ao aplicar este procedimento de digestão.

Tabela 4.21. Resultados das concentrações de Al, Cu, Fe, Pb e Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) obtidas pela digestão das amostras de alcachofra (n = 3)

Tipo	Marca	Al	Cu	Fe	Pb	Zn
Folhas	A	11029 $\pm$ 714	11,5 $\pm$ 0,3	4388 $\pm$ 91	3,77 $\pm$ 0,19	40,9 $\pm$ 0,8
	B	18163 $\pm$ 536	15,1 $\pm$ 0,7	17047 $\pm$ 492	6,76 $\pm$ 0,47	48,4 $\pm$ 2,5
	C	13196 $\pm$ 698	15,9 $\pm$ 0,3	5807 $\pm$ 422	5,60 $\pm$ 0,36	65,9 $\pm$ 4,0
	D	1399 $\pm$ 133	4,32 $\pm$ 0,28	434 $\pm$ 12	4,15 $\pm$ 0,22	26,7 $\pm$ 0,6
	E	3752 $\pm$ 284	4,76 $\pm$ 0,22	1232 $\pm$ 35	< LQ	32,5 $\pm$ 1,3
	F	8499 $\pm$ 368	10,5 $\pm$ 0,1	153 $\pm$ 4	4,98 $\pm$ 0,19	33,2 $\pm$ 1,6
Cápsula	G	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	5,69 $\pm$ 0,21
	H	443 $\pm$ 33	1,41 $\pm$ 0,08	283 $\pm$ 4	< LQ	7,43 $\pm$ 0,47
	I	2132 $\pm$ 34	7,42 $\pm$ 0,25	1754 $\pm$ 53	1,36 $\pm$ 0,07	41,3 $\pm$ 1,1
	J	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Comprimido	L	957 $\pm$ 30	9,96 $\pm$ 0,61	175 $\pm$ 11	1,44 $\pm$ 0,07	10,8 $\pm$ 0,9
Extrato	M	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	N	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	O	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

Tabela 4.22. Resultados das concentrações de Al, Cu, Fe, Pb e Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) obtidas pela digestão das amostras de catuaba em pó (n=3)

Marca	Al	Cu	Fe	Pb	Zn
P	263,9 $\pm$ 4,2	1,56 $\pm$ 0,27	365,9 $\pm$ 16,5	< LQ	25,04 $\pm$ 0,85
Q	37,55 $\pm$ 1,43	1,56 $\pm$ 0,73	< LQ	< LQ	21,59 $\pm$ 0,43
R	390,5 $\pm$ 14,6	1,79 $\pm$ 0,35	188,2 $\pm$ 8,0	< LQ	30,87 $\pm$ 0,23
S	203,0 $\pm$ 8,0	1,68 $\pm$ 0,28	113,1 $\pm$ 3,1	< LQ	28,07 $\pm$ 0,44
T	72,72 $\pm$ 2,23	1,89 $\pm$ 0,12	< LQ	< LQ	25,77 $\pm$ 0,32

As cápsulas da marca J apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção para todos os elementos. Para as cápsulas da marca G os valores de concentração também se apresentaram abaixo do limite de detecção para todos os elementos, com exceção do zinco.

Em geral, para os digeridos das amostras de alcachofra, pode-se perceber que a concentração dos metais foi maior nas folhas em comparação aos valores obtidos nas cápsulas e comprimidos. Nos extratos não foi possível quantificar os elementos estudados, mesmo analisando as amostras diretamente, pois para todos os elementos a concentração apresentava-se abaixo dos limites de quantificação.

Estes resultados podem ser explicados pelo uso de solventes orgânicos e excipientes em cápsulas e extratos comercializados, usados com o objetivo de viabilizar as substâncias responsáveis pela ação terapêutica (Brasil, 2004). Existem várias metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos. Um dos métodos, que considerado ser o mais adequado, é a preparação de um extrato hidroalcoólico (Filho e Yunes, 1998). Neste processo, a interação dos metais com os solventes orgânicos é baixa, o que pode levar à redução da concentração dos metais nos produtos derivados. Fato semelhante ocorre nas cápsulas, em que a presença dos excipientes é maior que as plantas maceradas, reduzindo o teor dos analitos em questão nas amostras.

Com dos dados obtidos foi possível perceber que o teor total dos elementos nas folhas de alcachofra foi maior para alumínio e ferro, seguido de

zinco, cobre e chumbo. Lésniewicz et al. (2006) também destacaram a maior concentração de alumínio e ferro comparado ao teor de cobre e zinco após quantificação em ervas e medicamentos.

Segundo Ma et al. (2001) as raízes das plantas expostas ao alumínio de alguma forma permanecem como óxidos ou aluminossilicatos. No entanto, quando o solo tem a sua acidez aumentada por algum processo natural ou atividade humana, este elemento é solubilizado como cátion trivalente,  $Al^{3+}$ . Este cátion é tóxico para muitas plantas acima de determinada concentração e pode limitar o seu crescimento. Essa toxicidade do alumínio vem sendo um fator limitante para a produtividade em solos ácidos.

Nas amostras de catuaba em pó as concentrações de alumínio e ferro também apresentaram os maiores valores e cobre os menores, visto que o sinal de chumbo foi menor que o limite de detecção para todas as amostras digeridas.

Além disso, percebeu-se que as concentrações de alumínio e ferro apresentaram grande variação entre as amostras de alcachofra e catuaba analisadas, enquanto os outros elementos apresentaram menor variação. O tipo de solo utilizado, a forma de plantio e de armazenamento da planta e a idade das plantas podem ser algumas das justificativas para a variação do teor destes analitos.

#### **4.5. Avaliação dos resultados de Al, Cu, Fe, Pb e Zn nas soluções de extrato de alcachofra e de bebida de catuaba**

As bebidas de catuaba foram analisadas diretamente por diluição para que o teor alcoólico da solução atingisse aproximadamente 3,5% e acidificação do meio. Ao final, as soluções obtidas continham ácido nítrico 5% v/v. Os extratos de alcachofra foram acidificados da mesma forma. As soluções foram assim analisadas diretamente por F AAS e GF AAS. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 4.23.

Tabela 4.23. Resultados obtidos ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de Al, Cu, Fe, Pb e Zn obtidas pelas análises diretas

	Marca	Al	Cu	Fe	Pb	Zn
Extrato de alcachofra	M	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	$3,591 \pm 0,159$
	N	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	O	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Bebida de Catuaba	U	< LQ	$8,659 \pm 0,113$	$2589 \pm 24$	< LQ	$661,3 \pm 6,1$
	V	< LQ	$14,36 \pm 0,68$	$1375 \pm 18$	$5,102 \pm 0,124$	$206,7 \pm 10,1$

De acordo com os resultados, foi verificado que houve uma variação na concentração dos elementos nas duas amostras de bebidas de catuaba. O ferro foi o metal em maior quantidade, enquanto chumbo em menor, sendo que a marca U apresentou uma concentração menor que o limite de detecção.

De todos os extratos de alcachofra analisados apenas o da marca M foi encontrado zinco ( $3,591 \pm 6,1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Os outros resultados foram abaixo do limite de detecção. Como justificado anteriormente, extratos comercializados são produzidos a partir de solventes orgânicos com a finalidade de viabilizar as substâncias responsáveis pela ação terapêutica (Brasil, 2004) e, portanto, a concentração dos metais na amostra explicada pela baixa interação dos metais com os solventes orgânicos.

#### 4.6. Avaliação da disponibilidade dos elementos empregando solução simulada do suco gástrico

Foi preparada uma solução simulada do suco gástrico e essa solução foi usada como extrator para avaliar a disponibilidade dos elementos nas amostras. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas das amostras de alcachofra e catuaba.

Vale ressaltar que, para todas as amostras, alumínio, ferro e zinco foram determinados no F AAS, enquanto que cobre e chumbo por GF AAS.

As Tabelas 4.24 e 4.25 apresentam os resultados das concentrações obtidas pela extração de alumínio, cobre, ferro, chumbo e zinco empregando a solução simulada de suco gástrico nas amostras de alcachofra e catuaba.

Tabela 4.24. Resultados das concentrações obtidas pela extração de Al, Cu, Fe, Pb e Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) empregando uma solução de suco gástrico simulado nas amostras de alcachofra (n = 3)

Tipo	Marca	Al	Cu	Fe	Pb	Zn
Folhas	A	2312,3 $\pm$ 0,8	4,70 $\pm$ 0,13	256,9 $\pm$ 0,7	2,39 $\pm$ 0,12	169,7 $\pm$ 3,7
	B	3314,1 $\pm$ 1,8	5,39 $\pm$ 0,02	380,0 $\pm$ 1,9	3,68 $\pm$ 0,26	293,4 $\pm$ 9,1
	C	645,73 $\pm$ 0,21	4,91 $\pm$ 0,44	78,46 $\pm$ 0,21	3,97 $\pm$ 0,02	61,08 $\pm$ 0,31
	D	< LQ	4,62 $\pm$ 0,06	76,33 $\pm$ 2,48	3,12 $\pm$ 0,21	58,95 $\pm$ 2,62
	E	< LQ	2,87 $\pm$ 0,13	132,9 $\pm$ 6,1	1,54 $\pm$ 0,18	115,3 $\pm$ 6,1
	F	3009,5 $\pm$ 1,0	4,51 $\pm$ 0,58	179,5 $\pm$ 1,0	3,54 $\pm$ 0,03	90,7 $\pm$ 5,0
Cápsula	G	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	H	< LQ	0,34 $\pm$ 0,01	< LQ	< LQ	7,22 $\pm$ 0,17
	I	260,0 $\pm$ 5,0	3,65 $\pm$ 0,07	130,9 $\pm$ 5,0	< LQ	113,5 $\pm$ 4,8
	J	< LQ	0,19 $\pm$ 0,01	< LQ	2,20 $\pm$ 0,14	< LQ
Comprimido	L	< LQ	2,12 $\pm$ 0,03	110,0 $\pm$ 6,4	2,17 $\pm$ 0,10	92,61 $\pm$ 6,20

Tabela 4.25. Resultados das concentrações obtidas pela extração de Al, Cu, Fe, Pb e Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) empregando uma solução de suco gástrico simulado nas amostras de catuaba em pó ( $n = 3$ )

Marca	Al	Cu	Fe	Pb	Zn
P	< LQ	$1,63 \pm 0,08$	$58,39 \pm 7,68$	< LQ	$20,52 \pm 0,81$
Q	< LQ	$1,72 \pm 0,07$	< LQ	< LQ	$19,91 \pm 1,12$
R	< LQ	$1,61 \pm 0,08$	$50,52 \pm 1,63$	< LQ	$30,03 \pm 0,31$
S	< LQ	$1,84 \pm 0,03$	$82,58 \pm 3,42$	< LQ	$30,94 \pm 0,81$
T	< LQ	$1,76 \pm 0,02$	$24,53 \pm 3,55$	< LQ	$22,32 \pm 1,51$

A Figura 4.16 ilustra as concentrações de alumínio em amostras de alcachofra. As folhas das marcas D e E, as cápsulas das marcas H e I e os comprimidos da marca L apresentaram valores abaixo do limite de quantificação pela extração com suco gástrico.

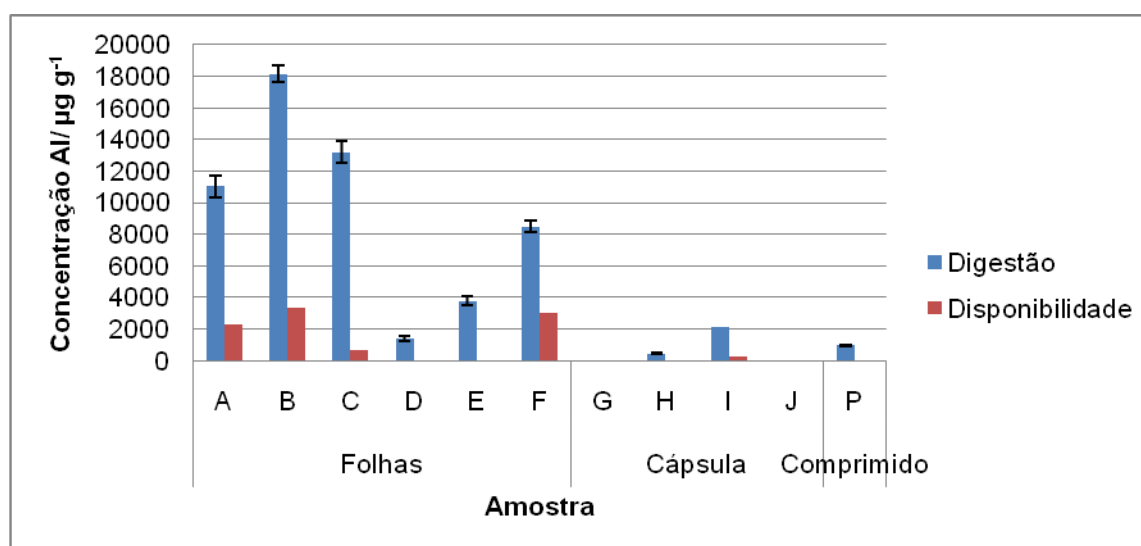


Figura 4.16. Concentração de alumínio nas amostras de alcachofra pelo método de digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado.

A digestão ácida por micro-ondas resultou em maiores valores de concentração de alumínio em relação à extração com suco gástrico simulado para as amostras de alcachofra. As concentrações obtidas para as folhas A, B,



C e F no processo de extração com suco gástrico simulado representam 20,96; 18,25; 4,89 e 35,41%, respectivamente, em relação às concentrações obtidas pelo processo.

Para todas as amostras de catuaba em pó, a extração com suco gástrico, os sinais obtidos para as amostras foram menores que o limite de detecção.

O alumínio é um elemento que se liga fortemente a matriz silicatada e, de fato, prejudicando a extração deste elemento para a bebida e, conseqüentemente, valores abaixo do limite de quantificação foram encontrados ao submeter a bebida a extração com a solução simulada do suco gástrico simulado.

A organização mundial de saúde (OMS) estabeleceu um limite seguro de 0,1-0,2 mg L<sup>-1</sup> de alumínio em água e uma ingestão de até 5 mg/dia (WHO 1997). Nessas condições, a ingestão de 3 g de folhas de alcachofra seria disponibilizado 6 mg de alumínio, ou seja, a concentração de alumínio nestas amostras estão elevadas.. No entanto, após avaliação da biodisponibilidade, é possível levantar a hipótese de que este elemento estaria pouco disponível nas amostras investigadas. Segundo Wong et al. (2003) a maior parte do alumínio ingerido pode ser convertido no corpo humano em uma forma não-solúvel, o que dificulta a sua absorção.

As concentrações de cobre em amostras de alcachofra e catuaba estão demonstradas nas Figuras 4.18 e 4.17.

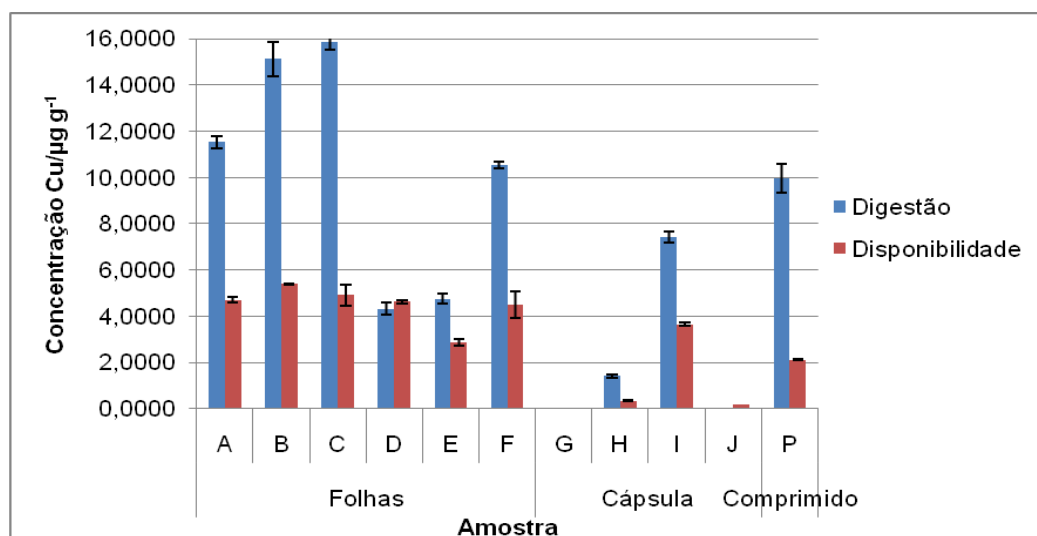


Figura 4.17. Concentração de cobre nas amostras de alcachofra após digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado.

De modo geral, em relação a extração com solução simulada do suco gástrico, a digestão ácida por micro-ondas apresentou valores maiores de concentração de cobre. As concentrações encontradas nas folhas de alcachofra das marcas A, B, C, D, E e F pelo processo de extração representam 40,8; 35,7; 30,9; 107,0 e 60,4; 42,8%, respectivamente, em relação as concentrações obtidas por digestão. As concentrações encontradas nas cápsulas das marcas H, I e J pelo processo de extração representam 24,23; 49,16; 40,57%, respectivamente. As concentrações encontradas nos comprimidos pelo processo de extração representam 21,24%.

Ao aplicar a extração com suco gástrico nas amostras de catuaba em pó as concentrações de cobre obtidas foram semelhantes aos da digestão ácida, como ilustrado na Figura 4.18.

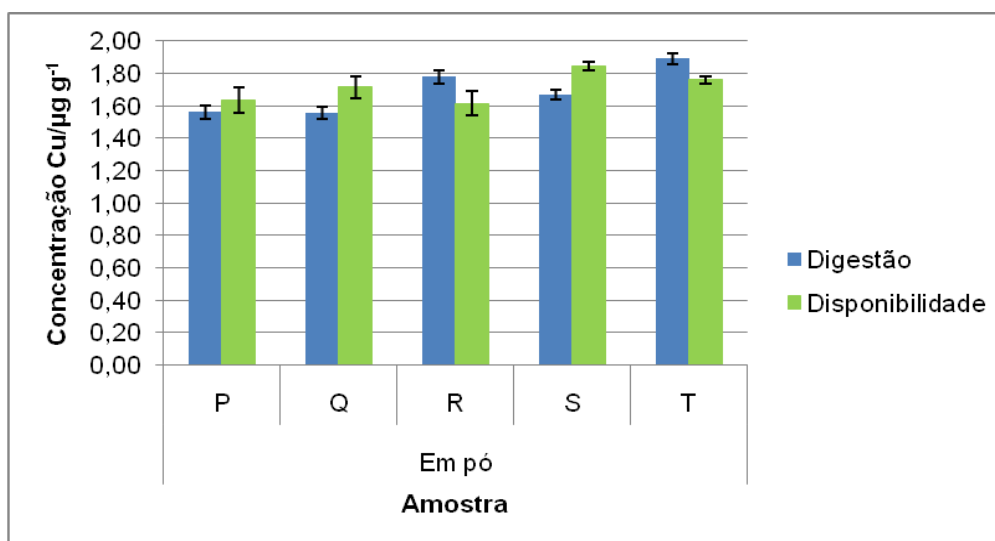


Figura 4.18. Concentração de cobre nas amostras de catuaba em pó após digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado.

A Figura 4.19 apresenta as concentrações de chumbo obtidas pela extração com suco gástrico simulado comparadas com as concentrações deste mesmo elemento obtidas pela digestão ácidas das amostras de alcachofra.

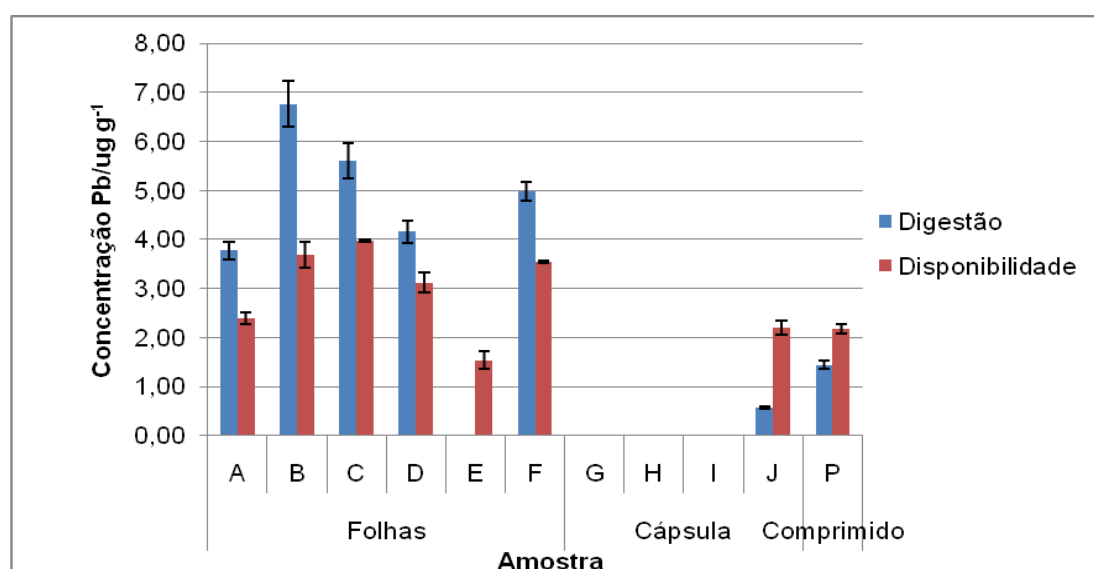


Figura 4.19. Concentração de chumbo nas amostras de alcachofra após digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado.

Em geral, em relação à extração com suco gástrico simulado, a digestão ácida por micro-ondas resultou em maiores valores de concentração de chumbo. As folhas de alcachofra das marcas A, B, C, D e F representam 63,31; 54,43; 70,87; 75,12 e 71,15%, respectivamente, em relação às concentrações obtidas por digestão. A cápsula J representa 71,90%, enquanto que o comprimido representa 150,3%.

No Brasil, de acordo com a Portaria nº 685 de 1998 do Ministério da Saúde (Brasil, 1998) os limites máximos de tolerância para chumbo em alimentos é de 0,05 a 2,0 mg kg<sup>-1</sup>. O *Codex Alimentarius* (FAO/WHO, 2001) recomenda um limite máximo de 0,3 mg kg<sup>-1</sup> de chumbo em vegetais. Comparados com estes limites para as amostras de folha, cápsula e comprimido de alcachofra, os teores de chumbo encontrados pela disponibilidade foram superiores, exceto para a folha da marca E de alcachofra.

Pelo método de avaliação da disponibilidade, as amostras de cápsulas de alcachofra das marcas H e I, além das amostras de catuaba em pó apresentaram valores de concentração abaixo do limite de quantificação.

As Figuras 4.20 e 4.21 ilustram os resultados de concentração obtidos nas amostras pelo procedimento de digestão das amostras estudadas e pelo processo de extração por suco gástrico simulado para o elemento ferro.

De maneira geral, os resultados da digestão foram muito maiores que as concentrações obtidas pela extração de ferro por suco gástrico simulado, sendo que a folha de alcachofra da marca D foi a que alcançou maior extração percentual 17,60%, em relação ao valor obtido na digestão. Ao avaliar a disponibilidade das cápsulas de alcachofra das marcas G, H e J, as concentrações resultantes apresentaram-se abaixo do limite de detecção do método. As concentrações obtidas para as cápsulas da marca I e os comprimidos da marca L de alcachofra no processo de extração com suco gástrico representaram 7,46 e 62,70%, respectivamente, em relação às concentrações obtidas por digestão.

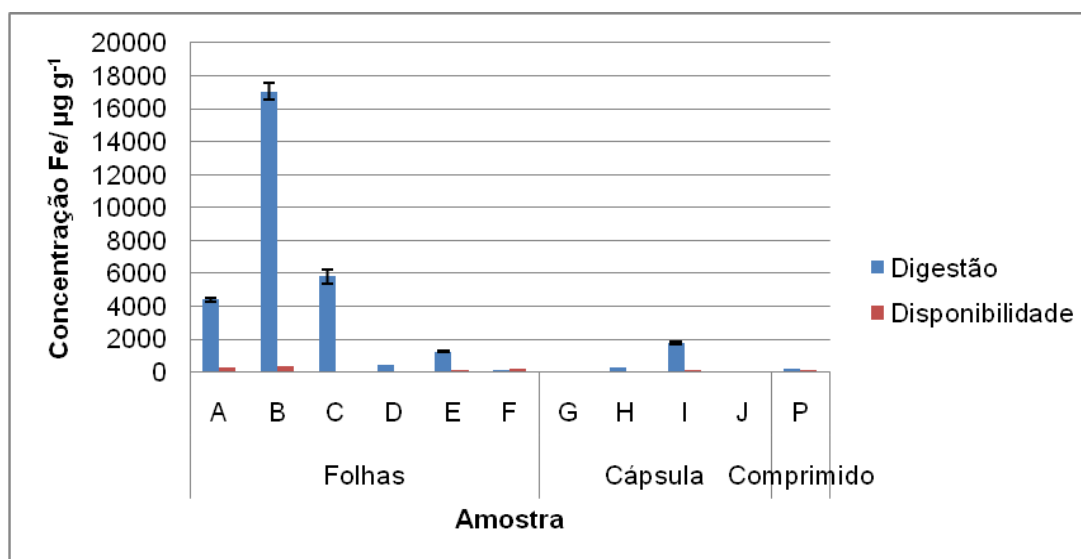


Figura 4.20. Concentração de ferro nas amostras de alcachofra após digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado.

Para as amostras de catuaba em pó, os resultados da digestão também foram maiores que as concentrações obtidas pela extração de ferro por suco gástrico simulado, sendo que as marcas A, C e D apresentaram 15,96; 26,84; 73,03%, respectivamente, em relação às concentrações obtidas por digestão.

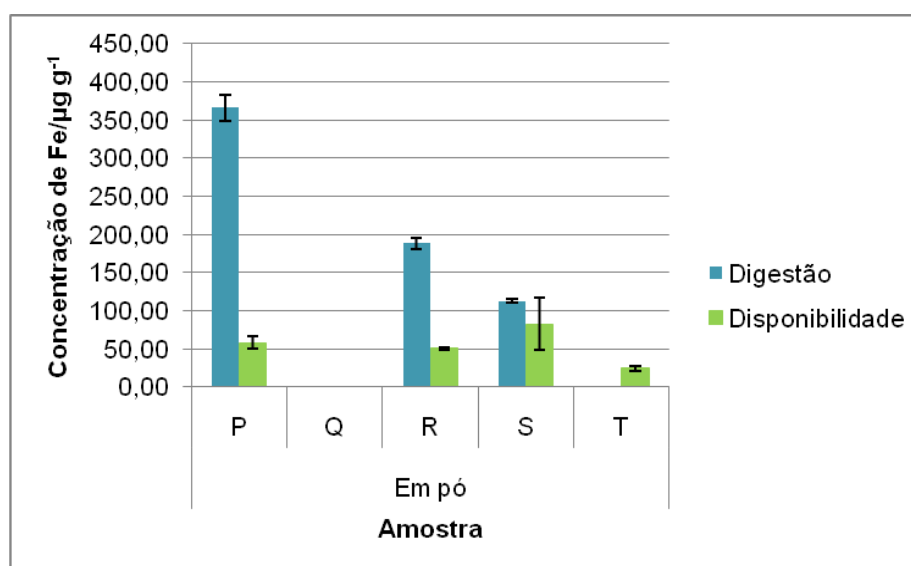


Figura 4.21. Concentração de ferro em amostras de catuaba em pó após digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado.

As Figuras 4.22 e 4.23 ilustram os resultados obtidos pela digestão das amostras estudadas e extração por suco gástrico simulado para zinco.

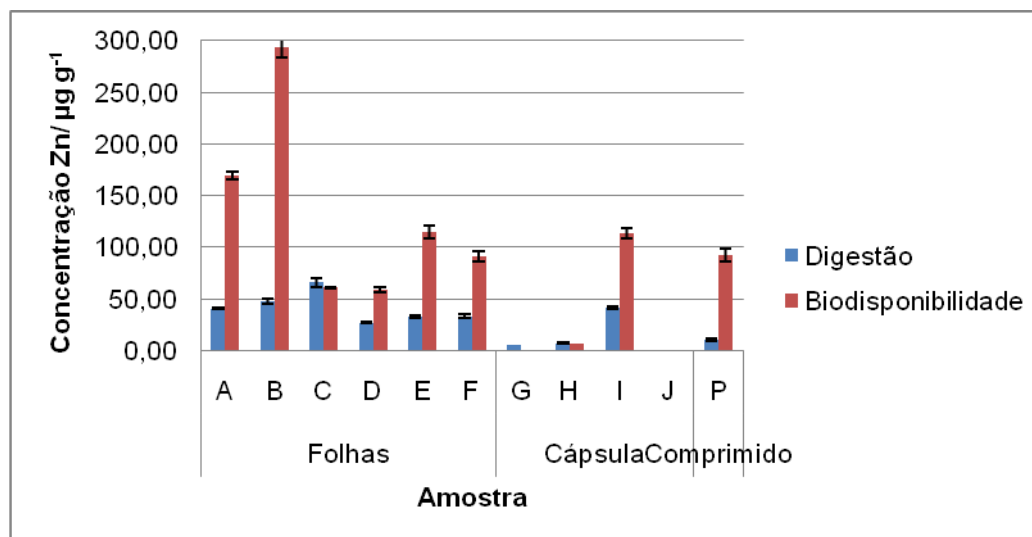


Figura 4.22. Concentração de zinco em amostras de alcachofra após digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado.

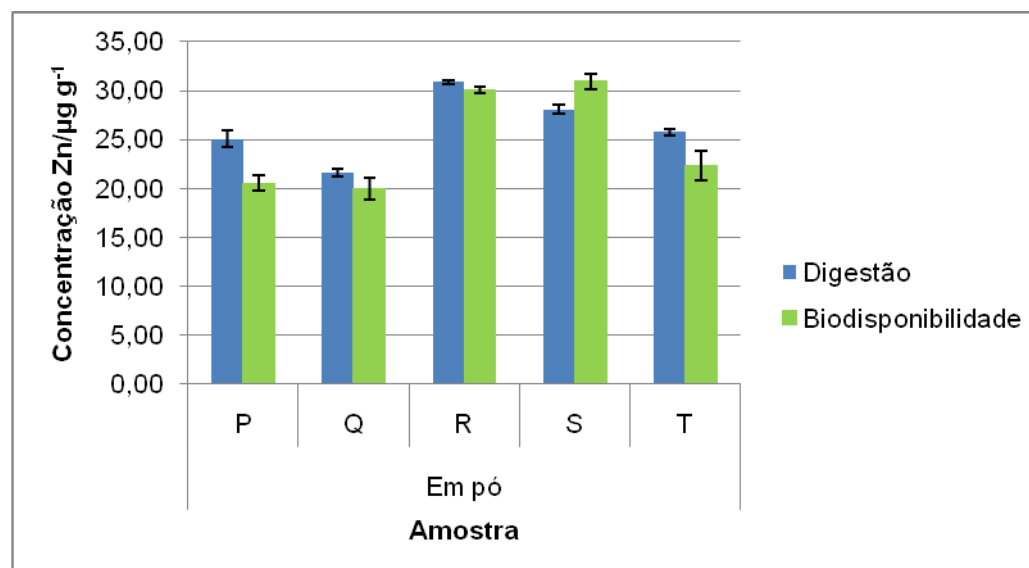


Figura 4.23. Concentração de zinco em amostras de catuba em pó após digestão ácida por micro-ondas e pela extração com o suco gástrico simulado.

Para o zinco, o processo de digestão por micro-ondas das amostras de alcachofra resultaram em valores de concentração menores do que quando esse elemento foi extraído pela solução simulada de suco gástrico. Nas

---

amostras de catuaba em pó digeridas, as concentrações deste elemento foram semelhantes às obtidas pela avaliação da disponibilidade.

Os procedimentos de extração propostos neste trabalho apresentaram dados significativos sobre a concentração de elementos essenciais e tóxicos, presente nas amostras alcachofra e catuaba estudadas. Procedimentos mais brandos de preparo de amostras, como análises diretas e extração por suco gástrico simulado são alternativas ao procedimentos de digestão total, porém, a eficiência na extração dos analitos depende do meio extrator, da amostra e da interação de cada elemento com a matriz.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a necessidade do controle de elementos essenciais e tóxicos nos fitoterápicos e disponíveis para o ser humano levando em conta a frequência de consumo dos mesmos.

## 5. Conclusão

Neste trabalho foi determinado de alumínio, chumbo, cobre, ferro e zinco em amostras de alcachofra e catuaba por espectrometria de absorção atômica com chama e com forno de grafite, utilizando diferentes estratégias de pré-tratamento da amostra como a digestão em forno de micro-ondas com cavidade, análise direta e disponibilidade empregando uma solução simulada do suco gástrico.

Os métodos desenvolvidos demonstraram ser uma boa forma para avaliar a presença de metais em amostras de alcachofra e catuaba, uma vez que permitiu a quantificação dos cinco elementos estudados em uma ampla faixa de concentração com elevada frequência analítica.

Comparando-se os resultados, pôde-se perceber que a eficiência na extração dos analitos depende do meio extrator, da amostra e da interação de cada elemento com a matriz.

Alumínio e ferro foram os elementos presentes em maiores concentrações. Estes altos teores de alumínio que foram encontrados e sugerem cautela no consumo à pacientes com insuficiência renal. Nas amostras de catuaba em pó, os elementos cobre e zinco foram os que apresentaram maior similaridade entre as diferentes marcas em todos os tratamentos de preparo das amostras.

Os procedimentos de extração e análises diretas foram alternativas aos procedimentos de digestão, porém, apresentaram resultados dependentes da interação do elemento que foi analisado com a matriz orgânica. Apesar disso, esses procedimentos são caracterizados pelo baixo custo e menor tempo de preparo.

A partir deste estudo algumas proposições futuras podem ser feitas, tais como a monitoração de um número maior de amostras de plantas medicinais encontradas no mercado para ser empregada no controle de qualidade nas indústrias.



## 6. Referências Bibliográficas

ADAMS, MICHAEL; GMÜNDER, FRANCINE; HAMBURGER, MATTHIAS. Plants traditionally used in age related brain disorders—A survey of ethnobotanical literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 363 – 381, 2003.

ANTUNES, E.; GORDO, W. M.; OLIVEIRA, J. F. DE; TEIXEIRA, C. E.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G. The Relaxation of Isolated Rabbit Corpus Cavernosum by the Herbal Medicine Catuama and its Constituents. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 416 – 421, 2001.

ARAÚJO, GEÓRGIA C. L.; GONZALEZ, MARIO H.; FERREIRA, ANTONIO G.; NOGUEIRA, ANA RITA A.; NÓBREGA, JOAQUIM A. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 57, p. 2121 – 2132, 2002.

ARRUDA, MARCO AURÉLIO ZEZZI; SANTELLI, RICARDO ERTHAL. Mecanização no preparo de amostras por micro-ondas: o estado da arte. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 638 – 643, 1997.

BARTHWAL, JYOTI; NAIR, SMITHA; KAKKAR, POONAM. Heavy Metal Accumulation in Medicinal Plants Collected from Environmentally Different Sites. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 21, p. 319 – 324, 2008.

BAKKALI, KARINA; MARTOS, NATIVIDADE RAMOS; SOUHAILB, BADREDINE; BALLESTEROS, EVARISTO. Characterization of trace metals in vegetables by graphite furnace atomic absorption spectrometry after closed vessel microwave digestion. **Food Chemistry**, v. 116, p. 590 – 594, 2009.

BELTRAME, FLÁVIO LUÍS; RODRIGUES FILHO, EDSON; PROENÇA, FABIO A.; CORTEZ, DIÓGENES APARÍCIO GARCIA; CASS, QUEZIA BEZERRA. A validated higher-performance liquid chromatography method for quantification of cinchonain Ib in bark and phytopharmaceuticals of *Trichilia catiguana* next term used as Catuaba. **Journal of Chromatography A**, v. 119, 257 – 263, 2006.

BRANDÃO, MARIA DAS GRAÇAS LINS; ZANETTI, NAIARA DO NASCIMENTO SANTIAGO. **Plantas medicinais na Estrada Real**. Belo Horizonte: O Lutador, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 48 de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil]**, Brasília, 18 março, 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil]**, Brasília, 18 mar. 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PN-PIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, 04 mai. 2006a.

BRASIL. Portaria nº 685/ Ministério da Saúde de 27 de agosto de 1998. Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos. **Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil]**, Brasília, agosto, 1998.

BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil]**, Poder Executivo, Brasília, 23 jun. 2006b.

BUNDY, RAFE; WALKER, ANN F.; MIDDLETONB, RICHARD W.; WALLISA, CAROL; SIMPSON, HUGH C. R. Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: A randomized, double blind placebo controlled trial. **Phytomedicine**, v. 15, p. 668 – 675, 2008.

BUSSE, JASON W.; HEATON, GRAHAM; WU, PING; WILSON, KUMANAN R.; MILLS, EDIWARD J. Disclosure of natural product use to primary care physicians: a cross-sectional survey of naturopathic clinic attendees. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 80, n. 5, p. 616 – 623, 2005.

CALDAS, E. D.; MACHADO, L. L. Cadmium, mercury and lead in medicinal plants in Brazil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 599 – 603, 2004.

CARVALHO, ANA CECILIA BEZERRA; NUNES, DIANA DE SOUZA GARCIA; BARATELLI, TATIANA DE GOUVEIA; SHUQAIR, NUR SHUQAIRA MAHMUD SAID ABDEL QADER; NETTO, EDMUNDO MACHADO Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, Ano V, n. 11, Junho de 2007

CHAN, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. **Chemosphere**, v. 52, p. 1361 – 1610, 2003.

CLEMENS, STEPHAN; PALMGREN, MICHAEL G.; KRÄMER, UTE. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. **TRENDS in Plant Science**, v. 7, n. 7, p. 309 – 315, 2002.

COON, JOANNA S. THOMPSON; ERNST, EDZARD. Herbs for serum cholesterol reduction. **The Journal of Family Practice**, p. 468-474, 2003.

DESIDERI, DONATELLA; MELI, MARIA ASSUSNTA; ROSELLI, CARLA. Determination of essential and non-essential elements in some medicinal plants by polarised X ray fluorescence spectrometer (EDPXRF). **Microchemical Journal**, v. 95, p. 174 – 80, 2010.

DEVI, N. K.; SARMA, N. H.; KUMAR, S. Estimation of essential and trace elements in some medicinal plants by PIXE and PIGE techniques. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 266, p. 1605 – 1610, 2008.

ELVIN-LEWIS, MEMORY. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 141 – 164, 2001.

EN, Z.; VASIDOV, A.; TISIPIN, V. V.; TILLAEV, T.; JUMANIYAZOVA, G. I. Study of element uptake in plants from the soil to assess environmental contamination by toxic elements. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A**, v. 505, p. 462 – 465, 2003.

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

FAO/WHO. Codex Alimentarius Commission. **Food additives and contaminants**. Joint FAO/WHO Food Standards Programme; ALINORM 01/12A:1- 289, 2001.

Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil. 2ª Edição. São Paulo: Siqueira, 1959.

FILHO, VALDIR CECHINEL; YUNES, ROSENDO A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, n. 21, v. 1, p. 99 – 105, 1998.

FLATEN, TROND PEDER. Aluminium in tea—concentrations, speciation and bioavailability. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 228, p. 385 – 395, 2002.

GEBHARDT, ROLF. Antioxidative and Protective Properties of Extracts from Leaves of the Artichoke (*Cynara scolymus* L.) against Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress in Cultured Rat Hepatocytes. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 144, p. 279 – 286, 1997.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Ann Epidemiol**, n. 9, p. 686 – 699, 2005.

HÄNSCH, ROBERT; MENDEL, RALF R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, next term Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 259 – 266, 2009.

HENSRUD, D .D.; ENGLE, D. D.; SCHEITEL, S. M. Underreporting the use of dietary supplements and nonprescription medications among patients undergoing a periodic health examination. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 75, n. 5, p. 443 – 447, 2003.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia. Normatização e Qualidade Industrial. *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*. Revisão: 02 de junho de . Vols. DOQ-CGCRE-008. 2007.

IUPAC TECHNICAL REPORT. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835 – 855, 2002.

JORDAN, SCOTT A.; CUNNINGHAM, DAVID G.; MARLES, ROBIN J. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 243, p. 198 –216, 2010.

KOIRTYOHANN, S. R.; KAISER, M. L. Furnace atomic absorption – A method approaching maturity. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 14, p. 1515 – 1524, 1982.

KRUG, FRANCISCO JOSÉ (Organizador) **Métodos de Preparo de Amostras**. 6 ed. Piracicaba, SP, 2006.

LAMARI, Z.; LANDSBERGER, S.; BRAISTED, J.; NEGGACHE, H.; LARBI, R. Trace element content of medicinal plants from Algeria. **Journal Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 276, n. 1, p. 95 – 99, 2008.

LATTANZIO, VINCENZO; KROON, PAUL A.; LINSALATA, VITO; CARDINALI, ANGELA. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. **Journal of Functional Foods**, p. 131 – 144, 2009.

LEŚNIEWICZ, ANNA; JAWORSKA, KATARZYNA; ŻYRNICKI, WIESLAW. Macro- and micro-nutrients and their bioavailability in polish herbal medicaments. **Food Chemistry**, v. 99, p. 670 – 679, 2006.

LUTZ, M.; HENRÍQUEZA, C.; ESCOBAR, M. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. **Journal of Food Composition and Analysis**, Article in Press, Accepted Manuscript, 2010.

MA, JIAN FENG; RYAN, PETER R.; DELHAIZE, EMMANUEL. Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. **TRENDS in Plant Science**, v. 6, n.6, p. 273 – 278, 2001

MAIGA, ABABACAR, DIALLO, DRISSA; RAGNAR, BYE; PAULSEN, SMESTAD. Determination of Some Toxic and Essential Metal Ions in Medicinal and Edible Plants from Mali. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p. 2316 – 2321, 2005.

MARKERT, B. Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices. **The Science of Total Environment**, v. 176, p. 45 – 61, 1995.

MESJAESZ-PRZUBULOWICS, J. ; PRZYBYLOWICZ, W. J. Micro-PIXE in plant sciences: Present status and perspectives. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B**, v. 189, p. 470 – 481, 2002.

MOSSOR-PIETRASZEWSKA, TERESA. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 3, p. 673 – 683, 2001.

ORTNER, H. M.; BULSKA, E.; ROHR, U.; SCHLEMMER, G.; WEINBRUCH, S.; WELZ, B. Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry—mechanisms of action (A tutorial review). **Spectrochimica Acta Part B**, v. 57, p. 1835 – 1853, 2002.

ÖZCAN, M. M., AKBULUT, M. Estimation of minerals, nitrate and nitrite contents of medicinal and aromatic plants used as spices, condiments and herbal tea. **Food Chemistry**, v. 106, p. 852 – 858, 2007.

PATRA, MANOMITA; BHOWMIK, NILADRI; BANDOPADHYAY, BULBUL; SHARMA, ARCHANA. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v.52, p. 199 – 223, December 2004.

POWELL, J. J., GREENFIELD, S. M., PARKNES, H. G., NICHOLSON, J. K., THOMPSON, R. P. H. Gastro-intestinal availability of aluminium. **Food Chemistry Toxicology**, v. 31, p. 449-454, 1993.

PEIJNENBURG, W. J. G. M.; JAGER, T. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, p. 63 – 77, 2003.

RAZIC, SLAVICA; DOGO, SVETELANA; SLAVCOVIC, LATINKA; POPOVIC, ALEKSANDAR. Inorganic analysis of herbal drugs. Part I. Metal determination in herbal drugs originating from medicinal plants of the family Lamiaceae. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 70, n. 11, p. 1347 – 1355, 2005.

SILVA, JOSÉ BENTO BORBA DA; BERTÍLIA, MARÍLIA; GIACOMELLI, OSS; SOUZA, IVAN GONÇALVES; CURTIUS, ADILSON JOSÉ. Iridium and Rhodium as Permanent Chemical Modifiers for the Determination of Ag, As, Bi, Cd, and Sb by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 60, p. 249 – 257, 1998.

SMITH, FRANK E.; ARSENAULT, EDWARD A. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. **Talanta**, v. 43, p. 1207 – 1268, 1997.

SOYLAK, MUSTAFA; TUZEN, MUSTAFA; SOUZA, ANDERSON SANTOS; KORN, MARIA DAS GRAÇAS ANDRADE; FERREIRA, SÉRGIO LUIS COSTA. 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 – 268, 2007.

SAHOO, NIHARIKA; MANCHIKANTI, PADMAVATI; DEY, SATYAHARI. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, p. 462 – 471, 2010.

VAZ, ZULMA R.; MATA, LUCIANA V.; CALIXTO, JOÃO B. Analgesic Effect of the Herbal Medicine Catuama in Thermal and Chemical Models of Nociception in Mice. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 101 – 106, 1997.

VEIGA JUNIOR, VALDIR F.; PINTO, ANGELO C.; MACIEL, MARIA APARECIDA M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n.3, p. 519 – 528, 2005.



THOMPSON, MICHAEL, ELLISON, STEPHEN L. R.; WOOD, ROGER. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, p. 835 – 855, 2002.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. Weinheim; New York: Wiley – VHC, 1999.

WHO, World Health Organization. Aluminum in drinking-water. **Guidelines for drinking-water quality**, 2nd ed. Addendum to vol. 2. *Health criteria and other supporting information*, Geneva, 1998.

WHO, World Health Organization. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines: Report of a WHO global survey. 2005.

WONG, M. H.; FUNG, K. F.; CARR, H. P. Aluminium and fluoride contents of tea, with emphasis on brick tea and their health implications. **Toxicology Letters**, v. 137, p. 111 – 120, 2003.

WU, SHAOLE; FENG, XINBANG; WITTMEIER, ADOLPH. Microwave Digestion of Plant and Grain Reference Materials in Nitric Acid or a Mixture of Nitric Acid and Hydrogen Peroxide for the Determination of Multi-elements by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 12, p. 797 – 806, 1997.

YUNES, ROSENDO A.; PEDROSA, ROZANGELA CURI; FILHO, VALDIR CECHINEL. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 147 – 152, 2001.

ZANOLARI, BORIS; GUILLET, DAVID; MARSTON, ANDREW; QUEIROZ, EMERSON F.; PAULO, MARÇAL DE QUEIROZ; HOSTETTMANN, KURT. Methylpyrrole Tropane Alkaloids from the Bark of *Erythroxylum vacciniifolium*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 1153 – 1158, 2005.