

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Victor Wagner Bechir Diniz

**DETERMINAÇÃO E ESPECIAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM PLANTAS  
MEDICINAIS COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE BELÉM-PA**

Tese  
581.6340981  
D 585  
Ex: 01



Tese  
581.6340981  
D 585  
Ex: 01

Belém  
2012

Victor Wagner Bechir Diniz



**DETERMINAÇÃO E ESPECIAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM PLANTAS  
MEDICINAIS COMERCIALIZADAS NA CIDADE DE BELÉM-PA**

Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutor em Química. Área de concentração: Química Analítica. Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Ciências Exatas e Naturais. Universidade Federal do Pará.

Orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.: Kelly das Graças Fernandes Dantas.

Belém  
2012

Victor Wagner Bechir Diniz

## **DETERMINAÇÃO E ESPECIAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO EM PLANTAS**

### **MEDICINAIS**

Tese apresentada para a obtenção do grau de Doutor em Química. Área de concentração: Química Analítica. Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Ciências Exatas e Naturais. Universidade Federal do Pará.

Data de apresentação: 22 de novembro de 2012

Conceito: \_\_\_\_\_

#### **Banca Examinadora**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>.: Kelly das Graças Fernandes Dantas  
Faculdade de Química / UFPA – Orientadora

---

Prof. Dr.: Heronides Adonias Dantas Filho  
Faculdade de Química / UFPA – co-orientador

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>.: Marta Helena Tavares Pinheiro  
Faculdade de Química / UFPA – Membro

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>.: Regina Celi Sarkis Müller  
Faculdade de Química / UFPA – Membro

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>.: Cássia Regina Rosa  
CCSE / UEPA – Membro

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>.: Laura Figueiredo Abreu  
EMBRAPA – Membro

Ao meu Pai e à minha Mãe, que sempre me incentivaram e nunca mediram esforços para me oferecer coisas que eles não tiveram a oportunidade de alcançar.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e pela graça de me conceder mais esta vitória.

À Universidade Federal do Pará, pelo curso oferecido.

À FAPESPA, pela bolsa de doutorado.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Kelly das Graças Fernandes Dantas, pela competente orientação, acompanhamento e incentivo científico em minha trajetória.

Ao Prof. Dr. Heronides Dantas, co-orientador, pela contribuição na parte de planejamento experimental e quimiometria.

Aos professores membros da banca examinadora, pelas suas excelentes contribuições.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Dulcidéia Palheta, por ter cedido gentilmente seu laboratório para efetuarmos parte das análises.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Regina Müller, por ter cedido gentilmente seu laboratório para efetuarmos parte das análises.

Aos colegas do Grupo de Espectrometria Analítica Aplicada (GEAAp), pelo companheirismo e ajuda ao longo deste período.

À Dr<sup>ª</sup>. Cleide Samara Mescouto, pela paciência, partilha de conhecimento, companheirismo, carinho e amizade que vem se fortalecendo desde os tempos de mestrado.

Aos amigos da UFPA, Márcia Freitas, Mariana Müller, Natália Gomes, Márcia Cristina, Prof. M.Sc. Afonso Mendes, pelo incentivo, apoio e por serem ombro amigo nos momentos de cansaço.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Regina Celi Sarkis Müller e ao Prof. M.Sc. Reginaldo Wanghon Monteiro, que sempre me incentivaram na vida profissional e pessoal.

Aos meus pais, que sempre foram meu porto seguro, meus incentivadores, meus exemplos e que a cada dia eu os admiro mais e mais.

À toda a minha família, que fica na torcida, emanando uma energia que me leva sempre mais adiante.

À minha namorada Valéria Soares, que dividiu comigo todos os momentos desta luta.

Aos membros da Pastoral da Juventude (PJ) da paróquia de Santa Teresinha, que me acompanharam neste trabalho com suas orações, o meu muito obrigado.

SENHOR, como se têm multiplicado os meus adversários! São muitos os que se levantam contra mim. Muitos dizem da minha alma: Não há salvação para ele em Deus. Porém tu, SENHOR, és um escudo para mim, a minha glória, e o que exalta a minha cabeça. Com a minha voz clamei ao SENHOR, e ouviu-me desde o seu santo monte. Eu me deitei e dormi; acordei, porque o SENHOR me sustentou. Não temerei dez milhares de pessoas que se puseram contra mim e me cercam. Levanta-te, SENHOR; salva-me, Deus meu; pois feriste a todos os meus inimigos nos queixos; quebraste os dentes aos ímpios. A salvação vem do SENHOR; sobre o teu povo seja a tua bênção. (Salmo 3)

## RESUMO

Este estudo apresenta a determinação de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn em dez plantas medicinais da Amazônia, pariri (*Arrabidaea chica*), aroeira (*Schinus terebinthifolia*), insulina (*Cissus sicyoides*), unha de gato (*Uncaria tomentosa*), graviola (*Annona muricata*), peão branco (*Jatropha curcas*), malva branca (*Sida cryphiopetala*), lacre (*Vismia guianensis*), perpétua roxa (*Gomphrena globosa*) e vinagreira roxa (*Hibiscus sabdariffa*), comercializadas na cidade de Belém-PA. As amostras foram digeridas com HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em bloco digestor e os chás foram feitos com água desionizada fervente, as amostras foram analisadas em FAAS e a exatidão foi avaliada com material de referência certificado GBW07604, os resultados foram interpretados com o auxílio de PCA e HCA, que permitiram evidenciar a alta correlação entre Cu e Fe e também entre Ca, Mg, Mn e Zn. Nas amostras digeridas os teores variaram entre 1,9-26,3% para o Ca, 4,0-10,6 µg g<sup>-1</sup> de Cu, 99,1-345,2 µg g<sup>-1</sup> de Fe, 0,14-1,6% de Mg, 9,6-154,7 µg g<sup>-1</sup> de Mn e 9,4-216,2 µg g<sup>-1</sup> de Zn. Nos chás, os teores variaram de 0,33-2,4% de Ca, 0,5-2,1 µg g<sup>-1</sup> de Cu, 1,5-30,2 µg g<sup>-1</sup> de Fe, 0,03-0,95% de Mg, 2,9-49,1 µg g<sup>-1</sup> de Mn e 1,2-60,7 µg g<sup>-1</sup> de Zn. insulina, graviola, peão Branco e fruta pão (*Artocarpus altilis*) são plantas medicinais usadas no tratamento de diabetes. Foi avaliado o teor de Cr (VI) nestas amostras. A metodologia utilizada extraiu o Cr (VI) das folhas destas plantas com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e posteriormente foi analisado por GF AAS juntamente com seus digeridos, que sofreram o processo de abertura em micro-ondas com auxílio de HNO<sub>3</sub> 50% (v/v) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em condições previamente avaliada e ajustada. As amostras analisadas não apresentaram riscos de contaminação de Cr (VI) para os seus consumidores. Os teores de Cr variaram entre 733,26-2449,29 µg Kg<sup>-1</sup> nos digeridos, 46,20-363,78 µg Kg<sup>-1</sup> para o Cr (VI) total e 41,09-309,03 µg Kg<sup>-1</sup> para o Cr (VI) solúvel em água. A metodologia de extração de Fe<sup>2+</sup> por ponto nuvem usando APDC como complexante foi otimizada com o intuito de se buscar a condição que apresente a máxima quantidade de Fe<sup>2+</sup> e a mínima quantidade de Fe<sup>3+</sup>, posteriormente esta condição foi testada em seis amostras de plantas medicinais da Amazônia, Pariri, Insulina, Unha de gato, Graviola, Peão branco e Vinagreira roxa, sendo que em cinco delas não foi detectado o Fe<sup>2+</sup>, somente a amostra de vinagreira que apresentou 5,34 µg g<sup>-1</sup> de Fe<sup>2+</sup>.

Palavras-chave: Especificação, plantas medicinais, metodologia analítica

## ABSTRACT

This study presents the determination of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn in ten medicinal herbs from the Amazon, pariri (*Arrabidaea chica*), aroeira (*Schinus terebinthifolia*), insulina (*Cissus sicyoides*), unha de gato (*Uncaria tomentosa*), graviola (*Annona muricata*), peão branco (*Jatropha curcas*), malva branca (*Sida cryphiopetala*), lacre (*Vismia guianensis*), perpétua roxa (*Gomphrena globosa*) e vinagreira roxa (*Hibiscus sabdariffa*), marketed in the city of Belém-PA. The samples were digested with HNO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in block digester and tea were made with deionized water boiling, samples were analyzed by FAAS and the accuracy was evaluated with certified reference material GBW07604, the results were interpreted with the aid of PCA and HCA, which made it possible to highlight the high correlation between Cu and Fe and also between Ca, Mg, Mn and Zn. In the sample digested the levels ranged from 1.9-26.3% for Ca, 4.0-10.6 µg g<sup>-1</sup> of Cu, 99.1-345.2 µg g<sup>-1</sup> of Fe, 0.14-1.6% of Mg, 9.6-154.7 µg g<sup>-1</sup> of Mn and 9.4-216.2 µg g<sup>-1</sup> of Zn. In teas, levels ranged from 0.33-2.4% for Ca, 0.5-2.1 µg g<sup>-1</sup> of Cu, 1.5-30.2 µg g<sup>-1</sup> of Fe, 0.03-0.95% of Mg, 2.9-49.1 µg g<sup>-1</sup> of Mn and 1.2-60.7 µg g<sup>-1</sup> of Zn. insulina, graviola, peão branco e fruta pão (*Artocarpus altilis*) are medicinal herbs used in the treatment of diabetes. Was evaluated the content of Cr (VI) in these samples. The methodology extracted Cr (VI) from the leaves of these herbs with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and then was analyzed by GF AAS together with their digested, they suffered the opening process in the microwave with the aid of HNO<sub>3</sub> 50% (v/v) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> under conditions previously evaluated and adjusted. The samples tested showed no risks of contamination of Cr (VI) to its consumers. Cr levels ranged between from 733.26-2449.29 µg kg<sup>-1</sup> in digested, 46.20-363.78 µg kg<sup>-1</sup> for Cr (VI) total and 41.09-309.03 µg kg<sup>-1</sup> for Cr (VI) in water soluble. A method for extraction of Fe<sup>2+</sup> by cloud point using APDC as complexing was optimized in order to find the condition which that the maximum amount of Fe<sup>2+</sup> and the minimum amount of Fe<sup>3+</sup> later this condition was tested in six samples of medicinal herbs from Amazon Pariri, Insulina, Unha de gato, Graviola, Peão branco e Vinagreira roxa and in five of them was not detected Fe<sup>2+</sup>, only a sample of Vinagreira roxa which showed 5.34 µg g<sup>-1</sup> of Fe<sup>2+</sup>.

Keywords: Speciation, medicinal plants, analytical methodology

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	p.
FIGURA 1. Pariri .....	37
FIGURA 2. Aroeira .....	37
FIGURA 3. Insulina .....	38
FIGURA 4. Unha de gato .....	38
FIGURA 5. Graviola .....	39
FIGURA 6. Peão branco .....	39
FIGURA 7. Malva branca .....	40
FIGURA 8. Lacre .....	40
FIGURA 9. Perpétua roxa .....	41
FIGURA 10. Vinagreira roxa .....	41
FIGURA 11. Análise de Componentes Principais nas plantas medicinais estudadas. Scores (a) e Loadings (b) .....	55
FIGURA 12. Dendograma obtido na análise hierárquica de agrupamento .....	57
FIGURA 13. Fruta pão .....	67
FIGURA 14. Curvas de pirólise e atomização para o cromo .....	75
FIGURA 15. Formação do ponto nuvem .....	86
FIGURA 16. Fluxograma de extração de $\text{Fe}^{2+}$ nas amostras .....	97
FIGURA 17. Gráfico de pareto .....	102
FIGURA 18. Gráfico de superfície relacionando NaCl e SDS com a recuperação de $\text{Fe}^{2+}$ .....	103
FIGURA 19. Gráfico de superfície relacionando pH e SDS com a recuperação de $\text{Fe}^{2+}$ .....	104
FIGURA 20. Gráfico de superfície relacionando NaCl e pH com a recuperação de $\text{Fe}^{2+}$ .....	104

## LISTA DE TABELAS

	p.
TABELA 1 – Valores recomendados para a ingestão diária de alguns elementos (mg/dia).....	24
TABELA 2 – Condições experimentais para a análise de elemental por FAAS .....	42
TABELA 3 – Amostras com seus nomes populares, código de identificação e a finalidade medicinal .....	44
TABELA 4 – Teores médios encontrados de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn com seus respectivos desvios-padrão (SD) no material de referência certificado (GBW 07604) por FAAS, a recuperação e os limites de detecção e quantificação .....	47
TABELA 5 – Teores de metais e seus desvios-padrão (n=3) para as plantas estudadas .....	48
TABELA 6 – Valores recomendados para a ingestão diária de cromo ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ ) .....	63
TABELA 7 – Programação do micro-ondas .....	70
TABELA 8 – Programa de aquecimento do forno de grafite .....	72
TABELA 9 – Otimização das condições experimentais de digestão das amostras usando micro-ondas com cavidade .....	73
TABELA 10 – Valores de cromo nas amostras em $\mu\text{g Kg}^{-1}$ .....	76
TABELA 11 – Delineamento experimental .....	95
TABELA 12 – Condições experimentais para a extração de ferro ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) com APDC por ponto nuvem .....	99
TABELA 13 – ANOVA dos dados de otimização .....	101
TABELA 14 – Condições experimentais para a extração de ferro ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) com PAN por ponto nuvem .....	105
TABELA 15 – Teores de Fe total e $\text{Fe}^{2+}$ nas infusões das amostras de pariri ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) .....	107
TABELA 16 – Teores de Fe total e $\text{Fe}^{2+}$ nas amostras de plantas medicinais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) .....	109

## LISTA DE SIGLAS

ARC	Aroeira chá
ARD	Aroeira digerido
APDC	Ácido pirrolidinacarboditióico amônio
EDXRF	Fluorescência de Raio-X por dispersão de energia
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama
FAES	Espectrometria de emissão atômica com chama
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite
GRC	Graviola chá
GRD	Graviola digerido
HCA	Análise Hierárquica de agrupamento
ICP-AES	Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
INC	Insulina chá
IND	Insulina digerido
LAC	Lacre chá
LAD	Lacre digerido
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MBC	Malva branca chá
MBD	Malva branca digerido
PAC	Pariri chá
PAD	Pariri digerido
PAN	1-(2-pyridylazo)-2 naphthol
PBC	Perpétua roxa chá
PBD	Perpétua roxa digerido
PC	Componente principal
PCA	Análise de componentes principais
PEC	Peão branco chá
PED	Peão branco digerido
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TRITON X-100	Octyl phenol ethoxylate
UGC	Unha de gato chá
UGD	Unha de gato digerido
VRC	Vinagreira roxa chá
VRD	Vinagreira roxa digerido

## SUMÁRIO

	p.
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1. IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS E DA ANÁLISE ELEMENTAR .....	14
1.2. OBJETIVO GERAL .....	20
<b>CAPÍTULO 2: CLASSIFICAÇÃO MULTIVARIADA DE PLANTAS MEDICINAIS DA REGIÃO AMAZÔNICA E SUAS INFUSÕES DE ACORDO COM A COMPOSIÇÃO MINERAL</b> .....	21
2.1. REVISÃO DA LITERATURA .....	22
<b>2.1.1. Elementos metálicos</b> .....	22
2.2. CÁLCIO .....	24
2.3. COBRE .....	25
2.4. FERRO .....	27
2.5. MAGNÉSIO .....	28
2.6. MANGANÊS .....	29
2.7. ZINCO .....	30
2.8. A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS .....	31
2.9. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA .....	33
2.10. ANÁLISE MULTIVARIADA .....	34
2.11. AS PLANTAS MEDICINAIS ESTUDADAS .....	36
2.12. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
2.13. METODOLOGIA .....	42
<b>2.13.1. Instrumentação</b> .....	42
<b>2.13.2. Reagentes e soluções</b> .....	43
<b>2.13.3. Amostras</b> .....	43
<b>2.13.4. Preparo das amostras</b> .....	45
<b>2.13.5. Digestão das amostras</b> .....	45
<b>2.13.6. Preparação das infusões</b> .....	46
<b>2.13.7. Análise elementar</b> .....	46
<b>2.13.8. Análise dos resultados</b> .....	47
2.14. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
2.15. CONCLUSÃO .....	58
<b>CAPÍTULO 3: DETERMINAÇÃO DE CROMO EM PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA USADAS NO TRATAMENTO DE DIABETES</b> .....	60
3.1. REVISÃO DA LITERATURA .....	61
<b>3.1.1. A importância do elemento cromo</b> .....	61
<b>3.1.2. Cromo em plantas medicinais</b> .....	64
<b>3.1.3. Extração de Cr<sup>6+</sup> com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b> .....	65
<b>3.1.4. Plantas medicinais estudadas</b> .....	66
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	67
3.3. METODOLOGIA .....	68
<b>3.3.1. Instrumentação</b> .....	68
<b>3.3.2. Reagentes e soluções</b> .....	68

3.3.3. Amostras .....	69
3.3.4. Preparo das amostras .....	69
3.3.5. Digestão das amostras .....	70
3.3.6. Extração do Cr (VI) solúvel em água .....	70
3.3.7. Extração do Cr (VI) total .....	71
3.3.8. Análise elementar .....	71
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	73
3.5. CONCLUSÃO .....	81
<b>CAPÍTULO 4: EXTRAÇÃO DE Fe<sup>2+</sup> EM PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA USANDO EXTRAÇÃO POR PONTO NUVEM .....</b>	<b>82</b>
4.1. REVISÃO DA LITERATURA .....	83
4.1.1. A importância do ferro .....	83
4.1.2. Extração e pré-concentração com micelas – Ponto nuvem .....	84
4.1.2.1. Efeito do pH no ponto nuvem .....	88
4.1.2.2. Efeito da concentração do surfactante no ponto nuvem .....	88
4.1.2.3. Efeito da temperatura no ponto nuvem .....	89
4.1.2.4. Efeito da força iônica (concentração do eletrólito) no ponto nuvem .....	90
4.1.2.5. Efeito do agente quelante no ponto nuvem .....	90
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	91
4.3. METODOLOGIA .....	92
4.3.1. Instrumentação .....	92
4.3.2. Reagentes e soluções .....	93
4.3.3. Otimização das condições experimentais para a extração por ponto nuvem.....	94
4.3.4. Amostras .....	94
4.3.5. Preparo das amostras .....	96
4.3.6. Preparo das infusões .....	96
4.3.7. Extração de Fe <sup>2+</sup> por ponto nuvem em plantas medicinais .....	97
4.3.8. Análise elementar .....	98
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	88
4.5. CONCLUSÃO .....	110
<b>CAPÍTULO 5: REFERÊNCIAS .....</b>	<b>111</b>

## *CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO*

## 1.1. IMPORTÂNCIA DAS PLANTAS MEDICINAIS E DA ANÁLISE ELEMENTAR

Desde os tempos mais remotos e imemoráveis, o homem vem se beneficiando de plantas medicinais para curar as doenças e mazelas que o acometem. Com o passar do tempo o homem foi adquirindo experiência na seleção e utilização de plantas para aliviar seus males (MACIEL *et al.* 2002; FERREIRA; PINTO,2010).

As plantas medicinais são aquelas que apresentam alguma propriedade medicinal em potencial, várias partes de uma planta medicinal podem ser utilizadas, como raiz, caule, folhas, flores, frutos, sementes ou seiva (BLICHARSKA *et al.* 2010). Estas plantas tem a capacidade de produzir compostos farmacologicamente ativos que auxiliam na cura de doenças e por isso podem ser usados como alternativa para tratamentos da saúde humana (KOLASANI; XU; MILIKAN, 2011). As plantas medicinais podem ser utilizadas de várias formas, como chá, infusão, decocção, maceração, cataplasma, emplasto, garrafada entre outros (LORENZI; MATOS, 2008).

Muitas pessoas utilizam plantas medicinais para tratar ou mesmo prevenir doenças (RAZIC, 2005), já que a medicina popular tem uma quantidade muito grande de exemplos que comprovam a sua eficácia. Mesmo assim, ainda se observa um grande número de pessoas que ainda recorrem as plantas medicinais quando apresentam sintomas de alguma enfermidade (SILVA; FILHO, 2002). As plantas medicinais devem ser selecionadas de acordo com a sua eficácia, segurança terapêutica e principalmente com a comprovação científica, pois são um medicamento quando usadas corretamente (LORENZI; MATOS, 2008).

As plantas medicinais têm um espaço garantido entre a população, especialmente entre aqueles que não tem acesso ao atendimento primário de saúde. Uma série de fatores são

levados em conta na utilização das plantas medicinais em comparação aos medicamentos convencionais, entre eles destaca-se o baixo efeito colateral ou contra indicação, o preço mais acessível, a preferência por terapias naturais e a tendência a auto medicação (PETRONILHO *et al.* 2012; YUNES; CALIXTO, 2001).

Um número considerável de pesquisas envolvendo plantas medicinais tem sido realizadas, mas o Brasil, mesmo com a rica herança indígena que usa prioritariamente as plantas como medicamentos, ainda estuda pouco as suas plantas medicinais (ALMEIDA *et al.* 2002).

As práticas indígenas e as contribuições africanas foram as principais bases que alicerçaram a tradição do uso de plantas medicinais no Brasil. Esta tradição se estende até os dias atuais (REIS, *et al.* 2010).

A heterogeneidade e a dimensão do território amazônico contribuem para a dificuldade na identificação e catalogação das espécies vegetais existentes, mas os seus habitantes nativos, os índios, são guardiões dos “mistérios” e saberes. Como o conhecimento sobre as plantas é transmitido oralmente, o uso foi sendo aperfeiçoado para as gerações seguintes obedecendo o método da tentativa e erro (BRITO; BRITO, 1993).

Os indígenas relatam que os espíritos da mata dizem aos pajés (durante os rituais de cura) quais as plantas deve ser utilizadas, a forma de preparação e a dosagem adequada para cada tipo de doença, demonstrando assim o caráter místico que as plantas medicinais desempenham na vida dos amazônidas.

Diversas são as formas de utilização das plantas medicinais, sendo que na Amazônia a planta medicinal fresca, recém-colhida ou mesmo seca é mais comumente utilizada, apesar do crescente mercado de fitoterápicos industrializado. Ainda se valoriza bastante a compra com os “raizeiros”, que em muitas vezes são quem indicam ou “receitam” a forma de utilização (LORENZI; MATOS, 2008). As vendedoras de plantas medicinais do mercado do Ver-o-

Peso, na capital paraense, por exemplo, indicam diversas plantas para os mais diversos males e em alguns casos, indicam até mesmo mistura de plantas para serem tomadas como preparados conhecidos como “garrafadas”, mas a indicação mais comum são os chás, quentes ou gelados, de uma ou várias plantas.

O chá é uma bebida bastante consumida no mundo inteiro (SOOROM, *et al.* 2008) e pode ser preparado para o consumo a partir de uma única erva ou mesmo de uma mistura de ervas (SCHULZ, 2002). O chá de plantas medicinais é importante na saúde preventiva e como tratamento auxiliar das mais diversas doenças (OBIAJUNWA, *et al.* 2001).

A preparação dos chás pode ser realizada de três formas, a infusão, a decocção e a maceração. A infusão é a técnica mais utilizada que consiste na adição de água fervente sobre uma quantidade específica de erva e em seguida é coberta e deixada em repouso por um período de 5 – 10 minutos, até chegar a temperatura adequada para ser bebido. A decocção consiste em colocar a erva em água fria e depois levá-la a fervura por um período que pode variar de 5 a no máximo 20 minutos, dependendo da parte vegetal que está sendo utilizada, após esta etapa deixa-se em repouso e seguida o decocto é coado. A maceração consiste em amassar ou picar a erva e em seguida descansá-la em água fria por um período compreendido entre 6 e 24 horas, dependendo da parte utilizada, em seguida o macerado é coado (SCHULZ, 2002; LORENZI; MATOS, 2008).

As infusões são indicadas para folhas frescas ou secas. Os decoctos são indicados para aquelas partes mais duras das erva medicinais como cascas raízes e sementes. A maceração pode ser utilizada para as mais variadas partes, diferenciando o tempo de permanência em contato com água, folhas, sementes e partes mais tenras são necessários um tempo máximo de 12 horas, enquanto que talos, cascas e raízes duras necessitam de até 24 horas de contato com água (LORENZI; MATOS, 2008).

Os chás devem ser preparados preferencialmente em doses individuais. Há casos em que se prepara uma quantidade um pouco maior de chá, que não será consumida de imediato, neste caso se recomenda que ele seja consumido no mesmo dia, e que seja armazenado na geladeira em frasco bem tampado (LORENZI; MATOS, 2008).

A dosagem recomendada para os chás deve ser de no máximo três xícaras por dia e por um período máximo de 3 a 4 semanas, não se recomenda o uso constante dos chás devido muitas de suas propriedades serem baseadas em evidências empíricas e também pelo fato de que ainda há carência de estudos experimentais sobre a toxicidade dos chás (SCHULZ, 2002).

A composição elementar de plantas medicinais tem sido objeto de estudo de cientistas em todas as partes do mundo. Uma das razões que levam a estes estudos é o risco de contaminação por metais pesados. Porém, também é objeto de investigação os teores de macro e micronutrientes em plantas medicinais, que podem se apresentar como uma alternativa para a suplementação de metais no organismos, ou mesmo auxiliar no tratamento de doenças, uma vez que eles estão envolvidos em uma série de processos metabólicos no corpo humano. É importante ressaltar que níveis elevados de metais no corpo humano podem ser perigosos ou tóxicos ao organismo (KONIECZYNSKI; WESOLOWSKI, 2007; SILVA, et al, 2010).

Os elementos traço desempenham um importante papel para a formação de compostos ativos em plantas medicinais e também tem muitas funções importantes no organismo humano, mas é importante se conhecer o estado de oxidação do elemento estudado, ou seja, é importante se realizar estudos de especiação química, onde se pode conhecer em qual concentração se encontra um elemento químico em um estado de oxidação específico na amostra estudada (KOLASANI; XU; MILIKAN, 2011; MICHALKE, 2003).

A utilização de plantas medicinais é muito comum na Amazônia, porém, não há muitos estudos sobre os teores de metais neste tipo de amostras. Sabe-se que alguns metais como o cromo, por exemplo, pode ser tóxico para o homem e este metal pode estar presente em quantidades relevantes nas plantas medicinais.

Constituintes tóxicos para a espécie humana podem estar presentes nas plantas medicinais, que apesar de serem produtos naturais podem ocasionar efeitos adversos aos seus usuários, como toxicidade, reações alérgicas e interações com outros medicamentos que podem ser acentuadas ou atenuadas pela dosagem incorreta (GJORGIEVA, *et al.* 2010; YUNES; CALIXTO, 2001).

Entre as inúmeras plantas medicinais ofertadas pela rica flora Amazônica, pode-se destacar para o tratamento de diabetes as folhas da insulina, da graviola, do peão branco e da fruta pão, que são plantas medicinais facilmente encontradas nas feiras livres e lojas de venda de plantas da capital paraense. O chá das folhas destas plantas são bastante consumidas por diabéticos na esperança de aliviar este mal que atinge, aproximadamente, 130 milhões de pessoas em todo o mundo (OLABANJI, *et al.* 2008; LORENZI; MATOS, 2008).

O cromo é um elemento que pode oferecer risco ou alguns benefícios para o homem, dependendo do estado de oxidação em que se encontra. O  $\text{Cr}^{3+}$  desempenha importante papel no metabolismo do açúcar e de lipídios em humanos, enquanto que o  $\text{Cr}^{6+}$  é extremamente tóxico e cancerígeno. Portanto é de fundamental importância a técnica de especiação do cromo em matrizes como plantas medicinais, que são utilizadas pela população. Para identificar o íon  $\text{Cr}^{6+}$  é usado a técnica de extração em meio alcalino usando o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , que separa as formas do  $\text{Cr}^{6+}$  solúvel do  $\text{Cr}^{3+}$  que precipita na forma de carbonatos e hidróxidos (ELCI, *et al.* 2010; PANICHEV, *et al.* 2005).

A determinação de elementos traço em matrizes complexas que apresentam baixas concentrações têm se tornado um problema em química analítica. Uma saída é a pré-concentração destes analitos que se encontram em níveis traço. As primeiras técnicas usadas para isso foram a precipitação, a coprecipitação e a destilação (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005).

Procedimentos de separação e pré concentração são de grande importância na química analítica e na química ambiental, pois estes procedimentos permitem a eliminação ou a minimização dos efeitos de concomitantes e efeitos da matriz, reduz o limite de detecção para muitos metais em varias técnicas, melhorando assim, a detecção de muitos metais (BEZERRA; ARRUDA; FERREIRA, 2005).

O uso de ambientes micelares não iônicos têm recebido especial atenção ultimamente para técnicas de pré concentração e separação em química analítica (TANI; KAMIDATE; WATANABE, 1997). A utilização de extração e pré concentração por ponto nuvem tem ganhado grande destaque no cenário mundial por ser um procedimento que têm se mostrado eficiente para as mais variadas e complexas matrizes.

Para este estudo foi selecionado folhas de onze plantas medicinais comercializadas na região metropolitana de Belém-PA, pariri, aroeira, insulina, unha de gato, graviola, peão branco, malva branca, lacre, perpétua roxa, vinagreira roxa e fruta pão. As plantas foram adquiridas no mercado do Ver-O-Peso. O critério de seleção de compra das ervas foi baseado na indicação dada pelas vendedoras para a cura de anemia e diabetes. Assim, buscou-se investigar plantas medicinais consumidas pela população de acordo com a tradição oral e com a indicação popular, fato muito comum na Amazônia como um todo.

## 1.2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi a determinação de constituintes inorgânicos e especiação de cromo e ferro em plantas medicinais comercializadas na Amazônia.

*CAPÍTULO 2:*

*CLASSIFICAÇÃO MULTIVARIADA DE  
PLANTAS MEDICINAIS DA REGIÃO  
AMAZÔNICA E SUAS INFUSÕES DE  
ACORDO COM SUA COMPOSIÇÃO  
MINERAL*

## 2.1. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1.1. Elementos metálicos

Através dos alimentos são ingeridas várias substâncias importantes para o bom funcionamento do corpo humano. Entre estas substâncias temos os elementos metálicos, os quais desempenham um papel muito importante para a saúde do homem. Um desequilíbrio nas quantidades destes elementos pode ocasionar uma série de problemas ou até mesmo doenças que podem ocasionar transtornos para a saúde (SOOMRO, *et al.* 2008).

Aproximadamente 4 % da porção sólida do corpo humano é formada por minerais. Em condições normais, entre 20 a 30 g destes minerais são excretados diariamente pelo corpo, sendo que a reposição imediata é feita a partir dos alimentos. Como os alimentos apresentam concentrações variadas dos mais diversos metais, deve-se ter um cuidado constante, pois variações de alguns elementos podem torná-lo tóxico ao homem (FRANCO, 2005).

Os elementos podem ser classificados como macronutrientes (Ca, Cl, S, P, Mg, K, Na) ou micronutrientes (Co, Cu, Cr, Sn, Fe, F, I, Mn, Mo, Ni, Se, Si, V, Zn) (FRANCO, 2005). Muitos elementos são considerados essenciais para a nutrição humana e desempenham importantes papéis no organismo como formadores de ossos, dentes e tecidos; ativadores de reações metabólicas catalisadas por enzimas e componentes de enzimas, proteínas e carboidratos complexos. São também necessários para o bom funcionamento e manutenção do sistema imunológico (ALMEIDA, *et al.* 2002; KOLASANI, XU, MILIKAN, 2011).

Nos vegetais de um modo geral, há uma série de processos que dependem direta ou indiretamente dos minerais (também chamados de elementos essenciais). Os teores destes

minerais sofrem grandes variações principalmente por influência da espécie da planta, genótipo, condições de desenvolvimento, diferentes órgãos e tecidos da mesma planta, estágio de maturação, condições do solo e sazonalidade. Há elementos que dependendo da concentração em que se apresenta na planta desempenham diferentes papéis no seu desenvolvimento (RAZIC, *et al.* 2005).

Em solos ácidos pode ocorrer uma quantidade expressiva de alguns metais que podem ser prontamente absorvidos pelas plantas, outros metais podem estar presentes em concentrações elevadas devido as contaminações ocasionada pela agricultura, mineração ou atividade industrial (KOPITTKE *et al.* 2010). A sazonalidade pode influenciar no teor de metais nas plantas devido, por exemplo, o excesso de chuvas pode lixiviar do solo nutrientes utilizados pelas plantas ou mesmo lixiviar substâncias hidrossolúveis das folhas e raízes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

As plantas medicinais são utilizadas para a produção dos mais variados remédios na medicina popular e os poucos estudos que envolvem estas matrizes são focados, em sua maioria, no isolamento e teste das propriedades farmacológicas de algumas substâncias orgânicas, que podem conferir alguma propriedade terapêutica a mesma. Estudos sobre os teores de metais em plantas medicinais ainda são muito raros, porém, é um campo que merece uma especial atenção, pois é conhecido que os metais são de suma importância para a saúde humana e eles se acumulam em diferentes partes da planta (CHUPARINA; AISUEVA, 2011).

Devido a grande utilização de infusões de plantas medicinais para tratar diversas doenças, muitos estudos têm surgido a fim de se determinar os teores de metais nas infusões e assim poder avaliar os riscos de toxicidade destas plantas, ou mesmo indicarem os chás como aliados na suplementação mineral, uma vez que as plantas podem acumular metais e estes

podem ser disponibilizados para os chás, que serão ingeridos pelo homem (MEENA, *et al.* 2010; KARAK; BHAGAT, 2010).

Entre os metais estudados estão cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês e zinco. Na Tabela 1 é mostrado as quantidades destes metais, em mg/dia, que devem ser ingeridas diariamente de acordo com a faixa etária.

Tabela 1 – Valores recomendados para ingestão diária de alguns elementos (mg/dia)

	Ca	Cu	Fe	Mg	Mn	Zn
Lactentes 0 a 1 ano	400 – 600	0,4 – 0,7	6 – 10	40 – 60	0,3 – 1,0	5
Crianças 1 a 10 anos	800	0,7 – 2,0	10	80 – 170	1 – 3	10
Adolescentes 11 a 18 anos	1200	1,5 – 2,5	12 (H) 15 (M)	270 – 400 (H) 280 – 300 (M)	2 - 5	15 (H) 12 (M)
Adultos	800 – 1200	1,5 – 3,0	10 (H) 15 (M)	350 (H) 280 (M)	2 – 5	15 (H) 12 (M)
Gravidez	1200	*	30	320	*	15
Lactação	1200	*	15	340 – 355	*	16 – 19

\* Valores não reportados.

H: Homens M: Mulheres

(ADAPTADO DE FRANCO, 2005)

## 2.2. CÁLCIO

O cálcio é absorvido do solo através das raízes como  $\text{Ca}^{2+}$  e transportado principalmente para as folhas, onde tem sua mobilidade reduzida. Este elemento é parte integrante da parede celular, conferindo a esta rigidez e controlando o seu crescimento, além de controlar também o volume celular e a absorção iônica (MALAVOLTA, 1980).

No corpo humano, o cálcio é o quinto mineral mais abundante, sendo a grande maioria encontrada nos ossos e dentes. A absorção no corpo humano é fortemente influenciada pela presença de vitamina D e também pelo pH ácido da parte superior do trato gastrointestinal. A absorção pode sofrer decréscimos devido a presença de grandes quantidades de lipídios, fitatos, oxalatos e glicocorticoides. A excreção se dá principalmente por via urinária, fecal e suor, numa taxa de aproximadamente 150, 100 e 15 mg dia<sup>-1</sup>, respectivamente (FRANCO, 2005).

Nos ossos e nos dentes, o cálcio se encontra na forma de hidroxiapatita. São os ossos responsáveis pelo maior parte do cálcio presente no organismo humano. Ele tem um importante papel no processo de coagulação sanguínea, nos movimentos de contração e relaxamento muscular e mantém o batimento regular do coração. A carência de cálcio no organismo pode ocasionar convulsões e hipersensibilidade muscular, por outro lado, o seu excesso pode ocasionar náuseas, vômito, anorexia, coma, sede, falta de coordenação motora, hipertensão, fraqueza muscular e diminuição da função renal crônica (FRANCO, 2005; LEE, 2001).

### 2.3. COBRE

O cobre no solo esta quase exclusivamente na forma de Cu<sup>2+</sup>, forma na qual ele é absorvido pelas plantas e onde desempenha as funções de síntese de proteínas, metabolismo de carboidratos e fixação simbiótica do nitrogênio. As principais funções das enzimas que contem cobre são a doação de elétrons para a clorofila e transporte de elétrons na respiração. A proteína plastocianina ocorre no cloroplasto das plantas verdes e contem um átomo de

cobre que atua como um transportador de elétrons importante na fotossíntese (LEE, 2001; MALAVOLTA, 1980; KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 1986)

Um adulto têm, em média, 100 mg de cobre em seu organismo. Este elemento é o terceiro metal de transição mais abundante no corpo humano, onde encontra-se distribuído principalmente pelo fígado, ossos, coração, rins e sistema nervoso, sendo que uma quantidade diminuta está presente no plasma sanguíneo associado às proteínas. Na dieta diária são necessários cerca de 4 a 5 mg de cobre (FRANCO, 2005; LEE, 2001).

A absorção e o transporte do cobre é comprometido em indivíduos portadores de um defeito genético conhecido como síndrome de Menkes, caracterizada por deterioração mental progressiva, defeito na queratinização normal da pele e baixos níveis de cobre no soro e no fígado, associando a isso reduzida atividade de várias enzimas cobre-dependentes. Outra doença relacionada ao cobre é a doença de Wilson, uma deficiência hereditária de ceruloplasmina, ela é caracterizada por produzir modificações degenerativas no cérebro e tecido hepático acumulando grandes quantidades de cobre no fígado, cérebro, rins e córnea (FRANCO, 2005; LEE, 2001; KARAK; BHAGAT, 2010).

O cobre desempenha um papel essencial em uma série de funções biológicas, entre elas a mobilização do ferro para a síntese da hemoglobina. Ele está presente em vários aminoácidos, metaloenzimas e metaloproteínas como citocromo C-oxidase (atuante na fosforilação oxidativa de tecidos músculo-esqueléticos), monoamino-oxidase (integra a estrutura do tecido vascular e ósseo), ascorbato oxidase (oxidação do ácido ascórbico); lisina oxidase (controle da elasticidade das paredes da aorta); dopamina hoidroxilase (funções cerebrais); tirosinase (pigmentação da pele) e na ceruloplasmina (metabolismo de ferro) (FRANCO, 2005; LEE, 2001; RAZIC, 2005).

A absorção do cobre se dá pela sua associação a metalotioneína, onde é transportado para o fígado e em seguida para os tecidos extra-hepáticos. Sua absorção é diminuída pelo excesso de fibras na alimentação. Zinco e ferro exercem interações competitivas com o cobre. A excreção do cobre é feita via fecal e, em maior teor pela bile, assim como urina e suor. A deficiência de cobre provoca anemia, hipotermia, atraso no crescimento, queratinização deficiente e despigmentação capilar. A toxicidade ocorre quando a ingestão é maior que 400 mg dia<sup>-1</sup> e é observada por sintomas como náuseas, vômitos, hemorragia gastrointestinal, diarreia, anemia hemolítica, cirrose hepática crônica e bronquite (FRANCO, 2005)

#### 2.4. FERRO

O ferro é o micronutriente que se apresenta em alto teor no solo, de onde as plantas o absorvem na forma de Fe<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup>. A sua absorção diminui quando aumenta a concentração de Ca, Mg, Cu, Zn e, principalmente, os níveis de Mn no meio. Nas plantas, o ferro atua na síntese de proteínas e na síntese da clorofila. O ferro está presente nas proteínas ferredoxina (transporte de elétrons na fotossíntese e na fixação do nitrogênio) e na oxidase do citocromo (transporte de elétrons e respiração) (MALAVOLTA, 1980; KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 1986).

O corpo humano tem, aproximadamente, quatro grama de ferro, mas cerca de 70 % é encontrado na hemoglobina. A maior parte do ferro remanescente é armazenado na ferritina que é encontrada no baço, no fígado e na medula óssea. Nos animais, inclusive no homem, o ferro dos alimentos é absorvido na forma de Fe<sup>2+</sup> (FRANCO, 2005).

É o metal de transição mais importante para animais e plantas, está envolvido em diversos processos como, transporte de oxigênio no sangue de mamíferos, aves e peixes (hemoglobina); armazenamento de oxigênio no tecido muscular (mioglobina); transporte de elétrons em plantas, animais e bactérias (citocromos), e também em plantas e bactérias (ferredoxinas); armazenamento de ferro em animais (ferritina) e remoção de ferro em animais (transferrina). Presente em metaloenzimas teciduais de funções respiratórias, oxidativas e de fosforilação, exercendo função importante para o metabolismo aeróbico (transporte de elétrons para o citocromos) (LEE, 2001; FRANCO, 2005; ZHANG; LIAN; CUI, 2008).

A excreção do ferro é baixa, por via fecal é em torno de 0,65 mg por dia, por via urinária, 0,08 mg por dia e durante o ciclo menstrual são perdidos entre 0,5 e 1 mg por dia. A deficiência de ferro pode afetar o metabolismo no músculo além de ocasionar anemia, alteração na função cognitiva, cefaleia, fadiga, sensação de queimação na língua e cáries. O excesso de ferro ocasiona paladar metálico, cefaleia, convulsão, doenças cardíacas coronárias, náusea, vômito e febre (FRANCO, 2005; LI; DENG, 2003; EL-ROJO, *et al.* 2008).

## 2.5. MAGNÉSIO

As plantas absorvem o magnésio na forma de  $Mg^{2+}$ . Sua absorção é diminuída pelo excesso de Ca e K. O magnésio na planta está envolvido na clorofila e na ativação enzimática, este elemento estimula a absorção do fósforo na planta (MALAVOLTA, 2005; LEE, 2001).

Nos seres humanos, o magnésio é o segundo cátion mais abundante dentro dos líquidos celulares. Este elemento age como ativador de muitos sistemas enzimáticos, na transferência do fósforo, na transmissão nervosa e na contração muscular, sendo que nestes

tecidos tem mais magnésio do que cálcio. O magnésio é considerado essencial para a estabilização estrutural dos ácidos nucleicos (FRANCO, 2005; LEE, 2001).

A vitamina D estimula a absorção do magnésio, porém, o excesso de gordura, fosfato ou álcalis inibem a sua absorção. O magnésio presente na clorofila de plantas verdes pode ser liberado para o corpo humano graças as secreções gástricas e intestinais. A principal forma de excreção do magnésio se dá pela urina e pelas fezes (cerca de 55 mg por dia). Alta percentagem de indivíduos que formam cálculos renais de oxalato apresentam baixos teores de excreção renal de magnésio. Indivíduos alcoólatras, em virtude da diminuição da absorção e aumento da excreção aumentam as necessidades diárias de magnésio. A carência de magnésio pode ser ocasionada por insuficiência renal aguda e crônica, diabetes, pancreatite, nutrição enteral prolongada e uso abusivo de álcool. Os sintomas são confusão mental, convulsão, tremor, mudanças na personalidade, anorexia, náusea, vômito, diarreia, dor abdominal, taquicardia, arritmia, alteração da pressão sanguínea, modificações no esqueleto e no músculo cardíaco (FRANCO, 2005; KOLASANI, XU, MILIKAN, 2011).

## 2.6. MANGANÊS

O manganês é um micronutriente essencial para as plantas, por quem é absorvido ativamente como  $Mn^{2+}$ , a absorção pode ser diminuída quando se tem altas concentrações de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  no meio. Ele atua indiretamente na síntese de proteínas, como doador de elétrons para a clorofila ativada (papel importante para fotossíntese), está presente na síntese da clorofila e no crescimento das plantas (MALAVOLTA, 2005; LEE, 2001).

O corpo humano em cerca de 10 a 20 mg de manganês distribuído pelos tecidos. A sua absorção é influenciada pela dieta com excesso de Ca e P. O manganês é importante em vários sistemas enzimáticos, constituindo uma parte da enzima arginase relacionada com a formação da uréia, funcionando como catalisador na síntese dos mucopolissacarídeos das cartilagens. Outra enzima que contém Mn é a piruvato-carboxilase, metaloproteína que acha-se envolvida com a utilização da glicose, assim como a superóxido-dismutase (LEE, 2001; FRANCO, 2005; WUILLOUD; KANNAMKUMARATH; CARUSO, 2004)

No metabolismo humano, o manganês liga-se a algumas biomacromoléculas formando compostos de coordenação, podendo também ser participante em coenzimas-chave, com influência no metabolismo das proteínas, ativando interconversões de aminoácidos, ativando peptidases para cindir aminoácidos específicos como a leucina; no metabolismo dos glicídios e na oxidação da glicose. É essencial para o metabolismo do colesterol, crescimento corpóreo e reprodução. A deficiência causa modificações na estrutura celular e deformações específicas no esqueleto. A toxicidade pode causar esquizofrenia, doença de Parkinson e anemia (FRANCO, 2005; RAZIC, 2005).

## 2.7. ZINCO

Nas plantas, a absorção de zinco se dá ativamente na forma de  $Zn^{2+}$ . A absorção é diminuída pela ação de  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$  e P. Nos vegetais, o Zn é essencial para a síntese do triptofano que, por sua vez, é o precursor do ácido indolil acético, que entre outros efeitos, causa o aumento do volume celular. O zinco também está relacionado ao metabolismo de carboidratos, proteínas e fosfatos, e, também algumas auxinas (MALAVOLTA, 2005; KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 1986).

O zinco é o segundo metal de transição mais abundante no corpo humano, a sua absorção pode ser inibida pela presença excessiva de ferro e cálcio. Um adulto tem, aproximadamente, dois grama de zinco em seu corpo, localizados no cabelo, pele, olhos, próstata, unhas, fígado, pâncreas, músculos, ossos e secreção das glândulas endócrinas. Este elemento é encontrado, principalmente, associado a enzimas com importante funções, participando do processo de respiração e mantendo o equilíbrio ácido-base (anidrase carbônica); processo de digestão de proteínas pelos animais (carboxipeptidase); liberação de energia (fosfatase alcalina) e metabolismo do álcool (álcool desidrogenase) (LEE, 2001; FRANCO, 2005; ZAICHICK, *et al.* 2011).

O zinco se encontra armazenado no pâncreas combinado com a insulina sob forma de zinco-insulina. O zinco atua na maturação sexual, na fertilidade, na reprodução e na função imunitária celular e humoral. A sua excreção é realizada através da via urinária, cabelo, descamação da pele e sêmen. A carência causa diminuição do paladar, anorexia, apatia, retardo do crescimento, hipogonadismo, hipospermia, retardo na maturação sexual, intolerância a glicose e deficiência na imunidade. A toxicidade pode ocasionar náuseas, vômitos, dores abdominais, deficiência de cobre, anemia, disfunção imune e prejudica a defesa antioxidante (FRANCO, 2005; KOLASANI, XU, MILIKAN, 2011; ZAICHICK, *et al.* 2011; GONZÁLEZ, *et al.* 2007).

## 2.8. A IMPORTÂNCIA DA DETERMINAÇÃO DE CONSTITUINTES INORGÂNICOS

Os minerais são necessários em diferentes quantidades, dependendo do elemento, para manter a boa saúde do corpo humano. A deficiência de minerais na alimentação de crianças pode levar a um aumento de doenças infecciosas, o que pode não só influenciar a saúde

imediate, mas que também pode ter um impacto importante na saúde do adulto (BRIONES-LABARCA, *et al.* 2011).

Os minerais estão envolvidos em muitas funções importante do corpo humano como a mineralização óssea, as reações enzimáticas, a secreção de hormônios, a proteção de células e lipídios em membranas biológicas. O desequilíbrio nutricional na fase inicial da vida pode influenciar mais tarde na saúde (ZAND, *et al.* 2011).

Os minerais são micronutrientes com papel importante no desenvolvimento do ser humano. Deficiência de minerais afeta aproximadamente dois terços da população mundial, ocasionando um grave problema de saúde pública, pois pode ocasionar danos ao desenvolvimento mental e psicomotor de crianças, diminuição no desempenho e maior tendência a infecções (MORAES, *et al.* 2009).

Nas últimas décadas, uma atenção especial têm sido dada a determinação de elementos traço em amostras de alimentos. Isto se deve, principalmente, a crescente preocupação dos riscos e dos benefícios da ingestão de certos tipos de alimentos (GUÉRIN, *et al.* 2011).

Os metais presentes nos alimentos, quando ingeridos, podem ser absorvidos pelo intestino e estes metais são então distribuídos pelo sangue através de metaloproteínas a diferentes tecidos e mostram significativas variações dependendo de vários fatores (por exemplo idade do indivíduo, o estado de oxidação do metal, estado fisiológico, entre outros) (MAAS, *et al.* 2011).

Os alimentos são uma das principais fontes de metais para o corpo humano. A maioria destes metais encontram-se ligados as proteínas ou enzimas, as quais exercem efeito em centros estruturais ativos, comandando processos de catálise. O conhecimento da composição química dos alimentos é fundamental para definir sua qualidade. Muitos esforços têm se realizado para compreender as interações dos metais com as proteínas e enzimas contidas nos

alimentos. Estima-se que, aproximadamente, 40% de todas as proteínas e enzimas contêm íons metálicos nas suas estruturas e que nestas espécies a ligação dos metais com as proteínas têm uma grande afinidade, principalmente, com os metais de transição como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . Por isso, estes elementos são facilmente encontrados em metaloproteínas (NAOZUKA; OLIVEIRA, 2007).

Vários trabalhos têm sido encontrados na literatura sobre a determinação dos teores de constituintes inorgânicos em plantas medicinais no Brasil e no exterior ( REIS, *et al.* 2010; OLABANJI, *et al.* 2008; ALMEIDA, *et al.* 2002; RAZIC, *et al.* 2005; EL-RJOOB; MASSADEH; OMARI, 2008; CHUPARINA; AISUEVA, 2011), mas são escassos os relatos referentes a composição mineral das plantas medicinais da região amazônica estudadas neste trabalho.

## 2.9. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA

A espectrometria de absorção atômica com chama é uma técnica empregada para a determinação qualitativa e quantitativa de mais de 70 elementos químicos, os quais podem ser detectado nas faixas de parte por milhão ( $\text{mg L}^{-1}$  ou  $\text{mg Kg}^{-1}$ ) e alguns caso até em partes por bilhão ( $\mu\text{g L}^{-1}$  ou  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ). Esta técnica é bem aceita por ser seletiva, de fácil operação e custo relativamente baixo, fatores estes que têm levado a maioria dos laboratórios a utilizarem com frequência (SKOOG, *et al.* 2007).

A espectrometria de absorção atômica é bastante utilizada para a determinação de elementos traço em vários tipos de matrizes (alimentos, solos, plantas, entre outras). Isto se deve certamente aos convenientes limites de detecção que podem ser alcançados,

disponibilidade simplicidade e custos razoáveis. A espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) é uma boa escolha quando se tem uma pequena quantidade de elementos para determinar, já que esta técnica é monoelementar, e esta é a sua principal limitação (MORAES, *et al.* 2009)

## 2.10. ANÁLISE MULTIVARIADA

A quimiometria é a combinação de matemática, estatística e outros métodos baseados em lógica para gerar e interpretar dados. Os métodos multivariados correlacionam simultaneamente uma grande quantidade de dados, proporcionando assim, uma extração de uma grande quantidade de informações desse conjunto de dados (SHIN, *et al.* 2010; FERREIRA, *et al.* 2002).

A Análise de Componentes Principais (PCA) é uma técnica multivariada de análise comumente utilizada em estudos quimiométricos. A PCA é uma técnica que permite as relações entre as variáveis e as observações a serem identificadas e estrutura os dados a serem detectados. Ela é capaz de separar a informação importante da redundante e aleatória. A PCA reduz a dimensão de dados da matriz original através da construção de componentes principais (PCs), que são combinações lineares das variáveis originais. (LLORENT-MARTÍNEZ, *et al.* 2011; SHIN, *et al.* 2010; FERREIRA, *et al.* 2002).

A PCA é aplicada na análise exploratória de dados para estudar as propriedades dos dados originais. A PCA é aplicada para reduzir a dimensão do conjunto de dados. A PCA detecta padrões e desvio na análise dos dados. A PCA transforma variáveis originais em novas variáveis conhecidas como componentes principais (PCs). Os PCs contam o tanto

quanto possível para a variabilidade dos dados originais. Ao traçar os PCs pode-se ver as inter-relações entre as diferentes amostras e examinar qualquer possibilidade de agrupamento de amostras (SHEN, *et al.* 2011). Portanto, a PCA pode indicar relações entre grupos de variáveis em um conjunto de dados e mostrar relações que podem existir entre os objetos (SHIN, *et al.* 2010).

A análise hierárquica de agrupamento (HCA) é um processo hierárquico no qual é reunido pares semelhantes de todos os pontos em um único grupo, com o objetivo de exibir os dados em um espaço bidimensional enfatizando os seus agrupamentos e padrões naturais. Os resultados são mostrados em um dendograma, onde enquanto mais próximo estão os pontos no espaço amostral mais similares são as propriedades das amostras (FERREIRA, *et al.* 2002).

Os métodos quimiométricos, em especial a análise multivariada, tem se revelado particularmente útil em estudos envolvendo a avaliação da qualidade dos alimentos (WELDEGERGIS; VILLIERS; CROUCH, 2011). Nos últimos anos, a análise multivariada tem sido introduzida para o tratamento de dados em diversas matrizes. A análise de componentes principais (PCA) e a análise hierárquica de agrupamentos (HCA) são métodos de análises exploratória que visam evidenciar similaridades ou diferenças entre amostras de um determinado conjunto de dados (REIS, *et al.* 2010; SOUSA, *et al.* 2006; KOLASANI; XU; MILIKAN, 2011).

## 2.11. AS PLANTAS MEDICINAIS ESTUDADAS

Para este estudo foram adquiridas dez plantas medicinais que são comercializadas em feiras livres de Belém-PA, Pariri (*Arrabidaea chica*), Aroeira (*Schinus terebinthifolia*), Insulina (*Cissus sicyoides*), Unha de gato (*Uncaria tomentosa*), Graviola (*Annona muricata*), Peão branco (*Jatropha curcas*), Malva branca (*Sida cryphiopetala*), Lacre (*Vismia guianensis*), Perpétua roxa (*Gomphrena globosa*) e Vinagreira roxa (*Hibiscus sabdariffa*). Todas estas espécies são indicadas, segundo os vendedores, para tratar anemia, diabetes e outras doenças.

A *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) é popularmente conhecida como crajiru, chica, cipó-cruz, guagiru e pariri, sendo esta última denominação mais comum na região Amazônica. Ela é um arbusto de ramos escandentes, bi ou trifolioladas de 8 – 13 cm de comprimento e flores de cor róseo. É muito comum na região amazônica, ocorre também no sudeste e sul do Brasil. Suas folhas são utilizadas na preparação de chás que podem ser usados para a limpeza de ferimentos crônicos, micoses e herpes ou estes chás podem ser ingeridos para tratar espasmo intestinal, diarreia sanguinolenta, leucemia e anemia, sendo esta enfermidade a que mais é indicada o uso do pariri. Esta planta apresenta as propriedades antiinflamatórias, antimicrobiana e adstringente. A figura 1 mostra as folhas de pariri (LORENZI; MATOS, 2008; DEVIA, et al. 2002).

*Schinus terebinthifolia* é popularmente conhecida como aguaráiba, fruto de sabiá ou aroeira, como é mais conhecida. É uma árvore mediana com 5 a 10 m de altura, apresenta-se com folhas compostas imparipinadas com 3 a 10 pares de folíolos aromáticos, medindo de 3 a 5 cm de comprimento por 2 a 3 de largura, flores muito pequenas e frutos globóides vermelhos de, aproximadamente, 5 cm de diâmetro. Ocorre ao longo de toda a mata atlântica.

São utilizadas a casca, os frutos e as folha, estas últimas são indicadas para o tratamento de doenças do sistema urinário, do aparelho respiratório, hemorragia uterina, lavagem de feridas e úlceras, feridas do colo do útero, hemorróidas, inflamações da gengiva e garganta. Aroeira apresenta propriedades antiinflamatória, cicatrizante e antimicrobiana. A figura 2 mostra folhas de aroeira com seus frutos (LORENZI; MATOS, 2008).



Figura 1. Pariri.  
(Fonte: <http://en.wikipedia.org>)



Figura 2. Aroeira.  
(Fonte: <http://beavercreek.nau.edu>)

*Cissus sicyoides* L., é conhecida como insulina ou insulina vegetal, uma trepadeira com ramos e folhas carnosas, folhas simples, membranáceas de 4 – 7 cm de comprimento, dotada de flores pequenas, de cor creme e frutos de cor roxo-escura de polpa carnosa contendo uma única semente. Ela é nativa da Amazônia. O chá de suas folhas são indicados para o tratamento de problemas cardíacos, pressão alta, anemia, derrame, tumor, epilepsia e principalmente para o tratamento de diabetes. A figura 3 mostra um pé de insulina (LORENZI; MATOS, 2008).

*Uncaria tomentosa* é mais conhecida como unha de gato, um arbusto vigoroso, pouco ramificado, de ramos escadentes com espinhos em forma de ganchos em cada axila foliar. As folhas são simples, opostas e pecioladas, suas flores são branco-amareladas. É uma planta

nativa da Amazônia. É utilizada para fins medicinais as folhas e as cascas do caule. Suas folhas são utilizadas para diversas doenças como asma, artrite, reumatismo, úlcera gástrica, dor nos ossos, além de atuar como antiinflamatório do trato urinário e purificador dos rins. A figura 4 mostra folhas de unha de gato (LORENZI; MATOS, 2008).



Figura 3. Insulina  
(Fonte: <http://pt.scribd.com>)

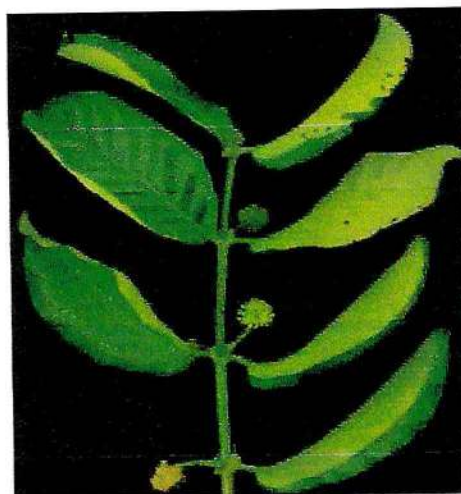


Figura 4. Unha de gato  
(Fonte: <http://www.discoverlife.org>)

*Annona muricata* L. mais conhecida como graviola, é uma árvore de aproximadamente 8 m de altura com folhas obovado-oblongas, medindo de 8 – 15 cm de comprimento, flores solitárias e frutos ouriçados, de 25 a 35 cm de comprimento, com polpa mucilaginosa e levemente ácida. Ocorre na Amazônia, onde seu fruto é bastante apreciado. As suas cascas, sementes e folhas são utilizadas para fins terapêuticos, sendo que estas últimas são indicadas para tratar diarreia, espasmos, diabetes e alguns tipos de câncer. São evidenciadas as propriedades emagrecedoras e antitumoral. A Figura 5 mostra a graviola com o seu fruto (LORENZI; MATOS, 2008).

*Jatropha curcas* L. é conhecida como pinhão-mansô ou peão branco. É um arbusto que pode atingir até 5 m de altura, com folhas esverdeadas de 8 – 17 cm de comprimento, apresentando seiva leitosa, acre e com fruto tipo cápsula, trissulcada com três sementes

oleaginosas escuras. A planta é cultivada no nordeste e também na Amazônia. Para fins medicinais são bastante utilizadas as suas folhas como cicatrizante, anti-reumática e também no tratamento de diabetes. A figura 6 mostra folhas de peão branco com seus frutos (LORENZI; MATOS, 2008).



Figura 5. Graviola.  
(Fonte: <http://www.nybg.org>)



Figura 6. Peão Branco.  
(Fonte: <http://www.plantasonya.com.br>)

*Sida cryphiopetala*, conhecida como malva é uma planta herbácea de 30 – 80 cm de altura, com folhas simples pecioladas, medindo de 1 – 3 cm de comprimento, tem flores amarelas. Esta planta é amplamente encontrada em todo o território brasileiro. O chá de suas folhas são amplamente utilizadas contra diarreias, febre e hemorroidas e também é utilizada como tônico capilar. A Figura 7 mostra a malva branca com suas flor (LORENZI; MATOS, 2008).

*Vismia guianensis* (Aubl.) Pers., é mais conhecida como lacre, também é chamada de goma-lacre e pau-de-febre. É uma pequena árvore de 3 – 7 m de altura, com folhas simples, discolores (face inferior marrom-dourada) de 6 – 15 cm de comprimento, flores amarelo-esverdeada, frutos arredondados marrom-esverdeados com menos de 1 cm de diâmetro contendo muitas sementes. Há a liberação de látex de cor amarelo-alaranjado sob ferimento.

Esta planta é nativa da região Amazônica e Nordeste. O seu látex, sua casca e suas folhas são muito utilizados na medicina popular, sendo que o chá de suas folhas são bastante indicados para reduzir a febre e também no tratamento de reumatismo. A Figura 8 mostra folhas de lacre (LORENZI; MATOS, 2008).



Figura 7. Malva branca.  
(Fonte:<http://www.plantsystematics.org>)



Figura 8. Lacre  
(Fonte:<http://www.google.com.br>)

*Gomphrena globosa* L. é popularmente conhecida como perpetua roxa, é uma planta herbácea de folhas oval-lanceoladas, de textura pilosa e coloração verde clara, com flores de coloração roxa. O chá de suas folhas é indicado para infecções respiratórias, bronquite, tosse e lariginte. A Figura 9 mostra a perpetua roxa com suas flores ([www.plantamed.com.br](http://www.plantamed.com.br)).

*Hibiscus sabdariffa* L. mais conhecida como vinagreira, um subarbusto, ereto, de caule arroxeadado de 80 – 140 cm de altura, com folhas alternadas verde-arroxeadas de 5 – 12 cm de comprimento. É uma planta encontrada com facilidade na região Amazônica, apesar de ser nativa da África. Suas folhas são bastante apreciadas para fins culinários e também terapêuticos, onde são usadas como chás para tratar problemas digestivo-estomacais, diurético e como protetor das mucosas bucal, bronquial e pulmonar. A Figura 10 mostra folhas de vinagreira roxa (LORENZI; MATOS, 2008).



Figura 9. Perpétua Roxa.  
(Fonte: <http://www.jardineiro.net>)



Figura 10. Vinagreira Roxa  
(Fonte: <http://www.plantamundo.com>)

## 2.12. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinação de cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês e zinco nas folhas digeridas e nas infusões de plantas medicinais comercializadas em Belém (Pará, Brasil), Pariri (*Arrabidaea chica*), Aroeira (*Schinus terebinthifolia*), Insulina (*Cissus sicyoides*), Unha de Gato (*Uncaria tomentosa*), Graviola (*Annona muricata*), Peão Branco (*Jatropha curcas*), Malva Branca (*Sida cryphiopetala*), Lacre (*Vismia guianensis*), Perpétua Roxa (*Gomphrena globosa*) e Vinagreira Roxa (*Hibiscus sabdariffa*);
- Utilizar a análise multivariada para tratar os dados obtidos nas análises das folhas e dos digeridos das ervas medicinais estudadas.

## 2.13. METODOLOGIA

### 2.13.1. Instrumentação

Um espectrômetro de absorção atômica com chama (SpectrAA 220, Varian, Mulgrave, Victoria, Austrália), do laboratório de minerais (LABMIN) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) foi usado para determinação de cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês e zinco nas folhas e no chá das plantas. A mistura ar/acetileno foi utilizada como gás oxidante e combustível, respectivamente. As condições experimentais são apresentadas na Tabela 2.

Para a digestão das amostras foi utilizado um bloco digestor Tecnal (Modelo TE-040/25-1, Piracicaba, São Paulo, Brasil).

Tabela 2 – Condições experimentais para análise elementar por FAAS

Elemento	Corrente aplicada (mA)	Resolução espectral (nm)	$\lambda$ (nm)
Ca	10	0,5	422,7
Cu	4	0,5	324,8
Fe	14	0,2	248,3
Mg	4	0,5	285,2
Mn	15	0,2	279,5
Zn	10	1,0	213,9

### 2.13.2. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água purificada (resistividade 18,2 M $\Omega$  cm) em sistema Elga (Elgastat, Buckinghamshire, England).

As soluções de referência de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn (SpecSol, São Paulo, Brasil) foram utilizadas na preparação dos padrões para curva analítica.

Ácido nítrico (Quimex, São Paulo, SP, Brasil) foi usado na digestão das plantas medicinais. Peróxido de hidrogênio 30% m/m (Synth, São Paulo, Brasil) foi usado como agente oxidante auxiliar.

Óxido de lantânio (Synth, São Paulo, Brasil) e ácido clorídrico (Quimex, São Paulo, Brasil) foram usados para preparar a solução de cloreto de lantânio usada na diluição dos digeridos das plantas medicinais para determinação de Ca e Mg por FAAS.

### 2.11.3. Amostras

As folhas de Pariri (*Arrabidaea chica*), Aroeira (*Schinus terebinthifolia*), Insulina (*Cissus sicyoides*), Unha de Gato (*Uncaria tomentosa*), Graviola (*Annona muricata*), Peão Branco (*Jatropha curcas*), Malva Branca (*Sida cryphiopetala*), Lacre (*Vismia guianensis*), Perpétua Roxa (*Gomphrena globosa*) e Vinagreira Roxa (*Hibiscus sabdariffa*) foram adquiridas no Mercado do Ver-o-Peso em Belém-PA, em barracas de venda de plantas medicinais, no dia 20 de janeiro de 2009. De acordo com os vendedores, todas estas plantas

foram produzidas na região metropolitana de Belém. As folhas foram adquiridas ainda frescas. A Tabela 3 apresenta as amostras com seus nomes populares, código de identificação e a finalidade medicinal de cada planta, de acordo com as informações fornecidas pelos vendedores de plantas medicinais do mercado do Ver-o-Peso.

Tabela 3 – Amostras com seus nomes populares, código de identificação e a finalidade medicinal

Nome	Amostra	Identificação	Uso popular
Pariri	Digerido	PAD	Anemia, diarreia, hemorragia, inflamação uterina
	Chá	PAC	
Aroeira	Digerido	ARD	Estômago, diarreia, gota, ínguas, bronquite, anemia
	Chá	ARC	
Insulina	Digerido	IND	Diabetes, anemia, coração, hipertensão, reumatismo, estômago, hemorróida
	Chá	INC	
Unha de gato	Digerido	UGD	Reumatismo, próstata, útero, mioma, anemia, estômago, artrite, hemorragia, rinite
	Chá	UGC	
Graviola	Digerido	GRD	Diabetes, emagrecimento, artrite, asma, hipertensão, reumatismo, vermes intestinais, anemia
	Chá	GRC	
Peão branco	Digerido	PED	Diabetes, sinusite, hemorroida, emagrecimento
	Chá	PEC	
Malva branca	Digerido	MBD	Dor de dente, clareamento dos dentes, tosse, diarreia
	Chá	MBC	
Lacre	Digerido	LAD	Emagrecimento, reumatismo, ferimento por inseto
	Chá	LAC	
Perpétua roxa	Digerido	PBD	Estômago, rim, tosse, coração
	Chá	PBC	
Vinagreira roxa	Digerido	VRD	Erisipela, emagrecimento, má digestão, hemorróidas
	Chá	VRC	

#### **2.13.4. Preparo das amostras**

Foram adquiridas, aproximadamente, 1000 g de folhas frescas que foram lavadas com água desionizada e posteriormente foram secas em estufa à 40 °C, com circulação de ar, até peso constante, por um período aproximado de 56 horas. As folhas das plantas medicinais já secas foram pulverizadas com auxílio de gral e pistilo e em seguida, armazenadas em frascos de polietileno previamente descontaminados.

#### **2.13.5. Digestão das amostras**

Uma massa de aproximadamente 0,5 g de folha seca pulverizada foi pesada, em triplicata, e em seguida, foi transferida para um tubo de digestão. Um volume de 4 mL de HNO<sub>3</sub> 65% e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% m/m foi adicionada em cada tubo de digestão contendo a amostra. Os tubos de digestão foram colocados no bloco digestor à 170 °C até digestão completa, quando não se observou nenhum resíduo. Todo o processo da digestão durou aproximadamente 20 horas (REIS, et al. 2010; SILVA, et al. 2010).

Os digeridos obtidos foram transferidos para frascos volumétricos e os volumes ajustados para 50 mL com água desionizada. Os brancos analíticos foram preparados pelo mesmo procedimento sem a adição da amostra. Para análise de cálcio e magnésio, uma alíquota dos digeridos foram diluídos com cloreto de lantânio 1% m/v (NASCENTES; KORN; ARRUDA, 2001).

### 2.13.6. Preparação das infusões

No preparo das infusões, uma massa de aproximadamente 1,0 g de cada amostra foi pesada e em seguida foi adicionado 25 mL de água fervente. A infusão foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e então, foi filtrada em papel de filtro quantitativo (AMARANTE, et al. 2011; WEBER, KONIECZYNSKI, 2003).

### 2.13.7. Análise elementar

Cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês e zinco foram determinados nos digeridos e nos chás por FAAS. O material de referência certificado GBW 07604 (Poplar Leaves) foi usado para validar o procedimento de preparo da amostra e as medidas no FAAS. O GBW07604 foi digerido pelo mesmo procedimento das folhas de plantas medicinais. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados usando dez medidas do branco analítico, onde o  $LOD = 3 \times s/m$  e o  $LOQ = 10 \times s/m$ , onde 's' é o desvio padrão das medidas do branco analítico e 'm' é a inclinação da curva analítica usada na determinação dos elementos estudados. Os dados estão apresentados na Tabela 4 (JALBANI, et al. 2010; RIBANI, et al. 2004; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; HARRIS, 2005).

Tabela 4 – Teores médios encontrados de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn com seus respectivos desvios-padrão (SD) no material de referência certificado (GBW 07604) por FAAS, a recuperação e os limites de detecção e quantificação.

Elementos	Material de referência certificado ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Valor encontrado ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) $\pm$ SD	Recuperação (%)	LOD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Ca	18100	17900,4 $\pm$ 4,5	98,90	1,00	4,00
Cu	9,3	8,8 $\pm$ 0,4	94,62	0,34	1,15
Fe	274,0	263,9 $\pm$ 8,6	96,31	0,91	3,04
Mg	6500	6590 $\pm$ 5,0	101,38	0,10	0,30
Mn	45,0	49,7 $\pm$ 1,6	110,44	0,27	0,92
Zn	37,0	37,4 $\pm$ 0,4	101,08	0,40	1,30

#### 2.11.7. Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram autoescalados (recurso utilizado em análise estatística onde centram-se os dados na média e dividi-se cada um pelo desvio padrão) de forma que todas as variáveis passam a ter a mesma importância, ou seja, o mesmo peso. Em seguida, os valores recalculados foram submetidos aos métodos de análise de componentes principais (PCA) para a classificação de 20 amostras, sendo 10 digeridos das amostras e 10 amostras de chás das plantas medicinais estudadas (SOUSA, et al. 2006).

Para realização do tratamento estatístico os dados originais foram dispostos em uma matriz de ordem 20x6 (20 determinações e 6 variáveis estudadas).

## 2.14. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês e zinco foram determinados nos digeridos de 10 plantas medicinais e seus chás por FAAS. Os valores são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Teores de metais e seus desvios-padrão ( $n=3$ ) para as plantas estudadas

Amostras	Código	Ca (%)	Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Mg (%)	Mn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Parirí	D PAD	5,3±0,2	4,0±0,2	99,1±6,5	0,43±0,01	24,7±0,7	20,6±0,4
	C PAC	2,4±0,1	0,62±0,03	<LOD	0,20±0,01	13,5±0,3	2,5±0,2
Aroeira	D ARD	4,5±0,3	<LOD	185,6±3,7	0,61±0,02	12,4±0,7	19,3±1,0
	C ARC	<LOD	<LOD	1,50±0,08	0,13±0,01	2,9±0,3	2,6±0,2
Insulina	D IND	26,3±1,7	<LOD	285,5±1,4	1,54±0,07	<LOD	21,8±0,6
	C INC	1,40±0,06	2,08±0,07	2,58±0,06	0,60±0,01	<LOD	2,8±0,4
Unha de gato	D UGD	1,9±0,1	10,3±0,2	183,8±4,4	0,44±0,01	<LOD	13,3±0,1
	C UGC	<LOD	<LOD	2,4±0,2	0,10±0,01	<LOD	1,2±0,1
Graviola	D GRD	5,2±0,2	8,8±0,3	248,9±8,4	0,40±0,03	<LOD	19,5±1,6
	C GRC	0,33±0,02	0,89±0,09	2,10±0,07	0,11±0,01	<LOD	2,60±0,04
Peão branco	D PED	6,2±0,4	6,6±0,3	194,8±8,8	0,64±0,03	16,3±1,0	21,0±2,4
	C PEC	<LOD	2,1±0,2	<LOD	0,05±0,01	<LOD	7,3±0,6
Malva branca	D MBD	<LOD	5,1±0,3	345,2±10,5	0,24±0,02	52,8±1,2	26,8±0,3
	C MBC	<LOD	0,55±0,03	2,7±0,4	0,03±0,01	9,4±1,1	3,3±0,3
Lacre	D LAD	<LOD	10,6±0,1	128,4±3,8	0,14±0,04	9,6±0,3	32,8±0,6
	C LAC	<LOD	1,17±0,03	2,13±0,08	<LOD	3,4±0,2	4,7±0,2
Perpétua Roxa	D PBD	4,62±0,07	9,7±0,1	243,4±7,2	1,6±0,1	154,7±1,2	216,2±2,3
	C PBC	<LOD	<LOD	19,9±3,5	0,95±0,02	49,1±0,7	60,7±3,8
Vinagreira Roxa	D VRD	6,1±0,2	8,2±0,7	272,1±1,0	1,20±0,01	<LOD	9,4±1,1
	C VRC	0,9±0,1	0,5±0,1	30,2±1,6	0,76±0,06	<LOD	8,81±0,08

D = Digerido; C = Chá; LOD = Limite de detecção

Os níveis de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn obtidos nos digeridos das amostras variaram entre 1,9 – 26,3%, 4,0 – 10,6  $\mu\text{g g}^{-1}$ , 99,1 – 345,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ , 0,14 – 1,6%, 9,6 – 154,7  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 9,4 – 216,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. Por outro lado, os teores encontrados para Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn nas infusões variaram de 0,3 – 2,4%, 0,55 – 2,1  $\mu\text{g g}^{-1}$ , 1,50 – 30,2  $\mu\text{g g}^{-1}$ , 0,03 – 0,95%, 2,9 – 49,1  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 1,2 – 60,7  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

Konieczynski e Wesolowski (2007), determinaram Ca, Mg, Na, K, Fe, Zn, Mn e Cu por FAAS e P por espectrofotometria em 27 amostras de plantas medicinais da Polônia. Os teores encontrados nas amostras digeridas variaram de 0,33-3,1% Ca, 0,08-0,5% Mg, 3,73-174  $\text{mg kg}^{-1}$  Fe, 4,98-67,21  $\text{mg kg}^{-1}$  Mn, 0,67-129,47  $\text{mg kg}^{-1}$  Zn e 0,49-10,6  $\text{mg kg}^{-1}$  Cu. Estes valores são semelhantes quando se compara com os teores de Mn e de Zn que foram estudados para as plantas medicinais da Amazônia, exceto a amostra de perpétua roxa que esta com o valor acima deste estudo para os dois metais em questão. Em relação ao cobre, todas as amostras se encontram com valores semelhantes ao que foram encontrados neste estudo. As amostras de pariri, unha de gato, graviola, malva branca e lacre apresentaram os valores dentro do intervalo deste estudo.

Ajasa et al. (2004) analisaram Fe, Mn, Cu, Pb, Zn, Na, K, Mg e Ca por FAAS e P por colorimetria em dez plantas com propriedades medicinais do sudoeste da Nigéria. Estes autores encontraram nas folhas das plantas medicinais estudadas os níveis de 3,24-35,1  $\text{mg L}^{-1}$  Zn, 1,12-24,4  $\text{mg L}^{-1}$  Cu, 35,6-241  $\text{mg L}^{-1}$  Fe e 31,7-685  $\text{mg L}^{-1}$  Mn. Os intervalos encontrados para Mg e para Ca foram de 0,14-0,55% e 0,26-5,1%, respectivamente. Estes valores são semelhantes para todas as amostras digeridas quando se compara com os valores de Cu para as plantas medicinais da Amazônia estudadas. São também semelhantes para o Ca, exceto nas amostras de pariri, insulina, graviola, peão branco e vinagreira roxa, que apresentam valores acima do intervalo.

Reis et al. (2010), estudaram as folhas de *Lippia Alba* (Mill.) coletadas no Brasil e determinaram Ba, Zn, Cu, Fe, Mn, Ni, Ca, Mg e P por ICP OES. Os teores encontrados por estes autores variam de 13,5-63,1 mg kg<sup>-1</sup> Zn, 4,9-17,2 mg kg<sup>-1</sup> Cu, 9,8-340 mg kg<sup>-1</sup> Fe e 1,7-96,8 mg kg<sup>-1</sup> Mn. Os teores obtidos para o Ca e Mg foram 0,77-3,9% e 0,3-8,6%, respectivamente. Nas plantas medicinais da Amazônia estudadas foram encontradas teores de Mg similares aos obtidos por estes autores, com exceção da malva branca e lacre que estão abaixo dos valores encontrados por estes autores.

Razic et al. (2005) investigaram oito plantas medicinais da família *Lamiaceae* encontradas na Sérvia que apresentavam diferentes ações farmacológicas. EDXRF, FAAS, FAES e ICP-AES foram utilizados para analisar Cu, Zn, Mn, Fe, K, Ca, Mg Al, Ba e B. Os teores encontrados nas folhas das plantas medicinais foram 5,92-14,79 mg kg<sup>-1</sup> Cu, 15,0-43,0 mg kg<sup>-1</sup> Zn, 25-111 mg kg<sup>-1</sup> Mn e 74-546 mg kg<sup>-1</sup> Fe. Os valores obtidos para Ca variaram de 0,90-1,43% e para Mg variaram de 0,17-0,67%. Estes valores estão dentro das médias encontradas para Fe em todas as amostras estudadas. Em relação ao Mg, os níveis obtidos na malva branca se mostrou dentro do intervalo deste estudo.

Olabanji et al. (2008), estudaram dezesseis plantas medicinais da Nigéria usadas no tratamento de diabetes. Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Br, Rb e Sr foram determinados nas amostras. Os teores dos elementos estudados nestas plantas variaram entre 0,1-1,3% Mg, 0,19-4,1% Ca, 1-2830 mg kg<sup>-1</sup> Mn; 44-9600 mg kg<sup>-1</sup> Fe; 6-6400 mg kg<sup>-1</sup> Cu; 15-3010 mg kg<sup>-1</sup> Zn. Estes valores são semelhantes aos encontrados para as plantas medicinais da Amazônia estudadas neste trabalho. A amostra de perpétua roxa apresentou valores de Mn e Zn dentro das faixas que estes autores encontraram.

Almeida et al. (2002) investigaram dez plantas medicinais cultivadas no Nordeste do Brasil. Os teores de Na, K, Ca, Mg, Fe, Al, Mn e Zn foram determinados nas cinzas das

folhas e Na, K, Ca e Mg nos chás destas plantas. As técnicas utilizadas para a determinação foram FAAS, fotometria de chama e espectrometria de absorção molecular. Os teores encontrados nas folhas das plantas medicinais estudadas foram 0,13-1,39% Ca; 0,04-0,24% Mg; 1,32-34,76 mg kg<sup>-1</sup> Fe; 0,4-11,3 mg kg<sup>-1</sup> Mn e 0,19-11,6 mg kg<sup>-1</sup> Zn. Os valores de Mg encontrados na amostra de lacre foram similares comparados aos teores de Mg encontrados por estes autores. Ao analisarem os chás das plantas medicinais, os referidos autores encontram 0,01-0,32% Ca e 0,002-0,13% Mg. Os valores de Ca nestes chás são menores que os valores encontrados para os chás das plantas medicinais da Amazônia estudados neste trabalho. Para o Mg, as amostras de chá estão com valores semelhantes ao encontrado pelo autores, somente as amostras de pariri, insulina, perpétua roxa e vinagreira roxa estão com valores acima do que foi determinado nas plantas estudadas por Almeida et al. (2002).

Amarante et al. (2011) avaliaram Ca, Mg, Fe, Cu, Zn e Mn por FAAS nas folhas e nos chás das folhas (*in natura* e secas) da *Montrichardia linifera* coletadas no Estado do Pará (Brasil). As concentrações nas amostras digeridas variaram entre 5,10-5,12% Ca; 0,94-0,96% Mg; 128,35-335,93 mg kg<sup>-1</sup> Zn; 5,75-6,52 mg kg<sup>-1</sup> Cu; 182,98-819,52 mg kg<sup>-1</sup> Fe e 4590,49-7140,85 mg kg<sup>-1</sup> Mn. Valores que se aproximam da maioria dos valores encontrados para as plantas que foram aqui estudadas. Em relação ao chás feitos com as folhas secas de *Montrichardia linifera*, a concentração encontrada foi 0,12-0,16% Ca; 0,27-0,32% Mg; 11,91-54,08 mg kg<sup>-1</sup> Zn; 1,36-1,79 mg kg<sup>-1</sup> Cu; 1,44-5,69 mg kg<sup>-1</sup> Fe e 412,6-989,29 mg kg<sup>-1</sup> Mn. Estes valores quando comparados com as amostras de plantas medicinais estudadas revelam que o Ca em todas as amostras apresentou os teores mais elevados dos que foram reportados por Amarante et al. (2001). Por outro lado, os teores de Mg nas infusões de insulina, de perpétua roxa e de vinagreira roxa estão com teores acima dos que foram encontrados neste estudo e as demais amostras apresentam seus níveis menores do que obtido por Amarante et al. (2001). A amostra de perpétua roxa apresentou níveis de Zn acima do que foi encontrado

por estes autores. As amostras de infusão de insulina e peão branco apresentaram os maiores teores de Cu quando comparado com os chás das folhas secas de *Montrichardia linifera*. Em relação ao Fe, os teores nas amostras de infusão de perpétua roxa e vinagreira roxa foram maiores do que os valores encontrados pelos autores. Os níveis de Mn nas amostras foram menores quando comparados com os chá de folhas secas de *Montrichardia linifera*.

Nas amostras de plantas digeridas, os níveis mais elevados de Ca foram encontrados no pariri, insulina, graviola, peão branco e vinagreira roxa. Nas infusões, os níveis mais elevados de Ca foram encontrados no pariri, insulina, vinagreira roxa e graviola. Os níveis mais elevados de Cu foram obtidos para peão branco e lacre. O ferro e o magnésio foram encontrados em altos teores nas amostras de perpétua roxa e vinagreira roxa. E o zinco apareceu em quantidades significativas na perpetua roxa. Isto pode ser devido à composição química do solo, uso de fertilizantes ou até mesmo pela fisiologia vegetal da planta (KOPITKE, et al. 2010; KARAK; BHAGAT, 2010).

Os teores encontrados nas infusões foram menores quando comparados as concentrações obtidas para os mesmos elementos nos digeridos das folhas de plantas medicinais estudadas. Entre as amostras de infusões estudadas destaca-se a Vinagreira Roxa (VRC) e a perpétua roxa (PBC) que apresentaram as maiores concentrações de ferro, magnésio e zinco.

Empresas que comercializam chás de plantas medicinais na forma de sachês, utilizam estes com 1 ou 2 grama e recomendam que cada sachê seja colocado em uma xícara de água fervente. Algumas empresas apresentam no rótulo da caixa de sachês que o volume de uma xícara de chá é de aproximadamente 130 mL. Sendo assim, se as plantas medicinais que foram apresentadas neste estudo fossem comercializadas na forma de sachês de 2 g (o valor máximo encontrado comercialmente) para serem preparadas em 130 mL de água, as amostras

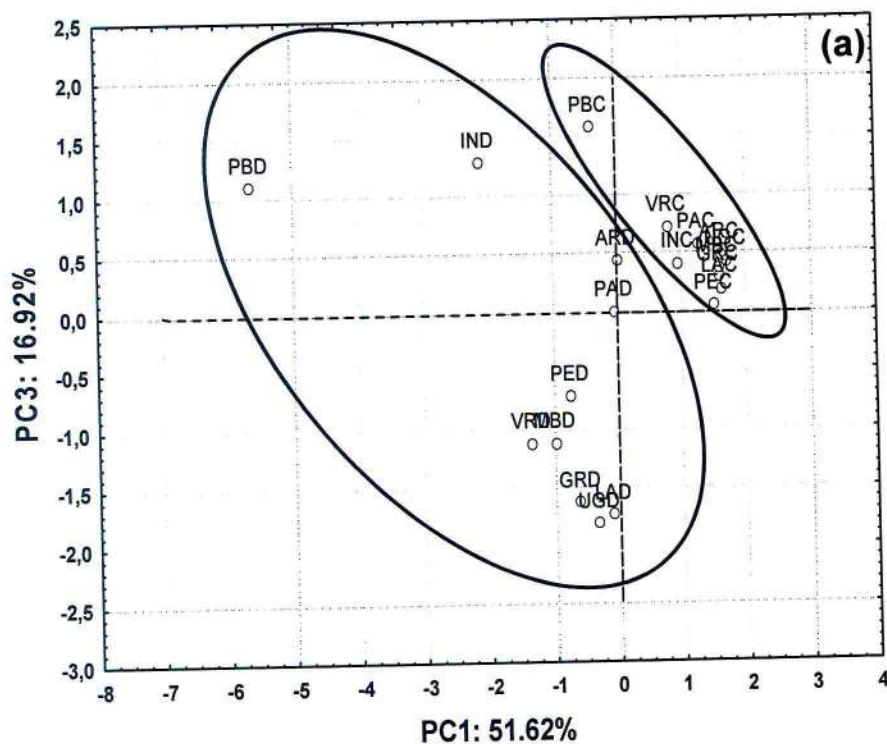
que apresentaram os maiores teores de metais nas infusões não apresentariam riscos de toxicidade para os consumidores.

Nas infusões, o maior teor de cálcio foi encontrado no de pariri, nesta amostra, neste caso, uma xícara de chá tem aproximadamente 48 mg de cálcio e três xícaras de chá suprimem em torno de 18% da quantidade que deve ser ingerida por dia deste metal. O nível mais elevado de cobre foi encontrado no peão branco, sendo assim, uma xícara de chá tem aproximadamente 4,2  $\mu\text{g}$  de cobre e três xícaras de chá fornecem apenas 0,8% da quantidade que deve ser ingerida por dia deste elemento.

A concentração mais elevada de ferro foi encontrada nas infusões de vinagreira roxa, neste caso, uma xícara de chá tem aproximadamente 60,4  $\mu\text{g}$  de ferro e três xícaras de chá suprimem em torno de 18% da quantidade que deve ser ingerida por dia deste elemento. A infusão de perpétua roxa é a que apresenta os mais elevados teores de magnésio, em uma xícara de chá tem aproximadamente 19 mg deste metal e três xícaras de chá fornecem em torno de 20% da quantidade de magnésio que deve ser ingerida diariamente.

Para o manganês, a amostra que apresentou os teores mais elevados no chá foi a perpétua roxa, onde em uma xícara de chá há em torno de 98,2  $\mu\text{g}$  deste metal e em três xícaras de chá é possível ingerir próximo de 12% da quantidade que deve ser ingerida por dia deste elemento. Também na infusão de perpétua roxa se encontra os mais elevados teores de zinco, em uma xícara de chá tem aproximadamente 121  $\mu\text{g}$  deste metal e três xícaras de chá fornecem em torno de 3% da quantidade de zinco que deve ser ingerida diariamente.

A 1ª (PC1) e 3ª (PC3) componente principal (PC) explicaram 68,54 % da informação dos dados originais. Uma nítida separação entre as amostras digeridas e os chás pode ser observada na Figura 11a, onde é evidenciado a grande correlação entre Ca, Mg, Mn e Zn que mostraram variabilidade de teores diferentes para o Cu e Fe.


**CÓDIGO DAS PLANTAS:**

- ARC: Aroeira chá  
 ARD: Aroeira digerido  
 GRC: Graviola chá  
 GRD: Graviola digerido  
 INC: Insulina chá  
 IND: Insulina digerido  
 LAC: Lacre chá  
 LAD: Lacre digerido  
 MBC: Malva branca chá  
 MBD: Malva branca digerida  
 PAC: Pariri chá  
 PAD: Pariri digerido  
 PBC: Perpétua roxa chá  
 PBD: Perpétua roxa digerido  
 PEC: Peão branco chá  
 PED: Peão branco digerido  
 UGC: Unha de gato chá  
 UGD: Unha de gato digerido  
 VRC: Vinagreira roxa chá

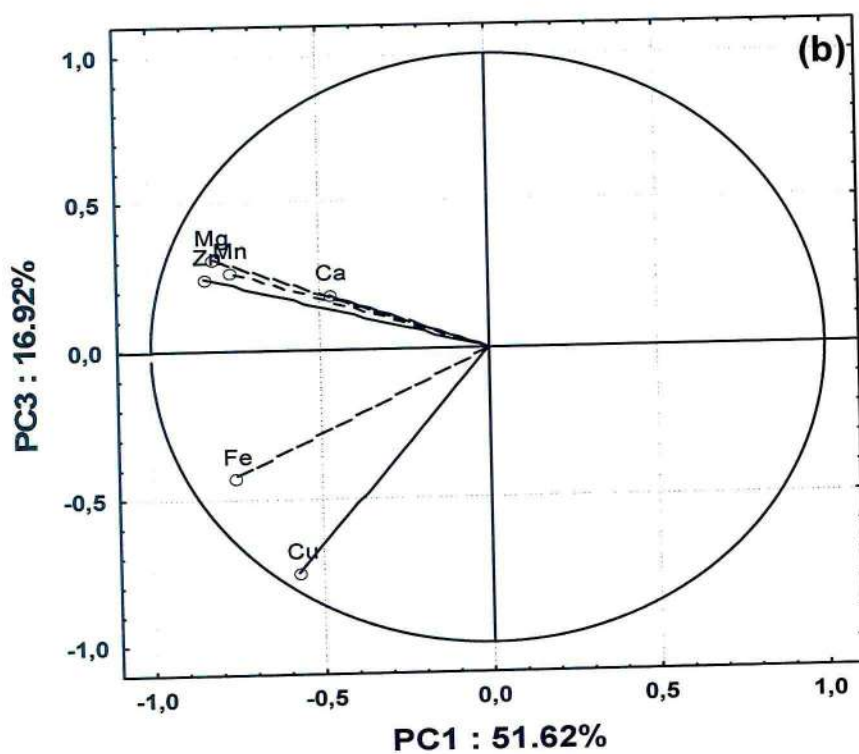


Figura 11. Análise de Componentes Principais nas plantas medicinais estudadas. *Scores* (a) e *Loadings* (b).

Entre as plantas estudadas, destaca-se o comportamento do digerido da amostra PBD que na Figura 11a (*scores*) apresenta-se bem distante das demais, quando comparado a sua posição com a Figura 11b (*loadings*) que contém informações sobre os constituintes inorgânicos, confirmando que esta apresenta os teores mais elevados de Mg, Mn e Zn.

Entre as amostras de chás destaca-se a amostra PBC que na Figura 11a apresenta-se de forma semelhante ao seu digerido (PBD). Esta amostra apresenta altos teores de Cu, Mg, Mn e Zn, o segundo maior nível de Fe e a quinta maior concentração de Ca entre os chás estudados. Pode ser observado a grande relação que existe entre as amostras de Perpétua Roxa, que tanto nos seus digeridos como nos chás tem sempre os maiores valores para Mg, Mn e Zn nas amostras estudadas.

Os digeridos das amostras de Lacre (LAD), Unha de Gato (UGD) e Graviola (GRD) encontram-se em um quadrante (Figura 11a) em que suas posições se sobrepõem as amostras que contém cobre (Figura 11b). Isto pode ser confirmado na Tabela 5, pois estas amostras apresentam os maiores teores de cobre. Um comportamento semelhante é observado para os digeridos de Malva Branca (MBD) e Vinagreira Roxa (VRD) em relação ao ferro. Isto pode ser confirmado através da Tabela 5, onde estas amostras apresentam a 1ª e a 3ª maior quantidade de ferro entre os digeridos estudados.

As tendências observadas através das PCs foram confirmadas através do dendograma obtido pela análise hierárquica de agrupamentos, mostrado na Figura 12, onde pode ser observado a formação de dois diferentes agrupamentos, separados pela máxima dissimilaridade com distância Euclidiana normalizada de 15,1. O primeiro grupo (amostras de chá) mostra a formação de dois subgrupos devido as diferenças encontradas na composição

mineral dos chás estudados. O segundo grupo formado pelos digeridos das amostras, PBD e IND aparecem no dendrograma separadas das demais amostras do conjunto de dados.

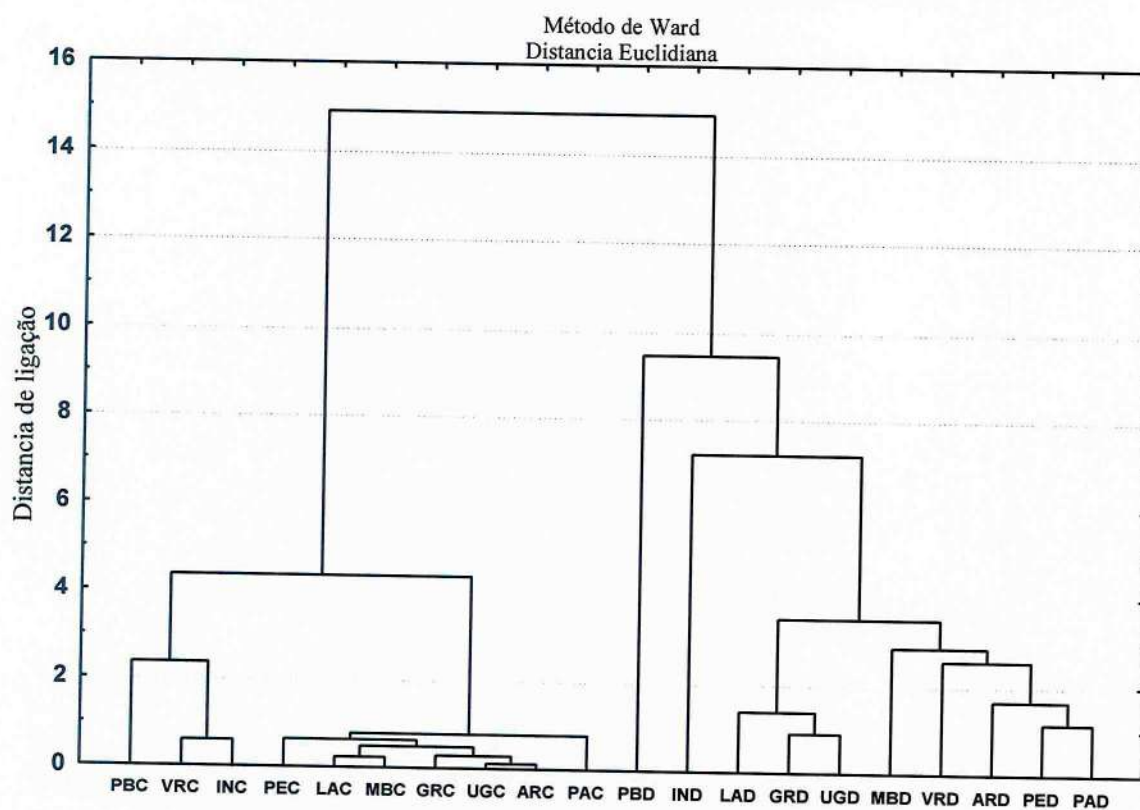


Figura 12. Dendrograma obtido na análise hierárquica de agrupamento.

## 2.15. CONCLUSÃO

A análise quimiométrica dos dados revela-se como uma boa ferramenta para a interpretação dos valores encontrados, as informações extraídas através da análise multivariada aplicadas aos dados de concentração dos metais estudados permitiram elucidar alta correlação entre Cu e Fe, bem como Ca, Mg, Mn e Zn e também Mg, Mn e Ca. A amostra de perpétua roxa, tanto no chá (PBC) quanto no digerido (PBD) apresentaram as maiores concentrações para Mg, Mn e Zn, justificando sua posição isolada nos seus respectivos agrupamentos no gráfico dos scores. Apesar de serem estudadas 10 espécies diferentes de plantas medicinais, com grande variabilidade nos teores dos constituintes inorgânicos, observou-se que a combinação da PC1xPC3 separou as 20 amostras em 2 grupos (digeridos e chás) e os elementos estudados que mais contribuíram para esta separação foram Cu e Fe, e em seguida Ca, Mg, Mn e Zn. A análise quimiométrica se mostrou uma ferramenta muito importante e eficiente para a análise de dados em plantas medicinais.

A separação observada nos digeridos e nos chás é reforçada pela grande diferença nos teores. Nos digeridos o ataque ácido destrói toda a matéria orgânica presente deixando apenas os metais livres em solução. Na preparação das infusões, há apenas uma extração com água quente, onde parte dos metais e alguns compostos orgânicos são extraídos, a presença destes compostos orgânicos podem interferir na disponibilidade do metal.

Os teores encontrados nas infusões não apresentam riscos de toxicidade para quem utiliza as plantas medicinais estudadas. Mesmo se fosse consumida a quantidade máxima de chá recomendada por dia, três xícaras, não haveria riscos. Há casos extremos de pessoas, que apesar de não ser recomendado, ingerem os chás durante o dia inteiro, deixando de beber água para tomar somente o chá, nestes casos, mesmo se for ingerido uma quantidade de 2 litros por

dia, não há riscos de contaminação por nenhum dos metais estudados nestas plantas medicinais.

Devido aos altos teores de Mg, Mn, Zn e até mesmo Fe presente nas infusões de perpétua roxa, os chás desta planta pode ser indicado para auxiliar uma suplementação mineral ou mesmo outras doenças onde estes metais podem atuar como agentes auxiliares na cura.

*CAPÍTULO 3:*

*DETERMINAÇÃO DE CROMO EM*

*PLANTAS MEDICINAIS DA*

*AMAZÔNIA USADAS NO*

*TRATAMENTO DE DIABETES*

### 3.1. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1.1. A importância do elemento cromo

Entre os compostos de cromo destacam-se o cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ), que é um forte agente oxidante e o dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) que também é um agente oxidante e bastante utilizado para o curtimento do couro. O cromato e o dicromato apresentam uma larga aplicabilidade em laboratórios químicos para as mais diversas análises. Existe também o  $\text{CrO}_3$  (óxido de cromo VI) que é bastante utilizado para soluções de cromação, pigmento, catalisador e proteção de madeira. Além disso, tem-se o ácido crômico que é usado para limpeza de vidrarias de laboratório (LEE, 2001).

Tanto o  $\text{Cr}^{6+}$  quanto o  $\text{Cr}^{3+}$  podem ocorrer naturalmente em diversas matrizes. Nos solos o  $\text{Cr}^{6+}$  aparece em menor frequência, pois nesta forma o cromo é solúvel, móvel e tóxico para os organismos vivos. Nas condições normais do solo, ele tende a ser convertido para  $\text{Cr}^{3+}$ , forma menos solúvel e menos reativa, por isso têm baixa mobilidade e toxicidade para os organismos vivos. Esta conversão pode, em parte, explicar a baixa disponibilidade deste metal para as plantas (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 1986; AZEVEDO; CHASIN 2003).

A baixa mobilidade do cromo nos solos se reflete na sua baixa suplementação para as plantas, sendo que a forma mais instável nos solos ( $\text{Cr}^{6+}$ ) é a forma mais disponível para as plantas, que o absorvem e tendem a reduzi-lo a  $\text{Cr}^{3+}$ . O conteúdo de cromo solúvel nos solos controla a quantidade presente nos vegetais. Não é bem evidente o papel da essencialidade do cromo para o metabolismo vegetal, porém, sabe-se que absorção e transporte do cromo pelas plantas é muito baixo, onde ele tende a ficar retido nas raízes e só uma pequena parte é

transportado para as partes superiores. O excesso de cromo pode diminuir a absorção de potássio, fósforo, ferro e magnésio nas raízes. Sabe-se também que existe uma relação antagônica entre o cromo e outros elementos como manganês, cobre e boro (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 1986; MALAVOLTA, 1980; AZEVEDO; CHASIN, 2003).

No organismo humano, o  $\text{Cr}^{6+}$  consegue penetrar nas células mais eficientemente do que o  $\text{Cr}^{3+}$ . Dentro da célula o  $\text{Cr}^{6+}$  tende a se reduzir a  $\text{Cr}^{3+}$ , produzindo os intermediários  $\text{Cr}^{5+}$  e  $\text{Cr}^{4+}$ , que acabam gerando radicais livres, que por sua vez podem desencadear processos carcinogênicos, justificando assim a grande toxicidade  $\text{Cr}^{6+}$ . Este fenômeno não é observado no  $\text{Cr}^{3+}$  (AZEVEDO; CHASIN, 2003)

O  $\text{Cr}^{3+}$  e a insulina estão envolvidos na manutenção do nível adequado de glicose no sangue. Em caso de deficiência de Cr, a velocidade de remoção da glicose do sangue é a metade da velocidade normal. Alguns casos de diabetes podem decorrer de problemas no metabolismo do cromo. Porém, o aspecto médico mais preocupante dos sais de cromo é o caráter cancerígeno dos mesmos quando ingeridos ou em contato com a pele, em quantidades relativamente grandes. Compostos de  $\text{Cr}^{6+}$  como os cromatos e dicromatos, são particularmente perigosos (LEE, 2001).

Muitos estudos têm mostrado o papel do cromo como um elemento essencial que possui um papel definitivo no metabolismo da glicose associado com a ação da insulina. Em comparação com a população normal, os diabéticos apresentam baixos níveis de cromo no sangue e na urina. Pacientes que foram tratados com suplementação de  $\text{Cr}^{3+}$  apresentaram diminuição nos níveis de glicose, colesterol e triglicerídeos no sangue, bem como a sensibilidade a insulina (RAINS; JAIN, 2010).

O mecanismo que a suplementação de  $\text{Cr}^{3+}$  exerce sobre a insulina e sobre a diminuição da inflamação vascular não é clara. Estudos tem demonstrado que a

suplementação com  $\text{Cr}^{3+}$  melhora o metabolismo da glicose, evidenciado pela diminuição dos níveis desta no sangue ou da diminuição da necessidade de insulina. Propõe-se que a suplementação com  $\text{Cr}^{3+}$  aumenta a quantidade de um oligopeptídeo contendo cromo, que esta presente em células sensíveis à insulina que se ligam a seus receptores e aumentando assim a sua quantidade (RAINS; JAIN, 2010) (AHMED; HELAL, 2011).

A Tabela 6 mostra as quantidades recomendadas de cromo que devem ser ingeridas diariamente, em micrograma por dia, em uma dieta equilibrada, de acordo com a faixa etária.

Tabela 6 – Valores recomendados para ingestão diária do cromo ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )

Período da vida	Idade (anos)	Cr ( $\mu\text{g}/\text{dia}$ )
Lactentes	0 – 0,5	10 – 40
	0,5 – 1	20 – 60
Crianças	1 – 3	20 – 80
	4 – 6	30 – 120
	7 – 10	50 – 200
	Mais de 10	50 – 200
Adultos	Acima de 30	50 – 200

Fonte: Franco, 2005

A análise de  $\text{Cr}^{3+}$  em plantas medicinais utilizadas no tratamento de diabetes é de relevante importância, pois com este resultado pode-se justificar, em partes, a eficácia da utilização destas plantas pela população.

### 3.1.2. Cromo em plantas medicinais

Em todo o mundo têm surgido trabalhos que avaliaram os teores de metais em diversas amostras, entre elas as plantas medicinais. O cromo como metal de toxicidade em potencial têm sido investigado tanto em relação ao teor total quanto ao teor de  $\text{Cr}^{6+}$ .

Nookabkalw, Rangkadilok e Satayavivad (2006), avaliaram Mg, Al, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Sr, Sb, Ba, As, Cd, Hg e Pb em 3 tipos de plantas medicinais consumidas na forma de chás na Tailândia. As plantas estudadas foram *Gynostemma pentaphyllum*, *Camellia sinensis* e *Morus Alba*, que são utilizadas para diversas enfermidades, entre elas diminuição do teor de colesterol e apresentam efeito hipoglicêmico. Os digeridos e o chá foram analisadas por ICP-MS e os valores encontrados variaram entre 0,205 e 12,42 mg  $\text{Kg}^{-1}$  nos digeridos e 0 a 1,405  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  nos chás. As extrações de cromo variaram de 2,57 a 11,45 % nestas amostras.

Panichev, *et al* (2005) determinaram Cr (VI) em amostras de plantas desenvolvidas em solos com altos teores de Cr cultivadas na África do Sul e na Rússia. O Cr (VI) foi obtido a partir da extração com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Por outro lado, cromo total foi obtido após abertura da amostra por calcinação e também digestão assistida por micro-ondas. Todas as amostras foram analisadas por GF AAS. Os resultados obtidos mostraram que os teores variaram de 1,4 – 8,0 e 0,12 – 0,48  $\mu\text{g g}^{-1}$  para cromo total e Cr (VI), respectivamente. As extrações de cromo nas amostras variaram de 6 a 8 %.

Elci, *et al.* (2010) analisaram os teores de cromo total e Cr (VI) em folhas de plantas, solos e sedimentos da Turquia. Para a determinação de Cr (VI) foi realizada a extração com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e para a determinação cromo total as amostras foram submetidas a digestão ácida em sistemas abertos. Todas as amostras foram analisadas por GF AAS. Os valores encontrados

variaram entre 3,58 – 21,95  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o cromo total e 0,46 – 8,07  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o Cr (VI). Desta forma as extrações de Cr (VI) obtidas nas amostras variaram de 11,05 e 48,06 %.

Mandiwana, Panichev e Panicheva (2011) determinaram os teores de cromo total e Cr (VI) em folhas de chá. As amostras foram digeridas em micro-ondas para a análise de cromo total, para a análise de Cr (VI) solúvel em água foram analisados os chás das folhas com água desionizada e, para a determinação de Cr (VI) total foi feita a extração com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Todas as amostras foram analisadas por GF AAS. Os teores encontrados variaram entre 0,28 – 14,0; 0,025 – 1,75 e 0,03 – 3,15  $\mu\text{g g}^{-1}$  para cromo total, Cr (VI) solúvel em água e Cr (VI) total, respectivamente. Assim, a extração de Cr (VI) solúvel em água variou na faixa de 2,6 e 20,8%.

### 3.1.3. Extração de $\text{Cr}^{6+}$ com $\text{Na}_2\text{CO}_3$

O procedimento de digestão alcalina baseado na extração com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para extrair  $\text{Cr}^{6+}$  na forma solúvel, adsorvido e precipitado em diversas matrizes, incluindo plantas medicinais têm sido proposto. A extração com solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para a espécie de  $\text{Cr}^{6+}$  se baseia na transformação de compostos de  $\text{Cr}^{6+}$  insolúvel em formas solúveis em meio alcalino, formando  $\text{Na}_2\text{CrO}_4$  e com a formação de espécies insolúveis de  $\text{Cr}^{3+}$  como hidróxidos ou carbonatos. O entendimento da discussão acerca da extração de  $\text{Cr}^{6+}$  com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  é na verdade um simples procedimento de especiação de cromo (ELCI, *et al.* 2010).

Em meio alcalino são minimizados os riscos de redução dos íons  $\text{Cr}^{6+}$  a  $\text{Cr}^{3+}$ . O íon carbonato extrai o  $\text{Cr}^{6+}$ , fazendo com que compostos sólidos de  $\text{Cr}^{6+}$  sejam dissolvidos e assim disponibilizados para medidas em fase líquida. Isto não ocorre quando se emprega

apenas água para a extração de  $\text{Cr}^{6+}$ , pois a água extrai apenas os compostos de  $\text{Cr}^{6+}$  solúveis neste meio (MATOS; NÓBREGA, 2009; MATOS, *et al.* 2008).

A transformação de compostos de  $\text{Cr}^{6+}$  insolúveis para a forma solúvel pode ser entendida de acordo com a seguinte equação:



O  $\text{Cr}^{6+}$  é transformado de cromato insolúvel para cromato solúvel em meio altamente alcalino com  $\text{pH} = 11$  (MANDIWANA; PANICHEV; PANICHEVA, 2011).

### 3.1.4. Plantas medicinais estudadas

As plantas medicinais selecionadas para este estudo foram aquelas que, de acordo com as vendedoras de plantas medicinais do Ver-O-Peso, são usadas para o tratamento de diabetes, Insulina (*Cissus sicyoides*), Graviola (*Annona muricata*), Peão branco (*Jatropha curcas*) e Fruta pão (*Artocarpus altilis*). As plantas insulina, graviola e peão branco já tiveram as suas descrições citadas anteriormente (ver item 2.11).

*Artocarpus altilis* é popularmente conhecida como fruta pão, uma árvore de grande porte, frutífera, originária da região da Malásia, porém, facilmente encontrada na Amazônia. Suas sementes são bastante apreciadas e são consumidas cozidas. Suas folhas são consumidas na forma de chás e são indicadas para o tratamento de diabetes, dores estomacais, diarreia e abaixamento da pressão arterial. A Figura 13 mostra as folhas e os frutos da fruta pão (<http://ntbg.org;>).

abaixamento da pressão arterial. A Figura 13 mostra as folhas e os frutos da fruta pão ([http://ntbg.org](http://ntbg.org;)).



Figura 13. Fruta Pão  
(Fonte: <http://pt.wikipedia.org>)

### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimização das condições experimentais de digestão assistida por micro-ondas de folhas de plantas medicinais;
- Otimização das condições experimentais de extração de Cr (VI) em plantas medicinais usando como extrator o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ;
- Determinação e especiação de cromo em folhas das plantas medicinais Insulina (*Cissus sicyoides*), Graviola (*Annona muricata*), Peão branco (*Jatropha curcas*) e Fruta pão (*Artocarpus altilis*), comercializadas em Belém-PA para o tratamento de diabetes.

### 3.3. METODOLOGIA

#### 3.3.1 – Instrumentação

Para a digestão das amostras foi utilizado um forno de Micro-ondas com cavidade (Milestone, Sorisole, Itália).

Para a determinação de cromo nas amostras foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica em forno de grafite (Spectra AA240Z, Varian, Austrália), equipado com corretor Zeeman transversal (Varian, Mulgrave, Austrália), amostrador automático GTA 120 e tubo de grafite aquecido longitudinalmente. Uma lâmpada de catodo oco de cromo foi utilizada como fonte de radiação. Os sinais de absorvância foram medidos utilizando o comprimento de onda de 357,9 nm, corrente aplicada a lâmpada de catodo oco de 6,0 mA e resolução espectral de 0,2 nm.

#### 3.3.2. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água purificada (resistividade 18,2 M $\Omega$  cm) em sistema Elga (Elgastat, Buckinghamshire, England).

A solução de referência de 1000 mg L<sup>-1</sup> Cr (SpecSol, São Paulo, Brasil) foi utilizada na preparação dos padrões (3, 6, 9 e 12  $\mu$ g L<sup>-1</sup> Cr) para curva analítica.

A solução de carbonato de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) utilizada na extração de Cr (VI) foi preparada a partir do  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Nuclear, São Paulo, Brasil).

Ácido nítrico (Quimex, São Paulo, SP, Brasil) foi usado na digestão das plantas medicinais. Peróxido de hidrogênio 30% m/m (Synth, São Paulo, Brasil) foi usado como agente oxidante auxiliar.

### **3.3.3. Amostras**

As folhas de insulina (*Cissus sicyoides*), graviola (*Annona muricata*), peão branco (*Jatropha curcas*) e fruta pão (*Artocarpus altilis*), foram adquiridas no Mercado do Ver-o-Peso em Belém-PA, em barracas de venda de plantas medicinais, no dia 20 de janeiro de 2009. De acordo com os vendedores, todas estas plantas foram produzidas na região metropolitana de Belém. As folhas foram adquiridas ainda frescas.

### **3.3.4. Preparo das amostras**

Foram adquiridas, aproximadamente, 1000 g de folhas frescas que foram lavadas com água desionizada e posteriormente foram secas em estufa à  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , com circulação de ar, até peso constante, por um período aproximado de 56 horas. As folhas das plantas medicinais já secas foram pulverizadas com auxílio de gral e pistilo e em seguida, armazenadas em frascos de polietileno previamente descontaminados.

### 3.3.5. Digestão das amostras

As amostras foram digeridas em forno de micro-ondas com cavidade. As condições experimentais para a digestão das amostras foram avaliadas, buscando-se obter a condição na qual se utiliza a quantidade mínima de ácido e o mais diluído possível, mas que garanta a completa digestão. Assim, busca-se reduzir o consumo de ácido concentrado, a geração de resíduos e o custo da análise.

Para a otimização do processo de digestão assistida por micro-ondas, uma massa de aproximadamente 0,25 g de amostra foi mantida constante e a concentração do HNO<sub>3</sub> (concentrado, 75 %, 50 % e 40 % (v/v)) e as quantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1, 2 e 3 mL) foram variadas. A programação do micro-ondas é mostrada na Tabela 7.

Tabela 7. Programação do micro-ondas

Etapa	Tempo (min.)	Temperatura (°C)	Potência (W)
Rampa	10	200	1000
Digestão	20	200	1000
Ventilação	50	ambiente	0

### 3.3.6. Extração do Cr (VI) solúvel em água

Uma massa de aproximadamente 0,25 g de cada amostras foi pesada e transferida para um erlenmeyer de 25 mL e em seguida foi adicionado 5 mL de água fervente e tampados com placas de petri. A infusão foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e então, foi filtrada em papel de filtro quantitativo. O Cr (VI) solúvel em água foi determinado nas plantas medicinais por GF AAS (AMARANTE, *et al.* 2011; WEBER, KONIECZYNSKI, 2003).

### 3.3.7. Extração do Cr (VI) total

Para a extração do Cr (VI) total foi adaptado a metodologia proposta por MATOS, *et al.* 2008; MATOS; NÓBREGA, 2009; MANDIWANA; PANICHEV; PANICHEVA, 2011. Estes autores propõem que se pese uma massa conhecida, adicione 10 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  e em seguida aqueça até a fervura, onde deve permanecer fervendo por 3 minutos, depois resfriar, filtrar, aferir para 10 mL e analisar, porém, esta metodologia não apresentou uma recuperação aceitável, por isso foi adaptada.

Uma massa de aproximadamente 0,25 g de folhas secas foram transferidas para um erlenmeyer de 25 mL e em seguida foi adicionado 10 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  em ebulição e tampado com placas de petri. Após o resfriamento, a mistura foi filtrada em papel de filtro quantitativo e então o Cr (VI) total foi determinado por GF AAS (MATOS, *et al.* 2008; MATOS; NÓBREGA, 2009; MANDIWANA; PANICHEV; PANICHEVA, 2011).

### 3.3.8. Análise elementar

O cromo foi determinado nos digeridos, nas extrações com água e com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  por GF AAS. Um estudo de adição e recuperação foi realizado para avaliar a exatidão do procedimento de extração da amostra e as medidas no GF AAS. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados usando dez medidas do branco analítico, onde o  $\text{LOD} = 3 \times s/m$  e o  $\text{LOQ} = 10 \times s/m$ , sendo 's' é o desvio padrão das medidas do branco analítico e 'm' é a inclinação da curva analítica usada na determinação dos elementos

estudados (JALBANI, et al. 2010; RIBANI, et al. 2004; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; HARRIS, 2005).

Durante a análise por GF AAS foi injetado 20  $\mu$ L da amostra no tubo de grafite, no qual era possível realizar aproximadamente 300 queimas. O programa de aquecimento do tubo de grafite é mostrado na Tabela 8.

Tabela 8: Programa de aquecimento do forno de grafite

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (s)		Gás (L/min)
		Rampa	Patamar	
Secagem 1	95	5	10	0,3
Secagem 2	120	15	20	0,3
Pirólise	1200	5	5	0,3
Atomização	2600	0,7	2	0
Limpeza	2700	1,0	2	0,3

### 3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de otimização das condições experimentais para a digestão das amostras foi otimizado com quantidades e concentrações diferenciadas de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Os resultados são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9 – Otimização das condições experimentais de digestão das amostras usando micro-ondas com cavidade

Condição	$\text{HNO}_3$	$\text{H}_2\text{O}_2$	Digestão
1	7 mL conc.	1 mL	Completa
2	6 mL conc.	2 mL	Completa
3	4 mL conc.	4 mL	Completa
4	7 mL 75 %	1 mL	Completa
5	6 mL 75 %	2 mL	Completa
6	4 mL 75 %	4 mL	Completa
7	7 mL 50 %	1 mL	Completa
8	6 mL 50 %	2 mL	Completa
9	4 mL 50 %	4 mL	Completa
10	7 mL 40 %	1 mL	Incompleta
11	6 mL 40 %	2 mL	Incompleta
12	4 mL 40 %	4 mL	Incompleta

Com os dados da Tabela 9 pode ser observado que nas condições de 1 a 9 a digestão foi completa. Nas condições de 4 a 6, a digestão foi eficiente sendo utilizado  $\text{HNO}_3$  75 % (v/v), uma concentração de ácido menor que a das condições 1 a 3. Porém, a digestão com ácido 50 % (v/v) também foi eficiente, como pode ser observado nas condições 7 a 9. As condições de 10 a 12 foram efetuadas com  $\text{HNO}_3$  a 40 % (v/v) e nestas condições a digestão não foi eficiente, pois, após a abertura dos frascos de digestão e transferência dos digeridos para frascos volumétricos, foi observado material sólido em suspensão.

Entre as condições favoráveis de digestão com  $\text{HNO}_3$  50 % (condições 7, 8 e 9), foi escolhida a condição 9, que utiliza uma quantidade menor de ácido nítrico (4 mL) em concentração relativamente baixa, 50 % (v/v). Assim, a condição ideal é aquela em que se utiliza uma menor quantidade de ácido na concentração mais baixa, assim, se reduz gastos e se gera uma menor quantidade de resíduo.

De acordo com as observações da Tabela 9 a condição ideal para a digestão total de plantas medicinais assistida por microondas deve ser realizada com 0,25 g de folhas secas e finamente pulverizadas, adicionado 4 mL de  $\text{HNO}_3$  50 % (v/v) e 4 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % (m/v) e programar o forno de micro-ondas para operar com a etapa de aquecimento de 10 minutos à 200 °C e com 1000 W de potência, a etapa de digestão deve ser realizada com 20 minutos à 200 °C e com 1000 W de potência e a etapa de ventilação deve ocorrer por no mínimo 50 minutos, até que o digerido adquira a temperatura ambiente, conforme mostra a Tabela 7.

Sendo assim, a digestão foi realizada com uma massa de aproximadamente 0,25 g de folha seca pulverizada foi transferida para um vaso de digestão. Um volume de 4 mL de  $\text{HNO}_3$  50 % (v/v) e 4 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% m/m foi adicionada ao vaso de digestão contendo a amostra. Os vasos foram fechados e colocados no forno de microondas, onde se realizou a programação e em seguida foram transferidos para frascos volumétricos e aferidos a 25 mL. Os brancos analíticos foram preparados pelo mesmo procedimento sem a adição da amostra.

A extração de  $\text{Cr}^{6+}$  foi realizado em meio alcalino a quente, neste meio é evitado a redução do  $\text{Cr}^{6+}$  a  $\text{Cr}^{3+}$ . A solução alcalina utilizada foi o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  previamente aquecida em banho de areia (MATOS, et al. 2008). Quando o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  foi adicionado à amostra em temperatura ambiente e posteriormente foi aquecido, os resultados mostraram uma recuperação de aproximadamente 60%, valor não aceito analiticamente, por

aquecida em banho de areia (MATOS, et al. 2008). Quando o  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foi adicionado à amostra em temperatura ambiente e posteriormente foi aquecido, os resultados mostraram uma recuperação de aproximadamente 60%, valor não aceito analiticamente, por este motivo buscou-se uma adaptação para a metodologia proposta para as amostras de plantas medicinais que forma estudadas.

As condições experimentais para análise de cromo por GFAAS foram otimizadas, para isso foi estudado uma solução de  $\text{Cr}$   $12 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  em  $\text{HNO}_3$  0,2%, uma amostra digerida e uma amostra na forma de chá. A medida da absorvância integrada/s versus a temperatura de pirólise e atomização é mostrado na Figura 14.

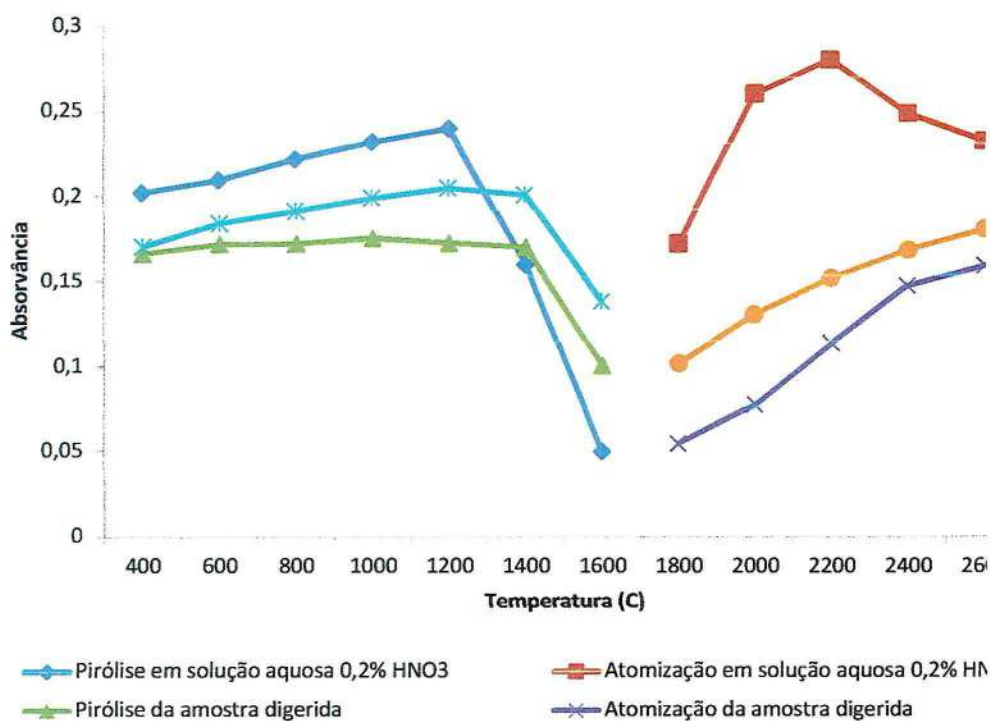


Figura 14: Curvas de Pirólise e Atomização para o cromo

As temperaturas ótimas de pirólise e atomização foram  $1200 \text{ } ^\circ\text{C}$  e  $2600 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

Os valores obtidos para o cromo total (digerido), para o  $\text{Cr}^{6+}$  total, para o  $\text{Cr}^{6+}$  solúvel em água e a percentagem de extração de  $\text{Cr}^{6+}$  solúvel em água em relação ao conteúdo total de cromo nas amostras de plantas medicinais é mostrado na Tabela 10.

Tabela 10 – Valores de cromo nas amostras em  $\mu\text{g Kg}^{-1}$

Amostras	Cr total	$\text{Cr}^{6+}$		Extração de $\text{Cr}^{6+}$ solúvel em água
		Total	Solúvel em água	
Graviola	1632,83 ± 93,79	188,89 ± 7,69	58,50 ± 4,10	3,58%
Insulina	1249,87 ± 23,57	363,78 ± 16,29	309,03 ± 23,24	24,72%
Peão Branco	733,26 ± 47,14	158,94 ± 5,46	99,17 ± 7,17	13,52%
Fruta Pão	2449,29 ± 212,76	46,20 ± 3,68	41,09 ± 4,09	1,68%

Os valores de cromo nas amostras digeridas variam de 733,26 a 2449,29  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ , que são valores concordantes com os encontrados por outros autores que avaliaram plantas medicinais.

Gjorgieva, *et al.* (2010), avaliaram os teores de cromo e outros metais nas folhas das plantas medicinais *Urtica dioica*, *Taraxacum officinale* e nas flores da *Matricaria recutita* que foram cultivadas em áreas poluídas e não poluídas da Macedônia. Os valores mais elevados de Cr foram 1,88 e 2,59  $\text{mg Kg}^{-1}$  em áreas não poluídas e poluídas respectivamente. Estes valores mostram que as amostras de graviola, insulina e peão branco, estão semelhantes aquelas plantas que são cultivadas em locais não poluídos, enquanto que a amostra de fruta pão esta com valor próximo ao das plantas cultivadas em locais poluídos.

Naithani e Kakkar (2006), realizaram estudos com várias plantas medicinais indianas cultivadas em diversas regiões e encontraram teores de Cr variando de 1,07-3,94  $\text{mg Kg}^{-1}$  nas folhas da *Cymbopogon citratus* e variações de 1,26-4,19  $\text{mg Kg}^{-1}$  nas folhas de *Ocimum*

*sanctum*. Estes intervalos de valores estão condizentes com os valores encontrados nas amostras de graviola, insulina e fruta pão, as amostras de peão branco apresentam valores mais próximos das amostras de *Glycyrrhiza glabra* (0,65-4,16 mg Kg<sup>-1</sup>), também avaliada pelos mesmos autores.

O trabalho de Maiga, *et al*, (2005), relata a avaliação de metais, entre eles o Cr em plantas medicinais utilizadas pela população de Mali para as mais diversas doenças. Destaca-se as plantas medicinais *Moringa oleifera* e a *Corchorus tridents* que apresentaram teores de Cr na faixa de 2,2 a 11,2 µg g<sup>-1</sup>, respectivamente, valores relativamente elevados quando se compara com as plantas deste estudo, graviola, insulina e peão branco.

Valores muito maiores do que os encontrados neste estudo foram os valores de Cr nas folhas de *Datura metel* (15,4 mg Kg<sup>-1</sup>) e nas folhas de *Calotropis procera* (198,6 mg Kg<sup>-1</sup>), que foram detectados em plantas medicinais utilizadas na Nigéria nos trabalhos de Obianjunwa, Adebajo e Omobuwajo (2001).

Os teores de Cr<sup>6+</sup> total presente nas amostras de plantas medicinais estudadas variaram entre 46,20 e 363,78 µg Kg<sup>-1</sup>, valores que são concordantes com o trabalho de Mandiwana, Panichev e Panicheva (2011) que encontraram valores de 0,03 – 3,15 µg g<sup>-1</sup> de Cr<sup>6+</sup> total presente em chás.

Elci, *et al*. (2010) encontraram em ervas da Turquia valores entre 0,46 – 8,07 µg g<sup>-1</sup> de Cr<sup>6+</sup> total, valores estes que estão acima dos valores encontradas para as plantas medicinais aqui estudadas. O maior valor encontrado foi para a amostra de insulina que esteve com de 0,363 µg g<sup>-1</sup> de Cr<sup>6+</sup> total, valor que é menor ao mínimo encontrado pelos autores citados, que é de 0,46 µg g<sup>-1</sup>.

Panichev, *et al*. (2005) encontraram valores que variaram de 0,12 a 0,48 µg g<sup>-1</sup> de Cr<sup>6+</sup> total em amostras de plantas cultivadas em solos ricos em cromo, as plantas avaliadas foram

*Alyssum obovatum*, *Cochlearia arctica*, *Armeria scabra*, *Salix arctica*, *Terminalia prunioides*, *Lydenburgia cassinoides*, *Leucas capensis*, *Petalidium oblongifolium* e outras plantas mais cultivadas tanto na África do Sul como na Rússia. Estes valores se assemelham aos encontrados para as amostras de graviola, insulina e peão branco, somente a amostra de fruta pão está com um valor muito abaixo dos reportados no estudo citado.

Os teores de  $\text{Cr}^{6+}$  solúvel em água nas amostras variaram de 41,09 – 309,03  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . Estes valores estão dentro do intervalo encontrado por Mandiwana, Panichev e Panicheva (2011) que encontraram valores oscilando entre 0,025 e 1,75  $\mu\text{g g}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{6+}$  em folhas de chá.

O teor de extração de  $\text{Cr}^{6+}$  solúvel em água em relação ao teor total de cromo nas amostras mostra que a extração varia de 1,68 a 24,72 %, valores que se comparados aos estudos de Panichev, *et al.* (2005) que encontrou valores entre 6 e 8% podem ser considerados na média.

Elci *et al.* (2010) encontraram intervalos de 11,05 a 48% de extração de  $\text{Cr}^{6+}$  solúvel em água em relação ao teor total de cromo, valores que contemplam as amostras de insulina e peão branco, já a amostra de graviola está mais próximo dos valores que foram encontrados por Mandiwana, Panichev e Panicheva (2011), que encontraram valores na faixa de 2,6 a 20,8%. A amostra de fruta pão teve sua extração muito baixa, em torno de 1,68% do total do cromo presente na amostra é extraído na forma de  $\text{Cr}^{6+}$  solúvel em água.

Sabendo do efeito tóxico do  $\text{Cr}^{6+}$  em alimentos e avaliando-se a concentração desta espécie nas amostras de insulina, a mais rica em  $\text{Cr}^{6+}$  solúvel em água entre as plantas medicinais estudadas, é encontrado uma concentração de 309,03  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ .

Adotando-se um padrão de preparação de chás (já que não há consenso na preparação destes) de 2 g e folhas secas para uma xícara de 200 mL, para os chás preparados com esta planta, a concentração é de 0,003  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Sendo que a concentração de ingestão do  $\text{Cr}^{6+}$  em

alimentos deve ser de no máximo  $0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nestas condições o consumo de uma xícara de chá de 200 mL de insulina, não oferece riscos para a saúde dos seus consumidores, porém se a ingestão for de uma xícara de chá de 200 mL for preparada com quantidades superiores de 3,5 g de folhas secas de insulina o risco de contaminação é presente (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Há a possibilidade de preparação dos chás de acordo com o procedimento de preparação fornecido pelas empresas que comercializam plantas medicinais em sachês. Estas empresas vendem os sachês com 1 ou 2 g e indicam a preparação para uma xícara com volume aproximado de 130 mL. Caso se utilize a quantidade máxima de um sachê com 2 g para a planta medicinal insulina em uma xícara de 130 mL, a concentração de  $\text{Cr}^{6+}$  solúvel em água será de  $0,0047 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Este valor está próximo da concentração máxima permitida para a ingestão diária ( $0,005 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), o que pode ser um perigo para os consumidores se ingerirem este chá nesta concentração.

Adotando o padrão máximo de preparação de chás comercializados por algumas empresas (2 g para 130 mL), as amostras de graviola, peão branco e fruta pão, apresentam concentrações de 0,0009, 0,0015 e  $0,0006 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, valores que não oferece riscos de intoxicação por  $\text{Cr}^{6+}$ .

Apesar de as amostras apresentarem valores significantes de Cr total, percebe-se que uma quantidade relativamente baixa deste metal é disponibilizado para as infusões, este fato pode ocorrer pela presença de substâncias que apresentam propriedades inibidoras, como ftatos ou taninos, ou mesmo o elemento cromo pode estar ligado fortemente a compostos orgânicos que não liberam este metal facilmente para a solução aquosa.

Kalny, et al. (2007) avaliaram Cr e outros metais em três plantas medicinais, entre elas na *Taraxacum officinale*, que apresentou uma percentagem de extração de Cr nos chás de

16,8%, valor próximo ao encontrado para a amostra de peão branco (13,52%), porém valor bem superior dos que foram encontrados para as amostra de fruta pão e graviola que foram de 1,68% e 3,58%, respectivamente.

Nookabkaew, Rangkadilok e Satayavivad (2006) estudaram três plantas utilizadas em chás na Tailândia e também exportado para várias partes do mundo, *Gynostemma pentaphyllum*, *Camellia sinensis* e *Morus Alba*, neste estudo foram avaliados 19 elementos, entre eles o cromo, nos digeridos e nos chás, foi também avaliado a percentagem de extração destes metais nos chás. As amostras de *Gynostemma pentaphyllum* e *Morus Alba* apresentaram extração de cromo total de 4,57% e 2,57%, respectivamente. Estes valores estão próximos da amostra de graviola e de fruta pão. A amostra de *Camellia sinensis* teve um valor de extração 11,45%, próximo ao valor da amostra de peão.

### 3.4. CONCLUSÃO

A otimização das condições experimentais para a digestão por micro-ondas das plantas medicinais possibilitou um processo de digestão mais eficiente, com uma menor geração de resíduos, um menor consumo de ácidos e amostras menos ácidas, conseqüentemente a diluição para correção da acidez é menor e os equipamentos utilizados para a análise não ficam tão expostos à ação de ataques ácidos, além de se minimizar a geração de resíduos com este procedimento.

A metodologia de extração de  $\text{Cr}^{6+}$  total em amostras de plantas medicinais mostrou-se bastante eficiente, fato comprovado pelo estudo de adição e recuperação, que revelou uma recuperação de 90,80%.

As amostras que apresentaram os maiores teores de  $\text{Cr}^{6+}$  solúvel em água foram a insulina, peão branco, graviola e fruta pão, respectivamente, porém, esta espécie de cromo mesmo sendo tóxica, não se encontra, nos chás, em concentrações considerados preocupantes para a saúde humana, mesmo para quem toma até três xícaras de chá por dia, preparadas com 2 g de folhas secas para cada xícara de 200 mL de água, porém, não é recomendável uma preparação com volumes menores de água (130 mL, por exemplo, como recomendam algumas empresas) para se evitar possíveis contaminações por  $\text{Cr}^{6+}$ .

Os valores de cromo nas amostras digeridas,  $\text{Cr}^{6+}$  total e  $\text{Cr}^{6+}$  solúvel em água encontram-se dentro dos valores permitidos para alimentos e não apresentam risco a saúde para os consumidores destas plantas que ingerem uma xícaras de chá por dia, preparada com 2 g de folha de seca em 200 mL de água.

*CAPÍTULO 4:*

*EXTRAÇÃO DE  $Fe^{2+}$  EM PLANTAS*

*MEDICINAIS DA AMAZÔNIA*

*USANDO EXTRAÇÃO POR PONTO*

*NUVEM*

## 4.1. REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1.1. A importância do ferro

O ferro é muito importante para nutrição de plantas, sendo considerado um micronutriente essencial encontrado em faixas que variam de 20 a 60  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Este metal é essencial para síntese de clorofila (SILVA; OLIVEIRA; ROCHA, 2010). O ferro tem um importante papel como componentes de enzimas envolvidas na transferência de elétrons (redox), como citocromos. Nesse papel, ele é reversivelmente oxidado de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$  durante transferência de elétrons (TAIZ; ZEIGER, 2004).

O ferro é importante nas proteínas ferro-enxofre e como catalisador de enzimas que participam nas reações redox. As plantas obtêm o ferro do solo, onde está presente primariamente como  $\text{Fe}^{3+}$ . Em pH neutro, o  $\text{Fe}^{3+}$  é altamente insolúvel. Para que quantidades suficientes de ferro sejam absorvidas da solução do solo, as raízes necessitam desenvolver vários mecanismos para aumentar a solubilidade e a disponibilidade do ferro. Tais mecanismos incluem o aumento da solubilidade do  $\text{Fe}^{3+}$  pela acidificação do solo, redução do  $\text{Fe}^{3+}$  a forma de  $\text{Fe}^{2+}$  mais solúvel e liberação de compostos que formam complexos estáveis e solúveis com o ferro. As membranas plasmáticas da raiz, possuem uma enzima, a *redutase ferro-quelante*, que reduz o  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , a atividade dessa enzima aumenta sob condições de deficiência de ferro. Uma vez que as raízes tenham absorvido ferro ou um ferro quelato, eles são oxidados nas raízes à forma férrica e translocados, em sua maior parte, para as folhas, na forma de complexos eletroestáticos com o citrato. A maior parte do ferro nos vegetais é encontrado na molécula heme do citocromo, nos cloroplastos e nas mitocôndrias (TAIZ; ZEIGER, 2004).

#### 4.1.2. Extração e pré concentração com micelas – Ponto Nuvem

Em 1976, Wanatabe e colaboradores introduziram a extração por ponto nuvem (Cloud-Point Extraction – CPE), uma nova técnica de extração e separação como alternativa para o uso de solventes orgânicos. Entretanto, a CPE foi inicialmente introduzida para a pré-concentração de metais na forma de complexos hidrofóbicos. Muitos estudos foram publicados propondo extração e pré-concentração para a determinação de analitos orgânicos e inorgânicos (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005).

Extração por ponto nuvem têm sido aplicada para a separação e pré-concentração de metais traços em diversas matrizes. Nesta técnica, o analito é extraído em micelas após a reação com um agente de complexação hidrofóbico na presença de um surfactante acima da concentração micelar crítica (CMC). Durante o processo uma solução aquosa de surfactante não iônico torna-se turva após a uma alteração adequada das condições físico-químicas, em geral por meio de aquecimento ou introdução de substâncias químicas adequadas. O processo resulta em um sistema bifásico, uma fase rica em surfactante que contém a maior parte do surfactante e a espécie hidrofóbica extraída e uma outra fase que contém uma pequena quantidade de surfactante, próximo da concentração micelar crítica (SILVA; OLIVEIRA; ROCHA, 2010).

O fenômeno do ponto nuvem se baseia quando uma solução aquosa de um agente tensoativo torna-se turvo separando-se em duas fases isotrópicas. Em uma das fases, os analitos podem ser extraídos e pré concentrados com sucesso quando são alteradas algumas condições que afetam a separação de fases. No processo de extração por ponto nuvem, a temperatura têm um papel importante, pois acima da temperatura do ponto nuvem a solução aquosa com o surfactante não iônico começa a turvar, a solubilidade em água diminui e o

numero de agregados micelares aumenta consideravelmente, e então simultaneamente ocorre a separação de fases, uma concentrada em analito e outra aquosa (ZHANG; DUAN; WANG, 2011; ANDRADE; NASCENTES; COSTA, 2009; BEZERRA; ARRUDA; FERREIRA, 2005).

A extração mediada por micelas baseia-se no fenômeno bem conhecido de separação de fases em soluções micelares de tensoativos não iônicos. Por exemplo, uma solução micelar de Triton X-100 torna-se turva quando aquecida acima de 60 °C, que é definido como ponto nuvem. A solução micelar separa-se em duas fases distintas. Uma fase contém bastante Triton X-100 (rica em surfactante) e uma outra fase aquosa (pobre em surfactante) em que a concentração de Triton X-100 é igual ou abaixo da concentração micelar crítica (CMC) (TANI; KAMIDATE; WATANABE, 1997).

Quelatos metálicos hidrofóbicos originalmente presentes em soluções que se ligam a micelas podem assim ser extraídos da solução micelar em um pequeno volume da fase rica em surfactante. Baseado-se na separação de fases a uma temperatura acima do ponto nuvem, a extração mediada por micelas também foi denominada como separação de fases induzida por temperatura ou extração por ponto nuvem. O ponto de turvação das soluções micelares pode ser controlado pela adição de sais, alcoóis, tensoativos não iônicos e alguns compostos orgânicos (TANI; KAMIDATE; WATANABE, 1997).

A extração mediada por micelas para a análise e especiação de metais é bastante utilizada, geralmente ela segue os seguintes passos: o metal reage com o ligante para formar um complexo hidrofóbico; uma turvação é gerada pelo aumento na temperatura acima do ponto nuvem ou pela adição de sal; as micelas formadas prendem os complexos metálicos dentro dos seus núcleos hidrofóbicos; a fase rica em surfactante é subsequentemente separada

a partir de uma massa aquosa por centrifugação (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005). A Figura 15 ilustra um esquema de formação do ponto nuvem.



Figura 15: Formação do ponto nuvem.

(Fonte: Adaptado de PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005)

Usualmente, depois que as fases são separadas por centrifugação os tubos de testes são colocados em banho de gelo para aumentar a viscosidade das micelas e a remoção da fase aquosa ser realizada até mesmo pela inversão do tubo. As etapas do procedimento são importantes, pois resultam na redução da fase rica em surfactante a um valor mínimo, raramente excede 100  $\mu\text{L}$  por 10 mL de volume da amostra (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005).

Baixas concentrações de moléculas surfactantes em solução aquosa são encontradas principalmente na forma de monômeros, embora seja possível encontrar também dímeros e trimeros. Quando a concentração do surfactante aumenta acima de um certo limite, chamado de concentração micelar crítica (CMC), monômeros de surfactantes espontaneamente se acumulam para formar aglomerados coloidais conhecidos como micelas, que podem tomar as mais variadas formas (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005). As micelas são estruturas de dimensões coloidais, formadas por moléculas de surfactantes que se agregam de forma espontânea em solução aquosa quando a concentração micelar crítica (CMC) é

alcançada. Abaixo da CMC o tensoativo é encontrado principalmente na forma de monômero, e, quando o CMC é alcançado, o processo de formação das micelas é favorecido. Micelas são estruturas estáticas, termodinamicamente estáveis e facilmente reproduzíveis, porém, podem ser destruídas por diluição em água quando a concentração do surfactante é menor que o CMC (BEZERRA; ARRUDA; FERREIRA, 2005).

A extração mediada por micelas apresenta uma série de vantagens onde entre elas pode ser destacado a simplicidade de operação da metodologia, a capacidade de concentrar uma série de analitos com recuperações quase quantitativas; os fatores de pré-concentração obtidos são comparáveis ou superiores a outros sistemas; surfactantes comercializados são ambientalmente amigáveis e de baixo custo e as quantidades utilizadas são mínimas em comparação com solventes orgânicos usados na extração convencional; em técnicas de extração por ponto nuvem são aplicadas condições suaves, permitindo pré-concentração em analitos termicamente sensíveis como moléculas biológicas e ambientais; a fase rica em surfactante é compatível com as maiorias das fases móveis utilizadas em sistema hidrodinâmico analíticos, ao mesmo tempo que aumenta o sinal analítico em FAAS e a molhabilidade na superfície de grafite em ETAAS (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005; TANI; KAMIDATE; WATANABE, 1997; ZHANG; DUAN; WANG, 2011; ANDRADE; NASCENTES; COSTA, 2009; BEZERRA; ARRUDA; FERREIRA, 2005).

As limitações à extração mediada por micelas são a manipulação da fase rica em surfactante, que é muito viscoso, e não pode ser diretamente injetada em instrumentos convencionais de análise; surfactantes cromóforos que interferem na detecção por UV com a sobreposição com o sinal do analito; os coeficientes de partição relativamente baixos de várias espécies de metais quelados (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005; BEZERRA;

ARRUDA; FERREIRA, 2005; ZHANG; DUAN; WANG, 2011; ANDRADE; NASCENTES; COSTA, 2009; BEZERRA; ARRUDA; FERREIRA, 2005)

#### 4.1.2.1. Efeito do pH no ponto nuvem

Para espécies inorgânicas pouca diferenciação é observada na eficiência da extração de complexos formados em diferentes valores de pH, pois estes complexos são volumosos, não carregados e covalentes (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005).

#### 4.1.2.2. Efeito da concentração do surfactante no ponto nuvem

Os surfactantes são agentes de superfície ativa, também chamados de tensoativos, que são moléculas anfífilas, com metades distintas hidrofóbicas e hidrofílicas, fato que proporciona ao surfactante a propriedade de ser solúvel em água e em outros solventes. Um surfactante típico tem uma estrutura R-X, onde R é uma cadeia de hidrocarboneto que pode conter de 8 a 18 átomos de carbono, e X um grupo cabeça polar ou iônico. Os surfactantes são geralmente classificados de acordo com a natureza do grupo hidrofílico, que pode ser não iônico, catiônico, aniônico ou anfótero (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005; BEZERRA; ARRUDA; FERREIRA, 2005).

Se a concentração do surfactante for muito pequena pode comprometer a precisão e a reprodutibilidade porque a fase rica em um surfactante pode não reproduzir suficientemente as medidas de extração e separação (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005).

Quando apenas um surfactante aniônico é usado, a formação da micela é governada por dois fatores, primeiro a tendência das cadeias alquila de evitar o contato com a água, e depois, a repulsão eletrostática entre os grupos cabeça. No caso de formação de micelas por surfactantes não iônicos a tendência para a cadeia alquila para evitar o contato com a água é compensado pela hidratação e pelo espaço necessário para a cadeia com o grupo oxietileno (que no caso do Triton X-100 apresenta 9-10 cadeias). Por isso, o Triton X-100 é mais hidrófilo. Micelas mistas podem ser formadas a partir de tensoativos aniônicos e não iônicos, esta formação depende destes tensoativos e da concentração de equilíbrio entre eles (NASCENTE; ARRUDA, 2003; NAQVI; KHATOON; KABIR-UD-DIN, 2011).

#### 4.1.2.3 – Efeito da temperatura no ponto nuvem

Observações têm demonstrado que a temperatura é um fator importante para a eficiência da pré-concentração. Elevadas temperaturas levam a uma desidratação das micelas. Em muitos estudos o tempo de reação de 10 minutos têm sido reconhecido como ideal (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005).

A temperatura elevada leva a desidratação da micela e aumenta a razão fase-volume. Por este motivo, a eficiência da pré-concentração pode ser melhorada (ZHAO, et al. 2011).

#### 4.1.2.4. Efeito da força iônica (concentração de eletrólitos) no ponto nuvem

Um aumento na força iônica aumenta a separação de fase. A força iônica também tem aumentado a recuperação, por este motivo têm sido aplicada para matrizes difíceis, como ambientais, águas e fluidos biológicos (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005).

A adição de sal pode reduzir a concentração de água livre na fase rica em surfactante e conseqüentemente reduzir o volume da fase. A adição de sal pode também acelerar a separação de fases através do aumento da concentração micelar na fase rica em surfactante e, uma concentração alta de sal pode levar a uma queda na temperatura do ponto nuvem (ZHAO, et al. 2011).

Coelho e Arruda (2005) estudaram entre outros parâmetros, a influência da concentração do eletrólito na extração de Cd por ponto nuvem em amostras de tabaco. Estes autores investigaram a possível formação do ponto nuvem a temperatura ambiente. A concentração final de NaCl foi variada entre 0,5 e 5% (m/v) e o maior sinal de absorção foi detectado à 1% de NaCl nas amostras que foram analisadas por FAAS.

#### 4.1.2.5. Efeito do agente quelante no ponto nuvem

O agente quelante é um fator que regula a extração do metal mediada por micela, muitos agentes quelantes têm sido utilizados para produzir complexos hidrofóbicos para serem isolados na fase rica de surfactantes da solução micelar (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005).

Baseado na sua reatividade e na sua constante de formação com um grande número de metais, muitos agentes quelantes são utilizados, tais como carbamatos, piridilazo, quinolina e derivados de naftol. Estas substâncias são agentes quelantes universais, que formam compostos hidrofóbicos com a maioria dos íons metálicos (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005).

O ligante é selecionado com o requisito que o complexo formado é suficientemente hidrofóbico, possui alto coeficiente de partição e é formado rapidamente e quantitativamente com o mínimo possível de excessos (PALEOLOGOS; GIOKAS; KARAYANNIS, 2005).

#### 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimização das condições experimentais para a extração de  $\text{Fe}^{2+}$  usando ponto nuvem;
- Avaliar os complexantes para  $\text{Fe}^{2+}$  PAN e APDC;
- Especificação de  $\text{Fe}^{2+}$  em amostras de plantas medicinais comercializadas em Belém-PA usando extração por ponto nuvem.

## 4.3. METODOLOGIA

### 4.3.1. Instrumentação

Para a digestão das amostras foi utilizado um forno de Micro-ondas com cavidade (Milestone, Sorisole, Itália).

Uma chapa aquecedora (Tecnal, Brasil) foi usada na preparação das infusões.

Para a preparação das extrações por ponto nuvem foi utilizado um banho Maria (Quimis, Brasil) e uma centrífuga (Centribio, Brasil) para acelerar a separação de fases no procedimento de extração por ponto nuvem.

Um espectrômetro de absorção atômica com chama (Thermo Scientific ice 3300, Reino Unido, Cambridge) foi utilizado para a determinação de ferro. O comprimento de onda ( $\lambda$ ), a corrente da lâmpada de catodo oco de ferro e a resolução espectral usada foram 248 nm, 6 mA e 0,2 nm, respectivamente. A curva de calibração foi preparada com as soluções de referência de 0,25, 0,5, 1,0, 5,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup> Fe. A mistura ar/acetileno foi utilizada como gás oxidante e combustível, respectivamente.

#### 4.3.2. Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água purificada (resistividade 18,2 MΩ cm) em sistema Elga (Elgastat, Buckinghamshire, England).

As soluções de referência de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  1000 mg L<sup>-1</sup> foram preparadas a partir de seus sais,  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (Vetec – Química fina, Rio de Janeiro, Brasil) e posteriormente sofreram as devidas diluições. As soluções de ácido pirrolidinacarboditióico (APDC) 5% (m/v) (Fluka, Suíça), Triton X-100 2,5% (v/v) (J. T. Baker, USA), SDS 5% (m/v) (Fluka, Japão) e cloreto de sódio (NaCl) (Vetec – Química fina, Rio de Janeiro, Brasil) 25% (m/v) foram preparadas de acordo com diluições apropriadas com água ultra-pura.

A solução de 1-(2-pyridylazo)2-naphthol (PAN) 0,1% (m/v) (Fluka, Suíça) foi preparado com diluição em etanol.

A solução tampão (pH=5) foi preparada com  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (CRQ, São Paulo, Brasil) 0,2 mol L<sup>-1</sup> e  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (Nuclear, São Paulo, Brasil) 0,2 mol L<sup>-1</sup> na proporção 3:7.

Soluções de HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil) e NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> (Synth, São Paulo, Brasil) foram preparadas para ajuste do pH.

Etanol (CRQ, São Paulo, Brasil) foi utilizado para a diluição dos extratos por ponto nuvem.

### 4.3.3. Otimização das condições experimentais para extração por ponto nuvem

A avaliação das melhores condições experimentais para se extrair a máxima concentração de  $\text{Fe}^{2+}$  e a mínima de  $\text{Fe}^{3+}$  por ponto nuvem foi realizada com um planejamento fatorial ( $2^5$ ), usando dois complexantes diferentes APDC e PAN.

Nestas condições foi otimizado as variáveis as condições experimentais para cada um dos complexantes estudados (APDC e PAN). Os parâmetros avaliados foram pH da solução: 0,5 ou 5; concentração do complexante (APDC 5% ou PAN 0,1%): 1mL ou 100  $\mu\text{L}$ ; concentração do surfactante não iônico (Triton X-100 2,5%): 1 mL ou 40  $\mu\text{L}$ ; concentração do surfactante aniônico (SDS 5%): 1 mL ou 100  $\mu\text{L}$ ; e concentração do eletrólito (NaCl 25%): 4 ou 2 mL. Foi avaliada a condição máxima, mínima e média de cada uma das variáveis citadas.

Dois complexantes diferentes foram avaliados, o APDC e o PAN. Cada condição experimental foi avaliada em triplicata, sendo 33 condições testadas para  $\text{Fe}^{2+}$  com o complexante APDC, 33 condições testadas para  $\text{Fe}^{3+}$  com o complexante APDC, 33 condições testadas para  $\text{Fe}^{2+}$  com o complexante PAN e 33 condições testadas para  $\text{Fe}^{3+}$  com o complexante PAN. Cada condição em triplicata totalizou 396 análises.

Para o tratamento estatístico foi utilizado o programa STATISTICA. Todos os cálculos de otimização foram realizados com um nível de significância de 95%. A Tabela 11 mostra o delineamento experimental realizado.

Tabela 11: Delineamento experimental

Parâmetros	Níveis		
	-1	0	+1
pH	0,5	2,75	5
Concentração do complexante (PAN ou APDC)	0,001% (PAN) 0,05% (APDC)	0,0055% (PAN) 0,275%	0,01% (PAN) 0,5% (APDC)
Concentração do surfactante não iônico (Triton X-100)	0,01%	0,13%	0,25%
Concentração do surfactante aniônico (SDS)	0,05%	0,275%	0,5%
Concentração do eletrólito (NaCl)	5%	7,5%	10%

-1: Valor mínimo; 0: Valor médio; +1: Valor médio

#### 4.3.4. Amostras

Para validar a metodologia desenvolvida foi avaliado a planta medicinal pariri (*Arrabidaea chica*), adquirida em cinco pontos diferentes: 1) um quintal residencial (QR), localizado no bairro do Jurunas, em Belém-PA, coletada no dia 30/10/2008; 2) amostra do mercado do Ver-o-Peso (VF) adquirida como folhas frescas vendidas em barracas deste mercado no dia 18/11/2008; 3) amostra do mercado do Ver-o-Peso (VS) adquirida como folhas secas vendidas em uma loja de plantas medicinais no dia 18/11/2008; 4) amostra processada comercializada por uma empresa de plantas medicinais (PV) adquirida em supermercados de Belém-PA, embalada no dia 03/10/2008; 5) amostra processada comercializada por uma empresa de plantas medicinais (PE) adquirida em supermercados de Belém-PA embalada no dia 17/12/2008.

Outras plantas medicinais também foram avaliadas, tais como Insulina (*Cissus sicyoides*), Unha de Gato (*Uncaria tomentosa*), Graviola (*Annona muricata*), Peão Branco

(*Jatropha curcas*) e Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa*). Todas estas amostras foram adquiridas no Mercado do Ver-o-Peso em Belém-PA, em barracas de venda de plantas medicinais, no dia 20 de janeiro de 2009. De acordo com os vendedores, todas estas plantas foram produzidas na região metropolitana de Belém. As folhas foram adquiridas ainda frescas.

#### **4.3.5. Preparo de amostras**

As amostras foram digeridas de acordo com a metodologia que foi otimizada para a digestão assistida por micro-ondas para plantas medicinais. As amostras secas e finamente pulverizadas foram pesadas (cerca de 0,25 g) e foram transferidas para frascos de digestão de teflon, em seguida foram adicionados 4 mL de HNO<sub>3</sub> 50% (v/v) e 4 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (m/m) e os frascos foram fechados e levados ao forno de micro-ondas, que operou com a programação mostrada na Tabela XY. Após estas etapas as amostras foram transferidas para frascos volumétricos e aferidos à 25 mL com água desionizada.

#### **4.3.6. Preparo das infusões**

Uma massa de aproximadamente 1,0 g de cada amostra foi pesada e em seguida foi adicionado 50 mL de água fervente. A infusão foi deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente e então, foi filtrada em papel de filtro quantitativo (AMARANTE, et al. 2011; WEBER, KONIECZYNSKI, 2003).

#### 4.3.7. Extração de $\text{Fe}^{2+}$ por ponto nuvem em plantas medicinais

A extração de  $\text{Fe}^{2+}$  nos chás das plantas medicinais estudadas foi realizado de acordo com a melhor condição otimizada neste estudo. A Figura 16 mostra a marcha analítica desenvolvida para esta extração

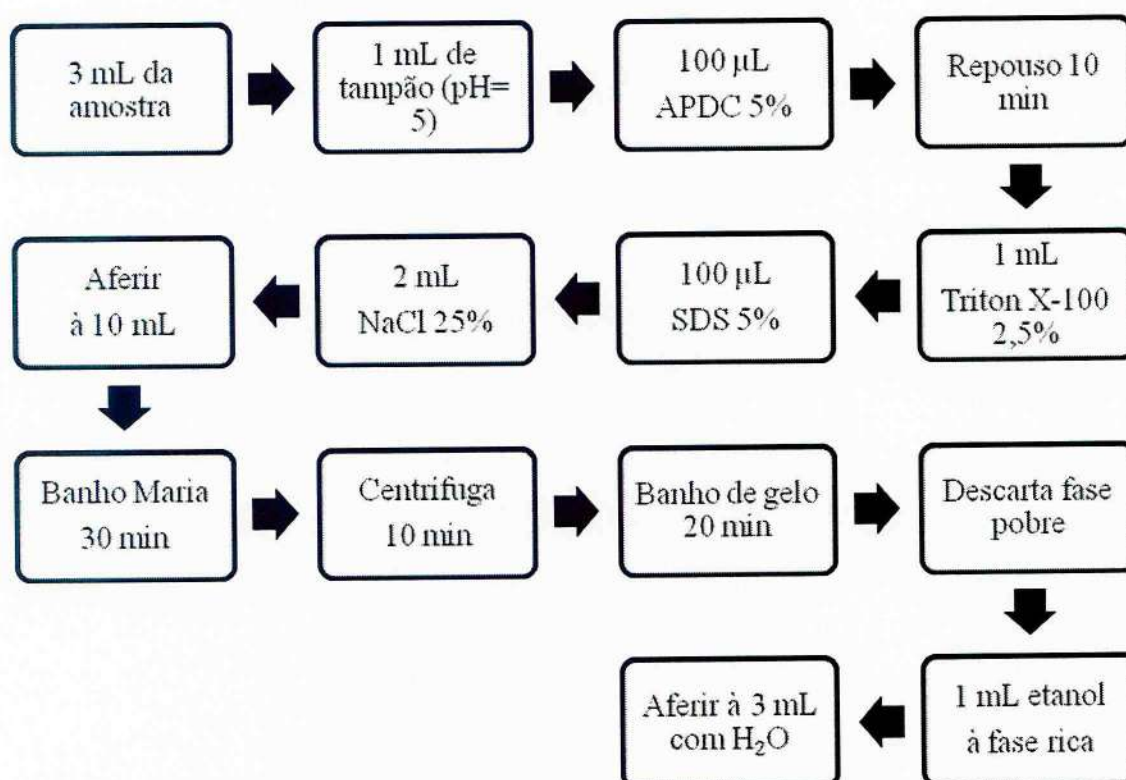


Figura 16. Fluxograma de extração de  $\text{Fe}^{2+}$  nas amostras.

#### 4.3.8. Análise elementar

As amostras digeridas, os seus chás e as suas extrações de  $\text{Fe}^{2+}$  por ponto nuvem foram analisadas por FAAS. A curva analítica foi preparada em meio alcoólico, nas mesmas condições em que se encontravam as amostras.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados usando dez medidas do branco analítico, onde o  $\text{LOD} = 3 \times s/m$  e o  $\text{LOQ} = 10 \times s/m$ , sendo 's' é o desvio padrão das medidas do branco analítico e 'm' é a inclinação da curva analítica usada na determinação de ferro (JALBANI, et al. 2010; RIBANI, et al. 2004; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; HARRIS, 2005).

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das médias com os seus respectivos desvios-padrão e as condições experimentais em que foram realizadas são mostradas na Tabela 12 para o complexante APDC.

Tabela 12 – Condições experimentais para extração de ferro (100 µg L<sup>-1</sup>) com APDC por ponto nuvem

Condição	APDC	pH	TRITON X-100	NaCl	SDS	Conc. Fe (II)	Recuperação Fe (II)	Conc. Fe (III)	Recuperação Fe (III)
1	0,05 (-1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,05 (-1)	*	*	*	*
2	0,50 (+1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,05 (-1)	*	*	*	*
3	0,05 (-1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,05 (-1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
4	0,50 (+1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,05 (-1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
5	0,05 (-1)	5 (+1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,05 (-1)	*	*	*	*
6	0,50 (+1)	5 (+1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,05 (-1)	*	*	*	*
7	0,05 (-1)	5 (+1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,05 (-1)	0,0932 ± 0,0233	93,2 %	< LOD	< LOD
8	0,50 (+1)	5 (+1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,05 (-1)	0,2097 ± 0,0233	209,79 %	< LOD	< LOD
9	0,05 (-1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,05 (-1)	*	*	< LOD	< LOD
10	0,50 (+1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,05 (-1)	*	*	< LOD	< LOD
11	0,05 (-1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,05 (-1)	*	*	*	*
12	0,50 (+1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,05 (-1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
13	0,05 (-1)	5 (+1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,05 (-1)	< LOD	< LOD	*	*
14	0,50 (+1)	5 (+1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,05 (-1)	< LOD	< LOD	*	*
15	0,05 (-1)	5 (+1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,05 (-1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
16	0,50 (+1)	5 (+1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,05 (-1)	0,0777 ± 0,0134	77,7 %	*	*
17	0,05 (-1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,50 (+1)	*	*	< LOD	< LOD
18	0,50 (+1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,50 (+1)	*	*	*	*
19	0,05 (-1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,50 (+1)	*	*	*	*
20	0,50 (+1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,50 (+1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
21	0,05 (-1)	5 (+1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,50 (+1)	< LOD	< LOD	*	*
22	0,50 (+1)	5 (+1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,50 (+1)	< LOD	< LOD	*	*
23	0,05 (-1)	5 (+1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,50 (+1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
24	0,50 (+1)	5 (+1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,50 (+1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
25	0,05 (-1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,50 (+1)	*	*	< LOD	< LOD
26	0,50 (+1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,50 (+1)	*	*	< LOD	< LOD
27	0,05 (-1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,50 (+1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
28	0,50 (+1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,50 (+1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
29	0,05 (-1)	5 (+1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,50 (+1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
30	0,50 (+1)	5 (+1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,50 (+1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
31	0,05 (-1)	5 (+1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,50 (+1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
32	0,50 (+1)	5 (+1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,50 (+1)	0,1010 ± 0,0134	101 %	0,1398 ± 0,0329	139,9 %
Médio	0,275 (0)	2,75 (0)	0,13 (0)	7,5 (0)	0,275 (0)	0,0932 ± 0,0329	93,2 %	0,0815 ± 0,0164	81,6 %

\* Condição na qual não houve a formação do Ponto Nuvem

LOD = 0,047 mg L<sup>-1</sup>

Com a análise dos resultados a Tabela 12 pode-se observar qual a condição que apresentou a maior recuperação para as análises de  $\text{Fe}^{2+}$  com o complexante APDC.

Comparando-se as condições que apresentaram recuperações aceitáveis para a extração de  $\text{Fe}^{2+}$  (experimentos 7, 32 e média) com as mesmas condições de extração de  $\text{Fe}^{3+}$ , pode-se perceber que a condição 7 apresentou recuperação de 93,2% para o  $\text{Fe}^{2+}$  e apresentou abaixo do limite de detecção para  $\text{Fe}^{3+}$ . A condição 32 apresentou recuperação para o  $\text{Fe}^{2+}$ , porém, para o  $\text{Fe}^{3+}$  a recuperação foi 139,9%, demonstrando uma interferência positiva para o  $\text{Fe}^{3+}$ . A condição média apresentou 93,2% de recuperação para o  $\text{Fe}^{2+}$  e 81,6% para o  $\text{Fe}^{3+}$ . Esta condição não foi selecionada como melhor condição, pois a extração de  $\text{Fe}^{3+}$  foi elevada.

A melhor condição para a máxima extração de  $\text{Fe}^{2+}$  e a mínima extração de  $\text{Fe}^{3+}$  por ponto nuvem usando APDC como complexante foi a condição 7, que extraiu aproximadamente 93,2% do  $\text{Fe}^{2+}$  presente na amostra e uma quantidade mínima detectada de  $\text{Fe}^{3+}$  ( $< 0,047 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Portanto, a proposta de extração máxima de  $\text{Fe}^{2+}$  e mínima de  $\text{Fe}^{3+}$  deve ser desenvolvida com transferência de 3 mL da amostra para frasco volumétrico de 14 mL, em seguida tamponar o meio com tampão de acetato (pH=5), adicionar 100  $\mu\text{L}$  do complexante APDC 5% (m/v) homogeneizar a solução e deixar em repouso por 10 minutos para garantir a completa complexação do analito com o complexante, após esse período adicionar 1 mL do tensoativo não iônico Triton X-100 2,5% (v/v), 100  $\mu\text{L}$  do tensoativo aniônico SDS 5% (m/v), 2 mL do eletrólito NaCl 25% (m/v) e aferir para 10 mL com água desionizada, em seguida deixar por 30 minutos em banho Maria à 60 °C e logo após centrifugar por 10 minutos à 4500 rpm e lavar à banho de gelo (-10 °C) por 20 minutos, depois disso descartar a fase pobre (sobrenadante), adicionar 1 mL de etanol à fase rica, aferir à 3 mL com água desionizada e realizar a determinação de ferro por FAAS.

A Tabela 13 traz a tabela ANOVA, através da qual foi possível construir os gráficos de pareto e de superfície.

Tabela 13. ANOVA dos dados de otimização

Fator	SS	DF	MS	F	p
(1) APDC	0,3	1	0,28	0,00016	0,990136
(2) pH	14238,3	1	14238,28	7,96905	0,011725
(3) Triton X-100	0,3	1	0,28	0,00016	0,990136
(4) NaCl	0,0	1	0,03	0,00002	0,996712
(5) SDS	14154,0	1	14154,03	7,92190	0,011933
1x2	0,3	1	0,28	0,00016	0,990136
1x3	1610,3	1	1610,28	0,90126	0,355746
1x4	1498,8	1	1498,78	0,83886	0,372534
1x5	6022,5	1	6022,53	3,37076	0,083916
2x3	0,3	1	0,28	0,00016	0,990136
2x4	6132,8	1	6132,78	3,43247	0,081369
2x5	1638,8	1	1638,78	0,91721	0,351631
3x4	1554,4	1	1554,03	0,86978	0,364074
3x5	0,8	1	0,78	0,00044	0,983560
4x5	24808,8	1	24808,78	13,88528	0,001679
Erro	30373,8	17	1786,70		
Total SS	102034,1	32			

Os valores destacados em vermelho nas colunas SS e F da Tabela 13 são os parâmetros mais significativos para os experimentos, assim, são destacados os parâmetros pH (2), SDS (5) e a interação 4X5.

A Figura 17 traz um gráfico de pareto, que comprova as análises feitas anteriormente. O gráfico de pareto é um gráfico de barras que representa o efeito nas variáveis sobre a resposta de interesse (concentração de  $Fe^{2+}$ ), o posicionamento das barras ajuda a enfatizar dados importantes (LARSON; FARBER, 2010).

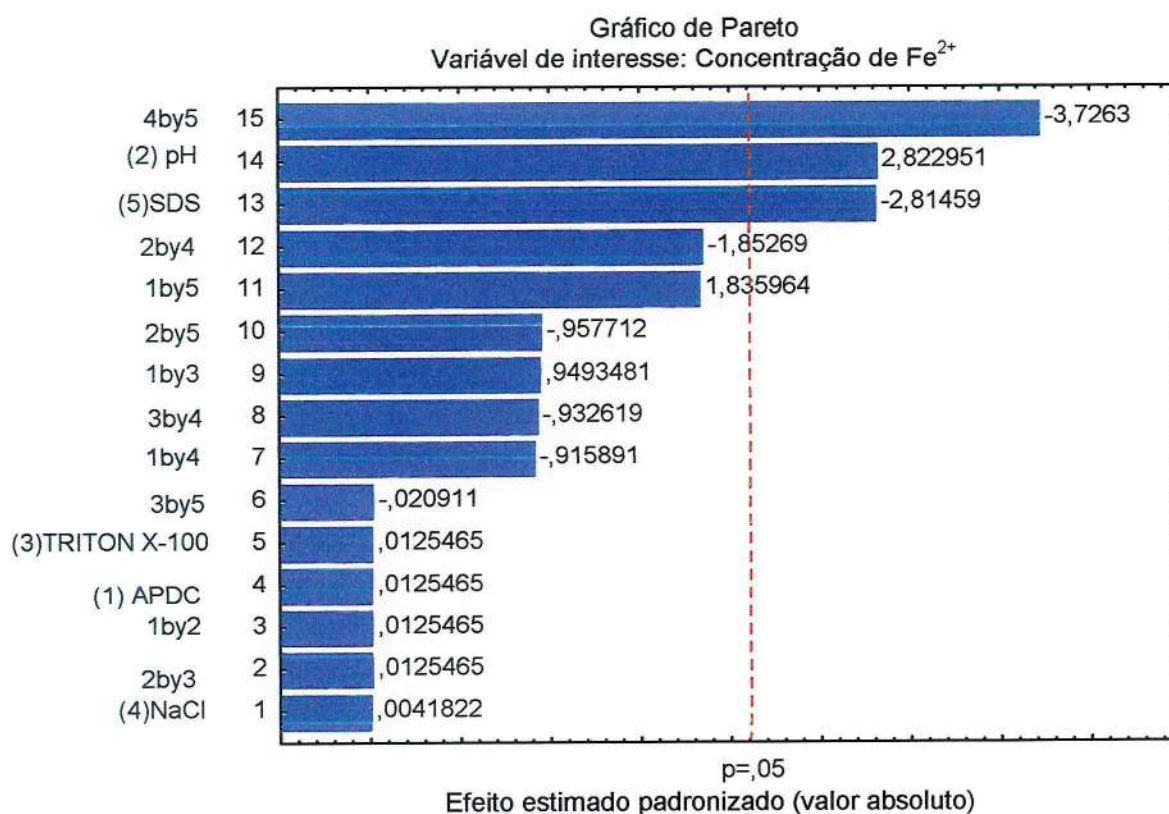


Figura 17. Gráfico de pareto

Pela análise da Figura 17, se observa que, isoladamente quem apresenta a maior influência é o pH, pois é o parâmetro que apresenta o maior valor de correlação positivo, enquanto que o SDS apresenta um efeito antagônico, porém, de elevada influência na recuperação da concentração do  $\text{Fe}^{2+}$ .

O gráfico de pareto ilustra ainda a alta importância da interação NaCl e SDS (4 e 5) e evidencia ainda que os dois parâmetros quando analisados conjuntamente influenciam de forma antagônica quando se busca uma melhor recuperação para o  $\text{Fe}^{2+}$ , ou seja, o acréscimo no valor de um dos parâmetros implica no decréscimo do valor do outro parâmetro e vice-versa.

O alto valor do efeito do pH (2,8229) e do SDS (-2,8146) encontrados no gráfico de pareto, também é confirmado na tabela de ANOVA (Tabela 13). Para o pH observa-se o

efeito sinérgico (positivo) desse parâmetro relacionado com a variável de resposta (concentração de  $\text{Fe}^{2+}$ ).

Um gráfico de superfície é mostrado na Figura 18, onde é evidenciado o comportamento antagônico existente entre o NaCl e o SDS, fato que foi observado no gráfico de pareto.

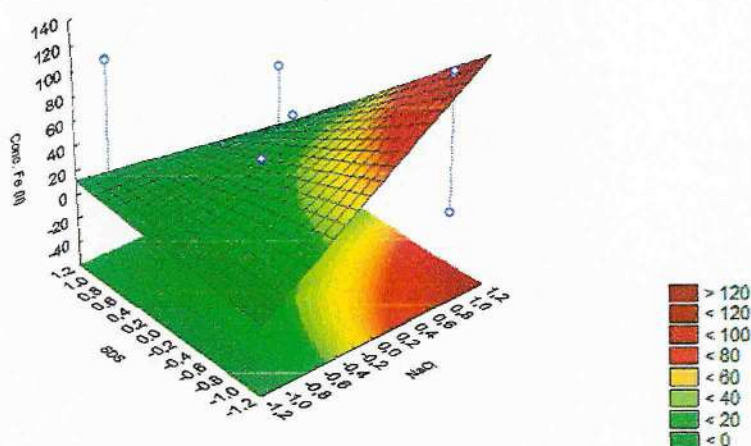


Figura 18. Gráfico de superfície relacionando NaCl e SDS com a recuperação de  $\text{Fe}^{2+}$ .

Na Figura 19, a relação do gráfico de superfície é entre os parâmetros pH e SDS, e, pela análise se compreende que nas condições de maior nível de pH e menor nível de SDS se obtém as melhores respostas para os valores de  $\text{Fe}^{2+}$ . Este fenômeno é confirmado pela condição experimental selecionada, onde se obteve uma boa recuperação na condição 7 (ver Tabela 12) que apresenta o valor máximo de pH (5,0) e mínimo de SDS (0,05%).

Se for desejável aumentar a percentagem de extração de  $\text{Fe}^{2+}$  na amostra para além dos 93,2% já encontrados, teoricamente deve-se diminuir o nível de SDS e aumentar o valor do pH além do nível máximo (5,0) já estudado neste trabalho.

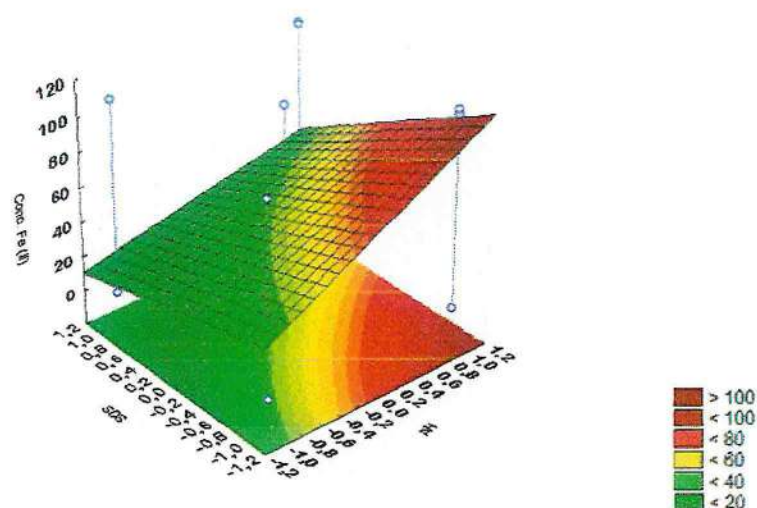


Figura 19. Gráfico de superfície relacionando pH e SDS com as recuperações de Fe<sup>2+</sup>.

As relações entre o NaCl e o pH com a recuperação de Fe<sup>2+</sup> são mostradas na Figura 20, as relações conjuntas destes parâmetros evidenciam que em condições máximas de pH e mínimas de NaCl a resposta é mais positiva em relação ao Fe<sup>2+</sup>. Este fenômeno também é comprovado na condição experimental, 7 (ver Tabela 12), onde se observa que a melhor condição é aceita quando se tem o valor máximo de pH (5,0) e mínimo de NaCl (5%).

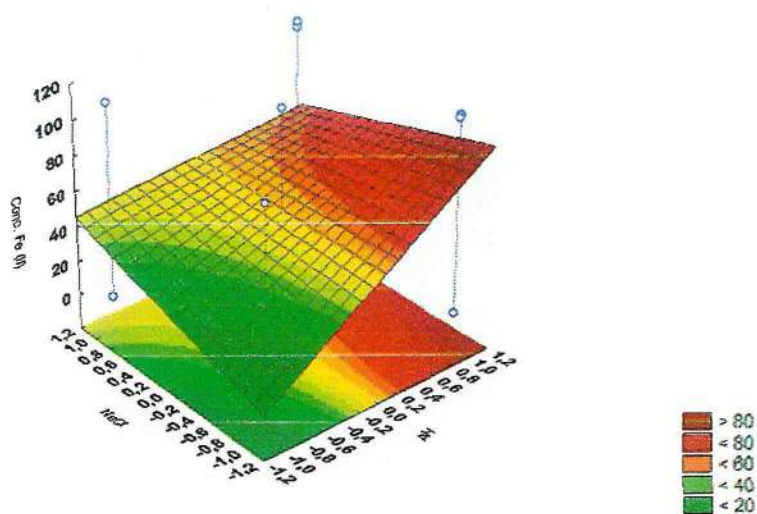


Figura 20. Gráfico de superfície relacionando NaCl e pH com a recuperação de Fe<sup>2+</sup>.

Os resultados das médias com os seus respectivos desvios-padrão e as condições experimentais em que foram realizadas são mostradas na Tabela 14 para o complexante PAN.

Tabela 14 – Condições experimentais para extração de ferro (100 µg L<sup>-1</sup>) com PAN por ponto nuvem

Condição	PAN	pH	TRITON X-100	NaCl	SDS	Conc. Fe (II)	Recuperação Fe (II)	Conc. Fe (III)	Recuperação Fe (III)
1	0,001 (-1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,05 (-1)	*	*	*	*
2	0,01 (+1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,05 (-1)	*	*	*	*
3	0,001 (-1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,05 (-1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
4	0,01 (+1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,05 (-1)	*	*	*	*
5	0,001 (-1)	5 (+1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,05 (-1)	*	*	*	*
6	0,01 (+1)	5 (+1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,05 (-1)	*	*	*	*
7	0,001 (-1)	5 (+1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,05 (-1)	< LOD	< LOD	0,1864 ± 0,0913	186,4 %
8	0,01 (+1)	5 (+1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,05 (-1)	*	*	*	*
9	0,001 (-1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,05 (-1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
10	0,01 (+1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,05 (-1)	*	*	*	*
11	0,001 (-1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,05 (-1)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
12	0,01 (+1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,05 (-1)	< LOD	< LOD	*	*
13	0,001 (-1)	5 (+1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,05 (-1)	0,0815 ± 0,0164	81,6 %	0,1243 ± 0,0134	124,3 %
14	0,01 (+1)	5 (+1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,05 (-1)	*	*	*	*
15	0,001 (-1)	5 (+1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,05 (-1)	< LOD	< LOD	*	*
16	0,01 (+1)	5 (+1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,05 (-1)	*	*	*	*
17	0,001 (-1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,50 (+1)	*	*	*	*
18	0,01 (+1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,50 (+1)	*	*	< LOD	< LOD
19	0,001 (-1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,50 (+1)	*	*	*	*
20	0,01 (+1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,50 (+1)	*	*	*	*
21	0,001 (-1)	5 (+1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,50 (+1)	< LOD	< LOD	*	*
22	0,01 (+1)	5 (+1)	0,01 (-1)	5 (-1)	0,50 (+1)	*	*	0,1864 ± 0,0233	186,4 %
23	0,001 (-1)	5 (+1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,50 (+1)	*	*	*	*
24	0,01 (+1)	5 (+1)	0,25 (+1)	5 (-1)	0,50 (+1)	*	*	*	*
25	0,001 (-1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,50 (+1)	*	*	*	*
26	0,01 (+1)	0,5 (-1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,50 (+1)	*	*	*	*
27	0,001 (-1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,50 (+1)	< LOD	< LOD	0,0932 ± 0	93,2 %
28	0,01 (+1)	0,5 (-1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,50 (+1)	*	*	*	*
29	0,001 (-1)	5 (+1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,50 (+1)	*	*	0,1087 ± 0,0485	108,7 %
30	0,01 (+1)	5 (+1)	0,01 (-1)	10 (+1)	0,50 (+1)	*	*	*	*
31	0,001 (-1)	5 (+1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,50 (+1)	*	*	*	*
32	0,01 (+1)	5 (+1)	0,25 (+1)	10 (+1)	0,50 (+1)	*	*	*	*
médio	0,0055 (0)	2,75 (0)	0,13 (0)	7,5 (0)	0,275 (0)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

\* Condição na qual não houve a formação do Ponto Nuvem

LOD = 0,047 mg L<sup>-1</sup>

Comparando-se as condições que apresentaram recuperações aceitáveis para a extração de  $\text{Fe}^{2+}$  (condição 13 com 81,6%) com a mesma condição de extração de  $\text{Fe}^{3+}$  (condição 13 com 124,3%), pode-se observar que esta condição não satisfaz o objetivo deste estudo, que é de obter uma condição em que se extraia a quantidade máxima de  $\text{Fe}^{2+}$  e a quantidade mínima de  $\text{Fe}^{3+}$ , pois nesta condição a recuperação para o  $\text{Fe}^{2+}$  é baixa e a recuperação para o  $\text{Fe}^{3+}$  é acima de 100%. Portanto, o uso do complexante PAN nestas condições, não é eficiente para especiação de  $\text{Fe}^{2+}$ .

O pH do meio é um importante fator na extração por ponto nuvem, pois ele está diretamente relacionado com a formação das espécies metal-ligante. Neste estudo foi avaliado os valores de pH 0,5 e 5, sendo que o pH ótimo para a extração foi 5. Filik e Giray (2012), avaliaram a influencia do pH na extração de  $\text{Fe}^{2+}$  por ponto nuvem em amostras de cervejas comercializadas na Turquia e entre os valores de pH variando de 3 a 8, encontraram que o pH onde é máxima a extração de  $\text{Fe}^{2+}$  e a é mínima a extração de  $\text{Fe}^{3+}$  foi 5,0.

Neste trabalho, a extração de  $\text{Fe}^{2+}$  por ponto nuvem foi realizada com uma micela mista, formada a partir de tensoativo não iônico (Triton X-100) e tensoativo aniônico (SDS). Nascentes e Arruda (2003) otimizaram a metodologia de extração e pré concentração de cobalto por ponto nuvem usando micelas mistas com tensoativos não ionico (Triton X-100) e aniônico (SDS) e aplicaram a metodologia para a extração de cobalto em amostras de vitamina B-12. Foi observado pelos autores que a presença de moléculas de Triton X-100 na composição micelar minimiza as forças de repulsão estabilizando assim o meio micelar e facilitando o processo de separação de fases. Isso pode justificar o fato das condições que foram otimizadas para a extração de  $\text{Fe}^{2+}$  neste estudo, contaram com uma quantidade máxima de Triton X-100 (1 mL à 2,5%), o que seria equivalente a uma concentração final de 0,25% (v/v) deste surfactante. Ainda neste estudo foi avaliado o efeito do eletrólito (NaCl) no ponto nuvem oriundo de micelas mistas de surfactantes (Triton X-100/SDS) e observaram o

importante papel que o eletrólito desempenha. Quando uma pequena quantidade de sal inorgânico é adicionado ao sistema é notado uma redução no ponto nuvem. Um aumento na concentração do eletrólito diminui a força de repulsão entre as micelas e conseqüentemente o volume da fase rica diminui. A quantidade de eletrólito (NaCl) que foi otimizada para a máxima extração de  $\text{Fe}^{2+}$  foi 0,5 g de NaCl, o mínimo entre os valores estudados, porém o suficiente para garantir uma extração eficiente.

A planta medicinal pariri (*Arrabidaea chica*) é muito utilizada para o tratamento de anemia na região Amazônica, por este motivo foi avaliado se os níveis de ferro nesta planta são  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Fe}^{3+}$  através do procedimento de ponto nuvem proposto. A Tabela 15 mostra os teores de ferro total nos digeridos e nas infusões e também o teor de  $\text{Fe}^{2+}$  presente nas infusões de pariri.

Tabela 15 - Teores de Fe total e  $\text{Fe}^{2+}$  nas infusões das amostras de pariri ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )

Amostras	Código	Digerido	Chá	$\text{Fe}^{2+}$
Quintal residencial	QR	$67,94 \pm 0,19$	< LOD	< LOD
Ver-O-Peso (Folha fresca)	VF	$139,36 \pm 2,06$	< LOD	< LOD
Ver-O-Peso (Folha seca)	VS	$132,26 \pm 2,94$	< LOD	< LOD
Empresa 1	PV	$87,46 \pm 0,21$	< LOD	< LOD
Empresa 2	PE	$148,94 \pm 0,17$	< LOD	< LOD

A análise da Tabela 15 mostra que os valores de ferro total nos digeridos das amostras de pariri variaram entre 67,94 e 148,94  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Estes valores encontrados são concordantes com os valores encontrados por vários autores que pesquisam plantas medicinais. Nookabkaew, Rangkadilok e Satayavivad (2006) avaliaram plantas medicinais consumidas na Tailândia e encontraram valores de ferro nos digeridos entre 20,91 e 318,3  $\text{mg kg}^{-1}$  na *C. sinensis*. Konieczynski e Wesolowski (2007) encontraram teores de ferro entre 3,73 e 174  $\text{mg Kg}^{-1}$  em amostras de 27 plantas medicinais polonesas. Ajasa, *et al.* (2004) avaliaram os teores

de ferro e outros metais em plantas nigerianas e encontraram de 35,6 a 208  $\mu\text{g g}^{-1}$  de ferro. Todos estes estudos evidenciam que as amostras de pariri apresentam quantidades de ferro em suas folhas condizentes com outras plantas medicinais estudadas em outras partes do mundo.

Os níveis de ferro total e  $\text{Fe}^{2+}$  nas infusões de *Arrabidaea chica* estavam abaixo do limite de detecção.

Jorge, et al. (2008) avaliaram extratos de *Arrabidaea chica* e encontraram teores significativos de carajurina e carajurona. Estes extratos quando administrados em ratos, estimularam o desenvolvimento de fibroblastos e a síntese de colágeno, estimulando assim a diminuição da área lesionada nestes roedores. Este extrato também apresenta propriedades anti oxidante. Os estudos de Oliveira et al (2008) apontam as propriedades antiinflamatórias do extrato aquosa da *Arrabidaea chica* em ratos com edemas induzidos por venenos de serpentes amazônicas. Sendo assim, a *Arrabidaea chica* pode não ser uma fonte de ferro assimilável, mas pode auxiliar a cura de inflamações e feridas que entre outras consequências pode levar ao aparecimento do quadro anêmico.

Outras amostras de plantas medicinais foram avaliadas. As amostras estudadas foram insulina (*Cissus sicyoides*), unha de gato (*Uncaria tomentosa*), graviola (*Annona muricata*), peão branco (*Jatropha curcas*) e vinagreira roxa (*Hibiscus sabdariffa*). Os teores de ferro total nos digeridos e nas infusões e  $\text{Fe}^{2+}$  nas infusões são apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Teores de Fe total e  $\text{Fe}^{2+}$  nas amostras de plantas medicinais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )

Amostras	Digerido	Chá	$\text{Fe}^{2+}$
Insulina	285,48 $\pm$ 1,43	2,58 $\pm$ 0,06	< LOD
Unha de gato	183,78 $\pm$ 4,42	2,44 $\pm$ 0,24	< LOD
Graviola	248,94 $\pm$ 8,38	2,10 $\pm$ 0,07	< LOD
Peão branco	194,80 $\pm$ 8,79	< LOD	< LOD
Vinagreira roxa	272,06 $\pm$ 1,03	30,22 $\pm$ 1,60	5,34 $\pm$ 0,05

As amostras de insulina, unha de gato, graviola, peão branco e vinagreira roxa apresentaram valores de ferro nos digeridos entre 183,78 e 285,48  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Valores concordantes com os obtidos foram encontrados por Kolasani, Xu e Milikan (2011). Estes autores encontraram valores entre 20 e 8020  $\mu\text{g g}^{-1}$  quando analisaram 50 tipos de plantas medicinais chinesas. Razic *et al.* estudaram 26 plantas medicinais e encontraram valores de ferro variando entre 47 e 546  $\text{mg Kg}^{-1}$ . Kalny, *et al.* (2007) encontraram valores entre 79,4 e 522  $\text{mg kg}^{-1}$  Fe em folhas digeridas de plantas medicinais utilizadas na Polônia.

Na infusão da amostra de peão branco não foi detectado ferro. Por outro lado, nas infusões de de insulina, unha de gato, graviola e vinagreira roxa, os teores de ferro variaram de 2,10 a 30,22  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Ferro (II) foi encontrado somente na infusão de vinagreira roxa, onde foi obtido 5,34  $\mu\text{g g}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ . Este valor é equivalente a 17,67% de  $\text{Fe}^{2+}$  do total de ferro presente na infusão.

Ramos, *et al.* (2011) estudaram a atividade antioxidante nos extratos etanólicos e aquosos de *Hibiscus sabdariffa* a partir da percentagem de sequestro do radical DDPH e, encontraram valores consideráveis para o teste da atividade antioxidante nas das folhas desta planta. Isto pode ser uma das possíveis explicações para os altos teores de  $\text{Fe}^{2+}$  encontrados na vinagreira, uma vez que quantidade de compostos antioxidantes podem ser tão elevadas que favorece a redução do  $\text{Fe}^{3+}$  nas folhas, local onde normalmente se encontra quantidades insignificantes de  $\text{Fe}^{2+}$ .

O LOD foi de 0,03  $\text{mg L}^{-1}$  Fe e o LOQ foi de 0,11  $\text{mg L}^{-1}$  Fe em meio alcoólico, na mesma condição em que foi realizada as extrações por ponto nuvem. O estudo de recuperação para as amostras digeridas e infusões foram de 93,26% e 101,72%, respectivamente.

#### 4.5. CONCLUSÃO

A especiação de ferro usando extração e pré concentração por ponto nuvem se mostra uma metodologia de fácil operação e de resultados satisfatórios. A otimização dos experimentos foi de grande importância para a escolha da condição ideal que favorece a formação do ponto nuvem e também a extração máxima de  $\text{Fe}^{2+}$  e a extração mínima de  $\text{Fe}^{3+}$ . Esta otimização também tornou-se importante para encontrar quantidades adequadas de reagentes que podem ser utilizados, evitando assim as perdas pelos excessos de reagentes adicionados, sem a perda de sensibilidade analítica.

Entre os complexantes avaliados, o APDC se mostrou bastante eficiente para a complexação máxima de  $\text{Fe}^{2+}$  e mínima de  $\text{Fe}^{3+}$  nas condições estudadas. Porém, o complexante PAN não se mostrou eficiente, sendo portanto descartado o seu uso nas condições que foram avaliadas.

Entre as cinco amostras de pariri estudadas nenhuma delas apresentou quantidades detectáveis de Fe total e de  $\text{Fe}^{2+}$  nos chás. As propriedades anti anêmicas do pariri devem estar mais relacionadas aos seus constituintes orgânicos (anti inflamatórios e cicatrizantes) do que aos seus constituintes inorgânicos (ferro assimilável). Sendo assim, em casos de anemia ocasionada pela carência de ferro não são indicados os chás de pariri.

O  $\text{Fe}^{2+}$  também não foi detectado nas amostras de chás de insulina, unha de gato, graviola e peão branco. Porém, foi encontrado nas amostras de vinagreira roxa, que por sinal é uma planta que já tem sido reportado na literatura por apresentar propriedades anti oxidantes, o que pode ser responsável pela presença do  $\text{Fe}^{2+}$  nesta amostra. Porém, a maioria das plantas evidenciam que o ferro nas folhas dos vegetais se encontram predominantemente na forma de  $\text{Fe}^{3+}$ .

*CAPÍTULO 5:*

*REFERÊNCIAS*

AHMED, Asmaa Ismail; HELAL, Manal Mahmoud. Serum Chromium Levels in Egyptian Diabetic Patients. **Comparative Clinical Pathology** DOI 10.1007/s00580-011-1299-z. 2011.

ALMEIDA, Maria Mozarina Beserra et al. Determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 94-97, 2002.

AMARANTE, Cristine Barros. et al. Avaliação da composição mineral do chá da folha de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae) por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). **Química Nova**, v. 34, n.3, p. 419-423, 2011.

ANDRADE, Frank P.; NASCENTES, Clésia C.; COSTA, Leticia M. Cadmium and lead cloud point preconcentration and determination in tobacco samples by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 8, p. 1460-1466, 2009.

ARGYRI, K. et al. Iron or zinc dialyzability obtained from a modified in vitro digestion procedure compare well with iron or zinc absorption from meals. **Food Chemistry**. v. 127, p. 716-721, 2011.

BEZERRA, Marcos de Almeida; ARRUDA, Marco Aurélio Zezzi; FERREIRA, Sérgio Luis Costa. Cloud point extraction as a procedure of separation and pre-concentration for metal determination using spectroanalytical techniques: A review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 40, p. 269-299, 2005.

BLICHARSKA, Eliza et al. A preliminary study on the effect of mineralization parameters on determination of metals in *Viscum album* species. **Central European Journal of Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 268-268, 2010.

BRIONES-LABARCA, Vilbett et al. Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on bioaccessibility, as well as antioxidant activity, mineral and starch contents in Granny smith Apple. **Food Chemistry**, v. 128, p. 520-529, 2011.

BRITO, Alba R. M. Souza; BRITO, Antonio A. Souza. Forty years of Brazilian medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 53-67, 1993.

COELHO, Luciana Melo; ARRUDA, Marco Aurélio Zezzi. Preconcentration procedure using cloud point extraction in the presence of electrolyte for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 60, p. 743-748, 2005.

CHUPARINA, Elena, V; AISUEVA, Tatiana, S. Determination of heavy metal levels in medicinal plant *Hemerocallis minor* Miller by X-ray fluorescence spectrometry. **Environmental Chemistry Letters**, n. 9, p. 19-23, 2011.

DEVIA, Beatriz, et al. New 3-Deoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 114-120, 2002.

EL-RJOOB, Abdul-Wahab O.; MASSADEH, Adna M.; OMARI, Mohammad N. Evaluation of Pb, Cu, Zn, Cd, Ni and Fe levels in *Rosmarinus officinalis labiatae* (Rosemary) medicinal plant and soils in selected zones in Jordan. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 140, p. 61-68, 2008.

FERREIRA, Edilene Cristina, et al. Análise exploratória dos teores de constituintes inorgânicos em sucos e refrigerantes de uva. **Eclética Química**, v. 27, n. especial, p. 77-90, 2002.

FERREIRA, Vitor F.; PINTO, Angelo C. A fitoterapia no mundo atual - Editorial. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FERNÁNDEZ, P. L. et al. Multi-element analysis of tea beverage by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Food Chemistry**, v. 76, p. 483-489, 2002.

FILIK, Hayati; GIRAY, Derya. Cloud point extraction for speciation of iron in beer samples by spectrophotometry. **Food Chemistry**, v. 130, p. 209-213, 2012.

FRANCO, Guilheme. **Tabela de composição químicas dos alimentos**. 9. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 307p.

GJORGIEVA, Darinka et al. Content of toxic and essential metals in medicinal herbs growing in polluted and unpolluted areas of Macedonia. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 61, p. 297-303, 2010.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONZÁLEZ, Horacio F. et al. Acquisition of visuomotor abilities and intellectual quotient in children aged 4-10 years: relationship with micronutrient nutritional status. **Biological Trace Element Research** v.120, p. 92-101, 2007.

GUÉRIN, Thierry et al. Determination of 20 trace elements in fish and other seafood from the French market. **Food Chemistry**, v. 127, p. 934-942, 2011.

<http://beavercreek.nau.edu>. Acesso em: 19/04/2012.

<http://en.wikipedia.org>. Acesso em: 19/04/2012.

[http://ntbg.org/plants/plant\\_details.php?plantid=1007](http://ntbg.org/plants/plant_details.php?plantid=1007). Acesso em: 22/09/2012.

<http://pt.scribd.com>. Acesso em: 19/04/2012.

<http://pt.wikipedia.org>. Acesso em: 19/04/2012.

[http://pt.wikipedia.org/wiki/Artocarpus\\_incisa](http://pt.wikipedia.org/wiki/Artocarpus_incisa). Acesso em: 22/09/2012.

<http://www.discoverlife.org>. Acesso em: 19/04/2012.

<http://www.google.com.br>. Acesso em: 19/04/2012.

<http://www.jardineiro.net>. Acesso em: 19/04/2012.

<http://www.nybg.org>. Acesso em: 19/04/2012.

<http://www.plantamundo.com>. Acesso em: 19/04/2012.

<http://www.plantasonya.com.br>. Acesso em: 19/04/2012.

<http://www.plantsystematics.org>. Acesso em: 19/04/2012.

JAIN, Sushil K.; RAINS, Justin L.; CROAD, Jennifer L. Effect of Chromium Niacinate and Chromium Picolinate Supplementation on Lipid Peroxidation, TNF- $\alpha$ , IL-6, CRP, Glycated Hemoglobin, Triglycerides and Cholesterol Levels in Blood of Streptozotocin-Treated Diabetic Rats. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 1124-1131, 2007.

- JORGE, Michelle Pedroza, et al. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 118, p. 361-366, 2008.
- KABATA-PENDIAS, Alina; PENDIAS, Henryk. **Trace elements in soils and plants**. Florida: CRC Press, 1986. 315p.
- KALNY, Piotr, et al. Determination of Selected Microelements in Polish Herbs and their Infusions. **Science of the Total Environment**. v. 381, p. 99-104, 2007.
- KARAK, Tanmoy; BHAGAT, R. M. Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. **Food Research International**. v. 43, p. 2234-2252, 2010.
- KOLASANI, Archana; XU, Hong; MILIKAN, Mary. Evaluation of mineral content of Chinese medicinal herbs used to improve kidney function with chemometrics. **Food Chemistry**. v. 127, p. 1465-1471, 2011.
- KONIECZYNSKI, Paweł; WESOŁOWSKI, Marek. Total phosphorus and its extractable form in plant drugs. Interrelation with selected micro- and macroelements. **Food Chemistry**. v. 103, p. 210-216, 2007.
- KOPITTKE, Peter M. et al. Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 4, p. 945-954, 2010.
- LEE, J. D.; **Química inorgânica não tão concisa**. 5. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 527p.
- LI, Shun-xing; DENG, Nan-sheng. Speciation analysis of iron in traditional Chinese medicine by flame atomic absorption spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 32, p. 51-57, 2003.
- LLORENT-MARTÍNEZ, E. J. et al. Investigation by ICP-MS of trace elements levels in vegetable edible oils produced in Spain. **Food Chemistry**, v. 127, p. 1257-1262, 2011.
- LORENZI, Harri; MATOS, Francisco José Abreu. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008. 544p.
- MAAS, Samuel et al. Trace metals in raw cow's Milk and assessment of transfer to comté cheese. **Food Chemistry**, v. 129, p. 7-12, 2011.
- MACIEL, Maria Aparecida M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p.429-438, 2002.
- MAIGA, Ababacar et al. Determination of some toxic and essential metal ions in medicinal and edible plants from Mali. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2316-2321, 2005.
- MALAVOLTA, Eurípedes. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 1980, 251p.
- MANDIWANA, Khakhathi L.; PANICHEV, Nikolay; PANICHEVA, Svetlana. Determination of chromium (VI) in black, green and herbal teas. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1839-1843, 2011.
- MATOS, Wladiana Oliveira. et al. Especificação Redox de Cromo em Solos Acidentalmente Contaminados com Solução Sulfocrômica. **Química Nova**. v. 31, p. 1450-1454, 2008.

MATOS, Wladiana Oliveira; NÓBREGA, Joaquim Araújo. Especificação de Cromo em Cimentos e Derivados de Cimentos Brasileiros. **Química Nova**. v. 32, p. 2094-2097, 2009.

MARREIRO, Dilina do Nascimento et al. Urinary excretion of zinc and metabolic control of patients with diabetes type 2. **Biological Trace Element Research**. V. 120, 42-50, 2007.

MEENA, Ajay K. et al. Estimation of heavy metals in commonly used medicinal plants: a market basket survey. **Environmental Monitoring and Assessment** v. 170, p. 657-660, 2010.

MICHALKE, Bernhard. Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 56, p. 122-139, 2003.

MORAES, Milena L. et al. Iron, copper and zinc in substitute foods for maternal Milk: Comparison with infant nutritional requirements. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 20, n. 9, 2009.

MUKHERJEE, Partha et al. Clouding behavior in surfactant systems. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 162, p. 59-79, 2011.

MUÑOZ, Carlos et al. Iron, copper and immunocompetence. **British Journal of Nutrition**, v. 98, p. 24-28, 2007.

NAITHANI, V.; KAKKAR, P. Effect of ecological variation on heavy metal content of some medicinal plants used as herbal tea ingredients in India. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, p.285-292, 2006.

NAOZUKA, Juliana; OLIVEIRA, Pedro V. Cu, Fe, Mn and Zn distribution in protein fractions of Brazil-Nut, cupuassu seed and coconut pulp by solid-liquid extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n.8, p. 1547-1553, 2007.

NAQVI, Andeleeb Z.; KHATOON, Suraiya; KABIR-UD-DIN. Cloud point variation of amphiphilic drug promethazine hydrochloride with added surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, p. 568-573, 2011.

NASCENTES, Clésia C.; ARRUDA, Marco Aurélio Z. Cloud point formation based on mixed micelles in the presence of electrolytes for cobalt extraction and preconcentration. **Talanta**, v. 61, p. 759-768, 2003.

NOOKABKAEW, Sumontha; RANGKADILOK, Nuchanart; SATAYAVIVAD, Jutamaad. Determination of trace elements in herbal tea products and their infusions consumed in Thailand. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 6939-6944, 2006.

OBIJUNWA, E. I.; ADEBAJO, Adeleke C.; OMOBUWAJO, Olanrewajo R. Essential and trace element contents of some Nigerian medicinal plants. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 252, n.3, p. 473-476, 2002.

OLABANJI, S. O. et al. Accelerator-based analytical technique in the study of some anti-diabetic medicinal plants of Nigeria. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 266, p. 2387-2390, 2008.

- OLIVEIRA, Denys Paixão Costa. et al. Atividade antiinflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. Sobre o edema induzido por venenos de serpentes amazônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 643-649, 2009.
- PALEOLOGOS, Evangelos K.; GIOKAS, Dimosthenis L.; KARAYANNIS, Miltiades I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 5, p. 426-436, 2005.
- PETRONILHO, Sílvia et al. *In vitro* and *in vivo* studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.) – Review. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 1-12, 2012.
- RAMOS, Diovany Doffinger et al. Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 8, p. 1331-1336, ago. 2011.
- RAZIC, Slavica et al. Determination of metal content in some herbal drugs-Empirical and chemometric approach. **Talanta**, v. 67, p. 233-239, 2005.
- RAINS, Justin L.; JAIN, Sushil K. Hyperketonemia decreases mitochondrial membrane potential and its normalization with Chromium (III) supplementation in monocytes. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 349, p. 77-82, 2011.
- REIS, Pedro S. et al. Mineral composition of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 1905-1909, 2010.
- SCHULZ, Volker; HÄNSEL, Rudolf; TYLER, Varro. **Fitoterapia racional: Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. São Paulo: Manole, 2002, 386p.
- SHEN, Fei et al. Multivariate classification of rice wines according to ageing time and brand based on amino acid profiles. **Food Chemistry**, v. 129, p. 565-569, 2011.
- SHIN, Eui-Cheol et al. Chemometric approach to fatty acid profiles in Runner-type peanut cultivars by principal component analysis (PCA). **Food Chemistry**, v. 119, p. 1262-1270, 2010.
- SILVA, Sidnei G.; OLIVEIRA, Pedro V.; ROCHA, Fábio R. P. A green analytical procedure for determination of copper and iron in plant materials after cloud point extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n.2, p. 234-239, 2010.
- SILVA, Karina Luize; FILHO, Valdir Cechinel. Plantas do gênero *Bauhinia*: Composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.
- SILVA, Ricardo J. N. B; CAMÕES, Maria F. G. F. C. Multivariate analysis of nutritional of foodstuff of plant origin for the selection of representative matrices for the analysis of pesticide residues. **Analytica Chimica Acta**. v. 674, p. 9-19, 2010.
- SOOMRO, M. Tahir et al. Quantitative assessment of metals in local brands of tea in Pakistan. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 2, p. 285-289, 2008.
- SOUSA, Rafeal A. et al. Classificação de água de coco processada e natural por meio de HCA, PCA e teores de íons metálicos determinados por ICP OES. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 654-656, 2006.

- TANI, Hirofumi; KAMIDATE, Tamio; WATANABE, Hiroto. Micelle-mediated extraction: Review. **Journal of Chromatography A**, v. 780, p. 229-241, 1997.
- VINSON, Joe A.; ZHANG, Juan. Black and green teas equally inhibit diabetic cataracts in a streptozotocin-induced rat model of diabetes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3710-3713, 2005.
- WEBER, Günther; KONIECZYŃSKI, Paweł. Speciation of Mg, Mn and Zn in extracts of medicinal plants. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 375, p.1067-1073, 2003.
- WELDEGERGIS, Berhane T.; VILLIERS, André; CROUCH, Andrew M. Chemometric investigation of the volatile content of young South African wines. **Food Chemistry**, v. 128, p. 1100-1109, 2011.
- WUILLOUD, Rodolfo G; KANNAMKUMARATH, Sasi S; CARUSO, Joseph A. Speciation of nickel, copper, zinc, and manganese in different edible nuts: a comparative study of molecular size distribution by SEC-UV-ICP-MS. **Analytical Bioanalytical Chemistry** v. 379, p. 495-503, 2004.
- YUNES, Rosendo Augusto; CALIXTO, João Batista. **Plantas medicinais: Sob a ótica da química medicinal moderna**. Santa Catarina: Argos, 2001. 523p.
- ZAICHICK, Vladimir; NOSENKO, Sergey; MOSKVINA, Irina. The effect of age on 12 chemical element contents in the intact prostate of adult men investigated by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Biological Trace Element Research**, 2011.
- ZAND, Nazanin et al. Essential and trace elements content of commercial infant foods in the UK, v. 128, p. 123-128, 2011.
- ZHANG, Wenjun; DUAN, Chunming; WANG, Minglin. Analysis of seven sulphonamides in milk by cloud point extraction and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 126, p. 779-785, 2011.
- ZHANG, Zhicai; LIAN, Bin; CUI, Fengjie. Effect of FeSO<sub>4</sub> treatment on glucose metabolism in diabetic rats. **Biometals**, v. 21, p. 685-691, 2008.
- ZHAO, Wei-jun, et al. Cloud point extraction coupled with ultrasonic-assisted back-extraction for the determination of organophosphorus pesticides in concentrated fruit juice by gas chromatography with flame photometric detection. **Food Chemistry**, v. 127, p. 683-688, 2011.
- ZIMMERMANN, Michael B. et al. Iron deficiency up-regulates iron absorption from ferrous sulphate but not ferric pyrophosphate and consequently food fortification with ferrous sulphate has relatively greater efficacy in iron-deficient individuals. **British Journal of Nutrition**. v. 105, p. 1245-1250, 2011.