

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Agatha Merilin de Oliveira Lopes**

**METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO, CROMO E CHUMBO  
EM TINTURAS FITOTERÁPICAS POR ANÁLISE DIRETA EM GF AAS**

Juiz de Fora

2020

**Agatha Merilin de Oliveira Lopes**

**METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO, CROMO E CHUMBO  
EM TINTURAS FITOTERÁPICAS POR ANÁLISE DIRETA EM GF AAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química. Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Dr. Rafael Arromba de Sousa  
Coorientadora: Dra. Paula Rocha Chellini

Juiz de Fora

2020

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lopes, Agatha Merilin de Oliveira.

Metodologia para a determinação de cádmio, cromo e chumbo em tinturas fitoterápicas por análise direta em gf aas / Agatha Merilin de Oliveira Lopes. -- 2020.

88 f. : il.

Orientador: Rafael Arromba de Sousa

Coorientadora: Paula Rocha Chellini

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.

1. Metais tóxicos. 2. Tintura fitoterápica. 3. GF AAS. 4. Análise direta. I. Sousa, Rafael Arromba de , orient. II. Chellini, Paula Rocha, coorient. III. Título.

**Agatha Merilin de Oliveira Lopes**

**Metodologia para a Determinação de Cádmio, Cromo e Chumbo em Tinturas  
Fitoterápicas por Análise Direta em GF AAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Química da Universidade  
Federal de Juiz de Fora como requisito parcial  
à obtenção do título de Doutora em Química.

Aprovada em 06 de novembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

*Rafael Sousa*

Prof. Dr. Rafael Arromba de Sousa - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

*Rafael Sousa*

Profa. Dra. Paula Rocha Chellini - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

*Rafael Sousa*

Prof. Dr. Ricardo Mathias Orlando

Universidade Federal de Minas Gerais

*Rafael Sousa*

Profa. Dra. Adriane Medeiros Nunes

Universidade Federal de Pelotas

*Rafael Sousa*

Prof. Dr. Renato Camargo Matos

Universidade Federal de Juiz de Fora

*Rafael Sousa*

Profa. Dra. Fabíola Dutra Rocha

Universidade Federal de Juiz de Fora

À minha mãe, Maria José Oliveira, ao meu Pai, Elair Lopes e ao meu  
anjinho Tchuca,

dedico este trabalho

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que em sua infinita bondade me fez capaz. Agradeço a Nossa Senhora, por interceder por mim nos momentos de dúvidas.

Agradeço aos meus pais, Maria José e Elair, pelo exemplo de força e honestidade que norteia a minha vida.

Agradeço ao meu namorado Adriadson, por todo o amor e todo apoio, ao meu anjinho Tchuca, por me esperar ansiosamente todos os finais de semana.

Agradeço as minhas irmãs, Morgana, Monique e Emila, por serem incentivadoras dos meus sonhos e as minhas sobrinhas Francielly, Hillary, Isadora e Labele por trazer graça aos meus dias, sendo uma grande motivação a continuar.

Agradeço aos meus amigos Helem e Thiago, pelo suporte recebido com tanta boa vontade. Agradeço ao meu amigo Marciano, por ter sido tão prestativo em ajudar e ao meu amigo Felipe, por ser a minha primeira amizade na Pós-Graduação. Sem vocês o início teria sido muito mais árduo.

Agradeço ao meu orientador Rafael Arromba, pela fé em mim e pela paciência em ensinar, assim como minha coorientadora Paula Chellini, sempre tão educada e atenciosa. Foi um prazer imenso ter sido orientada por vocês.

Agradeço as Profa. Dra. Letícia Malta, Profa. Dra. Cláudia Carvalhinho e Profa. Dra. Clésia Nascentes, assim como o Departamento de Química da UFMG, pela disponibilidade do uso GF AAS e TXRF, e pelo agradável convívio no Grupo de Espectrometria Atômica e Química Analítica Ambiental.

Agradeço a Profa. Dra. Fabíola, da Faculdade de Farmácia da UFJF, pela doação de amostras de tinturas fitoterápicas.

Agradeço aos colegas da UFMG, Camila Assis e Igor Foratinni, pela ajuda recebida em BH e pela colaboração no desenvolvimento dos experimentos e da análise dos dados.

Agradeço aos melhores *roommates*, Lucas e Antonio, por tornar inesquecível a minha estadia em JF. Agradeço ao meu amigo Úliman, que foi essencial na minha história nessa cidade.

Agradeço aos companheiros de laboratório, Náira, Ângela, Paola, Thalles e Jefferson, Joseane, Fernanda e Oliver por tão prontamente ajudar em diversas oportunidades e por tornar o ambiente de trabalho em um segundo lar.

À FAPEMIG, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

“O sucesso não é definitivo, a falha não é fatal. O que importa é a coragem de continuar.”

(Winston Churchill)

## RESUMO

Neste trabalho, tinturas fitoterápicas das plantas medicinais *Cynara scolymus L*, *Rhamnus purshiana DC*, *Maytenus officinalis Mabb*, e *Mikania glomerata Spreng* (Alcachofra, Cáscara Sagrada, Espinheira Santa e Guaco, respectivamente), prescritas pelo sistema de saúde público brasileiro, tiveram os teores de Cádmiu, Cromo e Chumbo determinados através da análise direta por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS). A digestão ácida assistida por radiação micro-ondas foi utilizada como preparo de amostra para avaliar a eficiência do método proposto, demonstrando não haver diferenças significativas entre o método proposto e método de referência. Foram obtidas figuras de mérito para ambos os métodos, com valores encontrados de acordo com esperado pela literatura. Destacando que para análise direta a exatidão avaliada obteve-se recuperações adequadas (102 e 109% para o Cr, 104 e 112% para o Cd, 92 e 111% para o Pb), bem como a precisão em termos de repetitividade (com desvio padrão relativo inferior a 10% para os três analitos). O método proposto também apresentou limites de detecção apropriados para análise de elementos traços, com valores (em  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) de 0,5; 1,3 e 1,6 para o Cd, Cr e Pb respectivamente. Não foi verificado efeito de matriz significativo e, dessa forma, a calibração externa foi usada para fins de previsão constituindo uma vantagem importante do método desenvolvido considerando aplicações de rotina. Através do preparo de tinturas fitoterápicas a partir das plantas medicinais correspondentes foi avaliada também a transferência desses contaminantes inorgânicos, com Cd transferindo até 120%, Cr até 19% e Pb até 88% do metal presente na matéria-prima até o produto final. Vinte e uma amostras de tinturas fitoterápicas comerciais foram então avaliadas, sendo possível detectar a presença de Cd, Cr, Pb em algumas dessas amostras. Os teores variaram para Cd de 0,76 a 40,80  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , para o Cr de 4,45 a 21,40  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  e de 22,26 a 88,47  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para o Pb. Os teores destes contaminantes, considerados metais tóxicos ao ser humano, ficaram abaixo dos limites máximos permitidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS). A análise direta teve desempenho favorável para determinação de contaminantes inorgânicos em GF AAS com alta frequência analítica e uso reduzido de reagentes e energia.

Palavras-chave: Metais tóxicos. Tintura Fitoterápica. Análise direta. Cádmiu. Chumbo. Cromo. GF AAS.



## ABSTRACT

In this work, herbal tinctures from *Cynara scolymus L*, *Rhamnus purshiana DC*, *Maytenus officinalis Mabb* and *Mikania glomerata Spreng*, (Artichoke, Cascara Buckthorn, *Espinheira Santa* and *Guaco*, respectively) prescribed by the Brazilian public health system (SUS), had their levels of Cd, Cr and Pb determined through direct analysis by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS). Acid digestion assisted by microwave radiation was used as sample preparation to evaluate the proposed method efficiency, which showed no significant differences between the proposed and reference methods. Figures of merit were obtained to both methods and the values found were in agreement with literature. The accuracy for direct analysis were evaluated and the recovery levels obtained were suitable (102 and 109% to Cr, 104 and 112% to Cd, 92 and 111% to Pb), as well as the precision in terms of repeatability (with relative standard deviation under 10% to the three analytes). The proposed method also showed appropriate limits of detection for trace elements analysis, with values (in  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ) of 0.5, 1.3 and 1.6 to Cd, Cr and Pb, respectively. No significant matrix effect were observed and, therefore, external calibration was used for purposes of prevision, which constitutes an important advantage of the developed method, considering routine applications. Through herbal tinctures preparation from the correspondent medicinal plants, the transference of these inorganic contaminants were also evaluated, with Cd transferring up to 120%, Cr up to 19% and Pb up to 88% of the metal present in the raw material until the final product. Twenty-one herbal tinctures commercial samples were evaluated, being possible to detect the presences of Cd, Cr and Pb in some of them. The levels varied from 0.76 to 40.80  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , from 4.45 to 21.40  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  and from 22.26 to 88.47  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  to Cd, Cr and Pb, respectively. The levels of these contaminants, considered toxic to human being, were under the maximum allowed limit by World Health Organization (WHO). Direct analysis had favorable results for the determination of inorganic contaminants by GF AAS, showing great analytical frequency, and decreased use of chemical reagents and energy.

Keywords: Toxic Metals. Herbal Tinctures. Direct Analysis. Cadmium. Lead. Chromium. GF AAS.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - *Rhamnus purshiana* (cáscara sagrada). A) aspecto geral da espécie, B) aspecto geral da droga vegetal casca) .....22
- Figura 2** - Aspecto geral da espécie. A) *Cynara scolymus* L. (Alcachofra) e B) *Maytenus officinalis* Mabb (Espinheira Santa) .....23
- Figura 3** - *Mikania glomerata* (Guaco). A) Aspecto geral da espécie e B) aspecto geral da droga vegetal.....23
- Figura 4** - Amostras das plantas após processo de secagem e trituração. 1-A (Alcachofra), 1-CS e 2-CS (Cáscara Sagrada), 1-ES e 2-ES (Espinheira Santa), 1-G e 2-G (Guaco).....32
- Figura 5** - Processo de preparação das tinturas fitoterápicas. (A) maceração e (B) percolação.....33
- Figura 6** - Tinturas fitoterápicas preparadas, recolhidas após percolação (A) e armazenamento final (B).....34
- Figura 7** - Etapas para análise por TXRF: (1) amostra misturada ao padrão interno, (2) amostra sendo levada para secagem com lâmpada IV, (3) amostra já seca e pronta para análise.....41
- Figura 8** - Efeito do uso de modificador químico nos sinais de absorbância de Cr para o digerido (solução mistura composta de *mix* de amostras de plantas digerido e *mix* de amostras de tinturas fitoterápicas digerido) e padrão ácido  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  .....47
- Figura 9** - Perfil dos sinais de absorbância de Cr para o digerido (solução mistura composta de *mix* de amostras de plantas digerido e *mix* de amostras de tinturas fitoterápicas digerido) com uso de Pd como modificador químico (A) e sem modificador químico (B).....47
- Figura 10** - Efeito do uso de modificador químico nos sinais de absorbância de Cd para o digerido (solução mistura composta de *mix* de amostras de plantas digerido e *mix* de amostras de tinturas fitoterápicas digerido) e padrão ácido  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$  .....48
- Figura 11** - Efeito do uso de modificador químico nos sinais de absorbância de Pb para o digerido (solução mistura composta de *mix* de amostras de plantas digerido e

	<i>mix</i> de amostras de tinturas fitoterápicas digerido) e para padrão ácido 10 µg L <sup>-1</sup> .....	49
<b>Figura 12</b>	- Curvas de temperatura de pirólise para Cd (A), Cr (B) e Pb (C) para o digerido (solução mistura composta de <i>mix</i> de amostras de plantas digerido e <i>mix</i> de amostras de tinturas fitoterápicas digerido) e para padrão em meio ácido nítrico (2% v/v) nas concentrações de 1,5 µg L <sup>-1</sup> para Cd, 5 µg L <sup>-1</sup> para Cr e 10 µg L <sup>-1</sup> para Pb. A temperatura de atomização foi de 900 °C para Cd, 2500 °C para Cr e 2100 °C para Pb.....	51
<b>Figura 13</b>	- Curvas de temperatura de atomização para Cd (A), Cr (B) e Pb (C) para o digerido (solução mistura composta de <i>mix</i> de amostras de plantas digerido e <i>mix</i> de amostras de tinturas fitoterápicas digerido) e para padrão em meio ácido nítrico (2% v/v) nas concentrações de 1,5 µg L <sup>-1</sup> para Cd, 5 µg L <sup>-1</sup> para Cr e 10 µg L <sup>-1</sup> para Pb. A temperatura de pirólise otimizadas foram de 500 °C para Cd, 1500 °C para Cr e 800°C para Pb.....	52
<b>Figura 14</b>	- Perfil dos sinais de absorbância para o digerido (solução mistura composta de <i>mix</i> de amostras de plantas digerido e <i>mix</i> de amostras de tinturas fitoterápicas digerido) para Cd (A), Cr (C) e Pb (E) e padrão ácido 1,5 µg L <sup>-1</sup> de Cd (B), padrão ácido 5 µg L <sup>-1</sup> de Cr (D) e padrão ácido 10 µg L <sup>-1</sup> de Pb (F) nas condições instrumentais otimizadas.....	53
<b>Figura 15</b>	- Estudo do efeito de matriz para determinação de Cd em plantas (A) e em tintura fitoterápica (B) após digestão assistida por radiação micro-ondas.....	54
<b>Figura 16</b>	- Estudo do efeito de matriz para determinação de Cr em plantas (A) e em tintura fitoterápica (B) após digestão assistida por radiação micro-ondas.....	55
<b>Figura 17</b>	- Estudo do efeito de matriz para determinação de Pb em plantas (A) e em tintura fitoterápica (B) após digestão assistida por radiação micro-ondas.....	56
<b>Figura 18</b>	- Soluções para diluição das tinturas fitoterápicas (A) Triton X-100 0,1% v/v e HNO <sub>3</sub> 0,2% v/v e (B) ácido nítrico 2% v/v.....	60
<b>Figura 19</b>	- Efeito da diluição das tinturas fitoterápicas no sinal de absorbância para análise direta para determinação de cromo por GF AAS.....	60

- Figura 20** - Efeito do uso de modificador químico nos sinais de absorvância de Cr para tinturas fitoterápicas diluídas em solução de Triton X-100 0,1% v/v acidificada com HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v e para padrão alcoólico de 5 µg L<sup>-1</sup>.....62
- Figura 21** - Efeito do uso de modificador químico nos sinais de absorvância de Cd para tinturas fitoterápicas diluídas em solução de Triton X-100 0,1% v/v acidificada com HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v e para padrão alcoólico de 1,5 µg L<sup>-1</sup> .....63
- Figura 22** - Efeito do uso de modificador químico nos sinais de absorvância de Pb tinturas fitoterápicas diluídas em solução de Triton X-100 0,1% v/v acidificada com HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v e padrão em meio alcoólico 10 µg L<sup>-1</sup>.....64
- Figura 23** - Curvas de temperatura de pirólise para Cd (A), Cr (B) e Pb (C) para *mix* de tintura fitoterápica diluída em solução de Triton X-100 0,1% v/v acidificada com HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v e padrão em meio alcoólico nas concentrações de 1,5 µg L<sup>-1</sup> para Cd, 5 µg L<sup>-1</sup> para Cr e 10 µg L<sup>-1</sup> para Pb. A temperatura de atomização foi de 900 °C para Cd, 2500 °C para Cr e 2100 °C para Pb..... 65
- Figura 24** - Curvas de temperatura de atomização para Cd (A), Cr (B) e Pb (C) para *mix* de tintura fitoterápica diluída em solução de Triton X-100 0,1% v/v acidificada com HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v e padrão em meio alcoólico nas concentrações de 1,5 µg L<sup>-1</sup> para Cd, 5 µg L<sup>-1</sup> para Cr e 10 µg L<sup>-1</sup> para Pb. A temperatura de pirólise foi de 400 °C para Cd, 1500 °C para Cr e 700 °C para Pb.....66
- Figura 25** - Perfil dos sinais de absorvância para *mix* de tintura fitoterápica diluída em solução de Triton X-100 0,1% v/v acidificada com HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v para Cd (A), Cr (C) e Pb (E) e padrão alcoólico 1,5 µg L<sup>-1</sup> de Cd (B), padrão ácido 5 µg L<sup>-1</sup> de Cr (D) e padrão ácido 10 µg L<sup>-1</sup> de Pb (F) nas condições instrumentais otimizadas.....67
- Figura 26** - Estudo do efeito de matriz para determinação de Cd (A), Cr (B) e Pb (C) por análise direta empregando GF AAS.....69

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	- Relação das amostras preparadas de tinturas fitoterápicas a partir da planta medicinal.....	33
<b>Tabela 2</b>	- Relação das amostras comerciais de tinturas fitoterápicas.....	34
<b>Tabela 3</b>	- Relação das amostras de tinturas fitoterápicas doadas e incluídas no estudo.....	35
<b>Tabela 4</b>	- Programa de aquecimento referente à digestão assistida por radiação micro-ondas do <i>mix de amostras</i> de plantas .....	36
<b>Tabela 5</b>	- Programa de aquecimento da digestão assistida por radiação micro-ondas para amostras de tinturas fitoterápicas.....	38
<b>Tabela 6</b>	- Condições instrumentais recomendadas pelo fabricante do equipamento, Thermo para a determinação de Cd e Cr e pela Agilent para determinação de Pb por GF AAS.....	39
<b>Tabela 7</b>	- Otimização instrumental da temperatura de pirólise e da temperatura de atomização para a determinação de Cd, Cr e Pb por GF AAS em <i>mix</i> de amostras digerida e em <i>mix</i> de amostras diluída.....	41
<b>Tabela 8</b>	- Valor de pH e densidade para as amostras de tinturas fitoterápicas doadas pela FF-UFJF.....	44
<b>Tabela 9</b>	- Valor de pH e densidade para as amostras de tinturas fitoterápicas preparadas a partir de plantas medicinais.....	45
<b>Tabela 10</b>	- Valor de pH e densidade para as amostras de tinturas fitoterápicas comerciais.....	45
<b>Tabela 11</b>	- Programa de aquecimento do GF AAS para a determinação de Cr, Cd e Pb em tintura fitoterápica e em plantas medicinais após digestão ácida.....	53
<b>Tabela 12</b>	- Comparações das concentrações de Cd, Cr e Pb no <i>mix</i> de amostras de plantas digerido e no <i>mix</i> de amostras de tinturas fitoterápicas digerido obtidas por calibração externa e por adição de padrão.....	57
<b>Tabela 13</b>	- Análise da regressão linear do modelo de calibração externa utilizada para determinação de Cd, Cr e Pb por GF AAS em plantas e tinturas fitoterápicas após digestão assistida por radiação micro-ondas.....	58

<b>Tabela 14</b>	- Figuras de mérito obtidas para determinação de Cd, Cr e Pb por GF AAS em plantas medicinais e tinturas fitoterápicas após digestão assistida por radiação micro-ondas.....	59
<b>Tabela 15</b>	- Programa de aquecimento do GF AAS para a determinação de Cd, Cr e Pb em tintura fitoterápica por análise direta.....	68
<b>Tabela 16</b>	- Comparações das concentrações de Cd, Cr e Pb em tinturas fitoterápicas por análise direta em GF AAS obtidas por calibração externa e por adição de padrão.....	70
<b>Tabela 17</b>	- Análise da regressão linear do modelo de calibração externa utilizada para determinação de Cd, Cr e Pb em tinturas fitoterápicas por análise direta em GF AAS.....	71
<b>Tabela 18</b>	- Figuras de mérito obtidas para determinação de Cd, Cr e Pb em tinturas fitoterápicas através de análise direta em GF AAS.....	71
<b>Tabela 19</b>	- Comparação entre análise direta das tinturas fitoterápicas com o método empregando as amostras digeridas (método de referência) para determinação Cd, Cr e Pb por GF AAS.....	73
<b>Tabela 20</b>	- Teores de Cd, Cr e Pb nas amostras de tinturas fitoterápicas comerciais e doadas pela FF-UFJF.....	74
<b>Tabela 21</b>	- Teores de Cd, Cr e Pb nas amostras de plantas medicinais (em mg Kg <sup>-1</sup> ) .....	76
<b>Tabela 22</b>	- Teores de Cd, Cr e Pb nas amostras de tinturas das fitoterápicas preparadas no laboratório a partir das plantas medicinais (em µg Kg <sup>-1</sup> ) .....	77
<b>Tabela 23</b>	- Porcentagem de transferência de Cd, Cr e Pb das plantas medicinais para as tinturas fitoterápicas.....	78
<b>Tabela 24</b>	- Teores de minerais nas amostras de tinturas fitoterápicas (em mg Kg <sup>-1</sup> ) .....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFS	Espectrometria de fluorescência atômica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
EPA	Agência de Proteção Ambiental ( <i>Environmental Protection Agency</i> )
F AAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica em plasma acoplado indutivamente
ICP-MS	Espectrometria de massas com fonte de plasma
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
$m_0$	Massa característica
MF	Medicamento Fitoterápico
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
ppb	Partes por bilhão
ppm	Partes por milhão
PTF	Produto Tradicional Fitoterápico
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
RSD	Desvio padrão relativo
STPF	<i>Stabilized Temperature Platform Furnace</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TXRF	Espectrômetro de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total
USP	Farmacopeia dos Estados Unidos ( <i>United States Pharmacopeia</i> )
XRF	fluorescência de raios X

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS .....	19
1.2 CONTAMINANTES INORGÂNICOS .....	24
1.3 DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA EM FORNO DE GRAFITE .....	26
1.4 PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS.....	28
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	30
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
3.1 VIDRARIAS, REAGENTES E SOLUÇÕES.....	31
3.2 INSTRUMENTAÇÃO .....	31
3.3 PREPARO DA TINTURA FITOTERÁPICA A PARTIR DA PLANTA MEDICINAL .	32
3.4 TINTURAS FITOTERÁPICAS COMERCIAIS .....	34
3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS – pH e DENSIDADE .....	35
3.6 PREPARO DE AMOSTRAS PELO DE MÉTODO DE REFERÊNCIA: DIGESTÃO ÁCIDA ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS.....	36
<b>3.6.1 Plantas</b> .....	36
<b>3.6.2 Tinturas Fitoterápicas</b> .....	36
3.7 ANÁLISE POR GF AAS .....	38
<b>3.7.1 Testes Preliminares</b> .....	39
<b>3.7.2 Análise direta</b> .....	40
<b>3.7.3 Método de referência</b> .....	40
<b>3.7.4 Otimização instrumental GF AAS</b> .....	40
3.8 ANÁLISE POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL.....	41
3.9 FIGURAS DE MÉRITO .....	42
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	44
4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS - pH e DENSIDADE APARENTE .....	44
4.2 ANÁLISE DAS PLANTAS MEDICINAIS E DAS TINTURAS FITOTERÁPICAS PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA .....	46
<b>4.2.1 Modificador Químico</b> .....	46
<b>4.2.2 Curvas de Temperatura de pirólise e Temperatura de atomização</b> .....	49



<b>4.2.3 Figuras de mérito</b> .....	54
<b>4.3 ANÁLISE DIRETA DAS TINTURAS FITOTERÁPICAS</b> .....	59
<b>4.3.1 Testes preliminares</b> .....	59
<b>4.3.2 Modificador químico</b> .....	61
<b>4.3.3 Curvas de Temperatura de pirólise e Temperatura de atomização</b> .....	64
<b>4.3.4 Figuras de mérito</b> .....	68
<b>4.4 COMPARAÇÃO ENTRE ANÁLISE DIRETA E O MÉTODO DE REFERÊNCIA</b> .....	72
<b>4.5. APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO</b> .....	73
<b>4.5.1 Tinturas fitoterápicas comerciais</b> .....	73
<b>4.5.2 Plantas Medicinais e Tinturas fitoterápicas preparadas</b> .....	76
<b>4.6 TRANSFERÊNCIA DOS ANALITOS DA PLANTA PARA A TINTURA</b> .....	77
<b>4.7 ESTUDOS COMPLEMENTARES - ANÁLISE POR TXRF</b> .....	78
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	81
<b>5.1 PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	81
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	83
<b>ANEXO I – ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	89
<b>ANEXO B - ATIVIDADES ACADÊMICAS DURANTE O DOUTORADO</b> .....	90

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais tem sido parte das práticas médicas tradicionais há milhares de anos e essas plantas têm sido particularmente reconhecidas como sendo um recurso valioso, disponível e acessível para os cuidados de saúde. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o uso de fitoterápicos é influenciado pela cultura e história de um país, ou onde a acessibilidade dos serviços de saúde convencionais é limitada. Contudo em países desenvolvidos muitos usuários confiam nos produtos à base de plantas medicinais no tratamento de suas doenças, sendo o custo financeiro o fator motivador (OMS, 2013).

Embora os medicamentos à base de plantas sejam considerados de menor risco em comparação aos fármacos sintéticos, eles não estão livres da possibilidade de toxicidade ou outros efeitos adversos. Esses medicamentos também possuem contraindicações, sendo algumas plantas medicinais naturalmente tóxicas. Outro problema recorrente é a identificação feita de forma errônea ou a preparação inadequada, ressaltando também, a possibilidade de ocorrer interações com outros medicamentos e outras plantas usadas concomitantemente. Com isso, é requerido conhecimento dos princípios ativos, bem como a qualidade da matéria prima vegetal e de sua procedência, a fim de que possam ser utilizados com segurança (JORDAN *et al.*, 2010).

As plantas espontaneamente podem absorver elementos químicos do solo ou da atmosfera. Consequentemente, o medicamento final pode conter grandes quantidades de elementos químicos inorgânicos, alguns dos quais são considerados essenciais, enquanto outros são tóxicos para os seres humanos (ZEINER & CINDRIC, 2017). Um dos fatores que afetam a qualidade das plantas medicinais é a contaminação por metais pesados, toxinas de origem microbiológica, resíduos de pesticidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Esses contaminantes podem se acumular durante o cultivo, armazenamento e processamento de ervas e podem causar efeitos adversos na saúde do consumidor (TRIPATHY, 2015).

Há dois métodos para a determinação de metais pesados em medicamentos preconizados pela 6ª edição Farmacopeia Brasileira; o ensaio limite por formação de partículas sólidas de sulfetos, que também é recomendado pela Farmacopeia Internacional, e a determinação por espectrometria atômica. Na Farmacopeia Homeopática Brasileira, são indicados apenas o teste da chama e técnicas não instrumentais para análises de metais tóxicos, como os citados anteriormente (BRASIL, 2019a; The International Pharmacopoeia, 2018; BRASIL, 2011).

O ensaio limite é o método mais comumente utilizado dentro a comunidade farmacêutica, provavelmente por não necessitar de equipamento de análises. Segundo consta na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019a), ocorre a formação de partículas sólidas dos sulfetos de metais pesados, em suspensão, para posterior comparação visual da intensidade da cor em três preparações; o branco do método, a amostra e um padrão de  $Pb(NO_3)_2$  presentes em tubo de vidro transparente de fundo chato (geralmente Nessler). O ensaio é semi quantitativo e possibilita inferir se a amostra passa ou não no teste, representando o somatório da concentração dos elementos contaminantes na amostra. A limitação desse método para tinturas fitoterápicas se dá pela forte coloração da amostra, que impossibilita a visualização correta da diferença de cores, que ocorre de forma suave até mesmo em amostras límpidas.

## 1.1 MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Os termos "medicina complementar" e "medicina alternativa" se referem a um amplo conjunto de práticas de cuidados de saúde que incluem a fitoterapia. Os fitoterápicos são uma opção terapêutica eficaz, com um custo relativamente reduzido e com efeitos colaterais diminuídos. Comparada à terapia tradicional, onde as administrações frequentes de doses elevadas muitas vezes são requeridas, ocasionando reações adversas sistêmicas, o uso dos fitoterápicos vem ganhando atenção (SOARES *et al.* 2010).

Entre os Estados Membros da OMS foi observada uma tendência no desenvolvimento de políticas de Medicina Complementar, com expressivo aumento de 1999 a 2018. O número de ações públicas quase dobrou entre 1999 e 2005 e depois duplicou novamente entre 2005 e 2018. Até 2018 mais de 50% dos 194 Estados Membros tinham algum incentivo em áreas como Medicina Tradicional Chinesa e Fitoterapia (OMS, 2019). Embora cada país tem a liberdade de criar legislação sobre o registro de fitoterápicos, considerando suas tradições, geralmente os medicamentos fitoterápicos não precisam ser submetidos à procedimentos rígidos de aprovação como medicamentos quimicamente sintéticos (WOLSKO *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2014).

A agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (FDA - *Food and Drugs Administration*,) estabeleceu em 2004 uma regra para garantir a qualidade dos fitoterápicos disponíveis, exigindo informações detalhadas em rótulos e bulas, o *Botanical Drugs Products: Guidance for Industry*. Contudo nenhuma prova de segurança é necessária, pois as plantas medicinais são consideradas suplementos nutricionais e estão sujeitos às regras mais brandas, presente no *Dietary Supplement Health and Education Act* de

1994. Esta legislação veio em resposta ao desejo da população a um maior acesso devido à crença de que plantas medicinais são seguras.

Na União Europeia, os medicamentos fitoterápicos são regulamentados por uma legislação específica para medicamentos tradicionais (SMICHOWSKI & LONDONIO, 2018; TAPPIN & LUCHETTI, 2007). A China, principal país consumidor de fitoterápicos e plantas medicinais, rigorosamente avalia os limites máximos de metais pesados preocupando-se com a segurança destes medicamentos, sendo seus princípios reconhecidos por organizações internacionais (LIU *et al.*, 2018).

No Brasil, o Estado se empenha criando portarias e programas relacionados a plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS). A Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006, propôs a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), que incluiu plantas medicinais e fitoterapia como opção terapêutica no SUS; a Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008, aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e criou o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, divulgado em 6 de março de 2009, a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), que contém 71 espécies vegetais orientando pesquisas e estudos com plantas medicinais (BRASIL, 2006; BRASIL, 2008; BRASIL, 2009).

Foram incluídos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), por meio da Portaria GM/MS nº. 533, de 28 de março de 2012, 12 medicamentos fitoterápicos no âmbito do SUS. Através da Portaria GM/MS nº 1, de 2 de janeiro de 2015, estabeleceu-se a RENAME 2014, sendo que, das 12 espécies vegetais em diferentes formas de apresentações, quatro são oferecidas na forma de tinturas fitoterápicas; Alcachofra (*Cynara scolymus L.*); Cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana DC.*); Espinheira santa (*Maytenus officinalis Mabb.*) e Guaco (*Mikania glomerata Spreng.*). Essas tinturas são mantidas na atualização da RENAME realizada em 2020 (BRASIL, 2012a; BRASIL, 2013; BRASIL, 2015; BRASIL, 2019c).

As plantas medicinais podem ser oferecidas pelo SUS de quatro formas, planta fresca (*in natura*); planta seca (droga vegetal); fitoterápico manipulado (preparados em farmácias com manipulação autorizada pela vigilância sanitária) e fitoterápico industrializado (produzidos e comercializados mediante registro na Anvisa/Ministério da Saúde). O fitoterápico pode se apresentar em diferentes formas farmacêuticas, como cápsula, comprimido, solução oral, gel, creme, emulsão, tintura, dentre outras. Tintura é a preparação hidroalcolica (70%) resultante da extração de drogas vegetais obtidas por maceração e percolação, utilizando uma parte em

massa de droga vegetal e quantidade suficiente do líquido extrator para produzir 10 partes de massa do produto final. Essa forma farmacêutica não é recomendada a menores de 18 anos, alcoolistas e diabéticos (BRASIL, 2018b).

O Brasil tem uma grande biodiversidade, com cerca de 50 mil espécies de plantas em mais de nove ecossistemas diferentes. Apesar da tradição de uso e aceitação de plantas medicinais pela população brasileira, o número de medicamentos fitoterápicos licenciados é pequeno quando comparado a outros países (CARVALHO *et al.*, 2014). No Brasil, para comercialização de um produto fitoterápico é necessário o registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), responsável pela qualidade, segurança e eficácia do produto, utilizando requisitos similares aos requeridos para os medicamentos sintéticos (BRASIL, 2019b). A regulamentação brasileira vem evoluindo desde 2010 no processo de harmonização internacional que resultou na publicação de um novo marco regulatório em 2014. Com a RDC nº 26/2014, ocorreu a divisão entre os produtos licenciados em duas categorias: medicamento fitoterápico (MF) e produto tradicional fitoterápico (PTF).

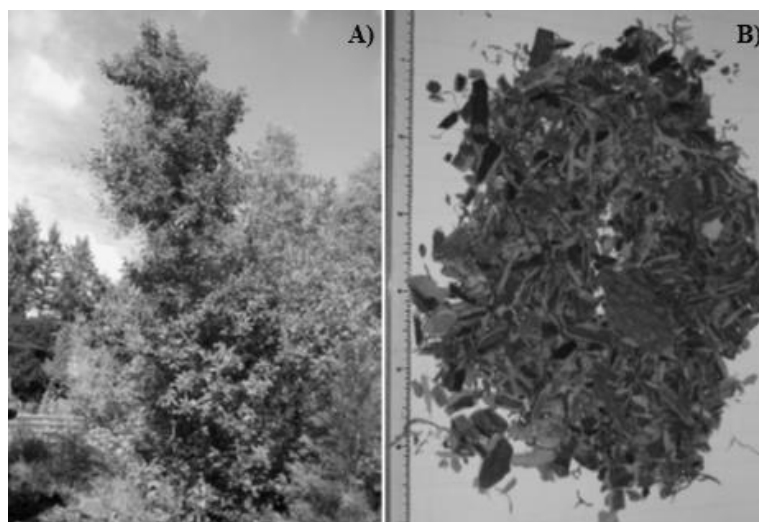
O MF é o produto licenciado que apresenta segurança e eficácia por meio de ensaios não clínicos e clínicos, que podem ter sido realizados com o produto que se pretende registrar ou podem estar disponíveis em documentação técnico-científica previamente publicada. O PTF é licenciado pelo uso tradicional, o fabricante do medicamento não necessita comprovações acerca do fitoterápico, pois o órgão regulador já o fez previamente e publicou sua decisão nas listas de fitoterápicos de registro simplificado. Mesmo para o PTF deve haver, no mínimo, monografia da droga vegetal descrita na Farmacopeia Brasileira ou em farmacopeia reconhecida pela Anvisa (que são: alemã, americana, argentina, britânica, europeia, francesa, internacional, japonesa, mexicana e portuguesa) (BRASIL, 2014c).

Ambos os produtos, MF e PTF, seguem os mesmos requisitos de qualidade. Para as matérias primas devem ser realizados testes de determinação dos caracteres organolépticos; materiais estranhos; cinzas totais, umidade, contaminação microbiológica. Além de testes de acordo com a apresentação, para plantas íntegras, caracteres macroscópicos; para materiais fragmentados ou pó, caracteres microscópicos, para matérias-primas líquidas, densidade. Os testes de controle de qualidade do produto acabado são de acordo com a forma farmacêutica. Para as tinturas são indicados os testes de pH, viscosidade, densidade relativa e testes contidos na monografia oficial (BRASIL, 2018a).

MF e PTF devem também possuir marcadores específicos para cada espécie vegetal, devendo-se fazer o controle qualitativo e quantitativo no produto final. O marcador é a substância ou classe de substâncias utilizada como referência no controle da qualidade da matéria-prima vegetal e dos fitoterápicos, preferencialmente tendo correlação com o efeito terapêutico (BRASIL, 2014c). Segundo a RENAME 2020, o marcador químico para alcachofra é derivado de ácido cafeoilquínico (expressos em ácido clorogênico), para cáscara sagrada são derivados hidroxiantracênicos (expressos em cascarosídeo A), para espinheira santa são taninos totais (expressos em pirogalol) e para o guaco é a cumarina (BRASIL, 2019c).

A Instrução Normativa nº 02, publicada em 13 de maio de 2014, divulgou a “*Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado*” e a “*Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado*” (BRASIL, 2018a). Cáscara sagrada e alcachofra são classificadas como medicamentos. A parte da planta a ser usada deve ser a casca no caso da cáscara sagrada (**Figura 1**) e as folhas, para alcachofra (**Figura 2a**). O Guaco e Espinheira Santa, que são espécies vegetais nativas, são classificados como produtos tradicionais fitoterápicos, e para ambos devem ser usadas as folhas das plantas (**Figuras 3a e 2b**, respectivamente).

**Figura 1** - *Rhamnus purshiana* (cáscara sagrada). A) aspecto geral da espécie, B) aspecto geral da droga vegetal (casca)

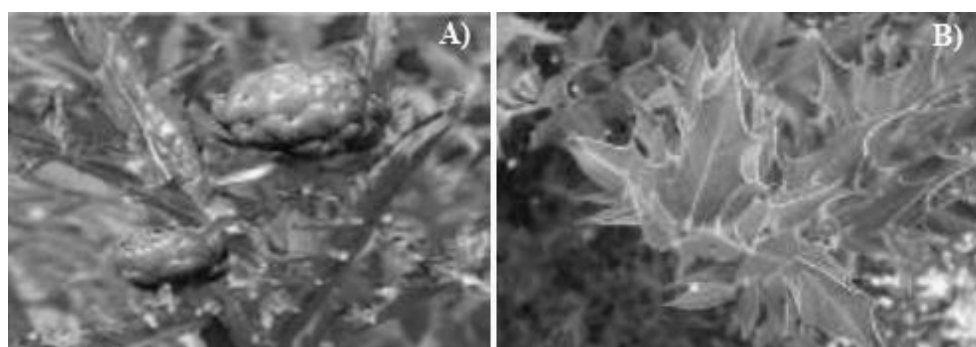


Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2014b).

A Cáscara sagrada é indicada para constipação ocasional, devido à ação dos compostos antracênicos, e também possui em sua composição ácidos graxos de cadeia longa e compostos fenólicos diversos. As cascas só podem ser utilizadas após um ano de coleta, devido a presença

de antranas que podem causar náusea, vômito e diarreia. Dentre as quatro espécies de plantas estudadas, apenas a Cáscara sagrada tem restrição de uso limitado a uma semana, devido ao risco de desequilíbrio eletrolítico, e também pelos indicativos apontados em estudos toxicológicos, onde demonstrou-se que o uso prolongado pode ser um fator de aumento no risco de câncer colorretal (BRASIL, 2014b).

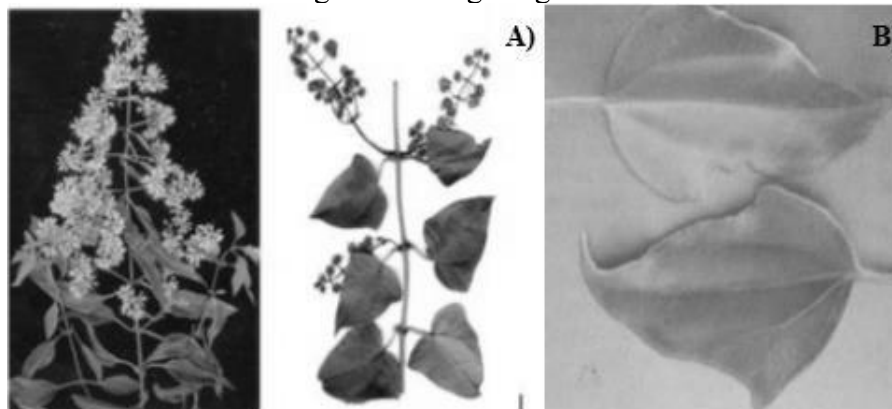
**Figura 2** - Aspecto geral da espécie. A) *Cynara scolymus* L. (Alcachofra) e B) *Maytenus officinalis* Mabb (Espinheira Santa)



Fonte: Ministério da Saúde (2016b).

A Alcachofra é indicada para tratamento dos sintomas de dispepsia funcional e hipercolesterolemia leve a moderada, as principais classes químicas encontradas em sua composição são ácidos fenólicos, fenilpropanoides, saponinas, flavonoides, sesquiterpenos e esteroides. A espinheira santa também é indicada para dispepsias, atuando como coadjuvante no tratamento de gastrite e úlcera gastroduodenal, destaca como principais metabólitos secundários a presença de terpenos, flavonoides e taninos (BRASIL, 2016a; BRASIL, 2018b).

**Figura 3** - *Mikania glomerata* (Guaco). A) Aspecto geral da espécie e B) aspecto geral da droga vegetal



Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2014a).

O guaco é usado como expectorante e broncodilatador. Entre os componentes químicos descritos estão os compostos cumarínicos, diterpenóides, fenilpropanóides, triterpenóides e esteróis, e componentes voláteis como os óleos essenciais. O metabólito secundário majoritário é a cumarina, ocorrendo principalmente nas folhas da planta e caracterizando o odor fragrante e aromático da espécie, além de ser um dos principais responsáveis pelas ações farmacológicas da planta. Outro metabólito secundário que se destaca como anti-inflamatória e expectorante, é o ácido caurenóico (diterpeno). (BRASIL, 2014a).

De acordo com dados recentes, 359 registros foram obtidos de 101 espécies de plantas medicinais. A planta medicinal com o maior número de licenças cedidas é o guaco, presente em 25 fitoterápicos licenciados, a alcachofra aparece na 8<sup>o</sup> posição, com 15 fitoterápicos. A espinheira santa possui 13 fitoterápicos enquanto a cáscara sagrada possui cinco (CARVALHO *et al.*, 2018).

## 1.2 CONTAMINANTES INORGÂNICOS

Algumas impurezas inorgânicas são tóxicas mesmo em baixas concentrações e devem ser cuidadosamente monitoradas para garantir a segurança da saúde humana (SILVA *et al.*, 2017). Os metais pesados prejudicam o bem-estar do ser humano pois são capazes de causar uma série de problemas à homeostase corporal, como estresse oxidativo celular (Cd, Cr, Pb), lesões neurológicas (Pb e Hg), lesões ao DNA (Cr e Pb), alterações no metabolismo do cálcio (Cd e Pb) e também a capacidade de interferir no metabolismo de elementos essenciais (Cd) (CASERTA *et al.*, 2013).

Veiga Jr. *et al.* (2005) relataram casos de contaminação de plantas medicinais por metais pesados, e citaram um estudo realizado em Londres na década de 90, onde foram encontrados 9 casos de contaminação por mercúrio, chumbo e arsênio os quais foram associados a utilização de ervas medicinais (SHAW *et al.*, 1997). Caldas & Machado (2004) analisaram 130 amostras de 10 espécies diferentes de plantas medicinais e foi verificado que o mercúrio foi o metal mais detectado nas amostras (38%), seguido pelo chumbo (23%) e cádmio (13%). Organizações governamentais também monitoraram fitoterápicos, como Departamento de Serviços de Saúde da Califórnia, que analisou 251 produtos à base de plantas e constatando que cerca de 10% das amostras continham 10 ppm ou mais de Pb, e mais de 14% continham uma média de 14,6 ppm de As. Um estudo de triagem na Alemanha constatou que cerca de 3,5% dos 317 lotes de ervas chinesas excederam os limites legais de metais pesados (BOLAN *et al.*, 2017).



Metais tóxicos como Cd, Cr e Pb podem ocorrer naturalmente no ambiente, devido a intemperismo, atividades biológicas e vulcânicas (SMICHOWSKI & LONDONIO, 2018). Os metais pesados frequentemente se encontram na forma catiônica, o que acarreta fortes interações com a matriz do solo e podem se tornar móveis, chegando até às plantas, que por sua vez podem acumular esses metais nos tecidos (STREET, 2012). No meio ambiente, diferentes fatores influenciam a absorção desses metais, tais como temperatura, pH, condutividade elétrica, competição entre espécies, tipo de planta, tamanho da planta, sistema radicular, disponibilidade de elementos, tipo de folha e teor de umidade do solo e da planta (GOMES *et al.*, 2017).

O chumbo e o cádmio são considerados tóxicos em qualquer faixa de concentração, enquanto o cromo mostra menos toxicidade, no entanto, em concentrações maiores podem ser agravantes para a saúde. Em relação ao potencial carcinogênico, Cr e Cd, em suas formas inorgânicas, são considerados cancerígenos para seres humanos, segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer. O Pb não possui características carcinogênicas; no entanto, é prejudicial aos sistemas neurológico, reprodutivo, imunológico, cardiovascular e renal (SILVA *et al.*, 2017).

O cádmio destaca-se entre os demais, devido ao longo tempo de meia vida. As principais fontes de contaminação por Cd são antropogênicas, como o uso de fertilizantes fosfatados e atividades industriais e de mineração. As plantas podem absorver o Cd devido à sua alta mobilidade química, afetando negativamente o seu crescimento (RIZWAN *et al.* 2018). Para o ser humano, os efeitos tóxicos após a exposição afetam principalmente os rins e o fígado (ZHANG & REYNOLDS, 2019).

O cromo não é um elemento raro, sendo o sétimo elemento mais abundante na crosta terrestre, sua presença, devido as atividades antropogênicas, vem da deposição de resíduos das indústrias metalúrgica, principalmente aço e metal, e química, como pigmentos, galvanoplastia e couro. É detectado na maioria das matrizes ambientais e aumentou exponencialmente nos ecossistemas aquáticos e terrestres nas últimas décadas (GOMES *et al.*, 2017).

A toxicidade do cromo está diretamente ligada à sua especiação. De acordo com a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, em português União Internacional de Química Pura e Aplicada) espécies químicas é forma específica de um elemento químico que pode ser definido quanto à composição isotópica, estado eletrônico ou de oxidação e (ou) estrutura complexa ou molecular. O cromo é um exemplo de elemento com espécies inorgânicas, variando apenas o estado de oxidação (TEMPLETON & FUJISHIRO, 2017). A espécie Cr (III) não é essencial para plantas, mas é um elemento traço essencial para os animais,

já o Cr (VI) é listado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*Environmental Protection Agency - EPA*) entre dezessete substâncias químicas que representam a maior ameaça para os seres humanos (GOMES *et al.*, 2017).

Os riscos para a saúde da exposição a Cr (VI) estão bem documentados pela OMS, sendo considerado altamente letal para a maioria dos organismos devido às suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas. O seu elevado potencial redox positivo faz com que atravesse membranas celulares, danificando seus componentes, sendo capaz de degradar proteínas e alterar o DNA em humanos, animais e plantas. Além de causar dor epigástrica, náusea, vômitos, reações alérgicas, úlceras estomacais e hemorragias, a exposição ao Cr (VI) é conhecida por causar câncer nos pulmões, danos às funções renais e hepáticas (SINHA *et al.*, 2018).

O envenenamento por chumbo através do consumo de medicamentos fitoterápicos é mais comum do que outros contaminantes inorgânicos como o Cd (BOLAN *et al.*, 2017). Os efeitos adversos à saúde causados pelo Pb envolvem o sistema cardiovascular, onde foi observado sinais de degeneração e função anormal do músculo liso. Em estudo realizado com ratos cronicamente expostos ao Pb, foram detectados hipertensão arterial. Outros estudos correlacionaram a exposição ao chumbo e comprometimento da função renal, além de neurotoxicidade, doenças respiratórias e comprometimento das capacidades cognitivas (GERALDES *et al.*, 2016; IYER *et al.*, 2015).

### 1.3 DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA EM FORNO DE GRAFITE

As principais técnicas analíticas instrumentais empregadas, sozinhas ou hifenizadas, desempenharam um papel crucial na determinação de contaminantes inorgânicos. As pesquisas realizadas nas últimas décadas utilizaram cromatografia de troca iônica (IC), espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS), espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS), espectrometria de fluorescência atômica (AFS), fluorescência de raios X (XRF) e técnicas baseadas em plasmas, como espectrometria de emissão óptica em plasma acoplado indutivamente (ICP OES) e espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS) (SMICHOWSKI & LONDONIO, 2018).

A Farmacopeia Americana (USP, do inglês *United States Pharmacopeia*) recomenda métodos baseados em técnicas de emissão atômica e espectrometria de massas, como ICP OES e ICP-MS. Embora tenham sensibilidade adequadas para elementos traços, exigem preparo de

amostra como a digestão ácida assistida por radiação micro-ondas, o que pode ser um problema em amostras com alto teor alcoólico (USP, 2015).

A técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite (GF AAS) é uma das opções para determinação de metais envolvendo a espectrometria atômica, pois possui limite de detecção adequado, na faixa de  $\mu\text{g L}^{-1}$ ; é mais barata comparada a outras técnicas de determinação de traços; utiliza de pequeno volume de amostra, cerca de 20  $\mu\text{L}$ ; e devido a etapa de pré-tratamento da amostra, durante o programa de aquecimento, permite o uso de análise direta ou com pouca preparação das amostras (WELZ & SPERLING, 1999).

Inicialmente a técnica de GF AAS possuía limitações principalmente pelo efeito da matriz da amostra nos resultados da análise. Para superar esse problema, foram propostas as condições STPF (*Stabilized Temperature Platform Furnace*, em português forno e plataforma com temperatura estabilizada), que consistem em um conjunto de 7 requisitos usados para o desenvolvimento da técnica baseados nas ideias de *L'vov*, que são:

- a) tubos de grafite com revestimento pirolítico;
- b) tubos com plataforma *L'vov*;
- c) interrupção do gás de proteção durante a etapa de atomização;
- d) cálculo das concentrações dos analito a partir das áreas dos sinais analíticos;
- e) eletrônica compatível com os sinais transientes;
- f) uso de sistema de correção de fundo para absorção não seletiva; e
- g) uso de modificadores químicos.

Essas condições resultaram em um passo importante na melhoria da seletividade do GF AAS (VOLYNSKII, 2003).

As técnicas de quantificação de elementos químicos, seja baseada em eletroquímica ou emissão atômica, têm sido amplamente descritas na literatura. Contudo, essas técnicas na grande maioria das vezes requerem a mineralização completa da amostra para decompor substâncias interferentes, tornando-as trabalhosas demais. Enquanto GF AAS, devido à sua alta sensibilidade e tolerância às matrizes inorgânicas e orgânicas, possibilita a determinação direta em diferentes amostras. A determinação direta, todavia, exige uma otimização cuidadosa do programa de temperatura e escolha adequada de modificador químico, além de outros parâmetros das condições STPF (DESSUY *et al.*, 2008). Tinturas fitoterápicas possuem alto potencial para análise direta, pois já se encontram no estado líquido. Contudo, a complexidade da matriz, devido ser derivado de plantas, e uso de alto teor alcoólico, usado como líquido

extrator, são os principais fatores que podem dificultar o processo de análise direta desse tipo de amostra.

#### 1.4 PREPARO DE AMOSTRAS PARA DETERMINAÇÃO DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

Os medicamentos fitoterápicos têm características distintas que os diferenciam dos fármacos sintéticos, principalmente por ter mais de um composto ativo. Os perfis químicos das plantas medicinais são afetados pelas condições de cultivo, fabricação, comercialização e distribuição. Variáveis fisiológicas, genéticas e ambientais afetam o perfil bioquímico e a produção secundária de metabólitos nas plantas. Os metabólitos secundários também dependem do tempo de colheita, armazenamento, secagem, extração e processamento para a embalagem final (SAHOO *et al.*, 2010). Muitas vezes para facilitar a determinação de metais pesados nessas amostras, é necessário um tratamento para eliminar as substâncias interferentes. Os métodos de preparo de amostras incluem principalmente cinzas secas e digestão úmida (KLOPPER, 2017).

Primeiramente é necessário ressaltar que, após a coleta das amostras é necessária a homogeneização antes de serem retiradas alíquotas, além disso as amostras devem estar de uma forma que possibilite a ser introduzida no instrumento analítico escolhido. Técnicas analíticas para determinação de metais, como as baseadas em AES e AAS, normalmente requerem amostras líquidas. No caso de amostras que já estão no estado líquido, a introdução direta tem sido investigada, pois pode simplificar o procedimento e evitar desvantagens dos métodos de mineralização (ZEINER & CINDRIĆ, 2017).

Algumas informações estão bem difundidas, como o fato da concentração dos analitos ser geralmente baixa em amostras líquidas, exigindo mais cuidado no método usado para sua determinação, pois o impacto da contaminação no resultado final aumenta. O preparo da amostra é uma etapa adicional que envolve operações demoradas e trabalhosas, reagentes de alta pureza, analistas qualificados. É sempre apropriado verificar a possibilidade da análise direta, a menos que exista efeitos de matriz interferindo na detecção do analito (HOENIG & KERSABIEC, 1996).

A etapa preliminar de preparo de amostra é também responsável pelos erros provenientes de contaminações, além de perdas causadas por volatilização e adsorção. Além de ser laborioso, sendo responsável pelo maior tempo gasto num procedimento completo, desde a coleta até a análise (KUBRAKOVA, 1997). O alto fator de diluição imposto às amostras prejudica também o limite de quantificação. Contudo, às vezes ela se faz necessária para

eliminação da matriz orgânica, que pode ser alcançada pela digestão total das amostras antes da análise (VINHAL & CASSELLA, 2019).

O método de digestão ácida de amostras é recomendado nas principais farmacopeias e por diversos procedimentos padrão para análise de amostras visando a determinação de metais. As razões para a grande difusão da tecnologia de micro-ondas para este fim estão relacionadas às suas vantagens em relação às tecnologias mais tradicionais, como tempo; melhor recuperação de elementos de compostos voláteis; níveis mais baixos de contaminação; volumes mínimos de reagentes, com procedimentos mais reprodutíveis (AGAZZIA & PIROLA, 2000).

## 2 OBJETIVOS

Determinar e avaliar os teores de contaminantes inorgânicos; cádmio, cromo e chumbo em tinturas fitoterápicas de Alcachofra, Cáscara Sagrada, Espinheira Santa e Guaco empregando técnicas espectrométricas de análise com mínimo de preparo de amostras.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. verificar a presença de cádmio, cromo e chumbo nas plantas Alcachofra, Cáscara Sagrada, Espinheira Santa e Guaco obtidas em feiras e comércio local;
2. realizar o preparo de tinturas fitoterápicas a partir das plantas correspondentes e avaliar a influência do processo de fabricação na presença dos contaminantes Cd, Cr e Pb;
3. propor e aplicar um método de análise quantitativa para cádmio, cromo e chumbo em tinturas fitoterápicas empregando a técnica de absorção atômica com forno de grafite com mínimo de preparo de amostras;
4. obter as figuras de méritos para a validação analítica do método de referência e do método proposto.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 VIDRARIAS, REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as vidrarias utilizadas foram previamente descontaminadas em banho de ácido nítrico 10% v/v por um período mínimo de 24 h, lavadas com água deionizada e secas à temperatura ambiente.

Todos os reagentes empregados foram de grau analítico, com exceção do álcool de cereais 96° GL (EMFAL, Brasil), por se tratar do reagente similar ao utilizado nas produções de tinturas fitoterápicas por profissionais farmacêuticos.

As soluções foram preparadas utilizando água deionizada pelo sistema Elga Purelab Option-Q (modelo LA611, UK). Ácido nítrico (65% v/v, Sciavicco, Brasil) foi utilizado para o preparo de amostras. Nas soluções, além de ácido nítrico e álcool de cereais, foi usado Triton X-100 (Vetec, Brasil).

As soluções padrão foram preparadas a partir de diluições de soluções estoque de Cd, Cr e Pb 1000 mg L<sup>-1</sup> (SpecSol, Brasil). Para a análise direta, a diluição foi feita com Triton X-100 0,1% v/v e HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v, e para o método de referência, foi feita com solução de HNO<sub>3</sub> 2% v/v. As soluções usadas como modificador químico no GF AAS foram Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 1000 mg L<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4000 mg L<sup>-1</sup> e Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 600 mg L<sup>-1</sup> (Sigma Aldrich, São Paulo, SP).

#### 3.2 INSTRUMENTAÇÃO

As leituras das amostras para determinação de Pb foram realizadas no Departamento de Química da UFMG, Cd e Cr foram determinados nas dependências do Departamento de Química da UFJF.

Os analitos Cd e Cr foram determinados utilizando um espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (Thermo Scientific, Solaar Series M5, USA) realizando-se injeções manuais. A lâmpada de deutério (D<sub>2</sub>) foi usada como correção de fundo durante a determinação de Cd. Para determinação de Pb foi utilizado espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite equipado com amostrador automático (Agilent, PSD 120, Santa Clara, EUA) com correção de fundo por Zeeman (Agilent, SpectrAA 240Z, Santa Clara, EUA).

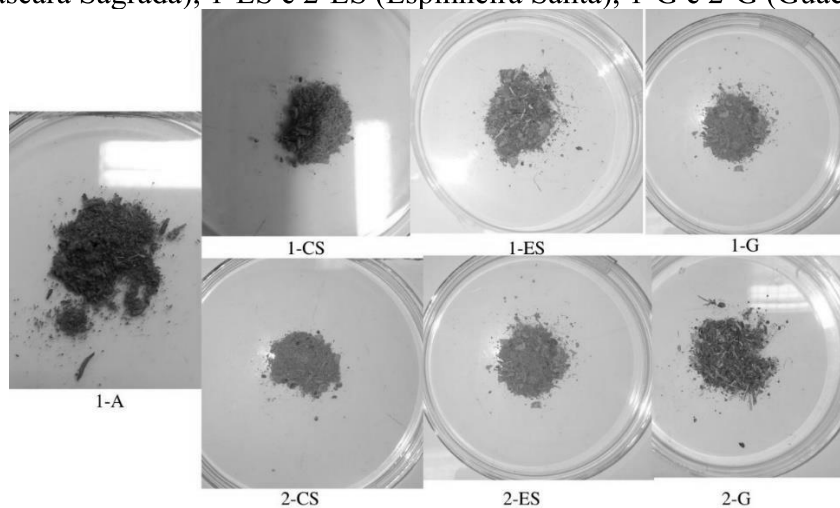
Lâmpadas de cátodo oco monoelementar de Cd, Cr e Pb foram empregadas como fontes de radiação. As absorvâncias foram registradas em área do sinal de absorvância, exceto para determinação de Cd por análise direta, na qual foi usada o sinal em altura do sinal de absorvância. Todas as medições foram feitas em duplicata. O tubo de grafite com revestimento pirolítico foi utilizado.

Como método de referência foi usada a mesma técnica de análise, porém realizando-se o preparo da amostra por meio de uma digestão assistida por radiação micro-ondas (Berghof, *SpeedWave Four*, Alemanha). A evaporação do etanol presente nas tinturas foi realizada em chapa aquecedora digital (Sterilifer, modelo SXDI 25, Brasil) antes do procedimento de digestão.

### 3.3 PREPARO DA TINTURA FITOTERÁPICA A PARTIR DA PLANTA MEDICINAL

Seguindo as recomendações de preparo de acordo com o Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2018b), primeiramente as plantas foram secas em estufa à 40 °C por 48 h, e, após resfriarem, foram trituradas em *mixer* de alimentos (Walita) e depositadas em placa de Petri (**Figura 4**). Como líquido extrator foi utilizada uma solução alcóolica a partir de álcool de cereais comercial diluído com água deionizada até a graduação de 70% v/v. As plantas selecionadas para o preparo da tintura são mostradas na **Tabela 1** junto a sua procedência

**Figura 4** - Amostras das plantas após secagem e trituração. 1-A (Alcachofra), 1-CS e 2-CS (Cáscara Sagrada), 1-ES e 2-ES (Espinheira Santa), 1-G e 2-G (Guaco)



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).



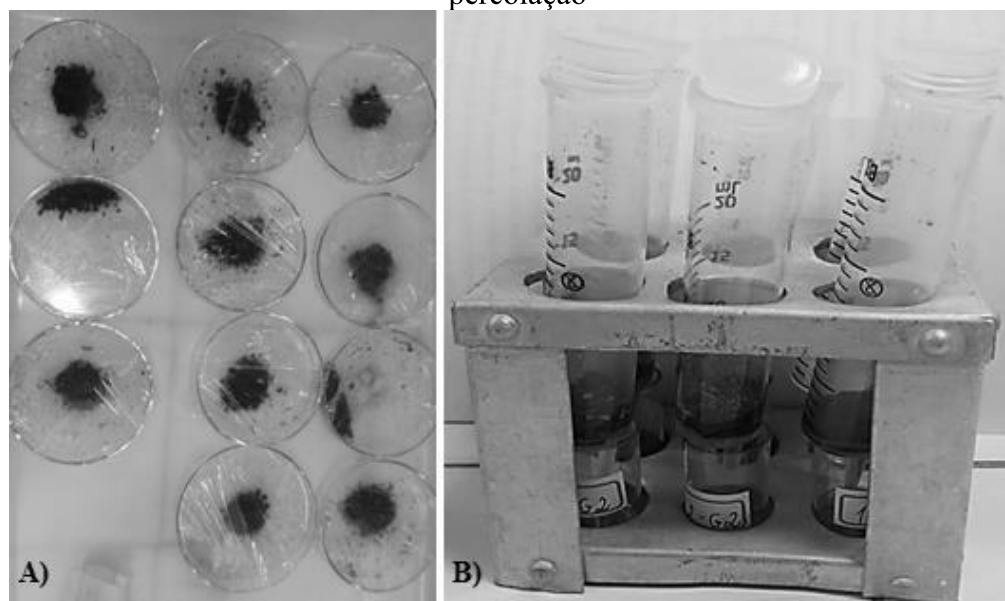
**Tabela 1** - Relação das amostras preparadas de tinturas fitoterápicas a partir da planta medicinal

Planta	Quantidade	Procedência	Código
Alcachofra	1	Manaus – AM	1-A
Espinheira Santa	2	Marca comercial 1	1-ES
		Manaus – AM	2-ES
Cáscara Sagrada	2	Marca comercial 2	1-CS
		Marca comercial 3	2-CS
Guaco	2	Manaus – AM	1-G
		Marca comercial 1	2-G

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

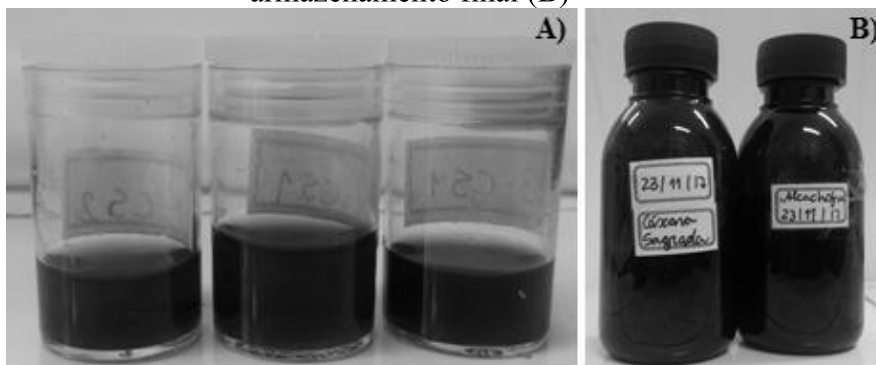
Foram pesados 500 mg de cada uma das plantas, que permaneceram em contato com a solução alcoólica por 24 h (**Figura 5A**). Após esse tempo, em uma seringa de 20 mL (tampada, com o fundo forrado com papel de filtro, mostrado na **Figura 5B**), foi colocado lentamente 3 mL de líquido extrator, que ficou em percolação espontânea até obter 2,5 mL de tintura (**Figura 6A**). As tinturas passaram novamente por papel de filtro e foram transferidas para frascos âmbar (**Figura 6B**), ficando armazenadas à temperatura ambiente até o uso. Os procedimentos foram realizados em duplicata.

**Figura 5** - Processo de preparação das tinturas fitoterápicas. (A) maceração e (B) percolação



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

**Figura 6** - Tinturas fitoterápicas preparadas, recolhidas após percolação (A) e armazenamento final (B)



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

### 3.4 TINTURAS FITOTERÁPICAS COMERCIAIS

As amostras comerciais analisadas (**Tabela 2**) consistiram em tinturas fitoterápicas adquiridas em sete farmácias de manipulação no estado de MG nas cidades de Juiz de Fora e Belo Horizonte. Para preservar a identidade dos estabelecimentos comerciais foram utilizados códigos numerados de 1 a 7. As tinturas fitoterápicas são de quatro plantas medicinais *Cynara scolymus L.*; *Rhamnus purshiana DC.*; *Maytenus officinalis Mabb.* e *Mikania glomerata Spreng.* As amostras preparadas a partir das plantas medicinais foram também analisadas pelo método proposto nesse trabalho.

**Tabela 2.** Relação das amostras comerciais de tinturas fitoterápicas

Nome comum	Nome Científico	Quantidade	Procedência*	Código
Alcachofra	<i>Cynara scolymus L</i>	4	Farmácia 1	A-1
			Farmácia 2	A-2
			Farmácia 4	A-3
			Farmácia 7	A-4
Espinheira Santa	<i>Maytenus officinalis Mabb.</i>	5	Farmácia 1	ES-1
			Farmácia 3	ES-2
			Farmácia 4	ES-3
			Farmácia 5	ES-4
			Farmácia 6	ES-5
Cáscara Sagrada	<i>Rhamnus purshiana DC.</i>	4	Farmácia 1	CS-1
			Farmácia 2	CS-2
			Farmácia 5	CS-3
			Farmácia 6	CS-4
Guaco	<i>Mikania glomerata Spreng</i>	3	Farmácia 1	G-1
			Farmácia 4	G-2
			Farmácia 7	G-3

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Além das amostras das quatro espécies de plantas medicinais em estudo, foram fornecidas através da Profa. Dra. Fabíola Dutra, da Faculdade de Farmácia da UFJF (FF-UFJF) cinco amostras de tinturas fitoterápicas das plantas medicinais *Thuja occidentalis L.*, *Curcuma zedoaria*; *Crataegus oxyacantha L.*; *Schinus terebinthifolius Raddi*, e *Zanthoxylum subserratum*, usadas para avaliar a aplicação do método proposto. Essas amostras são apresentadas na **Tabela 3**.

**Tabela 3** - Relação das amostras de tinturas fitoterápicas doadas e incluídas no estudo

Nome comum	Nome Científico	Quantidade	Procedência	Código
Aroeira	<i>Schinus terebinthifolius Raddi</i>	1	FF-UFJF	AR-1
Cratêgo	<i>Crataegus oxyacantha L.</i>	1	FF-UFJF	C-1
Mamica de Cadela	<i>Zanthoxylum subserratum</i>	1	FF-UFJF	MC-1
Tuia	<i>Thuja occidentalis L.</i>	1	FF-UFJF	T-1
Zedoária	<i>Curcuma zedoaria</i>	1	FF-UFJF	Z-1

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Para a otimização dos parâmetros instrumentais do GF AAS e para o método de referência (digestão ácida assistida por radiação micro-ondas) foi utilizado uma mistura das amostras das quatro plantas “principais”: alcachofra, espinheira santa, cáscara sagrada e guaco, na proporção de 1:1:1:1 v/v/v/v, denominada *mix de amostras*.

### 3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS – pH e DENSIDADE

A caracterização físico-química das amostras foi realizada de acordo com os procedimentos da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019a). Foi determinado o pH das tinturas fitoterápicas em pHmetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. As determinações foram realizadas em triplicatas.

Devido ao volume insuficiente de amostra para utilização do picnômetro, para a determinação da densidade das amostras foi utilizado os dados de massa e de volume medidos separadamente. Foram pipetados 100 µL de amostra com auxílio de uma micropipeta de 200 µl de capacidade, o volume foi pesado em balança analítica em 10 replicatas. Todos os instrumentos usados foram previamente calibrados, as determinações foram realizadas no mesmo dia em temperatura ambiente.

### 3.6 PREPARO DE AMOSTRAS PELO DE MÉTODO DE REFERÊNCIA: DIGESTÃO ÁCIDA ASSISTIDA POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS

#### 3.6.1 Plantas

Para a digestão das amostras de plantas, primeiramente elas foram levadas à estufa a 40 °C por 48 h e trituradas em *mixer* de alimentos, para então serem submetidas ao procedimento de digestão. Um *mix de amostras* de 200 mg (preparado pela combinação de 50 mg de cada uma das plantas) foi digerido para ser utilizado para a otimização instrumental do GF AAS. Na aplicação do método, foram pesados 200 mg de cada uma das plantas.

Após um período de 2 h de pré-digestão em um frasco digestor junto a 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado destilado, foram levados ao digestor, seguindo o programa de digestão apresentado na **Tabela 4**. O digerido obtido foi diluído para 20,00 mL em água deionizada.

**Tabela 4** - Programa de aquecimento referente à digestão assistida por radiação micro-ondas do *mix de amostras* de plantas

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo de rampa (min)	Tempo (min)	Potência (%)
1	145	2	5	70
2	170	5	10	80
3	200	2	15	80
4	50	1	10	0

Fonte: BERGHOF (2013).

#### 3.6.2 Tinturas Fitoterápicas

Considerando o alto teor alcoólico (cerca de 70% v/v) das tinturas fitoterápicas, foram encontradas algumas dificuldades no procedimento de digestão ácida das amostras de tinturas, devido à reação violenta entre o ácido nítrico e o etanol que ocorre ainda no processo de pré-digestão da amostra. No momento em que era adicionado o ácido nítrico concentrado à amostra, a reação fazia com que parte da solução fosse projetada para fora do frasco digestor, o que conseqüentemente acarreta a perda dos analitos.

Não foram encontrados na literatura dados relacionados à situação vivenciada experimentalmente, embora encontra-se disponíveis muitos trabalhos onde foram usadas

amostras alcoólicas, geralmente a concentração de etanol é até 50%, que é o teor alcoólico de bebidas como aguardente e whisky. O ácido nítrico é frequentemente envolvido em incidentes causados por reação química devido sua capacidade excepcional de oxidação, mesmo em condições bastante diluídas, ao contrário do ácido sulfúrico, ou à temperatura ambiente, ao contrário do ácido perclórico.

Segundo *Bretherick's Handbook of Reactive Chemical Hazards* (URBEN, 2006), misturas de ácido nítrico e álcoois são muito instáveis quando a concentração de ácido nítrico está acima de 10%, sendo que misturas contendo mais de 5% de  $\text{HNO}_3$  não devem ser armazenadas. O uso de álcool e ácido nítrico em altas concentrações, segundo o autor é “*na melhor das hipóteses, é uma aproximação completamente imprevisível de um sistema de propulsão de foguete de ácido nítrico – álcool*”.

Para solucionar o problema foram testadas quatro diferentes condições de trabalho. A primeira delas foi o uso de ácido nítrico diluído 1:2 v/v para digestão ácida em sistema fechado. Não ocorreu reação violenta durante a pré-digestão como ocorrido com ácido nítrico concentrado, mas o digerido não se apresentou de forma límpida. Ainda assim para verificar se o procedimento havia sido eficaz foi avaliada exatidão do método, sendo descartada essa condição de trabalho, pois obteve-se valores inadequados. Esse fato possivelmente foi causado por digestão incompleta da amostra, devido o menor poder oxidante do ácido nítrico diluído, o que provavelmente leva a interferência de matriz (KRUG & ROCHA, 2016).

A segunda condição testada foi o uso de ácido nítrico concentrado resfriado a 4 °C para digestão ácida em sistema fechado. Essa possibilidade também não foi eficaz, pois quando o ácido nítrico entrou em contato com o etanol a reação violenta ocorria, mesmo mantendo os frascos em banho de gelo, o que ocasionava a perda de analito por projeção da amostra, assim como ocorrido com o uso do ácido nítrico à temperatura ambiente.

A terceira condição testada consistia na evaporação do etanol das tinturas por banho-maria, diretamente nos recipientes de pesagem do digestor micro-ondas. Contudo, o processo foi lento e as altas recuperações obtidas ao verificar a exatidão do método indicam uma possível contaminação da amostra.

A quarta condição avaliada foi a digestão ácida em sistema aberto com uso da chapa aquecedora com evaporação do etanol presente nas tinturas. Embora o processo tenha se mostrado rápido e de fácil execução, ao avaliar a exatidão do método foram obtidas recuperações baixas, o que é comum devido à volatilidade dos analitos, como Cd e Pb, o que limita a digestão das amostras em frascos abertos.

Nos quatro processos citados acima, com exceção da digestão com uso da chapa aquecedora (que é um sistema aberto), devido a limitação da massa de amostra que pode ser usada para digestão em sistema fechado, combinado ao fato de que no final do processo de digestão assistida por radiação em micro-ondas ainda é feita a limpeza para garantir que toda solução digerida foi retirada do frasco digestor; a diluição da amostra no final do preparo de amostra era cerca de 100 vezes.

O processo de digestão já otimizado foi realizado em três etapas, devido a reação violenta observada experimentalmente entre ácido nítrico e etanol.

#### 1. *Evaporação do etanol.*

Foram transferidos 2 mL de amostra para barcas de pesagem, em Teflon, que foram levadas a chapa de aquecimento a 90 °C durante 30 min.

#### 2. *Pré-digestão.*

Após resfriamento das barcas de pesagem contendo as amostras sem o etanol, estas foram colocadas no frasco digestor DAP 30 e misturadas a 8 mL de ácido nítrico concentrado e deixadas em pré-digestão por 2 h.

#### 3. *Digestão assistida por radiação micro-ondas.*

Por fim as amostras foram digeridas seguindo o programa de aquecimento apresentado na **Tabela 5**, conforme sugerido pelo fabricante do equipamento (BERGHOF, 2013). O digerido obtido foi diluído para 20,00 mL em água deionizada.

**Tabela 5** - Programa de aquecimento da digestão assistida por radiação micro-ondas para amostras de tinturas fitoterápicas

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo de rampa (min)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Potência (%)</b>
1	145	2	5	60
2	170	5	10	70
3	190	2	15	80
4	50	1	10	0

Fonte: BERGHOF (2013).

### 3.7 ANÁLISE POR GF AAS

Foi testada a necessidade do uso de modificador químico, avaliando o sinal obtido sem o seu uso e com a utilização de 5 µg Pd, 3 µg Mg, e a mistura 3 µg Mg/5 µg Pd na condição do

programa de aquecimento recomendado pelo fabricante do equipamento na determinação de Cd e Cr. Na determinação de Pb foram testados também como modificadores químicos 20 µg NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 20 µg NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/3 µg Mg.

Foram introduzidos no forno de grafite 20 µL de solução de amostra ou 25 µL quando o modificador químico foi usado. As condições instrumentais utilizadas recomendadas pelo fabricante do equipamento para determinação de Cd, Cr e Pb são mostradas na **Tabela 6**.

**Tabela 6** - Condições instrumentais recomendadas pelo fabricante do equipamento, *Thermo* para a determinação de Cd e Cr e *Agilent* para determinação de Pb por GF AAS

Parâmetro	Cádmio	Cromo	Chumbo
Corrente da lâmpada (mA)	3	6	10
Comprimento de onda (nm)	228,8	357,9	283,3
Fenda espectral (nm)	0,5	0,2	0,5
Temperatura de Pirólise (°C)	300 <sup>a</sup> , 600 <sup>b</sup>	1200	600
Temperatura de Atomização (°C)	600 <sup>a</sup> , 1000 <sup>b</sup>	2500	2100
Modificador Químico	Pd, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> ou Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Pd, EDTA, Oxalato

<sup>a</sup> sem o uso de modificador químico

<sup>b</sup> com uso de modificador químico

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

### 3.7.1 Testes Preliminares

No início dos estudos das condições instrumentais, foram observadas dificuldades de injeção da amostra no GF AAS, usando o cromo como analito teste, foram realizados testes preliminares que pudessem corrigir os problemas apresentados. Assim, na determinação de Cr por análise direta, foram avaliadas as temperaturas de secagem de 100 °C, e o uso de duas etapas de secagem, 70/ 110 °C e 90/130 °C sendo também avaliado o tempo de pirólise de 10, 20 e 30 segundos.

Quanto ao preparo da amostra, ocorreu problemas em solubilizar e estabilizar a amostra quando foi necessário a diluição para a análise direta, com isso foram testados como diluentes as soluções de HNO<sub>3</sub> 2% v/v e solução de Triton X-100 0,1% v/v e HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v.

### 3.7.2 Análise direta

Para otimização instrumental do GF AAS foi usado *mix de amostras* diluída 1:10 v/v em solução de Triton X-100 0,1% v/v acidificada com ácido nítrico 0,2% v/v e soluções padrão mono-elementares nas concentrações 1,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Cd, de 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Cr e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Pb no meio alcoólico 7% v/v diluído com uso de Triton X-100 0,1% v/v acidificado com ácido nítrico 0,2% v/v. Para aplicação do método, as amostras foram diluídas com solução de Triton X-100 0,1% v/v e  $\text{HNO}_3$  0,2% v/v.

### 3.7.3 Método de referência

Para otimização instrumental do GF AAS foi usado a mistura do *mix de amostras* de tinturas fitoterápicas digerida junto ao *mix de amostras* de plantas medicinais digerida e soluções padrão mono-elementares nas concentrações 1,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Cd, de 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Cr e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Pb no meio de ácido nítrico 2% v/v.

### 3.7.4 Otimização instrumental GF AAS

Após verificar a necessidade do uso de modificador químico, para otimização das temperaturas de pirólise e de atomização, construiu-se curvas de temperatura de pirólise e temperatura de atomização para os analitos para o método de referência (digestão ácida) e para análise direta.

Durante a otimização da temperatura de pirólise fixou-se a temperatura de atomização em 2200 °C para determinação de Cr, em 2100°C para determinação de Pb e em 1000 °C (com modificador químico Pd) e 900 °C (sem modificador químico), para Cd, sendo os sinais de absorvância em altura do pico e em área integrada coletados.

Para otimização da temperatura de atomização, foram fixadas as temperaturas de pirólise otimizadas anteriormente. Os incrementos de 100 °C foram usados para todas as otimizações e a faixa estudada para todos os analitos é mostrada da **Tabela 7**.



**Tabela 7** - Otimização instrumental da temperatura de pirólise e da temperatura de atomização para a determinação de Cd, Cr e Pb por GF AAS em *mix de amostras* digerida e em *mix de amostras* diluída

Parâmetro	Cádmio	Cromo	Chumbo
Temperatura de Pirólise mínima (°C)	300	900	300
Temperatura de Pirólise máxima (°C)	800	1700	1100
Temperatura de Atomização mínima (°C)	900	1800	1200
Temperatura de Atomização máxima (°C)	1600	2700	2200

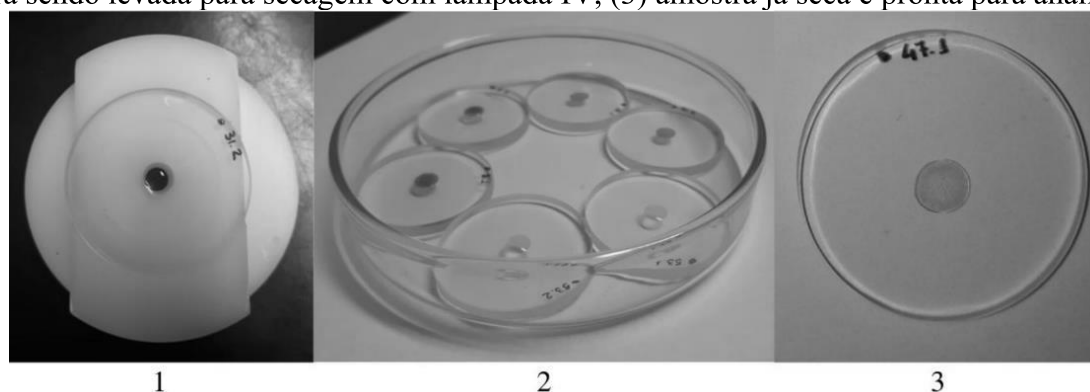
Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

### 3.8 ANÁLISE POR FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR REFLEXÃO TOTAL

As medidas por Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) foram feitas utilizando o equipamento S2 PICOFOX™ (Bruker Nano GmbH, Karlsruhe, Alemanha), equipado com um tubo de molibdênio. Os espectros foram obtidos através do software SPECTRA 7.5.3 (Bruker, Karlsruhe, Alemanha) e os seguintes elementos foram monitorados: Ca, Mn, Fe, Cu, Zn. As análises foram realizadas aleatoriamente em duplicata.

Para o preparo das amostras, os seguintes passos foram realizados: 180 µL de amostra foram misturados com 20 µL do padrão interno (solução padrão de gálio 10 mg L<sup>-1</sup>) em suporte específico e levados a câmara com lâmpada infravermelho até secar o solvente. As etapas são mostradas na **Figura 7**.

**Figura 7** - Etapas para análise por TXRF: (1) amostra misturada ao padrão interno, (2) amostra sendo levada para secagem com lâmpada IV, (3) amostra já seca e pronta para análise



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

### 3.9 FIGURAS DE MÉRITO

O desempenho analítico do método proposto para análise direta, bem como aquele usado como referência, foi estudado avaliando-se os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, sensibilidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), exatidão e precisão. Para a avaliação de cada método, amostras testes foram analisadas em duplicata.

A linearidade das curvas analíticas foi estudada através da análise de variância (ANOVA), após verificar a normalidade dos resíduos e a homocedasticidade dos dados através dos testes de Shapiro–Wilk e de Cochran, respectivamente. Para avaliar a seletividade, foram aplicados os testes  $F$  (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e o teste  $t$  (*Student*) não pareado com variância agrupada para comparação de médias entre as curvas externas (em meio alcoólico para análise direta e em meio ácido para o método de referência) e de adição de padrão (AOAC, 2002).

Em GF AAS utiliza-se o conceito de massa característica ( $m_0$ ), expressa em picogramas, para verificar a sensibilidade analítica. Para calcular, é realizada a multiplicação dos termos  $C$ , concentração do padrão,  $V$ , volume do padrão, e a constante 0,0044 dividido pela absorbância do padrão, termo  $A$  (BEATY & KERBER, 1993), conforme mostra a equação 1.

$$m_0 = \frac{C \times V \times 0,0044}{A} \quad (\text{Equação 1})$$

A exatidão foi avaliada por meio de testes de adição/recuperação de analito, visto que não existe amostra de referência certificada para metais em tintura fitoterápica. A recuperação dos analitos foi obtida pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas dos mesmos. (THOMPSON *et al.*, 1999). Calcula-se a quantidade percentual recuperada usando a Equação 2, onde  $C_1$  é a concentração determinada na amostra adicionada,  $C_2$  concentração determinada na amostra não adicionada e  $C_3$  concentração adicionada.

$$\text{Recuperação(\%)} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

As concentrações adicionadas foram de 1,0 e 2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o Cr; 0,3 e 0,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o Cd e 2,5 e 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o Pb.

A precisão do método foi avaliada em termos de repetitividade, calculando-se os desvios padrões relativos (RSD) para um conjunto de 10 leituras consecutivas do *mix de amostras*. Para

os cálculos do LD e LQ (equações 2 e 3, respectivamente), foram feitas 10 leituras dos brancos de digestão e da análise direta. Com base nessas leituras os desvios padrões (SD) obtidos foram multiplicados por 3 e 10, respectivamente, e dividido pelos coeficientes angulares ( $\alpha$ ) das curvas analíticas correspondentes para cada um dos meios (AOAC, 2002).

$$LD_{Inst} = \frac{3,3 \times SD}{\alpha} \quad (\text{Equação 3})$$

$$LQ_{Inst} = \frac{10 \times SD}{\alpha} \quad (\text{Equação 4})$$

Para calcular os valores de LD e LQ de cada método, multiplicou-se os valores dos limites instrumentais pelos fatores de diluição das amostras, ou seja, considerou-se as etapas de preparo de amostra, que levam a uma diluição dos analitos na solução de leitura.

$$LD_{Met} \text{ ou } LQ_{Met} = LD_{Inst} \text{ ou } LQ_{Inst} \times \text{fator de diluição} \quad (\text{Equação 5})$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS - pH e DENSIDADE APARENTE

As **Tabelas 8, 9 e 10** mostram os valores de pH e densidade das tinturas doadas, das tinturas preparadas a partir de plantas medicinais e das tinturas comerciais, respectivamente. A partir da análise destas tabelas, constata-se que os valores de pH variam entre 4,67 e 5,91; classificando as tinturas como fracamente ácidas. A densidade variou de 0,80 a 0,95 g/cm<sup>3</sup>.

Os valores encontrados mostraram-se de acordo com os de Alvarenga *et al.* (2009), que avaliaram tinturas comerciais de Guaco, encontrando os valores de pH entre 5,77 e 6,34. Este resultado representa um dado importante por ser um fator de influência na estabilidade de formulações à base de planta (MACIEL *et al.*, 2006). A faixa de pH encontrada pode ser influenciada pela acidez do etanol usado, que foi de 5,57, e também pelos ácidos orgânicos presentes nas plantas. As amostras preparadas obtiveram valores um pouco diferentes daqueles obtidos nas amostras comerciais, provavelmente devido a presença de outros reagentes químicos, tais como estabilizantes.

A densidade do etanol a 96% (v/v) varia de 0,803 a 0,808 g/cm<sup>3</sup>; como a preparação da tintura utiliza-se álcool na graduação 70%, a maior porcentagem de água (densidade 0,997 g/cm<sup>3</sup> a 25°C) acarreta o aumento no valor da densidade, sendo assim a faixa encontrada se mostra coerente. Os valores obtidos estão de acordo também com dados da literatura, como em Alvarenga *et al.* (2009) que encontrou um valor médio de 0,92 g/cm<sup>3</sup> para amostras comerciais de tinturas de guaco e Nunes *et al.* (2009) que determinou a densidade de 0,89 g/cm<sup>3</sup> em tinturas de Calêndula.

**Tabela 8** - Valor de pH e densidade para as amostras de tinturas fitoterápicas doadas pela FF-UFJF

Código	pH	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )
AR-1	4,71	0,87
C-1	5,75	0,85
MC-1	4,96	0,86
T-1	5,08	0,86
Z-1	5,58	0,82

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

**Tabela 9** - Valor de pH e densidade para as amostras de tinturas fitoterápicas preparadas a partir de plantas medicinais

<b>Código</b>	<b>pH</b>	<b>Densidade (g/cm<sup>3</sup>)</b>
1-A	5,33 ± 0,12	0,86± 0,01
1-CS	5,19 ± 0,16	0,85± 0,01
2-CS	5,27 ± 0,01	0,86± 0,01
1-ES	5,66 ± 0,04	0,87± 0,02
2-ES	5,66 ± 0,39	0,86± 0,01
1-G	5,87 ± 0,12	0,86± 0,01
2-G	5,91 ± 0,00	0,85± 0,01
BR*	5,57 ± 0,33	0,87± 0,02

\* Branco do método

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

**Tabela 10** - Valor de pH e densidade para as amostras de tinturas fitoterápicas comerciais

<b>Código</b>	<b>pH</b>	<b>Densidade (g/cm<sup>3</sup>)</b>
A-1	5,01	0,90
A-2	5,00	0,85
A-3	5,30	0,94
A-4	5,15	0,95
CS-1	4,67	0,88
CS-2	5,03	0,88
CS-3	5,19	0,86
CS-4	5,64	0,85
ES-1	5,51	0,89
ES-2	4,82	0,84
ES-3	5,22	0,90
ES-4	5,75	0,86
ES-5	5,31	0,88
G-1	5,34	0,87
G-2	5,00	0,93
G-3	5,26	0,80

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

## 4.2 ANÁLISE DAS PLANTAS MEDICINAIS E DAS TINTURAS FITOTERÁPICAS PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA

O processo de digestão ácida assistida por radiação micro-ondas das amostras foi empregado como método de referência para o método analítico proposto, que é a análise direta das amostras. A digestão de amostras é amplamente usada, pois é capaz de corrigir efeitos indesejáveis sobre desempenho instrumental de técnicas espectrométricas baseadas na absorção ou emissão atômica. A digestão converte compostos orgânicos a CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e óxidos de nitrogênio disponibilizando os elementos na forma inorgânica para determinação (KRUG & ROCHA, 2016).

Elementos traços são usualmente difíceis de detectar devido à baixa concentração e também ao fator de diluição elevado dos processos de preparo de amostra, que deixam os teores dos analitos abaixo do limite de detecção até mesmo de técnicas como a GF AAS. Com o método de digestão ácida proposto, foi possível diminuir a diluição final para apenas 10 vezes, pois com a evaporação do etanol ocorre uma pré-concentração da amostra e a possibilidade do uso de uma maior massa de amostra a ser digerida, pois sem a presença do etanol não foi mais observada a projeção da amostra na etapa de pré-digestão.

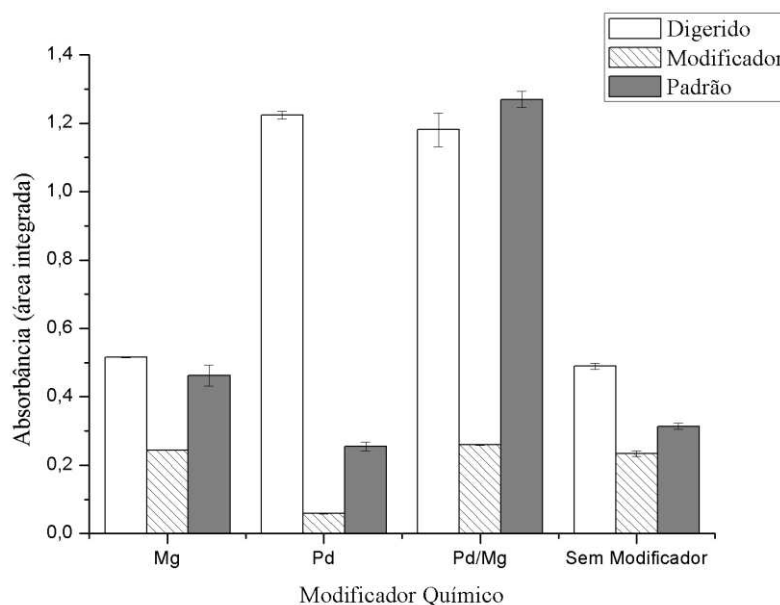
Para as plantas medicinais não ocorreu nenhum contratempo, e foi viável apenas seguir o programa de aquecimento sugerido pelo fabricante do equipamento, com a digestão completa com uso apenas de ácido nítrico concentrado. A solução digerida ficou límpida tanto para as amostras de plantas quanto para amostras de tintura fitoterápica indicando que a digestão foi completa em ambas as matrizes. Sendo então a digestão completa, sabe-se que há apenas um meio ácido resultante, com isso a otimização instrumental do GF AAS foi realizada com *mix* de amostras de plantas digeridas misturado ao *mix* de tinturas fitoterápicas digeridas.

### 4.2.1 Modificador Químico

Em análises por GF AAS, o modificador químico convencional é introduzido no atomizador junto da amostra para diminuir o efeito de matriz através de reação química. Sua função normalmente é estabilizar termicamente o analito ou tornar a matriz mais volátil (VOLYNSKII, 2003). Para o estudo do uso de modificador químico para determinação de cromo, os dados são mostrados na **Figura 8**, sendo escolhido trabalhar sem o uso de modificador. A condição não teve o maior sinal analítico, mas obteve um perfil do sinal de absorvância mais satisfatório, como mostra na **Figura 9** a comparação com o uso de Pd como

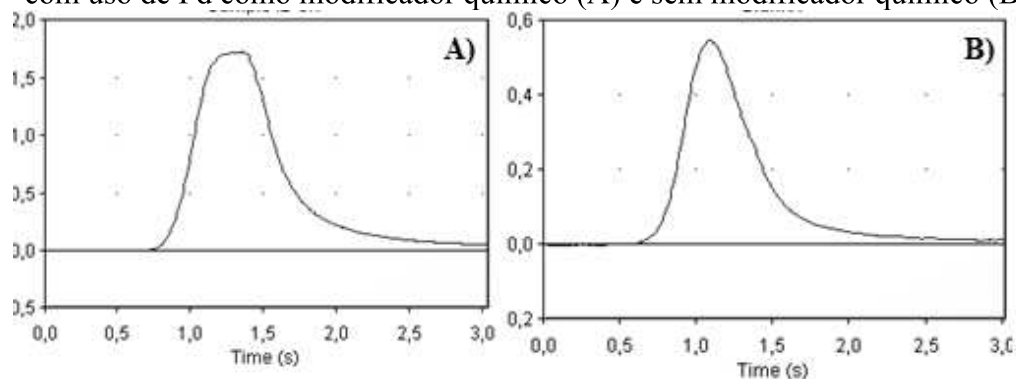
modificador químico. Pode-se notar que o pico correspondente ao sinal de absorvância é também menos ruidoso e mais simétrico, o que corrobora com a escolha de trabalhar sem modificador químico.

**Figura 8** - Efeito do uso de modificador químico nos sinais de absorvância de Cr para o digerido (solução mistura composta de *mix* de amostras de plantas digerido e *mix* de amostras de tinturas fitoterápicas digerido) e padrão ácido  $5 \mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

**Figura 9** - Perfil dos sinais de absorvância de Cr para o digerido (solução mistura composta de *mix* de amostras de plantas digerido e *mix* de amostras de tinturas fitoterápicas digerido) com uso de Pd como modificador químico (A) e sem modificador químico (B)



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

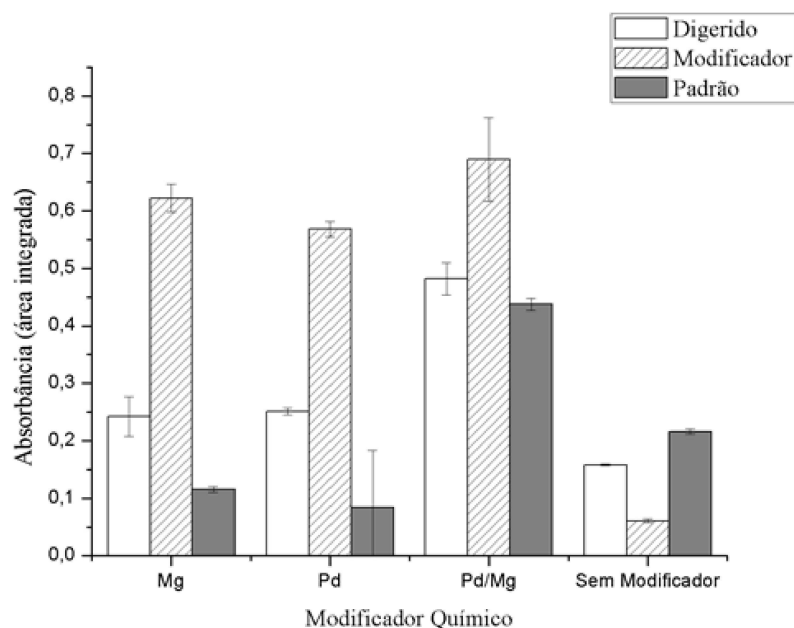
O cromo geralmente não requer modificador químico, mesmo usando de altas temperaturas de pirólise, pois não há indícios de formação de compostos voláteis. Além disso,

dispensar o uso de modificador químico diminui uma etapa no processo analítico, deixando o método mais simples e exigindo menos manuseio das amostras, o que evita o risco de contaminação; estratégia essa adotada por Paula *et al.* (2013), ao trabalharem com formulações farmacêuticas propondo um método de extração em ultrassom.

Para determinação de cádmio, os dados são mostrados na **Figura 10**. Quando avaliado somente o modificador químico (sem presença de amostra ou padrão analítico), o sinal analítico produzido é maior do que aqueles encontrados para a amostra digerida e para o padrão ácido. A situação ocorre com o uso de todos os modificadores químicos estudados, isso poderia acarretar alto sinal de fundo nas análises das amostras.

Então, foi escolhido prosseguir nas otimizações das temperaturas de pirólise e atomização sem o uso de modificador químico, que foi também a condição que apresentou desvio padrão menor comparado aos que foram obtidos com uso de modificador químico.

**Figura 10** - Efeito do uso de modificador químico nos sinais de absorvância de Cd para o digerido (solução mistura composta de *mix* de amostras de plantas digerido e *mix* de amostras de tinturas fitoterápicas digerido) e padrão ácido  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$



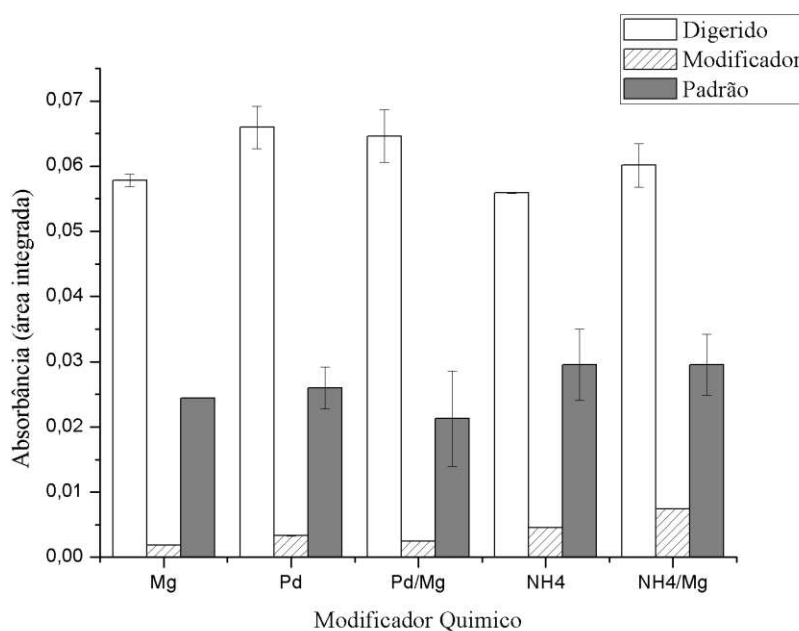
Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Na verificação dos sinais obtidos para Pb (**Figura 11**) mostrou-se necessário a avaliação de outros modificadores químicos, pois para Mg e Pd, bem como a combinação destes, não foi possível obter um perfil adequado de sinal analítico. Utilizando-se então dihidrogenofosfato de amônio combinado a Mg foi possível obter um sinal de absorvância com pico simétrico e



estreito, adequado para as demais otimizações instrumentais e para obtenção das figuras de méritos que foram realizadas posteriormente. A combinação dos modificadores é comum para analitos voláteis como Pb, e é usado em amostras complexas, como sangue (RODOLFO *et al.*, 2005).

**Figura 11** - Efeito do uso de modificador químico nos sinais de absorvância de Pb para o digerido (solução mistura composta de *mix* de amostras de plantas digerido e *mix* de amostras de tinturas fitoterápicas digerido) e para padrão ácido  $10 \mu\text{g L}^{-1}$



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

#### 4.2.2 Curvas de Temperatura de pirólise e Temperatura de atomização

Após a verificação se haveria necessidade do uso de modificador químico, foram construídas curvas para determinar a temperatura de pirólise e a temperatura de atomização mais adequadas para padrão analítico em meio ácido e para mistura do *mix* de amostras de plantas digerido e *mix* de amostras de tinturas fitoterápicas digerido.

No programa de aquecimento do GF AAS, a pirólise é a segunda etapa do processo, nesse momento ocorre a eliminação dos componentes majoritários da matriz, utilizando a maior temperatura possível sem perdas do analito. Nessa etapa a matéria orgânica presente na matriz da amostra é calcinada ou convertida em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CO}_2$ . De modo geral, para determinar a melhor

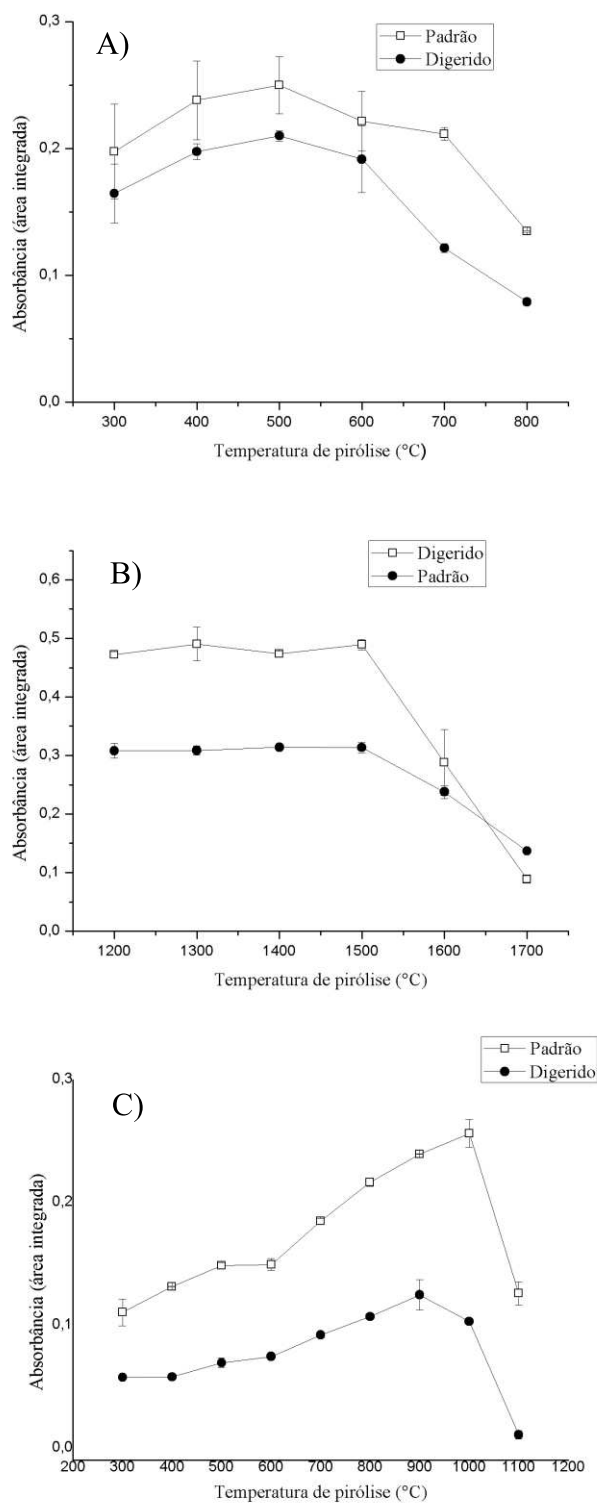
temperatura de pirólise observa-se no gráfico onde há queda do sinal analítico e se escolhe a temperatura anterior a queda (BEATY & KERBER, 1993).

Assim, a escolha da maior temperatura de pirólise possível é adequada para que ocorra uma degradação mais eficiente da matéria orgânica presente. As curvas são mostradas na **Figura 12**, onde vê-se que a queda no sinal de absorbância ocorre na mesma temperatura, independente da presença da amostra, para os três analitos. Então, foram selecionadas as temperaturas de pirólise de 500 °C para Cd, 1500 °C para Cr e 800 °C para Pb.

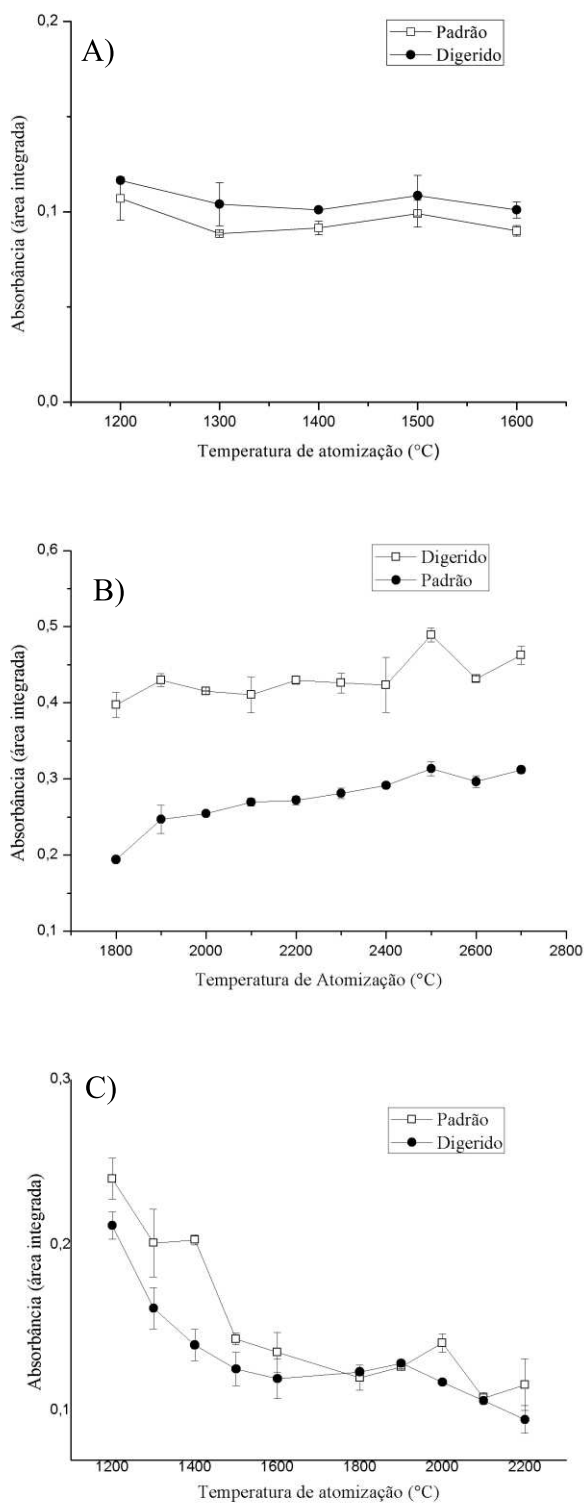
Após a pirólise, a temperatura é aumentada rapidamente para que ocorra a atomização do analito. Ocorre a interrupção do fluxo de gás inerte para evitar a dispersão da nuvem atômica, maximizando a sensibilidade. A escolha de uma temperatura mais amena com um bom sinal analítico favorece a durabilidade do forno de grafite, permitindo mais queimas e reduzindo o custo do método. Para a temperatura de atomização ótima a escolha foi baseada não somente no valor do sinal analítico, mas principalmente no perfil do pico de atomização. Com isso, as temperaturas de atomização de 1500 °C para Cd, 2500 °C para o Cr e 2000 °C para Pb foram selecionadas. As curvas podem ser observadas na **Figura 13**.

As curvas de otimização para temperatura de pirólise e atomização possuíram comportamento parecidos. Nas três otimizações obteve-se perfis de absorbância adequados tanto para o padrão em meio ácido nítrico 2% v/v quanto para o *mix* de digeridos, como apresentado na **Figura 14**. A semelhança entre padrão e amostra indica que a calibração externa é adequada para o método.

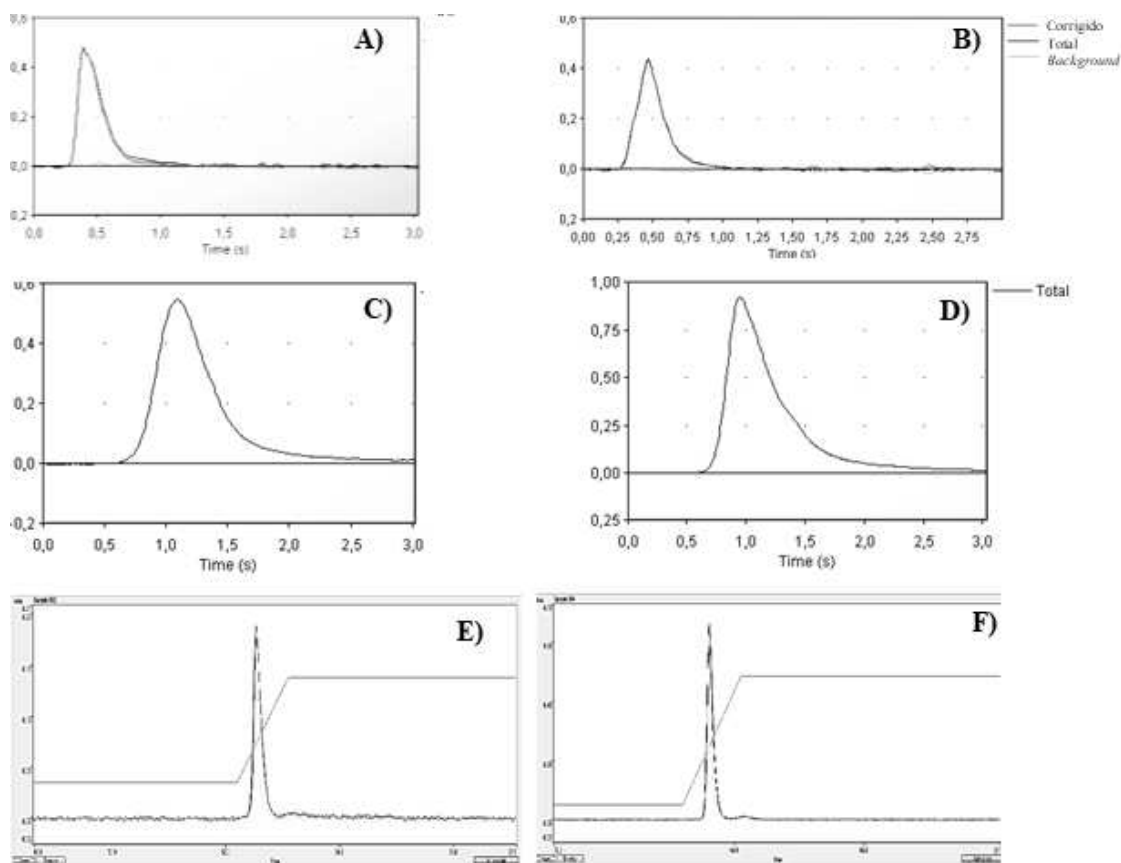
**Figura 12** - Curvas de temperatura de pirólise para Cd (A), Cr (B) e Pb (C) para o digerido (solução mistura composta de *mix* de amostras de plantas digerido e *mix* de amostras de tinturas fitoterápicas digerido) e para padrão ácido (2% v/v) nas concentrações de  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$  para Cd,  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  para Cr e  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  para Pb modificador químico  $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4/\text{Mg}$ ). A temperatura de atomização foi de  $900 \text{ }^\circ\text{C}$  para Cd,  $2500 \text{ }^\circ\text{C}$  para Cr e  $2100 \text{ }^\circ\text{C}$  para Pb.



**Figura 13** - Curvas de temperatura de atomização para Cd (A), Cr (B) e Pb (C). para o digerido (solução mistura composta de *mix* de amostras de plantas digerido e *mix* de amostras de tinturas fitoterápicas digerido) e para padrão em meio ácido nítrico (2% v/v) nas concentrações de  $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$  para Cd,  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  para Cr e  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  para Pb. Temperaturas de pirólise otimizadas,  $500 \text{ }^\circ\text{C}$  para Cd,  $1500 \text{ }^\circ\text{C}$  para Cr e  $800 \text{ }^\circ\text{C}$  para Pb (modificador químico  $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4/\text{Mg}$ )



**Figura 14** - Perfil dos sinais de absorvância para o digerido (solução mistura composta de *mix* de amostras de plantas digerido e *mix* de amostras de tinturas fitoterápicas digerido) para Cd (A), Cr (C) e Pb (E) e padrão ácido 1,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cd (B), padrão ácido 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cr (D) e padrão ácido 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Pb (F) nas condições instrumentais otimizadas.



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

O programa de aquecimento do GF AAS possui, anterior a pirólise, a secagem, onde ocorre a eliminação dos solventes e posterior a atomização, a limpeza. O resumo das condições otimizadas das temperaturas de pirólise e atomização para Cd, Cr e Pb são mostradas na **Tabela 11**.

**Tabela 11** - Programa de aquecimento do GF AAS para a determinação de Cr, Cd e Pb em tintura fitoterápica e em plantas medicinais após digestão ácida

Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tempo (s)	Rampa ( $^{\circ}\text{C s}^{-1}$ )	Vazão do Ar ( $\text{L min}^{-1}$ )
100	30	10	0,2
500 <sup>a</sup> 1500 <sup>b</sup> 900 <sup>c</sup>	20	150	0,2
1500 <sup>a</sup> 2500 <sup>b</sup> 2000 <sup>c</sup>	3	0	0
2500	3	0	0,2

<sup>a</sup> determinação de Cd <sup>b</sup>determinação de Cr <sup>c</sup> determinação de Pb

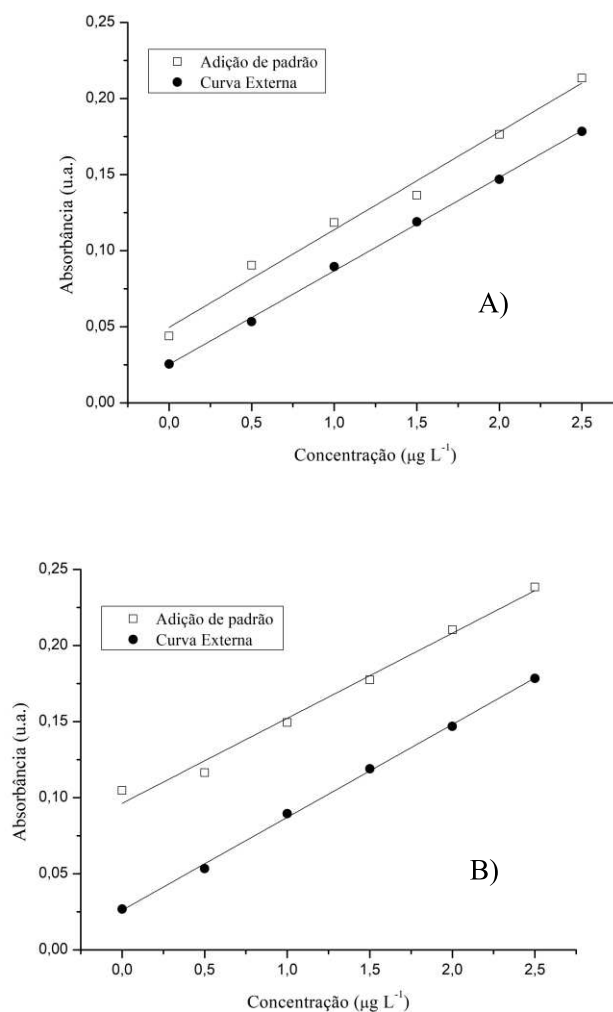
Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

### 4.2.3 Figuras de mérito

Escolhidas as condições ótimas dos programas de aquecimento do GF AAS, foram obtidas algumas figuras de mérito para determinação de Cd, Cr e Pb nas amostras *mix* de plantas medicinais e nas amostras *mix* de tinturas fitoterápicas após digestão assistida por radiação micro-ondas.

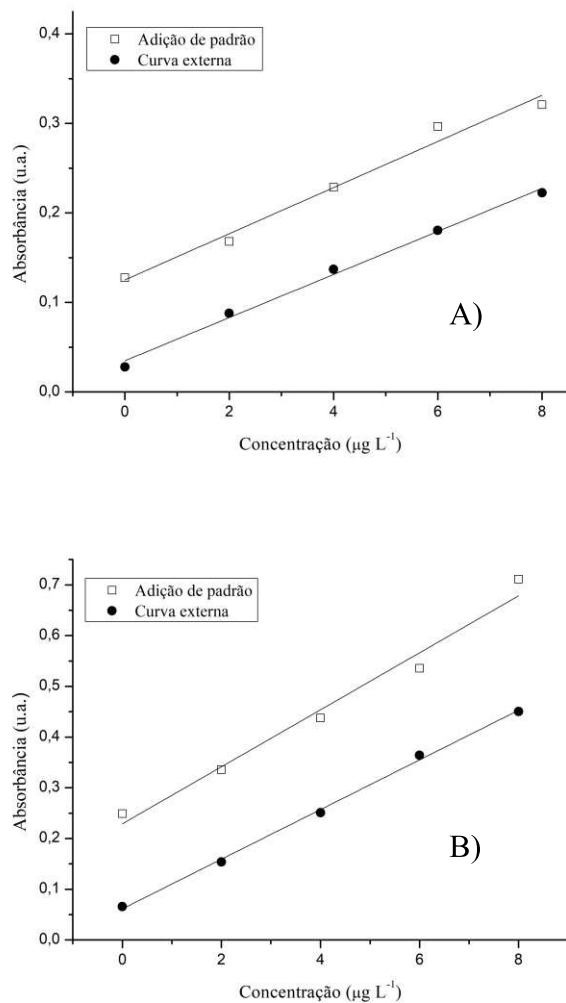
A seletividade foi avaliada para ambos tipos de amostras e a comparação das curvas visando a verificação de efeito de matriz para análise das plantas e para tinturas são mostradas na **Figura 15** para Cd, na **Figura 16** para Cr e na **Figura 17** para o Pb.

**Figura 15** - Estudo do efeito de matriz para determinação de Cd em plantas (A) e em tintura fitoterápica (B) após digestão assistida por radiação micro-ondas



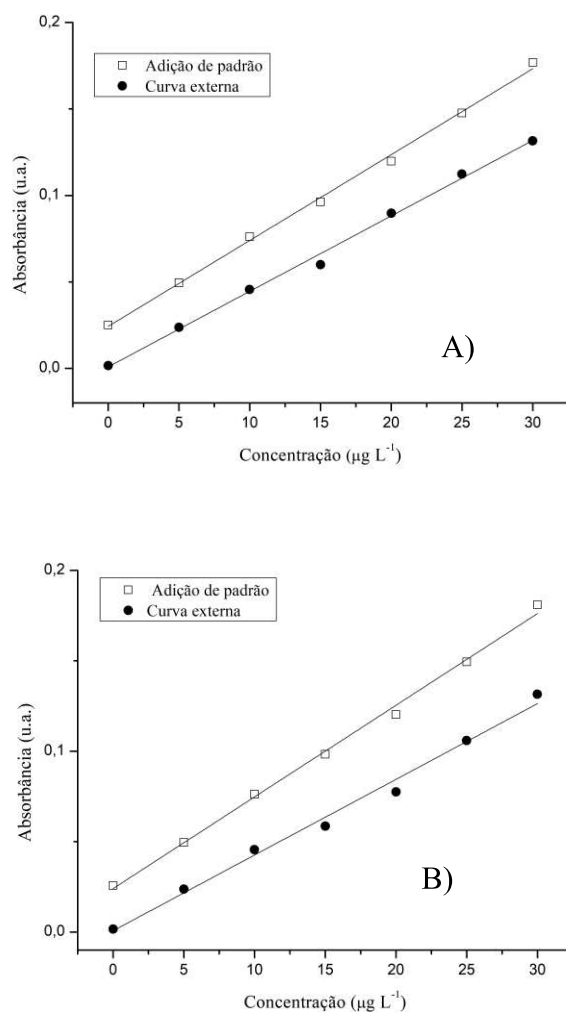
Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

**Figura 16.** Estudo do efeito de matriz para determinação de Cr em plantas (A) e em tintura fitoterápica (B) após digestão assistida por radiação micro-ondas



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

**Figura 17.** Estudo do efeito de matriz para determinação de Pb em plantas (A) e em tintura fitoterápica (B) após digestão assistida por radiação micro-ondas



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Na **Tabela 12**, são mostradas as equações das curvas analíticas obtidas para adição de padrão, contendo a matriz digerida e calibração externa, em meio ácido junto aos respectivos coeficientes de determinação. Comparando os valores de concentração obtidos através da curva externa e da curva de adição de padrão, encontra-se  $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$ , definindo que a matriz não afeta significativamente a determinação de Cd, Cr e Pb nas plantas, nem nas tinturas fitoterápicas. Com isso, as curvas externas podem ser usadas para a calibração analítica nas determinações de Cd, Cr e Pb, seja nas amostras de plantas como nas de tinturas fitoterápicas, após digestão ácida assistida por radiação micro-ondas.



**Tabela 12** - Comparações das concentrações de Cd, Cr e Pb no *mix* de amostras de plantas digerido e no *mix* de amostras de tinturas fitoterápicas digerido obtidas por calibração externa e por adição de padrão

Analito	Faixa de Calibração	Matriz	Curva Analítica	Equação	R <sup>2</sup>	Concentração (µg Kg <sup>-1</sup> )	F <sub>calc</sub> *	t <sub>calc</sub> **
Cd	0 a 2,5 µg L <sup>-1</sup>	Plantas	Curva Externa	$y = 0,0579x + 0,0284$	0,9929	(1,301±0,128)	1,27	3,842
			Adição de padrão	$y = 0,0547x + 0,0982$	0,9873	(1,727±0,144)		
		Tintura	Curva Externa	$y = 0,0605x + 0,0046$	0,9913	(0,699± 0,07)	2,92	2,464
			Adição de padrão	$y = 0,0635x + 0,0518$	0,9874	(0,809± 0,04)		
Cr	0 a 8 µg L <sup>-1</sup>	Plantas	Curva Externa	$y = 0,0241x + 0,0349$	0,9943	(4,781±0,148)	2,03	0,718
			Adição de padrão	$y = 0,0258x + 0,1252$	0,9827	(4,856±0,104)		
		Tintura	Curva Externa	$y = 0,0499x + 0,0588$	0,9982	(3,803±0,145)	1,06	4,142
			Adição de padrão	$y = 0,0562x + 0,2289$	0,9791	(4,286±0,104)		
Pb	0 a 30 µg L <sup>-1</sup>	Plantas	Curva Externa	$y = 0,0044x + 0,0009$	0,9961	(4,640± 2,26)	3,54	3,076
			Adição de padrão	$y = 0,005x + 0,0243$	0,9976	(4,865 ± 0,12)		
		Tintura	Curva Externa	$y=0,0042x + 0,0007$	0,9908	(5,972± 0,43)	2,14	2,914
			Adição de padrão	$y = 0,005x + 0,0241$	0,9961	(5,095 ± 0,30)		

\*F<sub>tab</sub>= 19 \*\*t<sub>tab</sub>= 4,303

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Em relação dados estatísticos das curvas externas, os resultados obtidos pela análise de variância são mostrados na **Tabela 13**. Como  $F_{faj-calc} < F_{faj-tab}$ , pode-se afirmar que não há falta de ajuste do modelo; enquanto o  $F_{reg-calc} > 10x F_{reg-tab}$  mostra a alta significância do modelo. Aceita-se que os valores estão distribuídos de acordo com uma distribuição normal, de acordo com  $W_{calc} > W_{tab}$  e o valor de  $C_{calc} < C_{tab}$ , mostra que as variâncias são homogêneas conforme o aumento da concentração. As curvas analíticas foram feitas em duplicatas autênticas.

**Tabela 13** - Análise da regressão linear do modelo de calibração externa utilizada para determinação de Cd, Cr e Pb por GF AAS em plantas e tinturas fitoterápicas após digestão assistida por radiação micro-ondas

Teste	Tabelado	Cádmio	Cromo	Chumbo
Shapiro-Wilk	0,859	0,975	0,937	0,965
Cochran	0,7808	0,3655	0,4580	0,4862
Falta de Ajuste	4,53	0,38	3,06	0,87
Regressão	1,04	526	5752	1069

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

As figuras de mérito obtidas para os métodos estabelecidos são mostradas na **Tabela 14**. Os valores obtidos para a precisão e exatidão, de acordo com a faixa de aceitabilidade para concentrações no nível de 10 ppb, que é RSD de 21% e recuperação média entre 60 e 115% (AOAC, 2012). Enquanto a exatidão mede a concordância entre um resultado e o valor aceito, a precisão descreve a concordância entre os vários resultados obtidos da mesma forma (SKOOG *et al.*, 2007).

Os valores de LD e LQ instrumentais estão concordantes com a literatura, estando abaixo de 0,30 e 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  encontrados por Paula *et al.* (2013) e 11,80 e 17,60  $\mu\text{g L}^{-1}$  por Garcia *et al.* (1999), para determinações de Cr por GF AAS. Os valores reportados de LD<sub>met</sub> por Kalny *et al.* (2007) foi 50  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  (em amostras de ervas polonesas e suas infusões) e LD<sub>inst</sub> para Lobo *et al.* (2011) foi de 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  (em amostras de biodiesel).

Para o método de referência, os valores quanto ao LD variaram de 0,06 a 1,61  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e os valores de LQ variaram de 0,20 a 5,35  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , como limites adequados para análise de amostras com baixa concentração de contaminantes inorgânicas, como os produtos à base de plantas medicinais.

**Tabela 14** - Figuras de mérito obtidas para determinação de Cd, Cr e Pb por GF AAS em plantas medicinais e tinturas fitoterápicas após digestão assistida por radiação micro-ondas

	Plantas			Tinturas		
	<i>Cd</i>	<i>Cr</i>	<i>Pb</i>	<i>Cd</i>	<i>Cr</i>	<i>Pb</i>
Precisão (%)	2,48	1,98	2,80	3,16	1,69	4,70
Recuperação nível inferior (%)	84	99	117	99	96	107
Recuperação nível superior (%)	106	86	110	120	101	115
LD instrumental ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,05	0,04	0,08	0,01	0,03	0,16
LQ instrumental ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,19	0,13	0,28	0,02	0,10	0,53
LD método ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	6,82	4,61	6,86	0,06	0,28	1,61
LQ método ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	22,75	15,41	22,86	0,20	0,93	5,35
$m_0$ (pg)	0,96	1,42	20,60	0,96	1,42	20,60

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

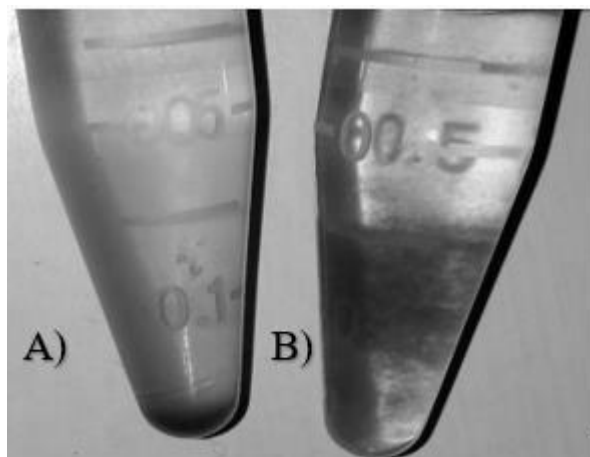
### 4.3 ANÁLISE DIRETA DAS TINTURAS FITOTERÁPICAS

#### 4.3.1 Testes preliminares

Testando a introdução das amostras diretamente no tubo de grafite, verificou-se interferências físicas durante o programa de aquecimento, que levaram a resultados com baixa repetibilidade. Ocorria a formação de uma película na entrada no tubo de grafite, e a maior parte da amostra não era injetada. Considerando-se essa evidência e o teor alcoólico elevado das amostras (70% v/v), optou-se pelo emprego das amostras diluídas em meio aquoso. Foram testados dois meios diluentes, Triton X-100 0,1% v/v acidificada com  $\text{HNO}_3$  0,2% v/v e  $\text{HNO}_3$  2% v/v.

Como mostrado na **Figura 18**, a solução com presença Triton X-100 apresentou-se em fase única, sendo também mais estável. O uso apenas de ácido nítrico separava-se em duas fases após repouso. De fato, a presença do surfactante Tritox X-100 aumenta a homogeneidade da solução por meio de emulsificação de pequenas partículas, sendo capaz de conservar e estabilizar amostras permitindo o armazenamento por períodos maiores de tempo tornando-as adequada para aplicação do método proposto (BEZERRA & FERREIRA, 2006).

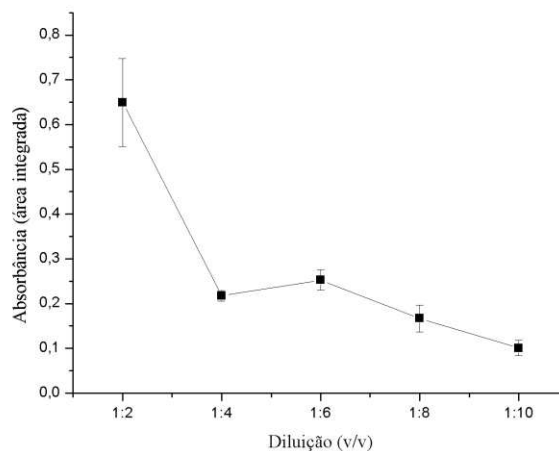
**Figura 18** -Soluções para diluição das tinturas fitoterápicas (A) Triton X-100 0,1% v/v e HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v e (B) ácido nítrico 2% v/v



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Após escolha do diluente, foram testadas 5 diferentes diluições, como mostra a **Figura 19**. Na diluição 1:10 v/v os sinais de absorvância obtidos apresentaram um perfil adequado, sendo mais estreitos do que aqueles das amostras não diluídas. As interferências físicas apresentadas antes da diluição também foram corrigidas, facilitando a injeção manual da amostra no tubo de grafite.

**Figura 19** - Efeito da diluição das tinturas fitoterápicas no sinal de absorvância para análise direta para determinação de cromo por GF AAS



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Além da melhora no perfil do sinal de absorvância, com uso da diluição 1:10 v/v não foi observada a formação de resíduos carbonáceos no tubo de grafite, o que aumenta o tempo

de vida útil do tubo e minimiza efeitos de memória. A diluição da amostra em um solvente apropriado foi baseada nos resultados de outros trabalhos, nos quais amostras de saliva puderam ser analisadas após a obtenção de uma suspensão de amostra. A diluição de amostras é um recurso utilizado em diversas amostras líquidas permitindo a calibração externa para quantificar metais como Cd, Cr e Pb por análise direta, sendo o suficiente para minimizar possíveis efeitos da matriz (OLMEDO *et al.*, 2010).

Com a escolha adequada do diluente e da diluição das amostras, alguns parâmetros do GF AAS foram avaliados. Para secagem, primeira etapa do programa de aquecimento, geralmente se usa como referência a temperatura de ebulição do solvente. Como o solvente nas tinturas é uma mistura hidroalcoólica, foram escolhidas as temperaturas de ebulição de 100°C para água e 70°C para o etanol. Contudo, foi observado um aumento de sinal analítico 10 vezes maior na determinação de Cr para a condição de 90/130°C. Com a elevação de temperatura de forma gradual, há menos riscos de perda de amostra. As temperaturas mais altas que as temperaturas de ebulição dos solventes podem estar relacionadas à presença de HNO<sub>3</sub>, que, por exemplo, forma um azeótropo com a água, com temperatura de ebulição de aproximadamente 120°C.

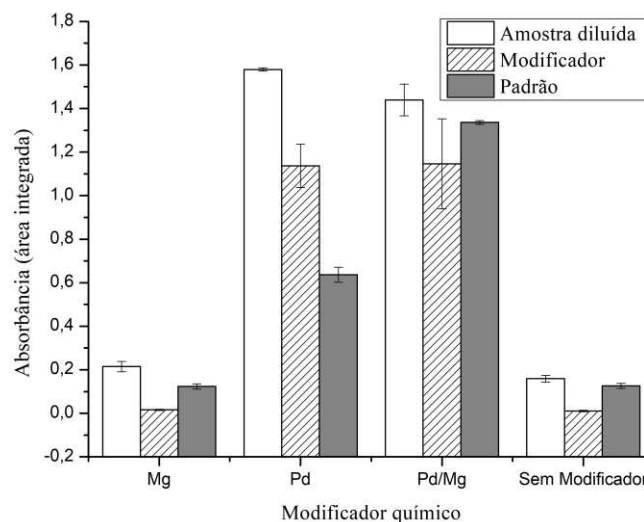
O último teste preliminar avaliado usando o Cr como analito teste foi o tempo de pirólise. Em análise direta, por não haver preparo de amostra, o aumento do tempo de pirólise pode ser interessante, pois há uma maior quantidade de matriz para ser eliminada. O tempo de 20s sugerido pelo manual do equipamento foi mantido. No tempo de 30s, é possível que haja perda de analito por volatilização, pois houve queda do sinal de absorvância.

#### **4.3.2 Modificador químico**

Assim como no método de referência, a utilização de modificador químico para determinação de cromo pode ser dispensada. Esse resultado corrobora com outros trabalhos, em que outras amostras complexas, como microemulsões de gasolina e refrigerantes puderam ser analisadas sem o uso do modificador químico para as determinações de Cr (CUNHA *et al.*, 2012; FRANCISCO *et al.*, 2015). Além disso, o cromo não é volátil, formando carbeto estáveis até 1200 °C com o carbono, proveniente do forno de grafite (THOMAIDIS & PIPERAKI, 2000). Logo, mesmo o uso de modificadores sendo uma das condições *STPF*, considerou-se viável a sua não utilização com base nas evidências experimentais obtidas para as amostras

estudadas, como é mostrado na **Figura 20**, onde o uso apenas de modificador químico, principalmente para o Pd, gera um alto sinal analítico.

**Figura 20** - Efeito do uso de modificador químico nos sinais de absorvância de Cr para tinturas fitoterápicas diluídas em solução de Triton X-100 0,1% v/v acidificada com HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v e para padrão alcoólico de 5 µg L<sup>-1</sup>

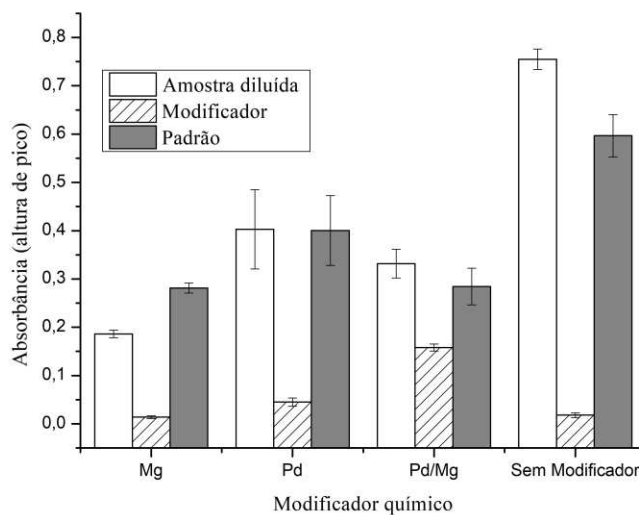


Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Já para a determinação de cádmio sobressaíram-se duas condições, sem o uso de modificador e o uso do Pd como modificador. Avaliou-se então as duas condições de trabalho, sem modificador químico com absorvância medida em altura de sinal de absorvância e o uso do modificador químico Pd com absorvância medida em área integrada.

A área integrada é recomendada pois pode eliminar possíveis erros na medida causados por efeitos cinéticos durante a atomização. Quando em situações que a atomização é rápida e os picos dos sinais de absorvância formado são estreitos e simétricos, trabalhar em altura resulta em um ganho de sensibilidade, o qual foi significativo neste caso. O gráfico com os dados de absorvância em altura do pico é mostrado na **Figura 21**. No que tange a determinação de Cd, o uso do sinal em altura do sinal vem sendo reportado na literatura desde a década 70, para análise direta de urina e em trabalhos recentes, para a análise direta de vinagre (GARDINER *et al.*, 1979; JUNIOR *et al.*, 2014).

**Figura 21** - Efeito do uso de modificador químico nos sinais de absorvância de Cd para tinturas fitoterápicas diluídas em solução de Triton X-100 0,1% v/v acidificada com HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v e para padrão alcoólico de 1,5 µg L<sup>-1</sup>

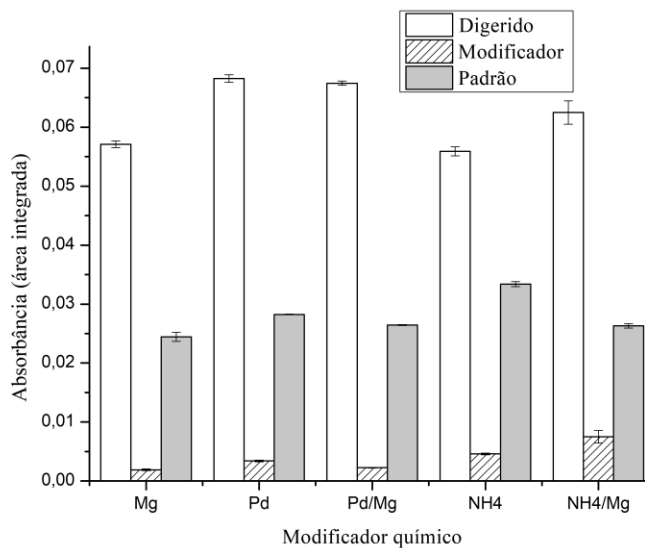


Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Para o estudo de modificador químico na determinação de Pb (**Figura 22**), foi selecionado o uso apenas de dihidrogefosfato de amônio. Embora os sinais de absorvância obtidos para os cinco modificadores estudados sejam semelhantes, o sinal de absorvância para NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> apresentou perfil mais promissor. A ação desse modificador se dá pela formação de fosfatos não voláteis insolúveis. Durante a pirólise, após o aumento adicional da temperatura, os ortofosfatos inicialmente formados são convertidos em pirofosfatos termicamente mais estáveis. Devido a isso, a temperatura de pirólise pode ser aumentada significativamente e a matriz da amostra pode ser removida (VOLYNSKII, 2003).

O uso da classe de modificador químico fosfatos de amônio é muito comum na determinação de Pb por GF AAS; estando presente na análise de diferentes amostras, como medicamentos fitoterápicos (GOMEZ *et al.*, 2007); solo, sedimentos, água do mar (ACAR, 2005) e vinagre (NDUNG’U *et al.*, 2007).

**Figura 22** - Efeito do uso de modificador químico nos sinais de absorvância de Pb em tinturas fitoterápicas diluídas em solução de Triton X-100 0,1% v/v acidificada com HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v e para padrão em meio alcoólico 10 µg L<sup>-1</sup>



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

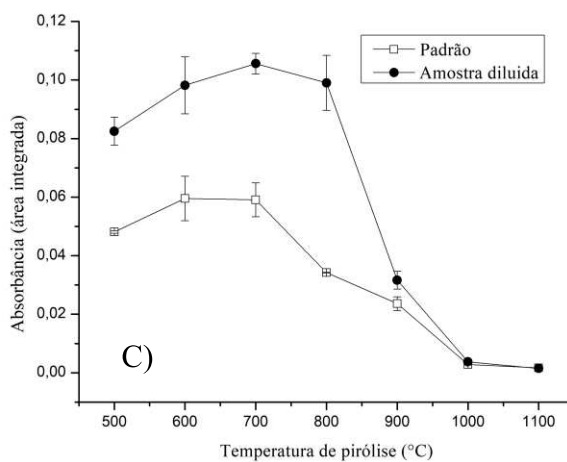
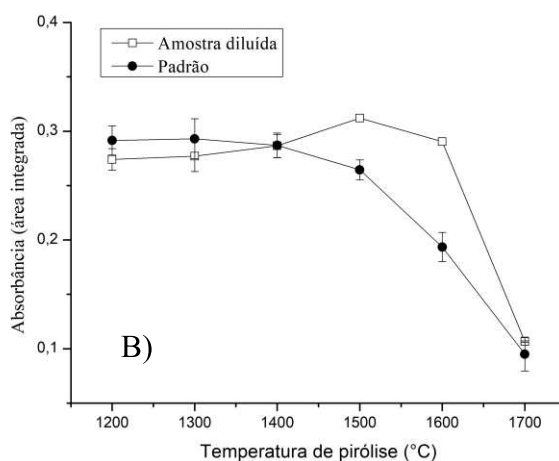
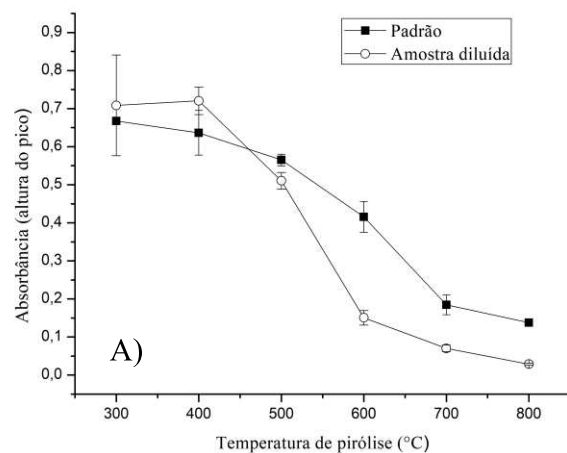
#### 4.3.3 Curvas de Temperatura de pirólise e Temperatura de atomização

Para cromo, a temperatura de pirólise foi de 1500 °C e a temperatura de atomização selecionada foi de 2200 °C. Para o cádmio, as temperaturas selecionadas para pirólise foram de 400 °C, e foi escolhido trabalhar sem modificador químico, com temperatura de atomização em 1400 °C e medindo a absorvância em altura do pico do sinal de absorvância. Para o Pb, 700 °C foi definida como a melhor temperatura de pirólise e 1800 °C como a melhor temperatura de atomização.

Os perfis dos sinais de absorvância do Cr ficaram com picos mais estreitos e simétricos sem o uso de modificador químico em relação ao uso de paládio, indicando uma atomização mais rápida. A queda do sinal ocorre de forma abrupta nas curvas de otimização da temperatura de pirólise de todos os analitos, facilitando a escolha da temperatura ideal. O Cr por ser um elemento refratário permite valores mais elevados de pirólise, enquanto o Cd e Pb, considerado voláteis necessita de temperaturas mais amenas. Na **Figura 23** são mostrados os perfis das curvas de pirólise para a análise direta das amostras na determinação de Cd, Cr e Pb.



**Figura 23** - Curvas de temperatura de pirólise para Cd (A), Cr (B) e Pb (C) para *mix* de tintura fitoterápica diluída em solução de Triton X-100 0,1% v/v acidificada com HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v e padrão em meio alcoólico nas concentrações de 1,5 µg L<sup>-1</sup> para Cd, 5 µg L<sup>-1</sup> para Cr e 10 µg L<sup>-1</sup> para Pb. A temperatura de atomização foi de 900 °C para Cd, 2500 °C para Cr e 2100 °C para Pb (modificador químico (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

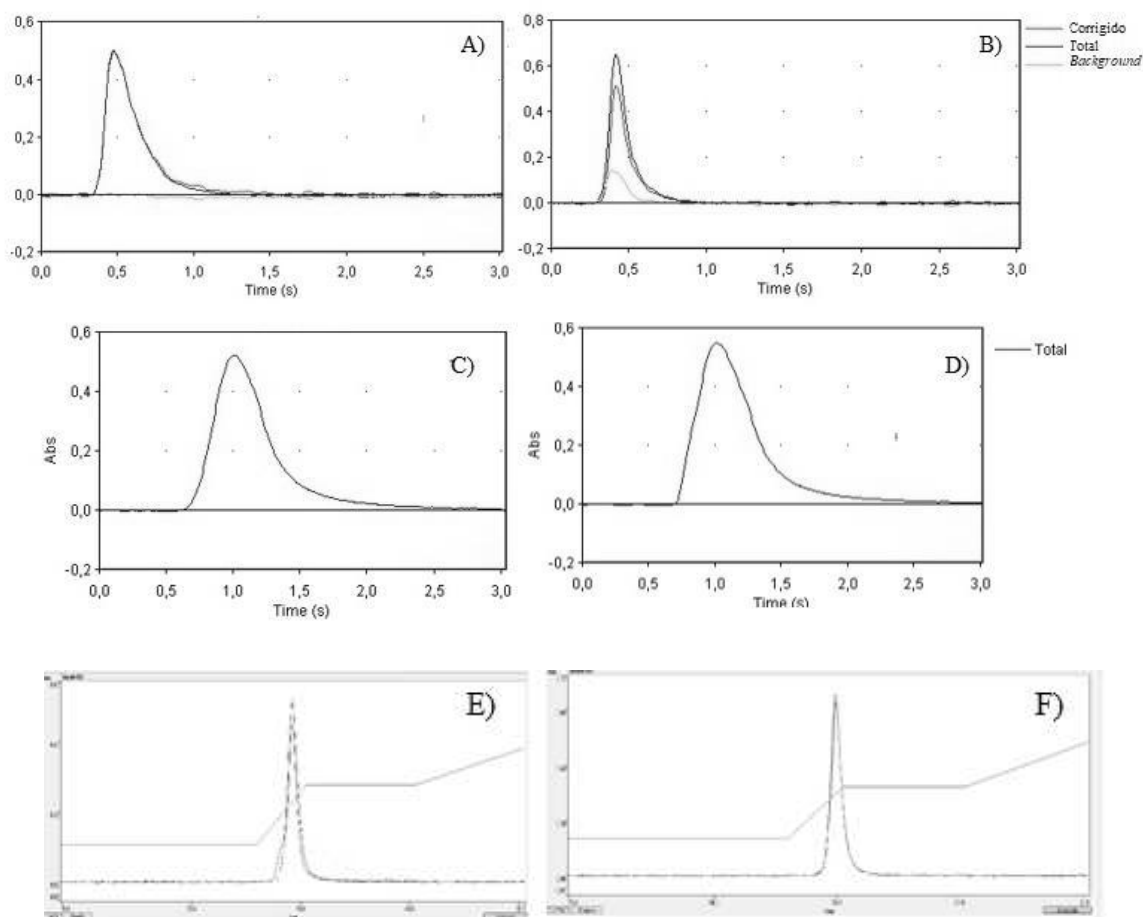


Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

De um modo geral, os gráficos referentes às curvas de temperatura de atomização mostrados na **Figura 24** mostram que os analitos tiveram comportamento semelhante para a amostra e para os padrões alcoólicos, o que possibilita uma condição de compromisso para que seja possível o uso da curva alcoólica para fins de calibração.

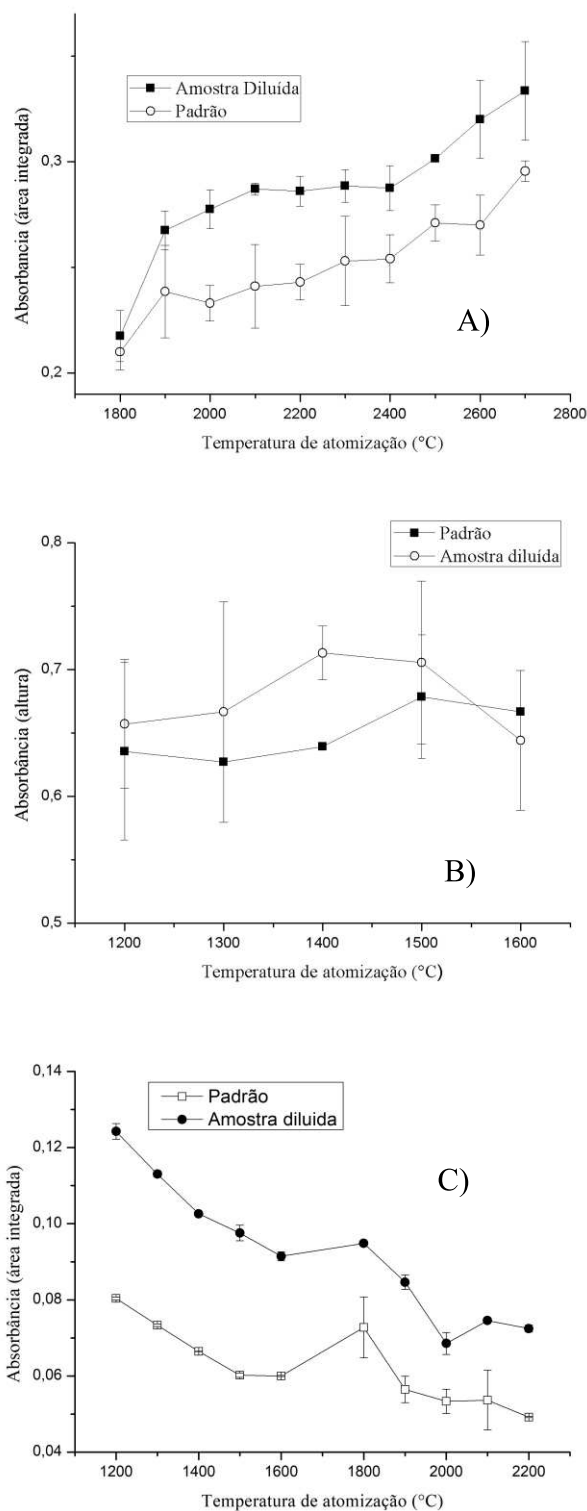
O "sinal do pico ideal" dos métodos GF AAS deve ser considerado para definir se as condições instrumentais foram escolhidas adequadamente. Uma maior área integrada garante maior sensibilidade; enquanto um pico estreito é resultante de um processo de atomização rápida (WELZ & SPERLING, 1999). Nesse contexto, as temperaturas otimizadas se mostraram adequadas, o que se pode observar com os perfis dos sinais de absorvância mostrados na **Figura 25**.

**Figura 24** - Perfil dos sinais de absorvância para o *mix* de tinturas fitoterápicas diluída em solução de Triton X-100 0,1% v/v acidificada com HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v para Cd (A), Cr (C) e Pb (E) e padrão em meio alcoólico nas concentrações de 1,5 µg L<sup>-1</sup> para Cd, 5 µg L<sup>-1</sup> para Cr e 10 µg L<sup>-1</sup> para Pb (F) nas condições instrumentais otimizadas



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

**Figura 25.** Curvas de temperatura de atomização para Cd (A), Cr (B) e Pb (C) para *mix* de tintura fitoterápica diluída em solução de Triton X-100 0,1% v/v acidificada com HNO<sub>3</sub> 0,2% v/v e padrão em meio alcoólico nas concentrações de 1,5 µg L<sup>-1</sup> para Cd, 5 µg L<sup>-1</sup> para Cr e 10 µg L<sup>-1</sup> para Pb. A temperatura de pirólise foi de 400 °C para Cd, 1500 °C para Cr e 700 °C para Pb (modificador químico (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

A temperatura de atomização deve ser suficientemente alta para gerar a nuvem atômica no menor tempo possível, mas não deve ser exageradamente elevada para não deteriorar prematuramente os tubos e os contatos de grafite (BEATY & KERBER, 1993). Os perfis das curvas para otimização da temperatura de atomização possuem um comportamento menos padronizado do que aqueles encontrados na otimização da temperatura de pirólise. O programa de aquecimento do GF AAS para os analitos Cd, Cr e Pb para a análise direta bem como para o método de referência são mostrados na **Tabela 15**.

A temperatura de atomização deveria ser a menor temperatura em que a sensibilidade é máxima. Contudo, observou-se uma oscilação dos sinais de absorvância, os quais foram atribuídos principalmente a efeitos cinéticos (já que dependem principalmente da temperatura). Esses efeitos cinéticos que ocorrem durante a atomização, e que causam mudanças na forma e na altura do pico. Em alguns casos, tais efeitos aumentaram o sinal analítico consideravelmente, mas torna o sinal de absorvância obtido inadequado para validação do método.

**Tabela 15** - Programa de aquecimento do GF AAS para a determinação de Cd, Cr e Pb em tintura fitoterápica por análise direta

Temperatura (°C)	Tempo (s)	Rampa (°C s <sup>-1</sup> )	Vazão do Ar (L min <sup>-1</sup> )
90	20	10	0,2
130	15	3	0,2
400 <sup>a</sup> 1500 <sup>b</sup> 700 <sup>c</sup>	20	150	0,2
1400 <sup>a</sup> 2200 <sup>b</sup> 1800 <sup>c</sup>	3	0	0
2500	3	0	0,2

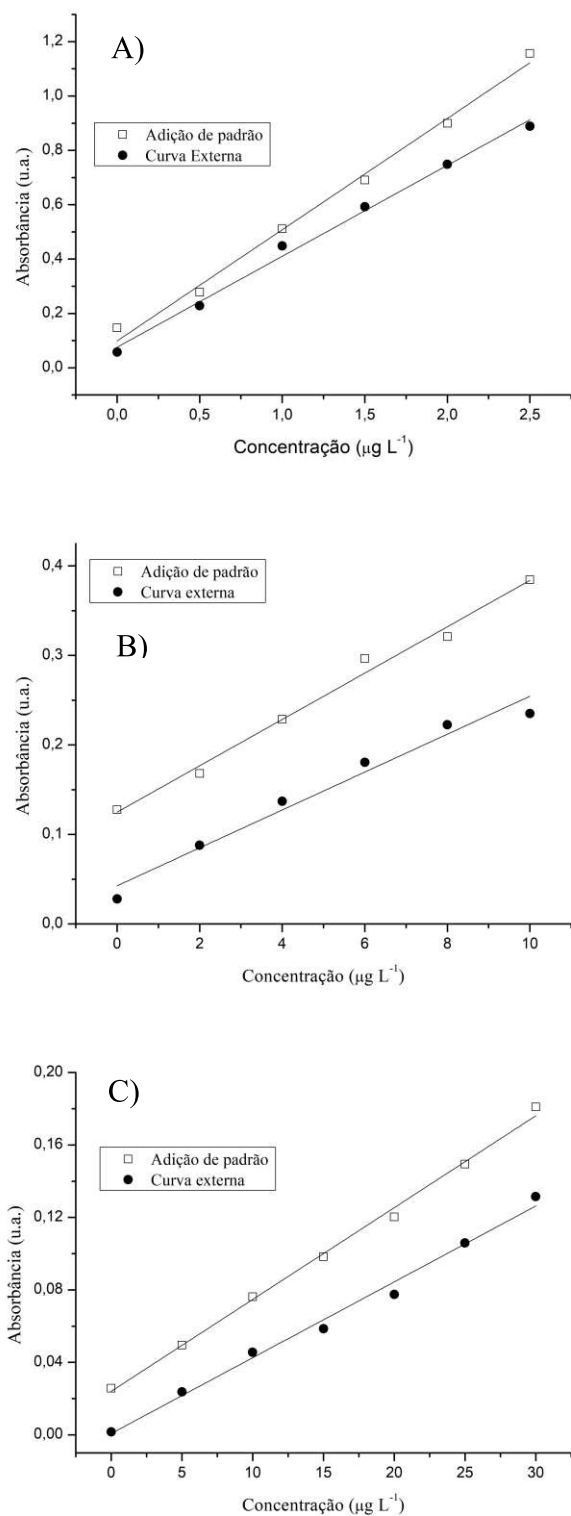
<sup>a</sup> determinação de Cd <sup>b</sup> determinação de Cr <sup>c</sup> determinação de Pb

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

#### 4.3.4 Figuras de mérito

A faixa linear de trabalho foi de 0,2 a 2,5 µg L<sup>-1</sup> para o Cd, 1 a 10 µg L<sup>-1</sup> para o Cr e 5 a 30 µg L<sup>-1</sup> para o Pb. As curvas analíticas foram feitas em duplicatas autênticas. Comparando-se as concentrações dos analitos obtidas pela calibração externa e por adição de padrão avaliou-se a seletividade das análises por determinação direta, utilizando-se do *mix* de amostras de tinturas de fitoterápicas. A comparação das curvas para os três analitos são mostradas na **Figura 26**. Obtendo-se as duas curvas de calibração, foram aplicados os testes *F* (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e o teste *t* (*Student*) de comparação de médias, adotando-se para ambos um nível de confiança de 95%.

**Figura 26** - Estudo do efeito de matriz para determinação de Cd (A), Cr (B) e Pb (C) por análise direta empregando GF AAS



Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Na **Tabela 16** são mostrados os valores obtidos para os testes estatísticos. Como de  $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$ , pode-se concluir que a matriz não afeta significativamente a determinação de Cd, Cr e

Pb. Com isso a curva externa pode ser usada como meio de calibração para determinação de Cd, Cr e Pb por análise direta, sendo construídas em meio alcóolico de 7% v/v.

Quando os padrões externos são usados, considera-se que quando a mesma concentração do analito estiver presente na amostra e no padrão, a mesma resposta será obtida. Assim, a relação funcional da calibração entre a resposta e a concentração do analito também deve-se aplicar à amostra (SKOOG *et al.*, 2006). A calibração externa torna o método muito menos trabalhoso aumentando a frequência analítica.

**Tabela 16.** Comparações das concentrações de Cd, Cr e Pb em tinturas fitoterápicas por análise direta em GF AAS obtidas por calibração externa e por adição de padrão

Analito	Equação	R <sup>2</sup>	Concentração (µg Kg <sup>-1</sup> )	F <sub>calc</sub> *	t <sub>calc</sub> **
Cd	CE <sup>1</sup> y= 0,3349x +0,0678	0,9947	0,20± 0,03	3,23	0,092
	AP <sup>2</sup> y= 0,4101x +0,1106	0,9922	0,20±0,05		
Cr	CE <sup>1</sup> y= 0,0358x +0,023	0,9909	0,77± 0,08	7,70	3,263
	AP <sup>2</sup> y= 0,0444x +0,0463	0,995	0,94± 0,03		
Pb	CE <sup>1</sup> y= 0,0024x +0,0064	0,9915	7,29± 0,53	1,83	0,674
	AP <sup>2</sup> y = 0,0028x + 0,0206	0,9979	7,57± 0,72		

<sup>1</sup> Curva Externa

<sup>2</sup> Adição de Padrão

\*F<sub>tab</sub>= 19

\*\*t<sub>tab</sub>= 4,303

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

A linearidade foi verificada através da análise de variância (ANOVA) das curvas analíticas. Avaliando os dados da curva externa de calibração, os resultados para análise direta são mostrados na **Tabela 17**.

Pode-se afirmar que os valores seguem uma distribuição normal, pois temos  $W_{calc} > W_{tab}$ . As variâncias são homogêneas conforme o aumento da concentração, uma vez que o valor de  $C_{calc} < C_{tab}$ . Como esses pressupostos estatísticos foram atendidos, foi possível verificar se há falta de ajuste e qual é a significância do modelo. A 95% de confiança pode-se afirmar que não há indícios de falta de ajuste do modelo ( $F_{faj-calc} < F_{faj-tab}$ ) e como  $F_{reg-calc} > 10x F_{reg-tab}$ , o mesmo apresenta alta significância e pode ser usado para fins de previsão.

**Tabela 17** - Análise da regressão linear do modelo de calibração externa utilizada para determinação de Cd, Cr e Pb em tinturas fitoterápicas por análise direta em GF AAS

Teste	Tabelado	Cádmio	Cromo	Chumbo
Shapiro-Wilk	0,859	1,024	0,965	0,975
Cochran	0,7808	0,6504	0,4874	0,3849
Falta de Ajuste	4,53	3,21	0,51	2,87
Regressão	1,04	1347	497	1170

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Para avaliar a precisão e exatidão por meio dos valores de RSD e recuperação média, respectivamente, os critérios de aceitação são atrelados ao nível de concentração do analito. Os critérios sugeridos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2002) para recuperação média são de 60-115% ou 40-120% e, para repetibilidade 21% ou 30% para os teores de 10 e 1  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , respectivamente. A **Tabela 18** mostra as figuras de mérito dos métodos propostos. Ressalta-se que a precisão e a exatidão estão concordantes com a faixa de aceitabilidade referida. Os valores obtidos de RSD ficaram abaixo de 10% e a recuperação variou de 92% a 112%.

**Tabela 18** - Figuras de mérito obtidas para determinação de Cd, Cr e Pb em tinturas fitoterápicas através de análise direta em GF AAS

	Cd	Cr	Pb
Precisão (%)	4,53	9,90	4,30
Recuperação nível inferior (%)	104	109	111
Recuperação nível superior (%)	112	102	92
LD instrumental ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,05	0,13	0,16
LQ instrumental ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0,17	0,43	0,54
LD método ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	0,5	1,3	1,6
LQ método ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	1,7	4,3	5,4
$m_0$ (pg)	0,22	2,05	15,7

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Uma sensibilidade muito alta está relacionada a uma massa característica muito baixa, quando os valores são altos indicam principalmente que o método não está otimizado. Os

valores de  $m_0$  estão menores do que os usuais para tubos de grafite longitudinalmente aquecidos, cujo valor reportado é de 3 pg para Cr, 0,4 pg para Cd e 16 pg para Pb (WELZ & SPERLING, 1999).

Além disso, os valores  $m_0$ , LD e LQ obtidos neste estudo foram melhores do que outros trabalhos envolvendo a determinação de Cr por análise direta, como amostras de *Orujo* (destilado alcoólico de vinagre), onde foram obtidos valores de LD de  $0,29 \mu\text{g L}^{-1}$  e LQ de  $0,97 \mu\text{g L}^{-1}$  Cr. Em outro estudo sobre a análise direta de suspensão de plantas medicinais determinando Cd, obtiveram  $m_0$  igual a 1,8 pg; com LD e LQ de 0,12 e  $0,40 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente (FARIÑAS *et al.*, 2008; FORTUNATO *et al.*, 2012). Para o Pb é reportado na literatura valores de massa característica acima de 30 pg, o dobro do encontrado nesse trabalho (DESSUY *et al.*, 2008).

#### 4.4 COMPARAÇÃO ENTRE ANÁLISE DIRETA E O MÉTODO DE REFERÊNCIA

A digestão assistida por radiação micro-ondas é comumente aceita como método de referência, por ser tratar de um preparo de amostra recorrente na literatura para análises em AAS, no qual espera-se não ter efeito significativo da matriz orgânica. Usando as palavras-chave “*microwave and digestion*” com filtro na área “*chemistry*” gera um total de 2513 artigos, de acordo com uma pesquisa na base dados do *Web of Science* realizada em 16 de maio de 2016 (KRUG & ROCHA, 2016).

Contudo, a análise direta possui muitas vantagens em relação aos procedimentos de digestão da amostra, como o uso de menores quantidades de amostra e manuseio mínimo. Destacam-se também o tempo reduzido de preparação, maior sensibilidade e a ausência de resíduos corrosivos ou tóxicos (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Quatro amostras de tinturas foram submetidas à digestão assistida por radiação micro-ondas, em duplicata. Os teores de Cd, Cr e Pb foram comparados com os obtidos por análise direta e estão dispostos na **Tabela 19**. Foi aplicado o teste *t* de *Student*, não pareado com variância agrupada, e como  $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$  para os três analitos nas quatro amostras avaliadas, isso indicou ser possível o uso da análise direta conforme a diluição e condições instrumentais propostos.



**Tabela 19.** Comparação entre análise direta das tinturas fitoterápicas com o método empregando as amostras digeridas (método de referência) para determinação Cd, Cr e Pb por GF AAS

<b>Analito</b>	<b>Amostra</b>	<b>Análise direta</b>	<b>Método de Referência</b>	<b>t<sub>calc</sub><sup>2</sup></b>
Cd ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	A-2	42,14 $\pm$ 1,92	43,13 $\pm$ 0,49	0,860
	ES-2	3,67 $\pm$ 0,02	3,18 $\pm$ 0,12	2,451
	CS-1	23,26 $\pm$ 1,83	24,55 $\pm$ 0,44	1,191
	MC-1 <sup>1</sup>	0,71 $\pm$ 0,12	0,63 $\pm$ 0,06	0,978
Cr ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	A-2	12,43 $\pm$ 0,71	13,09 $\pm$ 0,86	1,035
	ES-2	7,08 $\pm$ 0,65	7,12 $\pm$ 0,70	1,202
	CS-1	< LD	< LD	-
	MC-1 <sup>1</sup>	< LD	< LD	-
Pb ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	A-2	29,78 $\pm$ 2,09	33,00 $\pm$ 2,46	1,311
	ES-2	80,56 $\pm$ 2,31	83,03 $\pm$ 1,02	1,431
	CS-1	32,32 $\pm$ 3,42	34,49 $\pm$ 5,12	4,203
	MC-1 <sup>1</sup>	22,26 $\pm$ 1,10	23,50 $\pm$ 2,13	0,338

<sup>1</sup> Concentração estimada entre o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ).

<sup>2</sup> t<sub>tab</sub> = 4,303

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Uma vez que as figuras de mérito avaliadas se mostraram adequadas para a realização das análises com boas precisão e exatidão, o método baseado na análise direta foi aplicado para um conjunto de 21 amostras.

#### 4.5. APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

##### 4.5.1 Tinturas fitoterápicas comerciais

Os dados obtidos para a determinação de Cd, Cr e Pb nas amostras de tinturas fitoterápicas são mostrados nas **Tabela 20**. As diferenças nos teores dos contaminantes encontradas nas tinturas comercializadas, justifica-se pelo fato de que produtos derivados de plantas variam amplamente no conteúdo de metais em função do ambiente onde a planta é cultivada; equipamentos de processamento, excipientes e recipientes dos produtos também podem influenciá-las (FILIPIAK-SZOK *et al*, 2015).

**Tabela 20** - Teores de Cd, Cr e Pb nas amostras de tinturas fitoterápicas comerciais e doadas pela FF-UFJF

Amostras	Cd ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	Cr ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )
A-1	7,03 $\pm$ 1,23	4,98 $\pm$ 0,63	80,46 $\pm$ 0,66
A-2	42,14 $\pm$ 1,92	12,43 $\pm$ 0,71	29,78 $\pm$ 2,09
A-3	< LD	7,36 $\pm$ 0,58	< LD
A-4	< LD	5,29 $\pm$ 0,08	< LD
CS-1	23,26 $\pm$ 1,83	< LD	32,32 $\pm$ 3,42
CS-2	13,20 $\pm$ 2,17	< LD	32,61 $\pm$ 2,42
CS-3	< LD	< LD	29,49 $\pm$ 2,87
CS-4	< LD	9,88 $\pm$ 1,49	27,73 $\pm$ 3,09
ES-1	1,84 $\pm$ 0,37	< LD	88,47 $\pm$ 3,09
ES-2	3,67 $\pm$ 0,02	7,08 $\pm$ 0,65	80,56 $\pm$ 2,31
ES-3	3,70 $\pm$ 0,64	< LD	82,51 $\pm$ 3,64
ES-4	< LD	21,41 $\pm$ 0,11	32,03 $\pm$ 3,53
ES-5	< LD	11,09 $\pm$ 0,50	43,16 $\pm$ 2,42
G-1	4,30 $\pm$ 0,18	10,80 $\pm$ 0,85	37,98 $\pm$ 2,77
G-2	< LD	4,64 $\pm$ 0,04	< LD
G-3	< LD	4,45 $\pm$ 0,53 <sup>1</sup>	< LD
T- 1	< LD	< LD	< LD
Z- 1	8,76 $\pm$ 1,72	< LD	28,02 $\pm$ 3,64
C- 1	< LD	< LD	34,17 $\pm$ 3,53
Ar- 1	< LD	< LD	24,41 $\pm$ 2,87
MC -1	0,71 $\pm$ 0,12 <sup>1</sup>	< LD	22,26 $\pm$ 1,10

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Para as amostras comerciais, dentre as quatro tinturas de cáscara sagrada, em apenas uma foi detectada a presença de Cr, já para as tinturas de Alcachofra e Guaco foi detectada a presença de Cr em todas as amostras. Os valores variaram de 4 a 21  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  nas 21 amostras de tinturas analisadas.

O Cd teve teores quantificáveis nos quatro tipos principais de tinturas fitoterápicas estudadas, e variou nas 21 amostras de 0,71 a 40,78  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . Dentre os três analitos, foi o que houve a maior variação de teores encontrados. Para Pb, apenas para 25% das amostras não foi encontrado teor detectável, sendo que a concentração encontrada foi em média 60  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ .

Fazendo um paralelo com a literatura, também foram observadas diferenças entre os teores obtidos para amostras de uma mesma planta. Quando foram avaliadas as concentrações elementares em 59 espécies de plantas medicinais indicadas pelo SUS *in natura*, também foi observado que as concentrações dos analitos nas amostras de plantas medicinais variavam em ampla escala para quase todos os elementos (SILVA *et al.*, 2016).

As quatro espécies de plantas avaliadas, na forma de tintura, foram o objetivo principal deste trabalho visto que são oferecidas pelo SUS; mas sabe-se que a população faz uso de outras tinturas fitoterápicas baseando-se na sabedoria popular. Vale ressaltar que na aplicação do método proposto em cinco outras tinturas fitoterápicas (provenientes de outras espécies de plantas), o Cr não foi detectado, para o Cd a tintura de Zedoária (Z-1) obteve-se uma concentração acima do LQ, enquanto que na tintura da Mamica de cadela a concentração estava acima do LD mas abaixo do LQ. Na tintura de Thuya não foi encontrado nenhum dos três analitos, enquanto Pb foi encontrado nas demais. A obtenção de resultados para outras amostras de tinturas, indica que o método se mostrou aplicável para amostras não consideradas nas etapas de desenvolvimento analítico.

Nas recomendações da OMS não há recomendação para o limite máximo permitido para Cr, esse valor aparece na legislação canadense como 2 mg Kg<sup>-1</sup> para plantas e de 200 µg/dia para produtos fitoterápicos (OMS, 2007). Valor bem acima do que foi encontrado nesse trabalho, onde o maior teor encontrado foi de 21,41 µg Kg<sup>-1</sup>. O mesmo ocorreu para o cádmio e para o chumbo, que tem como limite máximo permitido, respectivamente, 0,3 mg Kg<sup>-1</sup> e 10 mg Kg<sup>-1</sup> pela OMS, enquanto o maior valor encontrado foi de 40,78 µg Kg<sup>-1</sup> para Cd e 88,47 µg Kg<sup>-1</sup> para Pb (STREET, 2012).

Na farmacopeia americana, para medicamentos por via oral, o consumo diário não deve exceder 5 µg de Cd e Pb e 11000 µg de Cr (USP, 2015). As tinturas têm uso recomendado de três vezes ao dia, na dosagem média de 5mL no total diário (BRASIL, 2018b). Os valores encontrados nas amostras analisadas, comparados com as recomendações diárias, mostram que os valores encontrados não excedem a ingestão diária permitida/recomendada para os contaminantes determinados.

No Brasil, segundo a Farmacopeia Brasileira, quando é usada a determinação por espectrometria atômica, os limites diferenciados são estabelecidos para cada elemento de acordo com a sua toxicidade e via de administração. Sendo assim, os limites máximos de contaminação são (em mg Kg<sup>-1</sup>) de 0,5 para o Cd, 25 para o Cr e 1,0 para o Pb, todos para medicamentos de via oral.

Contudo, quando não estabelecido na monografia, os limites para metais pesados em drogas vegetais deverá ser de no máximo 20 ppm, não podendo ultrapassar os limites especificados de 1 ppm para Cd e de 5 ppm para Pb; não há citação do limite para Cr. Nesse caso é indicado um “ensaio limite”, que consiste na formação de partículas sólidas dos sulfetos de metais pesados, em suspensão, para posterior comparação visual da intensidade da cor nas preparações de amostras e padrões. O ensaio referido é semi-quantitativo e possibilita inferir se a amostra “passa ou não” no teste (BRASIL, 2019). Para soluções de cor intensa, como ocorre para medicamentos na forma de tintura, a diferenciação visual se torna inviável, e o uso de técnicas como GF AAS se mostra adequada.

#### 4.5.2 Plantas Medicinais e Tinturas fitoterápicas preparadas

Os teores de Cr encontrados nas amostras plantas medicinais que foram analisadas estão abaixo do permitido pela legislação brasileira, enquanto que para Cd, uma amostra excedeu esse valor e para o Pb apenas duas amostras ficaram abaixo do limite. Visto que essas plantas são usadas como matéria-prima para produção de tinturas fitoterápicas, entende-se que esses contaminantes poderiam ser transferidos para o produto final. Os valores encontrados são mostrados na **Tabela 21**.

**Tabela 21** - Teores de Cd, Cr e Pb nas amostras de plantas medicinais (em mg Kg<sup>-1</sup>)

Amostra	Cd	Cr	Pb
1-A	0,25 ± 0,01	1,27 ± 0,01	1,84 ± 0,03
1-CS	0,14 ± 0,03	0,59 ± 0,10	2,91 ± 0,12
2-CS	0,34 ± 0,06	4,24 ± 0,22	2,26 ± 0,25
1-ES	0,19 ± 0,01	0,48 ± 0,01	1,24 ± 0,01
2-ES	0,16 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,51 ± 0,02
1- G	0,68 ± 0,06	0,45 ± 0,01	0,47 ± 0,04
2-G	0,38 ± 0,01	0,90 ± 0,01	1,44 ± 0,02

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

Sabendo-se então dos teores dos contaminantes presentes nas sete plantas medicinais foi realizada a preparação da tintura fitoterápica a partir dessas plantas, para posterior análise pelo método proposto. As concentrações obtidas para os contaminantes avaliados foram

similares àquelas encontradas nas amostras comerciais, destacando que, apenas o Cr não foi encontrado em duas amostras de espinheira santa. Além disso, Cd e Pb estiveram presentes em concentrações expressivas em todas as amostras. Os teores encontrados nas tinturas produzidas são vistos na **Tabela 22**.

**Tabela 22** - Teores de Cd, Cr e Pb nas amostras de tinturas das fitoterápicas preparadas no laboratório a partir das plantas medicinais (em  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ )

Amostra	Cd	Cr	Pb
1-A	37,37 $\pm$ 4,85	33,02 $\pm$ 3,02	16,74 $\pm$ 2,14
1-CS	44,72 $\pm$ 0,78	15,73 $\pm$ 1,95	29,98 $\pm$ 5,93
2-CS	36,60 $\pm$ 0,53	21,77 $\pm$ 3,06	31,83 $\pm$ 2,34
1-ES	15,96 $\pm$ 0,58	<LD	3,31 $\pm$ 0,33
2-ES	15,93 $\pm$ 1,04	<LD	7,27 $\pm$ 0,25
1- G	27,82 $\pm$ 1,28	23,83 $\pm$ 1,11	1,88 $\pm$ 0,27
2-G	49,98 $\pm$ 6,47	24,02 $\pm$ 0,86	25,58 $\pm$ 0,27

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

#### 4.6 TRANSFERÊNCIA DOS ANALITOS DA PLANTA PARA A TINTURA

A porcentagem (em  $\mu\text{g}$ ) de Cd, Cr e Pb transferidos da planta medicinal para a tintura produzida é mostrado na **Tabela 23**. A importância dessa avaliação está de acordo com a recomendação da OMS (2007), que diz que a contaminação de metais e não-metais tóxicos, como Cr, Cd, Pb, As e Hg; em fitoterápicos pode ser proveniente do solo e água poluídos, durante o cultivo e crescimento da planta; e no processo de fabricação dos fitoterápicos.

Nas plantas, os efeitos tóxicos do Cr dependem principalmente da especiação do metal, que determina sua captação, translocação e acúmulo. Os mecanismos de absorção e distribuição de Cr, no entanto, ainda não são totalmente compreendidos (GOMES *et al.*, 2017). Em relação à porcentagem transferida de Cr das plantas para as tinturas fitoterápicas, houve uma variação de 2 a 19%, sendo que nas amostras de espinheira santa não foi possível quantificar esse elemento, devido a sua baixa concentração nas tinturas produzidas. Para Cd, a faixa foi de 16 a 120%, para o Pb foi de 14 a 88%.

Não foi possível verificar um padrão de transferência para as mesmas plantas, provavelmente devido à variabilidade química da espécie vegetal utilizada como matéria-prima,

onde a presença de outros compostos químicos os quais os metais podem interagir diferem entre as amostras. Barthwal *et al.* (2008) observaram que houve um diferente acúmulo de metais pesados em plantas medicinais, ao analisar os teores de Ni, Cr, Cd e Pb em amostras coletadas na mesma cidade durante a mesma estação.

**Tabela 23** - Porcentagem de transferência de Cd, Cr e Pb das plantas medicinais para as tinturas fitoterápicas preparadas

<b>Plantas</b>	<b>% Cd (em µg)<sup>1</sup></b>	<b>% Cr (em µg)<sup>1</sup></b>	<b>% Pb (em µg)<sup>1</sup></b>
Alcachofra	58,80 ± 7,97	10,38 ± 0,98	45,13 ± 4,87
Cáscara Sagrada 1	120,40 ± 21,16	10,05 ± 1,44	47,86 ± 4,53
Cáscara Sagrada 2	43,09 ± 6,15	2,05 ± 0,31	70,59 ± 7,74
Espinheira Santa 1	33,55 ± 2,04	ND <sup>2</sup>	13,63 ± 1,04
Espinheira Santa 2	39,33 ± 5,63	ND	67,78 ± 5,52
Guaco 1	16,04 ± 1,39	19,72 ± 0,42	18,97 ± 1,71
Guaco 2	52,35 ± 7,18	10,66 ± 0,43	88,26 ± 1,31

<sup>1</sup> Porcentagem média ± desvio padrão <sup>2</sup> ND – Valor não detectado

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

#### 4.7 ESTUDOS COMPLEMENTARES - ANÁLISE POR TXRF

O foco deste trabalho foi avaliar criticamente os teores de alguns contaminantes inorgânicos em tinturas fitoterápicas, mas com os resultados encontrados foi possível perceber que, embora a presença dos metais tóxicos tenha sido encontrada em muitas amostras, os teores máximos permitidos pelos órgãos regulamentadores são muito permissivos e, por isso, nenhuma das tinturas teve valor acima do estabelecido.

Para as plantas alguns elementos devem estar presentes no ambiente em que são cultivadas para que se desenvolvam saudáveis. Alguns exemplos são aqueles exigidos em maior quantidade e que são definidos como macronutrientes, como o Ca; e os outros que são exigidos em pequenas quantidades, denominados micronutrientes, como Cu, Fe, Mn e Zn. Para o ser humano, o Ca é um elemento essencial à vida, em maior quantidade que elementos como Cu, Fe, Mn e Zn, que ao ultrapassar determinada concentração pode gerar toxicidade (RAVEN *et al.*, 2007).

Para verificar então se, por outro lado, essas tinturas poderiam ser fontes de minerais essenciais foram realizadas análises por TXRF, os valores encontrados para Ca, Mn, Fe, Cu e

Zn são mostrados na **Tabela 24**. Esse estudo foi feito com a colaboração das professoras Dra. Clésia Cristina Nascentes e Dra. Letícia Malta Costa, do Departamento de Química da UFMG. Os resultados desse estudo poderiam justificar estudos mais sistemáticos voltados à determinação da composição mineral desse tipo de amostra.

**Tabela 24** - Teores de minerais nas amostras de tinturas fitoterápicas (em mg Kg<sup>-1</sup>)

	<b>Ca</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>
A-1	84,329	0,711	0,667	0,759	4,731
A-2	46,840	0,490	0,137	0,028	0,470
A-3	21,156	0,339	0,112	0,048	0,338
A-4	30,782	0,341	0,085	0,051	0,209
CS-1	9,172	1,062	0,142	0,054	0,072
CS-2	9,194	1,281	0,261	0,109	15,037
CS-3	18,02	2,346	0,185	0,056	0,102
CS-4	6,652	0,855	0,374	0,026	7,866
ES-1	19,937	1,727	0,348	0,172	10,048
ES-2	6,220	3,373	0,221	0,221	0,469
ES-3	17,514	0,626	0,217	0,033	0,213
ES-4	13,213	0,818	0,120	0,046	0,108
ES-5	21,404	2,532	1,338	0,129	11,018
G-1	13,596	2,948	0,417	0,465	15,425
G-2	8,187	0,664	0,091	0,079	0,240
G-3	22,000	1,605	0,089	0,010	0,109
T- 1	8,447	0,261	0,878	0,065	13,544
Z- 1	2,029	0,702	0,399	0,088	0,101
C- 1	17,358	0,171	1,003	0,158	3,993
Ar- 1	1,653	0,066	0,111	0,039	0,046
MC -1	5,637	0,456	0,171	0,054	0,134

Fonte: elaborado pela própria autora (2020).

A ingestão diária recomendada para adultos é 1000 mg de Ca, 2,3 mg de Mn, 14mg de Fe, 0,9 mg de Cu e 7 mg de Zn (BRASIL, 2005). O teor de Ca variou de 1,65 a 84 mg Kg<sup>-1</sup>, de Mn foi de 0,07 a 3,373 mg Kg<sup>-1</sup>, Fe de 0,09 a 1,34 mg Kg<sup>-1</sup>, Cu de 0,03 a 0,76 mg Kg<sup>-1</sup> e Zn de 0,05 a 15,43 mg Kg<sup>-1</sup>. Para ser considerado fonte de um nutriente, um alimento deve fornecer

pelo menos 15% da ingestão diária recomendada (BRASIL, 2012b). Sabendo-se que a recomendação do uso diário de tinturas é de até 15 mL (equivalente a cerca de 0,012 kg), os valores dos nutrientes encontrados nas amostras analisadas não podem ser considerados expressivos do ponto de vista nutricional.



## 5 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um método baseado na análise direta de tinturas fitoterápicas utilizando a técnica de GF AAS e calibração externa para determinar Cd, Cr e Pb. Os resultados obtidos com o método proposto foram comparados com aqueles obtidos para quando utilizada a digestão assistida por radiação micro-ondas, não havendo evidências de divergência entre os métodos.

Os teores de Cd, Cr e Pb encontrados nas 21 amostras de tinturas avaliadas estão abaixo dos limites máximos permitidos pela ANVISA, Farmacopeia Internacional, Farmacopeia americana e pela OMS. Isso indica que as amostras estudadas seriam seguras para consumo, ainda que os limites possam ser considerados elevados.

Ainda em relação ao método proposto, as figuras de mérito demonstram ser compatíveis para uso em rotinas, pois atendem tanto a quesitos de detectabilidade como de exatidão. A análise direta não demanda preparo de amostra e evita riscos desnecessários para o analista devido a reação violenta entre ácido nítrico e etanol, além de não precisar de equipamentos caros, tais como digestor micro-ondas.

A análise direta para determinação de contaminantes inorgânicos em GF AAS teve uma frequência analítica alta, com uso reduzido de reagentes e energia, gerando menos desperdício e minimizando riscos de contaminação da amostra e perdas de analito. O desempenho favorável em relação à seletividade, sensibilidade e precisão para as amostras sob investigação demonstrou a versatilidade desse método e se torna uma opção atraente comparada aos métodos usuais, como o ensaio limite por formação de partículas sólidas de sulfetos.

### 5.1 PERSPECTIVAS FUTURAS

Dentre os objetivos iniciais deste projeto se incluía a determinação de mais um contaminante inorgânico, o arsênio, comumente encontrado em plantas medicinais e em medicamentos fitoterápicos. No entanto, o equipamento - espectrômetro de absorção atômica com atomização em forno de grafite - disponível na Central Analítica do Departamento de Química- UFJF ficou fora de uso devido a problemas técnicos desde o 2º semestre de 2018.

Com o apoio da Profa. Dra. Leticia Malta Costa, utilizando-se de equipamento GF AAS localizado nas dependências do Laboratório de Espectrometria Atômica e Química Analítica e Ambiental - Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, na cidade de

Belo Horizonte- MG - foram realizados experimentos para determinação de Pb. Foram feitas as otimizações das condições instrumentais; temperatura de pirólise, temperatura de atomização e uso de modificador químico e parâmetros de validação analítica, como sensibilidade do método e linearidade da curva externa.

Devido a limitação de tempo e recursos para continuação do projeto em outra cidade, não foi possível a realização dos experimentos necessários para determinação de As. Neste sentido, sugere-se que o mesmo seja futuramente finalizado, junto a outros elementos traços com potencial tóxico à saúde humana.

O preparo de mais tinturas fitoterápicas a partir das plantas medicinais possibilitaria uma amostragem mais representativa, visto que adquirir tais amostras através do comércio local é complexo economicamente, pois o valor para compra de amostras comerciais é alto, com valor médio de R\$25 chegando a mais de R\$50 por unidade. Além disso, a preparação possibilitaria avaliar a transferência de outros contaminantes. Com mais amostras a aplicação de uma análise exploratória por meio da Análise de Componentes Principais (PCA) pode encontrar um perfil de acordo com elementos frequentemente encontrados e a procedência da amostra.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACAR, O. Determination of cadmium, copper and lead in soils, sediments and sea water samples by ETAAS using a Sc + Pd + NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> chemical modifier. **Talanta**, v.65, p.672–677, 2005.

AGAZZIA, A; PIROLA, C. Fundamentals, methods and future trends of environmental microwave sample preparation. **Microchemical Journal**, v.67, p.337-341, 2000.

ALVARENGA, F C R; GARCIA, E F; BASTOS, E M A F; GRANDI, T S M; DUARTE, M; GORETTE, R. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, p. 442-448, 2009.

AOAC. **Official methods of analysis**. 16<sup>a</sup> ed., Washington, 2002.

BEATY, R D; KERBER, J D. **Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrometry**. Perkin-Elmer Corporation, 1993.

BEZERRA, M A; FERREIRA, S L C. **Extração em Ponto Nuvem: Princípios e Aplicações e Química Analítica**. 1<sup>a</sup> ed., Edições UESB, 2006.

BOLAN, S; KUNHIKRISHNAN, A; SESHADRI, B; CHOPPALA, G; NAIDU, R; BOLAN, N S; OKE, Y S; ZHANG, M; LI, C G; LI, F; NOLLER, B; KIRKHAM, M B. Sources, distribution, bioavailability, toxicity, and risk assessment of heavy metal(loid)s in complementary medicines. **Environment International**, v. 108, p. 103–118, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consolidado de normas de registro e notificação de fitoterápicos**. Brasília: 2018a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 6<sup>a</sup> Ed., V. 1. Brasília: 2019a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Homeopática Brasileira**, 3<sup>a</sup> Ed. Brasília: 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário nacional de medicamentos fitoterápicos da farmacopeia brasileira**. Brasília: 2018b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia nº 22/2019 - Versão 1: Estudos não clínicos necessários ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos**. Brasília, 2019b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira**. 1<sup>a</sup> edição. Brasília, 2016a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografia da espécie *Rhamnus purshiana* (Cáscara Sagrada)**. Brasília, 2014a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Monografia da espécie *Mikania glomerata* (Guaco)**. Brasília, 2014b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC N° 26/2014**. Brasília, 2014c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC N° 54/2012**. Brasília, 2012b.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS – PNPIC**. Brasília: 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Medicinais**. Brasília: 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde - Renisus**. Brasília: 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais- RENAME 2012**. Brasília: 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME 2014**. Brasília: 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME 2020**. Brasília: 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Seminário de 10 anos PNPMF**. Brasília, 2016b. Disponível em <http://www.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/29/daf-monografias-10-anos-pnpmf.pdf>. Acesso 22 jul 2020.

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

CARVALHO, A C, RAMALHO, L S, MARQUES, R F O, PERFEITO, J P S. Regulation of herbal medicines in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 503–506, 2014.

CARVALHO, A C B, LANA, T N, PERFEITO, J P S, SILVEIRA, D. The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, p. 29–35, 2018.

CASERTA, D; GRAZIANO, A; Lo MONTE, G; BORDI, G; MOSCARINI, M. Heavy metals and placental fetal-maternal barrier: a mini-review on the major concerns. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 17, p.2198-2206, 2013.

CUNHA, F A S.; SOUSA, R A; HARDING, D P; CADORE, S; ALMEIDA, L F; ARAÚJO, M C U. Automatic microemulsion preparation for metals determination in fuel samples using a flow-batch analyzer and graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 727, p. 34– 40, 2012.

DESSUY, M B; VALE, M G R; SOUZA, A S; FERREIRA, S L C; WELZ, B; KATSKOV, D A. Method development for the determination of lead in wine using electrothermal atomic absorption spectrometry comparing platform and filter furnace atomizers and different chemical modifiers. **Talanta**, v. 74, p. 1321–1329, 2008.

FARIÑAS, M V; GARCÍA, J B; MARTÍN, S G; CRECENTE, R M P; LATORRE, C H. Determination of Cr and Ni in Orujo spirit samples by ETAAS using different chemical modifiers. **Food Chemistry**, v. 110, p. 177–186, 2008.

Farmacopeia Internacional, 2018. Disponível em: <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. Acesso em 01 ago 2019.

FILIPIAK-SZOK, A., KURZAWA, M., SZŁYK, E. Determination of toxic metals by ICP-MS in Asiatic and European medicinal plants and dietary supplements. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 30, p. 54–58, 2015.

FORTUNATO, F M; GOMES NETO, J A; FRESCHI, G P G. Simultaneous determination of Cadmium and Lead in Medicinal Plants using Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry and Direct Slurry Sampling. **Atomic Spectroscopy**, v.33, n.4, 2012.

FRANCISCO, B B A; BRUN, D M; CASSELLA, R. Determination of metals in soft drinks packed in different materials by ET AAS. **Food Chemistry** v. 185, p. 488–494, 2015.

GARDINER, P E; OTTAWAY, J M; FELL, G S. Accuracy of the direct determination of cadmium in urine by carbon-furnace atomic-absorption spectrometry. **Talanta**, v. 26, p. 841-847, 1979.

GERALDES, V; CARVALHO, M; GONCALVES-ROSA, N; TAVARES, C; LARANJO, S; ROCHA, I. Lead toxicity promotes autonomic dysfunction with increased chemoreceptor sensitivity. **NeuroToxicology**, v. 54, p.170–177, 2016.

GOMES, M A C; HAUSER-DAVIS, R A; SUZUKI, M S; VITÓRIA, A P. Plant chromium uptake and transport, physiological effects and recente advances in molecular investigations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p. 55–64, 2017.

GOMEZ, M R; CERUTTI, S; SOMBRA, L L; SILVA, M F; MARTINEZ, L D. Determination of heavy metals for the quality control in argentinian herbal medicines by ETAAS and ICP-OES. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p. 1060–1064, 2007.

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

IYER, S; SENGUPTA, C; VELUMANI, A. Lead toxicity: An overview of prevalence in Indians. **Clinica Chimica Acta**, v. 451, p.161–164, 2015.

JORDAN, S A, CUNNINGHAM, D G, MARLES, R J. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increasethe knowledge base for safety assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, V. 243, p. 198–216, 2010.

JUNIOR, M M S.; SILVA, L O B; LEÃO, D J; FERREIRA, S L C. Analytical strategies for determination of cadmium in Brazilian vinegar samples using ET AAS. **Food Chemistry**, v. 160, p. 209–213, 2014.

KLOPPER, R. Microwave digestion for elemental impurities analysis according to ICH and USP guidelines. **Spectroscopy**, v. 32, p.44–49, 2017.

KUBRAKOVA, I. Microwave-assisted sample preparation and preconcentration for ETAAS. **Spectrochimica Acta Part B** v.52, p.1469-1481, 1997.

KRUG, F J; ROCHA, F R P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. Sociedade Brasileira de Química, São Paulo, 2016.

LIU, C; QIN, J; DOU, X; YANG, M; SUN, X. Extrinsic harmful residues in Chinese herbal medicines: types, detection, and safety evaluation. **Chinese Herbal Medicines** v. 10, p.117–136, 2018.

MOREIRA, D L; TEIXEIRA, S S; MONTEIRO, M H D; DE-OLIVEIRA, A C A X; PAUMGARTTEN, F J R. Traditional use and safety of herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**; v.24, p. 248-257, 2014.

NDUNG’U, K; HIBDON, S; FLEGAL, A R. Determination of lead in vinegar by ICP-MS and GFAAS: evaluation of different sample preparation procedures. **Talanta**, v.64, p.258-263, 2007.

NUNES, K M; BARBOSA, W L R; OZELA, E F; SILVA JÚNIOR, J O C. Padronização da Tintura de *Calendula officinalis* L. para seu Emprego em Formulações Semi-sólidas Fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, p.344-50, 2009.

OLIVEIRA, H R; MESKO, M F; VALE, M G R; SILVEIRA, C A P; PICOLOTO, R S; BECKER, E M. Development of methods for the determination of cadmium and thallium in oil shale by-products with graphite furnace atomic absorption spectrometry using direct analysis. **Microchemical Journal**, v. 116, p. 55-61, 2014.

OLMEDO, P; PLA, A; HERNANDEZ, A F; LOPEZ-GUARNIDO, O; RODRIGO, L; GIL, F. Validation of a method to quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. V. 659, p.60-67, 2010.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues**, Genebra, 2007.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **WHO Global report on Traditional and complementary medicine**, Genebra 2019.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **WHO Traditional Medicine Strategy: 2014-2023**, Genebra, 2013.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 7<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan, 2007.

RIZWAN, M; ALI, S; REHMAN, M Z; RINKLEBE, J; TSANG, D C W; BASHIR, A; MAQBOOL, A; TACK, F M G; OK, Y S. Cadmium phytoremediation potential of Brassica crop species: A review **Science of the Total Environment** v. 631–632, p. 1175–1191, 2018.

- SAHOO, N; MANCHIKANTI, P; DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, p.462–471, 2010.
- SILVA, C S; PINHEIRO, F C; AMARAL, C D B; NÓBREGA, J A. Determination of As, Cd, Hg and Pb in continuous use drugs and excipients by plasma-based techniques in compliance with the United States Pharmacopeia requirements. **Spectrochimica Acta Part B**, v.138, p. 14–17, 2017.
- SILVA, P S C; FRANCISCONI, L S; GONÇALVES, R D M R. Evaluation of Major and Trace Elements in Medicinal Plants. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 12, p. 2273-2289, 2016.
- SINHA, V; PAKSHIRAJAN, K; CHATURVEDI, R. Chromium tolerance, bioaccumulation and localization in plants: An overview. **Journal of Environmental Management**. V. 206, n.15, p. 715-730, 2018.
- SKOOG, D A; WEST, D M; HOLLER, F J; CROUCH, S R. **Fundamentos de Química Analítica**, 1ª ed., Thomson, 2006.
- SMICHOWSKI, P; LONDONIO, A. The role of analytical techniques in the determination of metals and metalloids in dietary supplements: A review. **Microchemical Journal**, v. 136, p.113–120, 2018.
- SOARES, D G S; OLIVEIRA, C B; PAULO, M Q; CARVALHO, M F F P; PADILHA, W W N. Avaliação Clínica e Microbiológica do Tratamento da Estomatite Protética com Tintura de *Schinus terebinthifolius Raddi* (Aroeira). **Pesquisa brasileira em Odontopediatria e Clínica integrada**, v.10, n.3, p.365-370, 2010.
- STREET, R A. Heavy metals in medicinal plant products - An African perspective. **South African Journal of Botany** v. 82, p.67–74, 2012.
- TAPPIN, M R R; LUCCHETTI, L. Sobre a Legislação de Registro de Fitoterápicos Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v.3, nº 01, 2007.
- TEMPLETON, D M; FUJISHIRO, H. Terminology of elemental speciation – An IUPAC perspective. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 352, P. 424-431, 2017.
- The United States Pharmacopeia (USP). **General chapter 233 Elemental impurities**. 2015. Disponível em [http://www.usp.org/sites/default/files/usp\\_pdf/EN/USPNF/key-issues/233\\_ElementalImpuritiesProcedures.pdf](http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/key-issues/233_ElementalImpuritiesProcedures.pdf). Acesso em 13 Ago 2019.
- THOMAIDIS, N S., PIPERAKI, E A. Effect of chemical modifiers on the kinetic parameters characterizing the electrothermal atomization of chromium. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 55, p. 611-627, 2000.
- THOMPSON, M; ELLISON, S L R; FAJGELJ, A; WILLETTS, P; WOOD, R. Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, p.337-348, 1999.

TRIPATHY, V; BASAK, B B; VARGHESE, T S; SAHA, A. Residues and contaminants in medicinal herbs—A review. **Phytochemistry Letters**, v.14, p.67–78, 2015.

URBEN, P G. **Bretherick's Handbook of Reactive Chemical Hazards**. 7<sup>o</sup> ed, v. 1, Elsevier: Burlington, 2007.

VEIGA J R., V F; PINTO, A C; MACIEL, M A M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VINHAL, J O; CASSELLA, R J. Novel extraction induced by microemulsion breaking for Cu, Ni, Pb and V determination in ethanol-containing gasoline by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B** v. 151, p. 33–40, 2019.

VOLYNSKII, A B. Chemical Modifiers in Modern Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Analytical Chemistry**, 58, 905–921, 2003.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3ed., Wiley-VCH, 1999.

WOLSKO, P M; SOLONDZ, D K; PHILLIPS, R S; SCHACHTER, S C; EISENBERG, D M. Lack of herbal supplement characterization in published randomized controlled trials. **The American Journal of Medicine**, v.118, p. 1087-1093, 2005.

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

ZHANG, H; REYNOLDS, M. Cadmium exposure in living organisms: A short review. **Science of the Total Environment**, v. 678, p. 761-767, 2019.



## ANEXO I – ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico publicado proveniente desse projeto:  
<https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1729169>.

ANALYTICAL LETTERS  
<https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1729169>



ATOMIC SPECTROSCOPY



## Cadmium and Chromium Determination in Herbal Tinctures Employing Direct Analysis by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GF-AAS)

Agatha Merilin de Oliveira Lopes<sup>a</sup>, Paula Rocha Chellini<sup>b</sup>, and Rafael Arromba de Sousa<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil; <sup>b</sup>Pharmacy Faculty, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil

### ABSTRACT

In this study, herbal tinctures prescribed by the Brazilian public health system were analyzed for their Cd and Cr concentrations by direct analysis using electrothermal graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS). The acidic decomposition assisted by microwave radiation was employed to evaluate the efficiency of the proposed method, demonstrating no significant differences between the methods. The accuracy of the method was evaluated obtaining adequate recoveries ( $106 \pm 4$ ) % for Cr and ( $108 \pm 4$ ) % for Cd, as well as precision regarding the repeatability with a standard deviation below 10% for both analytes. The proposed method presented limits of detection of  $0.47$  and  $1.3 \mu\text{g kg}^{-1}$  for Cd and Cr, respectively. No matrix effects were observed and, as a result, the external calibration curve was used, demonstrating an important advantage for the method for routine applications. Twenty-one herbal tinctures samples were evaluated, and measurable concentrations of Cd and Cr were present in some of these samples. The Cr concentration varied between  $4.45$  and  $21.4 \mu\text{g kg}^{-1}$ , while the Cd level was from  $0.76$  to  $40.8 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Although these contaminant concentrations may be considered toxic to human beings, they are below the maximal limits permitted by the World Health Organization (WHO) in finished herbal products.

### ARTICLE HISTORY

Received 31 October 2019  
 Accepted 10 February 2020

### KEYWORDS

cadmium; chromium; direct analysis; herbal tinctures; graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS)

## ANEXO B - ATIVIDADES ACADÊMICAS DURANTE O DOUTORADO

### PARTICIPAÇÃO EM SEMINÁRIOS, ENCONTROS, SEMANAS ACADÊMICAS, EXPOSIÇÕES E *WORKSHOP*.

- 2019** Semana da Química. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora- MG
- 2018** *Determinação de As, Cd e Cr por GF AAS em plantas medicinais receitas pelos SUS.* XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química de Minas Gerais, Juiz de Fora- MG.
- 2018** *Influência do processo de preparação de tinturas fitoterápicas nos teores de cromo determinados por GF AAS.* 19º Encontro Nacional de Química Analítica / 7º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, Caldas Novas – GO.
- 2017** *Determinação de minerais, elementos tóxicos e agentes etiológicos em resíduos de estação de tratamento de esgoto para uso como fertilizante.* XXXI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química de Minas Gerais. Universidade Federal de Itajubá, Itajubá- MG.
- 2016** XI Workshop sobre Preparo de Amostras. Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. Piracicaba- SP.
- 2016** I Workshop de Caracterização de Materiais no Estado Sólido. Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora- MG.

### PARTICIPAÇÃO EM BANCAS DE TRABALHOS DE CONCLUSÃO

- 2018** Davi Marques de Farias. Determinação de zinco em amostras de *Whey Protein* por voltametria de onda quadrada. Graduação em Química - Universidade Federal de Juiz de Fora.

### PRODUÇÃO TÉCNICA

- 2017** Apostila: Preparação De Amostras Para Análise Elementar. Disciplina de pós-graduação Química Analítica Avançada, UFJF.
- 2019** Minicurso: Como determinar metais em amostras do cotidiano. Universidade Federal de Juiz de Fora. Carga horária: 2 horas.

### ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

- 2018** XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química. Universidade Federal de Juiz de Fora.