

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS – REGIONAL CATALÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM FASE
SÓLIDA *IN SITU* PARA DETERMINAÇÃO DE Cr(III) EM INFUSÃO DE
FITOTERÁPICOS**

Alêssa Gomes Siqueira

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Nunes Alves

Co-orientador: Dr. Bruno Elias dos Santos Costa

CATALÃO – GO

2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (EDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Aléssa Gomes Siqueira

Título do trabalho: Desenvolvimento de um método de extração em fase sólida *in situ* para determinação de Cr(III) em infusão de fitoterápicos

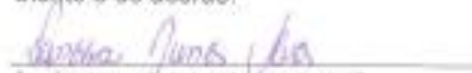
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 12 / 09 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

Alêssa Gomes Siqueira

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM FASE
SÓLIDA *IN SITU* PARA DETERMINAÇÃO DE Cr(III) EM INFUSÃO DE
FITOTERÁPICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão, como exigência parcial para obtenção do Título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanessa Nunes Alves.

CATALÃO – GO

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Gomes Siqueira, Alessa

DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA IN SITU PARA DETERMINAÇÃO DE Cr (III) EM INFUSÃO DE FITOTERÁPICOS [manuscrito] / Alessa Gomes Siqueira. - 2019. LXXIII, 73 f.: il.

Orientador: Profa. Vanessa Nunes Alves; co-orientadora Bruno Elias dos Santos Costa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade Acadêmica Especial de Física e Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão, 2019.

Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Fitoterápicos. 2. Extração. 3. In situ. 4. F AAS. I. Nunes Alves, Vanessa, orient. II. Título.

CDU 543

Relatório de Defesa de Dissertação
Candidato(a): Aléssa Gomes Siqueira

Aos 08/08/2019 às 14:00 horas, realizou-se na Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Química a Defesa de Dissertação de Mestrado sob o título: “Desenvolvimento de um método de extração em fase sólida nanoestruturada in situ para determinação de Cr3+ em infusão de fitoterápicos” apresentada pelo candidato(a): Aléssa Gomes Siqueira. Ao final dos trabalhos a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

Participantes da Banca:	Função	Instituição
Profa. Dra. Vanessa Nunes Alves	Presidente	UFG - Catalão
Profa. Dra. Hélen Cristine Rezende	Titular	UFG - Jataí
Profa. Dra. Luciana Melo Coelho	Titular	UFG - Catalão
Prof. Dr. Bruno Elias dos Santos	Coorientador	UFG - Catalão

Resultado Final: Aprovada

Parecer da Comissão Julgadora:

A dissertação está aprovada devendo apenas fazer as correções sugeridas pela banca.

Encerrada a sessão reservada, a presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar eu João Pedro Rocha de Carvalho, representante do Programa de Pós-Graduação em Química lavrei o presente relatório que será assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Vanessa Nunes Alves
Profa. Dra. Vanessa Nunes Alves

Hélen Cristine Rezende
Profa. Dra. Hélen Cristine Rezende

Luciana Melo Coelho
Profa. Dra. Luciana Melo Coelho

Bruno Elias dos Santos
Prof. Dr. Bruno Elias dos Santos

João Pedro Rocha de Carvalho
Representante do PPG João Pedro Rocha de Carvalho
Assistente em Administração

() Não houve alteração no título. (X) Houve. O novo título passa a ser:

Desenvolvimento de um método de extração em fase sólida in situ para determinação de Cr(III) em infusão de fitoterápicos

*A meus pais, Alex e Idéria.
Meu irmão, Alexandre Filho.
Meu esposo Clayknon.
Por toda confiança, incentivo
e por me ensinar como é ser/ter uma família.*

AGRADECIMENTO

Desde já peço desculpas às pessoas que contribuíram de diversas formas para a realização deste trabalho, e que não foram citadas de forma específica neste item.

Agradeço primeiramente à minha família, aos meus pais Idéria e Alex por todo carinho, ensinamento e caráter que me passaram durante toda a vida, e por tornarem possível meus estudos e por sempre acreditarem em mim. A meu irmão Alexandre que amo muito e que mesmo longe me fortalece com seu carinho e amor.

Agradeço também uma pessoa que entrou na minha vida de pouco e que tomou conta do meu coração, pessoa com quem amo partilhar a vida, meu esposo, companheiro e amigo Clayknon. Obrigado pelo carinho, paciência e por sua capacidade de me trazer paz durante a correria dessa nova jornada. Que esteve comigo em vários momentos, momentos esses bons e ruins, mas que soube lidar, auxiliar e aconselhar. Agradeço-te eternamente.

Agradeço a minha professora e orientadora Vanessa Nunes pela confiança depositada em mim durante este período de orientação, e que com paciência soube me ensinar cada passo de cada trabalho desenvolvido. Pelas conversas de incentivo e de descontração frente a momentos difíceis.

Aos meus colegas de laboratório que de alguma forma contribuíram para o sucesso da minha pesquisa.

Aos grupos de pesquisas do LAPAM, por partilharem seus conhecimentos, além das boas conversas.

Não poderia esquecer da minha sogra Maria da Gloria que se tornou uma mãe, que me encheu de conselhos e forças para seguir cada novo dia.

Ao corpo docente e técnico do Departamento de Química da UFG- Regional Catalão, por todo o ensinamento passado a mim durante minha trajetória de curso.

À Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão por possibilitar a realização deste trabalho.

Agradeço também a Universidade Federal de Uberlândia – UFU, pela disposição do aparelho para as análises necessárias.

Aos órgãos de fomento, FAPEG, CAPES e CNPq, em especial a CAPES, pela bolsa concedida.

E finalmente agradeço a Deus, por proporcionar estes agradecimentos a todos que tornaram minha vida mais afetuosa, além de ter me dado uma família maravilhosa.

Deus, que a mim atribuiu alma e missões pelas quais já sabia que eu iria batalhar e vencer, agradecer é pouco. Por isso lutar, conquistar, vencer e até mesmo cair e perder, e o principal, viver é o meu modo de agradecer sempre.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Nesse trabalho é apresentado o desenvolvimento de um método de extração em fase sólida *in situ* (SPE-ISS) para determinação de cromo(III) em amostras de infusão de fitoterápicos, utilizando F AAS (do inglês – flame atomic absorption spectrometry). Assim, a fim de avaliar a composição inorgânica de amostras de plantas medicinais (calêndula, camomila, carqueja, chá verde, chapéu de couro, melissa e passiflora) utilizou-se o EDXRF (Fluorescência de raios X por energia dispersiva), onde se percebeu a presença de metais essenciais para as plantas além de metais tóxicos. Posteriormente, realizou-se a análise quantitativa de alguns íons metálicos em amostras de infusão preparadas a partir destas plantas, sendo que o íon Fe(III) foi o único encontrado em concentração considerável, enquanto Pb(II), Cr(III), e Cd(II) apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção da técnica. Diante disso, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos de extração e de pré-concentração, que permitam a determinação de Cr(III) de forma simples e segura, mesmo quando presente em baixas concentrações. Neste trabalho, o método SPE-ISS foi otimizado por meio de técnicas multivariadas, e os resultados encontrados apontaram que a formação do complexo Cr-PAN é favorecida em pH 9,5, com o complexante em concentração 0,18 mmol L⁻¹. Para otimização da formação da fase sólida e extração foram utilizados planejamentos fatoriais e superfícies de resposta, que apontaram o uso de CTAB como agente transferidor de fase, NaClO₄ 0,26 molL⁻¹ como pareador iônico e tempo de agitação de 7,5 minutos. Estudos dos possíveis interferentes apontaram interferência negativa dos íons metálicos Al(III), Zn(II), Fe(III) e Ca(II). O desempenho analítico foi avaliado por meio dos parâmetros, fator de pré-concentração, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) e os valores encontrados foram 1,66 µg L⁻¹ e 5,5 µg L⁻¹, respectivamente. Já a precisão (DPR) intra-dia e inter-dia foi de 0,001% e 0,0004%, respectivamente, sendo a faixa linear do método de 250 a 5000 µg L⁻¹, apresentando potencialidade para determinar baixas concentrações de cromo. Por fim, a exatidão do método foi avaliada a partir de análise de material certificado de referência de água (APS-1071), além de testes de recuperação em amostras de água e infusões de plantas medicinais, tendo sido encontrados valores na faixa de 77,60 – 116%.

Palavras-chave: Fitoterápicos, extração, *in situ*, F AAS

ABSTRACT

This work presents the development of an *in situ* solid phase extraction method (SPE-ISS) for the determination of chromium (III) in herbal infusion samples using flame atomic absorption spectrometry (F AAS). Thus, in order to evaluate the inorganic composition of medicinal plant samples (calendula, chamomile, carqueja, green tea, leather hat, melissa and passiflora) we used the EDXRF (Dispersive Energy X-ray Fluorescence). the presence of plant essential metals in addition to toxic metals. Subsequently, a quantitative analysis of some metal ions was performed in infusion samples prepared from these plants, and Fe(III) was the only one found in considerable concentration, while Pb(II), Cr(III), and Cd(II) presented concentrations below the detection limit of the technique. Therefore, it is necessary to develop extraction and preconcentration methods that allow the determination of Cr(III) simply and safely, even when present in low concentrations. In this work, the SPE-ISS method was optimized by multivariate techniques, and the results showed that the formation of the Cr-PAN complex is favored at pH 9.5, with the complexant at 0.18 mmol L⁻¹ concentration. For optimization of solid phase formation and extraction, factorial design and response surfaces were used, which pointed to the use of CTAB as phase transfer agent, NaClO₄ 0.26 mol L⁻¹ as ionic pairer and agitation time of 7.5 minutes. Studies of possible interferences indicated negative interference of the metallic ions Al(III), Zn(II), Fe(III) and Ca(II). The analytical performance was evaluated by the parameters, preconcentration factor, detection limit (LD) and limit of quantification (LQ) and the values found were 1.66 µg L⁻¹ and 5,5 µg L⁻¹, respectively. The intra-day and inter-day precision (RPD) was 0.001% and 0.0004%, respectively, being the linear range of the method from 250 to 5000 µg L⁻¹, presenting the potential to determine low chromium concentrations. Finally, the accuracy of the method was evaluated from analysis of certified reference water material (APS-1071), as well as recovery tests on water samples and herbal infusions 77.60 - 116%.

Key words: Phytotherapeutics, extraction, *in situ*, F AAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Trabalhos utilizando SPE-ISS para pré-concentração de íons metálicos em amostras de água e alimentos.	27
Tabela 2 - Condições de análise no F AAS para os metais utilizados.....	30
Tabela 3 - Dados experimentais para matriz Doehlert para 2 variáveis empregado para otimização da reação de complexação.....	33
Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial 2^4 em termos das variáveis escalonadas e seus dados experimentais utilizados para otimização das condições de extração.....	35
Tabela 5 - Matriz do planejamento 2^3 em termos das variáveis escalonadas e seus dados experimentais, avaliando o CTAB como agente transferidor de fase.	36
Tabela 6 - Dados experimentais para matriz doehlert utilizada para otimização da concentração do pareador iônico e tempo de agitação.	37
Tabela 7 - Dados experimentais para matriz Doehlert para 2 variáveis utilizada para otimização da formação do complexo (n=3).	46
Tabela 8 - Teores de elementos inorgânicos identificados na fase extratora formada sem e com a presença do íon Cr(III).	51
Tabela 9 - Matriz do planejamento fatorial 2^4 em termos das variáveis escalonadas e seus dados experimentais.....	52
Tabela 10 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 em termos das variáveis escalonadas e seus dados experimentais para o CTAB.	54
Tabela 11 - Dados experimentais da matriz Doehlert para 2 variáveis para otimização das variáveis significativas para a formação da fase sólida (n=3).....	57
Tabela 12 – Fator de interferência calculado para as espécies analisadas.....	60
Tabela 13 - Figuras de mérito do método desenvolvido.	62
Tabela 14 - Teste de recuperação de Cr(III) em amostras de infusões.....	63
Tabela 15 - Teste de recuperação de Cr(III) em amostras de água mineral.	63
Tabela 16 - Avaliação da exatidão do método proposto, empregando material de referência certificado de água.....	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração esquemática do procedimento de SPE-ISS.	25
Figura 2 - Agentes transferidores de fases catiônicos empregados no método SPE-ISS. (a) brometo de <i>n</i> -octiltrimetilamônio (OTAB); (b) brometo de <i>n</i> -cetiltrimetilamônio (CTAB); (c) cloreto de <i>n</i> -cetilpiridínio (CPC); (d) cloreto de tetra- <i>n</i> -decildimetilbenzilamônio (TBAC) e (e) brometo de <i>n</i> -dodeciltrimetilamônio (DTAB).	26
Figura 3 - Matriz doehlert para duas variáveis.	32
Figura 4 - Ilustração das etapas do procedimento SPE-ISS. (a) solução padrão de Cr contendo complexante, (b) formação do adsorvente, (c) solução resultante após adição da solução lixiviadora HCl e pronto para ser analisado no F AAS.	34
Figura 5 - Gráfico das porcentagens dos constituintes inorgânicos encontrados nas amostras analisadas.	41
Figura 6 - Espectro de varredura para o complexo Cr-PAN.	44
Figura 7 – Formas adquiridas pelo ligante pan dependendo do pH do meio.	45
Figura 8 - Distribuição das espécies para o agente complexante PAN.	45
Figura 9 - Superfície de resposta obtida no planejamento Doehlert para otimização das condições de formação do complexo.	47
Figura 10 - Espectros de absorção no Infravermelho médio com Transformada de Fourier (FT-IR) da fase extratora na presença e ausência do analito.	48
Figura 11 - Estrutura química do a) brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), b) 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN)	49
Figura 12 – Diagrama de pareto utilizado para triagem das variáveis do sistema de extração SPE-ISS.	53
Figura 13 - Gráfico de valores observados versus valores previstos para o agente transferidor de fases CTAB.	55
Figura 14 - Diagrama de pareto utilizado para triagem das variáveis do sistema de extração SPE-ISS utilizando CTAB como agente transferidor de fase.	56
Figura 15 - Superfície de resposta para otimização das variáveis significativas para a formação da fase sólida.	57
Figura 16 - Gráfico para otimização univariada da concentração de CTAB (n=3).	58
Figura 17 - Íons metálicos que reagem com PAN.	60

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APDC	Pirrolidina ditiocarbamato de amônio
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
DTAB	Brometo de <i>n</i> -dodeciltrimetilamônio
EDXRF	Fluorescência de Raios X por Energia Dispersiva
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização por Chama
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
LC-RX	Laboratório de Caracterização por Raios X
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAN	1-(2-piridilazo)-2-naftol
SPE	Extração em Fase Solida
SPE-ISS	Extração em Fase Sólida baseada em surfactante <i>in situ</i>
TBAB	Brometo de Tetra- <i>n</i> -butilamônio
UAEQ	Unidade Acadêmica Especial de Química
UFG-RC	Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão
UV-Vis	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	Legislação de medicamentos fitoterápicos no Brasil	18
2.2	Composição química de ervas e plantas medicinais	20
2.3	Íons metálicos em medicamentos fitoterápicos	21
2.4	Cromo	23
2.5	Extração em fase sólida	24
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4	METODOLOGIA ANALÍTICA	28
4.1	Padrões, reagentes e soluções	28
4.2	Materiais e amostras	29
4.3	Procedimentos experimentais	29
4.3.1	Análise do conteúdo inorgânico das folhas de plantas medicinais por Fluorescência de Raio X por Energia dispersiva	29
4.3.2	Análise quantitativa de íons metálicos nas amostras de infusões de plantas medicinais	29
4.3.3	Avaliação dos grupos funcionais presentes na fase extratora por Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)	30
4.3.4	Análise da composição inorgânica da fase extratora por Fluorescência de Raio X por Energia dispersiva	31
4.3.5	Avaliação e otimização da formação do complexo Cr-PAN por Espectroscopia de Absorção Molecular - UV/Vis	31
4.3.6	Otimização do procedimento de extração e pré-concentração	33
4.3.7	Estudo do efeito principal entre tempo de agitação e concentração do pareador iônico	36
4.3.8	Avaliação do desempenho analítico	37
4.3.9	Seletividade	38
4.3.10	Figuras de Mérito	38
4.3.11	Exatidão	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	Análise semi-qualitativa da composição da planta	40

5.2	Análise Quantitativa da composição da planta.....	42
5.3	Otimização do complexo Cr-PAN.....	43
5.4	Caracterização do material adsorvente.....	48
5.4.1	Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV).....	48
5.4.2	Fluorescência de Raio X por Energia dispersiva (EDXRF).....	50
5.5	Otimização das condições de extração.....	51
5.6	Avaliação do desempenho analítico	59
5.6.1	Seletividade	59
5.6.2	Figuras de Mérito	61
5.6.3	Exatidão.....	63
6	CONCLUSÃO.....	64
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais são capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade desde séculos passados, como mostram alguns manuscritos datados em 1500 anos a.C., feitos em Papiro de Ébers (LIMA, et al., 2006; BETTEGA, et al., 2011; RATES, 2001). Para serem usadas, é necessário conhecer a planta, bem como saber onde colhê-la e como prepará-la.

Quando a planta medicinal é industrializada para se obter um medicamento, tem-se como resultado o fitoterápico. Todos os medicamentos fitoterápicos industrializados devem ser registrados na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e no Ministério da Saúde antes de serem comercializados.

Medicamentos “fitoterápicos” consistem em uma mistura complexa de uma ou mais substâncias presentes na planta que são preparados adequadamente e posteriormente prescritos em obediência à legislação vigente. São regulamentados no Brasil como medicamentos convencionais e têm que apresentar critérios de qualidade, segurança e eficácia requeridos pela ANVISA (DI STASI, 2007).

Os fitoterápicos podem ser utilizados nas mais variadas fórmulas, como cápsulas, comprimidos, géis, pomadas, soluções aquosas, soluções hidroalcoólicas e infusões, que são conhecidas como chás. A escolha é realizada pelo profissional de saúde, que determina a dosagem e a apresentação ideais, buscando melhor ação e adesão ao tratamento (FRANCISCO, 2010).

Nos últimos anos, houve um aumento crescente na utilização destes medicamentos, uma vez que eles podem ser utilizados no tratamento e prevenção de vários problemas de saúde, como gastrite, ansiedade, distúrbios do sono e processos inflamatórios, entre outros. Portanto, faz-se necessário o controle de qualidade destes, pois sua segurança e a eficácia tornaram-se uma preocupação, tanto para as autoridades quanto para o público (MARTHE, 2011).

Vários elementos essenciais estão presentes em baixas concentrações nas plantas utilizadas na produção destes medicamentos e possuem um papel importante no seu metabolismo e composição, sendo responsáveis pela formação dos constituintes químicos ativos presentes. Entretanto, apesar de sua essencialidade, a presença destes elementos em concentrações elevadas, pode ter efeitos nocivos à saúde (DESIDERI, et al., 2010).

O ferro, por exemplo, se acumula nos tecidos e esse acúmulo tem sido associado a doenças neurológicas, incluindo a doença de Parkinson. A bioacumulação do ferro também pode causar prejuízos para as plantas como, perdas em propriedades funcionais como fotossíntese, redução de biomassa e reprodução (OLIVEIRA, et al., 2007; LAJAYER, 2017).

Para determinar íons metálicos presentes em amostras de fitoterápicos a técnica de espectrometria de absorção atômica (AAS – do inglês Atomic Absorption Spectrometry) pode ser usada, pois possui alta sensibilidade e seletividade, garantindo assim resultados mais precisos (ALMEIDA et al., 2015; WELZ e SPERLING, 1999). Entretanto, algumas amostras para serem analisadas por essa técnica, necessitam de uma etapa de extração e/ou pré-concentração dos analitos. Nesse sentido, diversos procedimentos de preparo de amostras como, solubilização, extração, pré-concentração, dentre outros, estão disponíveis (TABRIZI, 2007).

As técnicas de extração são consideradas uma das mais importantes no decorrer de todo o procedimento, pois quando não realizada de forma correta pode introduzir erros, principalmente devido à perda do analito e à contaminação da amostra. A extração em fase sólida (SPE – do inglês Solid Phase Extraction) é uma das técnicas mais utilizadas por apresentar vantagens como, menor consumo de solventes orgânicos, não formação de emulsões, facilidade de automação, altas porcentagens de recuperação do analito, volumes reduzidos de resíduos tóxicos, capacidade de aumentar seletivamente a concentração do analito e disponibilidade comercial de muitos equipamentos (JARDIM, 2010).

A extração em fase sólida baseada em surfactante, denominada de extração em fase sólida *in situ* (SPE-ISS), é uma variação da extração em fase sólida convencional e se constitui de um método simples e rápido. Utilizado para a extração em amostras aquosas e pré-concentração de compostos que contenham grupos hidrofóbicos. Para extração de íons metálicos, faz-se necessária a adição de um agente complexante, dando ao íon metálico a hidrofobicidade necessária. O surfactante, que é um agente tensoativo contendo uma cadeia alquila, é dissolvido em uma amostra aquosa, em seguida um agente de emparelhamento iônico é adicionado, e partículas sólidas muito finas são formadas no meio da amostra extraindo instantaneamente o analito por mecanismos de adsorção e interações hidrofóbicas (YOUSEFI, 2011).

O método de SPE-ISS é rápido, simples, barato e ecológico, podendo ser aplicado em amostras aquosas, para a extração de analitos contendo grupos hidrofóbicos. Além de ser um método preciso (YOUSEFI, 2011).

Nesse sentido, neste trabalho é proposto o desenvolvimento de uma metodologia de extração em fase sólida *in situ*, para a determinação de íons cromo em amostras aquosas, dando ênfase a amostras de infusões de plantas medicinais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Legislação de medicamentos fitoterápicos no Brasil

Como as plantas medicinais são utilizadas desde séculos passados, achou-se necessária a publicação da primeira edição da Farmacopéia Brasileira referente a plantas medicinais no Brasil, elaborada por Rodolfo Albino, em 1929. Na obra existiam mais de duzentos e oitenta espécies botânicas nacionais e internacionais, oficializando assim a utilização das plantas medicinais como matéria prima farmacêutica. Porém, não se tratava de aspectos de segurança de uso como: toxicidade, eficácia e qualidade do produto final (SILVA, 1929).

O Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia estabeleceu em 1967 normas para o emprego de preparações fitoterápicas (BRASIL, 1967), contemplando a definição do produto e obrigações de apresentação de dados técnicos sobre o medicamento como fabricação, fórmula, indicação terapêutica, título e bula.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) planta medicinal é todo e qualquer vegetal que possui substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos. Já, segundo a ANVISA fitoterápico é todo medicamento obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais com finalidade profilática ou curativa, com benefício para o usuário, é o produto acabado, embalado e rotulado (BRASIL, 2000).

Até os anos 90, os medicamentos fitoterápicos eram isentos de registro para comercialização, assim qualquer empresa poderia elaborar produtos e lançá-los no mercado sem que estes tivessem sido submetidos a qualquer seleção e avaliação técnica prévia. Propiciando assim, o abuso e o lançamento de fitoterápicos que não constavam em farmacopeias (MARQUES, 1992).

Em função do aumento do consumo de plantas medicinais, começaram a surgir regulamentações complementares onde a Portaria SNVS nº 19 de 30.1.92 (BRASIL,

1992b) suspendeu por tempo indeterminado o uso de algumas plantas bastante utilizadas nas décadas de 80 e 90, sendo elas confrei (*Symphytum officinale* L.) e camará (*Lantana* L. camara sp), pois o uso indiscriminado dessas plantas resultou em alguns casos de óbitos em todo o Brasil, levando o Ministério da Saúde a formar comissões técnicas visando regulamentar o registro, produção e comercialização dos produtos fitoterápicos (MARQUES e BÓRIO, 1991).

Nesse sentido, a Anvisa (BRASIL, 2000) estabeleceu parâmetros de qualidade como classificação, identificação botânica, determinação dos princípios ativos e identificação de contaminantes, para os medicamentos fitoterápicos no processo de registro do produto, inclusive a análise de metais pesados, segundo os critérios de farmacopeias reconhecidas pela ANVISA. Para isenção de registro, um medicamento fitoterápico deve ter sua formulação inscrita na Farmacopeia Brasileira ou códigos oficiais aceitos, e ser avaliado por relatório técnico que apresente, entre outras, informações referentes à toxicidade, indicações terapêuticas, produção e controle de qualidade.

Assim, após regulamentadas, as práticas de saúde como fitoterapia, acupuntura e homeopatia, contemplando as terapias alternativas e práticas populares, foram recomendadas a serem incorporadas no SUS (Sistema Único de Saúde) pela 10ª Conferência Nacional de Saúde (BRASIL, 2006).

De acordo com a doença são escolhidas as formas de consumo da planta medicinal, e seu preparo pode ser realizado por diversos procedimentos. No processo de infusão usado nesse trabalho, adiciona-se uma determinada quantidade do material, contendo folhas, caules, flores, raízes ou frutos, em água fervente, deixando esta maceração em repouso por tempo determinado. É indicada para ervas que não liberam seus componentes ativos em baixas temperaturas, mas que não podem ser fervidas, pois, dessa forma, podem perder suas propriedades medicinais. Já o processo de decocção, é a fervura por tempo determinado de ervas medicinais frescas ou desidratadas em água ou outro líquido extrator. Esta preparação é normalmente utilizada para plantas que contém princípios estáveis ao calor e para raízes, cascas e outras partes de maior resistência à ação da água quente. Esta é a preparação indicada para ervas que não liberam seus componentes ativos em baixas temperaturas (HALBERSTEIN, 2005).

Ambos os procedimentos permitem a liberação e recuperação do princípio ativo das plantas, além disso, os extratos das plantas podem ser utilizados para produzir xaropes, sprays orais, comprimidos, pó encapsulado e pastilhas. Algumas plantas

podem ser somente mastigadas, ou seja, sem acréscimo de algum outro preparo (MARTHE, 2011).

As plantas medicinais são comercializadas em sua maior parte em lojas de produtos naturais, porém esses materiais não passam por nenhum tipo de processo garantindo confiabilidade ao consumidor, e com isso não possuem certificado de qualidade (VEIGA JUNIOR, et al., 2005). A eficácia dos fitoterápicos está intimamente correlacionada com a qualidade dos materiais usados durante a produção, que por sua vez, é determinada por fatores externos como condições ambientais, cultivo e colheita, armazenamento, transporte e estocagem da planta. (WHO, 2005).

2.2 Composição química de ervas e plantas medicinais

As plantas medicinais são compostas por ingredientes químicos bioativos de valor terapêutico, comprovado a partir de testes clínicos e análises laboratoriais (HALBERSTEIN, 2005). Sabe-se que os íons metálicos são necessários para muitas das funções vitais do organismo humano, a absorção dos mesmos presentes nas plantas pode influenciar no funcionamento do sistema humano (LAMARI et al., 2008).

As plantas além dos elementos essenciais necessários para o seu crescimento saudável tais como, carbono (C), hidrogênio (H), oxigênio (O), nitrogênio (N), cobre (Cu), fósforo (P), potássio (K), cromo (Cr), zinco (Zn), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), entre outros, podem também acumular íons metálicos que possivelmente apresentam um caráter de toxicidade ao organismo. Esses íons mesmo que presentes em baixas concentrações possuem papéis importantes no metabolismo e na composição das plantas medicinais, sendo assim responsáveis pela formação de constituintes químicos ativos de propriedades terapêuticas ou tóxicas. A presença de íons metálicos nos medicamentos está relacionada com a espécie da planta, tipo de solo, clima e técnicas de plantio (MARTHE, 2011; DESIDERI, et al., 2010).

O zinco desempenha papel importante no desenvolvimento de sementes, síntese proteica, produção de energia e manutenção da integridade estrutural das biomembranas. Plantas com deficiência de zinco apresentam maturidade tardia (HÄNSCH e MENDEL, 2009).

O cobre é muito importante para a vida da planta. É de extrema importância para a fotossíntese e para respiração mitocondrial, metabolismo de carbono e nitrogênio, além da síntese da parede celular. Mas, em excesso, o cobre é muito tóxico. É

considerado metal pesado por possuir a característica de se acumular no organismo e gerar possíveis reações tóxicas: bioacumulação (HÄNSCH e MENDEL, 2009).

Em relação ao ferro, até 80% do ferro celular é encontrado nos cloroplastos, sendo sua função principal a fotossíntese, sendo também o responsável pela respiração mitocondrial, biossíntese de hormônios, na produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio (HÄNSCH e MENDEL, 2009).

O chumbo é um metal tóxico que geralmente é absorvido através do solo, água e atmosfera. Pode causar sérios efeitos à planta tanto em altas ou baixas concentrações. Quando em baixas concentrações pode estimular os processos metabólicos afetando a germinação das sementes, o crescimento das mudas, a fotossíntese e atividades enzimáticas (PATRA, et al., 2004).

MARTHE (2011) determinou alumínio (Al), chumbo (Pb), cobre (Cu), ferro (Fe) e zinco (Zn) em amostras de alcachofra (folhas, extratos, cápsulas e comprimidos) e catuaba (cascas em pó e a bebida alcoólica) por espectrometria de absorção atômica com chama e com forno de grafite, utilizando diferentes estratégias de pré tratamento da amostra, como a digestão em forno de micro-ondas com cavidade, onde Al e Fe foram os elementos presentes em maiores concentrações.

2.3 Íons metálicos em medicamentos fitoterápicos

Os compostos inorgânicos presentes em medicamentos fitoterápicos podem advir tanto de contaminações ambientais do solo, água ou ar, bem como contaminações oriundas de reagentes, matérias-primas, solventes, catalisadores, vidrarias e outros equipamentos usados durante a fabricação dos medicamentos. Portanto, o monitoramento de metais pesados durante todo o processo é indispensável na indústria farmacêutica (NAGESWARA RAO, 2007).

Íons metálicos como, mercúrio (Hg) e cádmio (Cd) diferem de outras substâncias, pois não desempenham funções nutricionais em plantas, microorganismos ou animais. São prejudiciais ao organismo em qualquer concentração, seus efeitos dependem de fatores como forma química, nível de exposição, rota de absorção entre outros, já o cromo (Cr) é um metal essencial para o organismo, mas que dependendo do seu estado de oxidação pode se tornar tóxico (ROCHA, 2009).

ESPINOZA e colaboradores (1995) estudaram os “medicamentos chineses tradicionais” a base de plantas onde perceberam níveis altos de Hg em ervas consumidas na forma de chá, para combater diversas enfermidades como febre,

reumatismo, apoplexia e catarata. Os níveis de mercúrio encontrados nesse tipo de amostra foram entre 7,8 e 621,3 mg g⁻¹.

De acordo com CHOW e colaboradores (1995), Singapura segue o regulamento de venda de medicamentos que estabelece limites máximos de Hg e Pb de 0,5 e 20 µg g⁻¹, respectivamente. Os autores analisaram medicamentos chineses tradicionais, em cápsulas, pílulas e tabletes utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica (AAS) para determinar teores de mercúrio e chumbo, além de outros metais. De 8 amostras analisadas, o íon chumbo foi detectado em 3 amostras, com níveis entre 8,2 a 12,8 µg g⁻¹, já o mercúrio foi detectado em todas as amostras, em níveis entre 0,12 a 45,1 µg g⁻¹.

O cádmio por sua vez é considerado carcinogênico, e se acumula no corpo humano, sendo o metal mais absorvido por plantas através do solo e fertilizantes. Possui uma meia-vida biológica de 30 anos. As plantas contêm Cd na faixa de 1 a 150 µg kg⁻¹, enquanto carnes e peixes entre 10 e 50 µg kg⁻¹, já os moluscos e ostras possuem entre 100 e 1000 µg kg⁻¹ deste íon (DAVIS, et al., 2006).

KALNY e colaboradores (2007) determinaram vários metais em folhas de bétula (*Folium Betulae*), raízes de dente-de-leão (*Radix Taraxacae*), flor de espinheiro (*Inflorescentiam m Crataegi*) e suas infusões utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS – do inglês graphite furnace atomic absorption spectrometry). De acordo com os resultados as amostras analisadas possuíam altos teores de Cd.

MACHADO (2001) otimizou uma metodologia para determinar mercúrio (Hg), chumbo (Pb) e cádmio (Cd) em 10 medicamentos fitoterápicos (ginkgo biloba, castanha-da-índia, cascara-sagrada, espinheira-santa, ginseng brasileiro, guaraná, centella asiática, berinjela, alcachofra e clorella) em forma de pó ou extrato seco, utilizando digestão via úmida com ácido nítrico em tubo de Nessler e quantificação por espectrometria de absorção atômica. Os limites de quantificação do método para Hg, Pb e Cd foram de 0,01 µg g⁻¹; 2,0 µg g⁻¹ e 0,2 µg g⁻¹, respectivamente. Os íons analisados não foram detectados em nenhuma das amostras de alcachofra, berinjela e guaraná analisadas. Centella asiática, Ginkgo biloba e espinheira santa foram os medicamentos com maior incidência dos metais analisados. Níveis altos de Pb (153, 156 e 1480 µg g⁻¹) foram encontrados em amostras de castanha da Índia.

Os níveis aceitáveis de íons metálicos em medicamentos fitoterápicos geralmente são definidos pelas agências reguladoras e controladoras. As Farmacopéias

dos Estados Unidos, Britânica, Européia, Japonesa e Brasileira propõem monitoramento do conteúdo total de metais em medicamentos (MACHADO, 2001), evidenciando a necessidade de métodos que permitam a determinação desses íons em concentrações a nível traço.

2.4 Cromo

Em 1797 o íon cromo foi descoberto pelo químico francês Louis Valquelin, mas só em 1854 foi isolado pela primeira vez por Busen. O cromo é o quinto elemento mais abundante da crosta terrestre e possui grande importância tecnológica e aplicação industrial (MALIOTIS, 1999). O Cr pode ser encontrado na natureza tanto por fontes naturais ou por fontes antrópicas, portanto, é inevitável sua presença no meio ambiente podendo entrar na cadeia alimentar a partir da água, solo e ar (CHEN et al., 2014).

O cromo (Cr) pode existir sob diferentes formas de oxidação, sendo encontrado naturalmente em nosso organismo na forma de Cr(III), que é o mais estável, e um mineral essencial ao homem. É considerado um elemento traço, mas, conforme sua oxidação, pode ser tóxico sendo o Cr(VI) a forma mais perigosa. Na forma trivalente, está presente em baixas quantidades fazendo parte do centro de biomoléculas no organismo humano. Sua principal função está relacionada ao metabolismo da glicose, do colesterol e de ácidos graxos. Já o Cr(VI) é reconhecido como um carcinógeno humano, e sua exposição pode ocorrer através da inalação, contato com a pele e ingestão, podendo causar câncer, dermatite alérgica, úlceras na pele, cicatrizes e até perfurações do septo nasal (KLAASSEN, 2001).

Muitas vezes faz-se necessário o monitoramento de amostras de interesse clínico e alimentício, as quais contêm cromo em baixas concentrações ou espécies diferentes desse elemento. Podendo então ser determinados utilizando técnicas com baixo custo, tais como a espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS) e a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, que são técnicas menos sensíveis quando comparadas com a Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS que é uma técnica mais sensível, com limite de detecção satisfatório, e que também é frequentemente utilizada (SHEMIRANI, et al., 2003; BURHAM, 2009).

De acordo com LUKINA e colaboradores (2016) em países asiáticos, Canadá e África do Sul existem grandes áreas de mineração de cromo levantando preocupações na população. Diante disso, realizaram testes em plantas selvagens terrestres e de zonas úmidas a fim de avaliar o efeito do cromo nessas amostras. Foi realizado o plantio

dessas espécies em solo artificial, onde estas foram expostas ao Cr^{3+} , percebendo que baixos níveis de cromo afetaram negativamente a germinação de 22% das espécies, enquanto níveis mais altos afetaram entre 69% e 94% de espécies. Posteriormente, o plantio foi realizado utilizando o solo coletado no norte de Ontário e exposto a Cr^{3+} . Assim, foi possível observar que os efeitos foram menos severos em relação ao experimento anterior. As sementes durante o processo de germinação foram muito afetadas.

2.5 Extração em fase sólida

Mesmo com os avanços tecnológicos ocorridos nas últimas décadas, a determinação de compostos de interesse diretamente na amostra, ainda apresenta muitas dificuldades, fazendo com que exista a necessidade do desenvolvimento de metodologias analíticas de extração e pré-concentração do analito na amostra (TABRIZI, 2007).

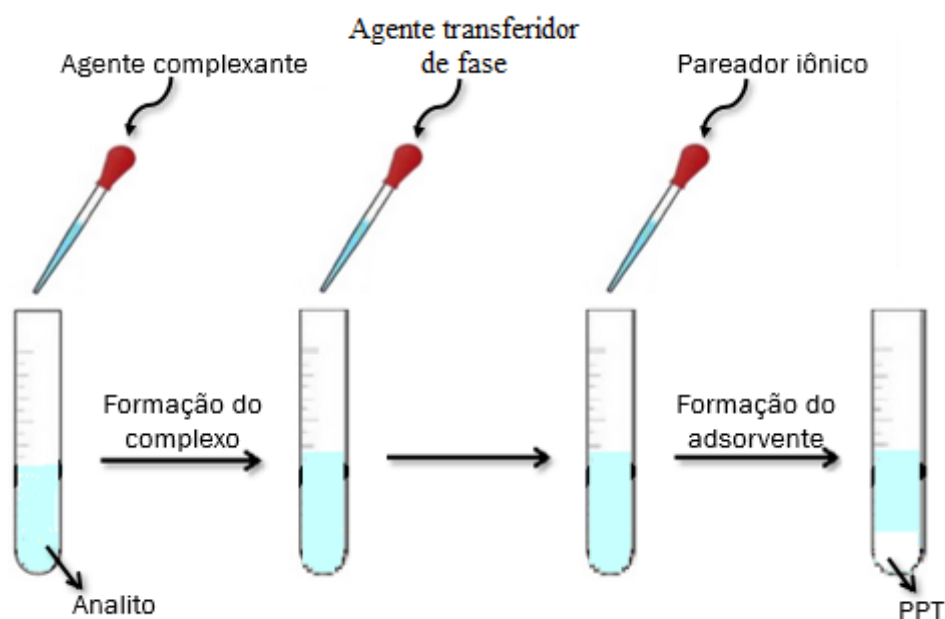
A extração em fase sólida (SPE) possui algumas vantagens em relação a outros tipos de extração, pois é um método simples, com baixo risco de contaminação, baixo consumo de reagentes, baixa geração de resíduos tóxicos, entre outros. Porém, possui algumas desvantagens como a dificuldade em selecionar o sorvente adequado para a aplicação desejada. O princípio fundamental do método é baseado na transferência de massa da amostra (fase líquida) para o adsorvente (fase sólida) (CAMEL, 2003).

Nos últimos anos, foi proposto um novo método de extração em fase sólida, similar a um procedimento de co-precipitação, no qual o analito pode ser extraído através de interações específicas com partículas de sais de surfactantes finamente dispersas no meio que constitui a amostra. Tal método foi denominado como extração em fase sólida baseada em surfactante *in-situ*, do inglês *in-situ* surfactante-based solid phase extraction (SPE-ISS), tendo Yousefi e Shemirani como precursores, do qual se tem o primeiro registro de publicação em 2011 (COSTA, 2018; YOUSEFI e SHEMIRANI, 2011).

A extração em fase sólida baseada em surfactante (SPE-ISS) é uma ramificação da SPE tradicional, que apresenta algumas vantagens como tempo de extração curto, baixo custo, alto índice de recuperação, simplicidade, podendo ser aplicada em amostras aquosas e pré-concentração de compostos que contenham grupos hidrofóbicos (YOUSEFI, 2011).

A SPE-ISS é uma técnica nova de extração em fase sólida, apresentada como um procedimento eficiente para aumentar a seletividade dos procedimentos analíticos existentes. O agente transferidor de fase (ATF) que é um agente tensoativo (catiônico ou aniônico), contendo uma cadeia alquila é dissolvido em uma amostra aquosa contendo o íon metálico e o agente complexante, onde este é adicionado dando as interações hidrofóbicas necessárias para o processo de extração. Em seguida um agente de emparelhamento iônico (API) é adicionado levando a formação da fase sólida extratora. As soluções ficam turvas e partículas sólidas muito finas são formadas no meio da amostra extraíndo instantaneamente o analito, por meio de mecanismos de adsorção e interações hidrofóbicas. Após centrifugação as partículas sedimentadas podem ser dissolvidas num solvente apropriado (YOUSEFI, 2011). A figura 1 mostra um esquema representativo das etapas gerais dos procedimentos de SPE-ISS.

Figura 1 - Ilustração esquemática do procedimento de SPE-ISS.



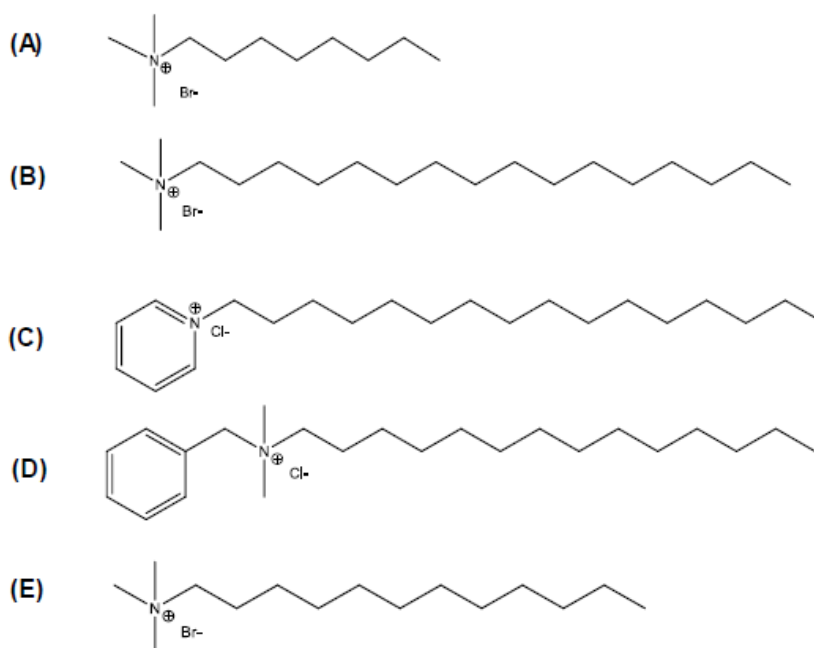
Fonte: Adaptado de (YOUSEFI, 2011)

COSTA (2018) realizou a SPE-ISS para pré-concentrar As(III), utilizando brometo de tetra-*n*-butilamônio (TBAB) como agente transferidor de fase e o íon ClO_4^- como agente pareador iônico, assim foi formado perclorato de tetra-*n*-butilamônio como fase sólida. Para garantir o procedimento de extração, o As(III) foi complexado anteriormente com APDC. A detecção foi realizada em sistema de geração de hidreto em fluxo multicomutado (FI-HG AAS).

Um método de microextração por formação de sorvente *in situ* (ISS-FME), foi desenvolvido para extração e pré-concentração de Co(II) em amostras de água e alimentos. O agente transferidor de fases catiônico usado foi o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), já o pareador iônico foi o íon perclorato e o 2-nitroso-1-naftol utilizado como agente complexante. Para determinação utilizou-se espectrometria de absorção atômica em chama. O método proposto permitiu a determinação de Co(II) em amostras de águas naturais e alimentos em níveis $\mu\text{g L}^{-1}$ (JAMALI, 2017).

A Figura 2 apresenta alguns exemplos de agentes transferidores de fases catiônicos, dos quais são derivados de sais de amônio quaternário com diferentes grupos alquila que podem ser empregados como ATF no método SPE-ISS.

Figura 2 - Agentes transferidores de fases catiônicos empregados no método SPE-ISS. **(A)** brometo de *n*-octiltrimetilamônio (OTAB); **(B)** brometo de *n*-cetiltrimetilamônio (CTAB); **(C)** cloreto de *n*-cetilpiridínio (CPC); **(D)** cloreto de tetra-*n*-decildimetilbenzilamônio (TBAC) e **(E)** brometo de *n*-dodeciltrimetilamônio (DTAB).



Fonte: COSTA, 2018

A Tabela 1 apresenta alguns trabalhos recentemente publicados abordando o desenvolvimento de métodos SPE-ISS para determinação de analitos metálicos, reportando suas características analíticas.

Tabela 1 - Trabalhos utilizando SPE-ISS para pré-concentração de íons metálicos em amostras de água e alimentos.

Analito	Amostra	Ligante	ATF	API	Técnica de Detecção	Figuras de Mérito	Referências
Mn (II)	Água, Pimentão, Noz, brócolis, amendoim e fígado bovino.	PAN (0,000015 mol L ⁻¹)	DTAB (15mmol L ⁻¹)	NaPF ₆ 25 mmol L ⁻¹)	F AAS	LD: 0,88 µg L ⁻¹ FE: 45,6 RSD: 3,5% Recuperação: 87 – 112,7%	YASINI et al., 2012
Co(II)	Água, espinafre e chá preto.	2-nitroso-1-naftol 0,0001 mol L ⁻¹)	CTAB (1,0 m mol L ⁻¹)	NaClO ₄ (0,2 mol L ⁻¹)	F AAS	LD: 0,8 µg L ⁻¹ FE: 50 RSD: 2,3% Recuperação: 98 – 102%	JAMALI et al., 2013
Cd(II)	Água, espinafre, chá preto, alface e peixe.	K-4-BPDC ^a (0,0002 mol L ⁻¹)	CTAB (1,0 m mol L ⁻¹)	NaPF ₆ (0,1 mol L ⁻¹)	F AAS	LD: 0,3 µg L ⁻¹ FE: 40 RSD: 2,2% Recuperação: 96 – 100,5%	JAMALI e BOROMANDI, 2014
Ag(I)	Águas naturais	Na ₂ CO ₃ (0,1 mol L ⁻¹)	DTAB (0,2 m mol L ⁻¹)	KClO ₄ (0,02 mol L ⁻¹)	F AAS	LD: 1,1 ng mL ⁻¹ FE: 36,7 RSD: 2,1% Recuperação: 96 – 102%	MOHAMMADI et al., 2013

^a 4-benzilpiperidinaditiocarbamato de potássio;

LD: Limite de detecção;

FE: Fator de Enriquecimento;

RSD: Desvio padrão relativo;

Fonte: COSTA, 2018

A partir dos fatos apresentados, tem-se o interesse no desenvolvimento de um método para extração e pré-concentração de cromo(III) em amostras aquosas, dando ênfase a amostras de infusões de plantas medicinais, empregando o método SPE-ISS.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia analítica para determinação de Cr(III) em amostras aquosas com ênfase à infusão de medicamentos fitoterápicos utilizando a técnica de extração em fase sólida nanoestruturada *in situ*.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar os metais presentes nas amostras de plantas medicinais utilizando o EDX RF (Fluorescência de raios X por energia dispersiva);
- Quantificar os íons metálicos presentes em amostras de infusão de plantas medicinais;
- Otimizar os fatores que influenciam a eficiência do método de extração proposto, incluindo concentração do agente transferidor de fase, concentração do pareador iônico, pH e formação do complexo;
- Validação da metodologia desenvolvida;

4 METODOLOGIA ANALÍTICA

4.1 Padrões, reagentes e soluções

Todas as soluções aquosas foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico e água ultrapura, proveniente de um sistema de purificação de água Milli-Q® (Millipore, Merck, Alemanha, 18,2 MΩ). As soluções de trabalho foram preparadas diariamente através da diluição de solução padrão de Cr(III) 1000 mg L⁻¹ Titrisol (Merck®, Alemanha).

Quando necessário, o pH das soluções foi ajustado utilizando ácido nítrico (HNO₃) 0,1 mol L⁻¹ (Synth®, Diadema, São Paulo) e hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L⁻¹ (Synth®, Diadema, São Paulo), através de um medidor de pH de bancada digital, da marca Edge®, modelo Hanna HI2002.

Para o preparo das soluções de 1-(2-piridilazo)-2-naftol PAN (Sigma® Saint Louis, USA), e do agente transferidor de fase brometo de cetiltrimetilamônio CTAB, utilizou-se álcool etílico (Synth®, Diadema, São Paulo), pois a solubilidade dos mesmos é aumentada na presença de etanol.

A solução tampão utilizada na etapa da complexação foi preparada utilizando 50 mL de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ($0,025 \text{ mol L}^{-1}$) e 8,8 mL de NaOH ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) diluído para 100 mL.

4.2 Materiais e amostras

As vidrarias, bem como os frascos utilizados na preparação e/ou armazenamento das soluções, foram descontaminados em banho de HNO_3 10% v/v por um período de 24 horas. Sendo, posteriormente, lavados com água deionizada e secos à temperatura ambiente.

As folhas desidratadas das plantas medicinais utilizadas (calêndula, camomila, carqueja, chá verde, chapéu de couro, melissa e passiflora) foram adquiridas no comércio de Catalão, onde eram vendidas no formato a granel, e armazenadas em frascos fechados para que não houvesse contaminação por material particulado.

4.3 Procedimentos experimentais

4.3.1 Análise do conteúdo inorgânico das folhas de plantas medicinais por Fluorescência de Raio X por Energia dispersiva

A análise elementar das folhas de plantas medicinais utilizadas para o preparo de chás (calêndula, camomila, carqueja, chá verde, chapéu de couro, melissa e passiflora) utilizadas nesse trabalho foram realizadas no Laboratório de Caracterização por Raios X (LC-RX) da Unidade Acadêmica Especial de Química (UAEQ) da UFG-RC, utilizando um EDX modelo Shimadzu 7000, com energia variando de 0 a 40 KeV e canal de leitura de alumínio-urânio. A análise foi realizada diretamente nas folhas, não sendo submetidas a nenhum processo químico.

4.3.2 Análise quantitativa de íons metálicos nas amostras de infusões de plantas medicinais

Para análise quantitativa das 7 amostras de fitoterápicos, 1 g da planta seca (folhas inteiras), foi adicionada à 50 mL de água deionizada fervente e deixada em

repouso por 15 minutos. Após este período, o chá foi filtrado e adicionado volume suficiente de ácido nítrico P.A (Synth®, Diadema, São Paulo) para obter um chá com 0,6 % de ácido (VULCANO et al., 2008). As análises das amostras foram realizadas no laboratório do Grupo de Instrumentação e Separações Analíticas (GrISA) do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), utilizando um espectrômetro de absorção atômica com atomização por chama Varian®, Victoria, Austrália, modelo SpectrAA-220. As condições de análise estão descritas na tabela 2, foram analisados os íons Fe, Pb, Cr e Cd.

Tabela 2 - Condições de análise no F AAS para os metais utilizados.

Metal	Corrente da lâmpada (mA)	Tamanho da fenda (nm)	Comprimento de onda (nm)	Curva analítica (mg L⁻¹)
Fe	5	0,2	248,3	0,02 a 0,3
Pb	5	1,0	217,0	0,02 a 0,5
Cr	7	0,2	357,9	0,005 a 50,0
Cd	4	0,5	228,8	1,0 a 10,0

Fonte: Próprio autor

4.3.3 Avaliação dos grupos funcionais presentes na fase extratora por Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)

A identificação dos grupos presentes na fase extratora formada foi realizada no Laboratório de Instrumentação da UAEQ da UFG-RC. A análise foi realizada diretamente na fase sólida sedimentada obtida no processo de extração na ausência e na presença do íon Cr(III), sem nenhum tratamento químico prévio. A fase sólida sedimentada foi isolada por filtração simples e deixada na capela de exaustão por um período de 24 horas. Posteriormente as amostras foram preparadas em pastilhas de KBr (brometo de potássio), na proporção de 1:100 (amostra:KBr), e a análise realizada utilizando um espectrofotômetro Shimadzu FT-IR Prestigie 21, associado à transformada de Fourier. As amostras foram irradiadas na região de 400 a 4000 cm⁻¹, com resolução de 16 cm⁻¹ e 32 varreduras por amostra.

4.3.4 Análise da composição inorgânica da fase extratora por Fluorescência de Raio X por Energia dispersiva

A análise elementar da fase extratora formada no processo de extração foi realizada diretamente na fase sólida sedimentada obtida no processo de extração na ausência e na presença do íon Cr(III), sem nenhum tratamento químico prévio. A fase sólida sedimentada foi isolada por filtração simples e deixada na capela de exaustão por um período de 24 horas, utilizando um EDX modelo Shimadzu 7000, com energia variando de 0 a 40 KeV e canal de leitura de alumínio-urânio situado no LC-RX da UAEQ da UFG-RC,

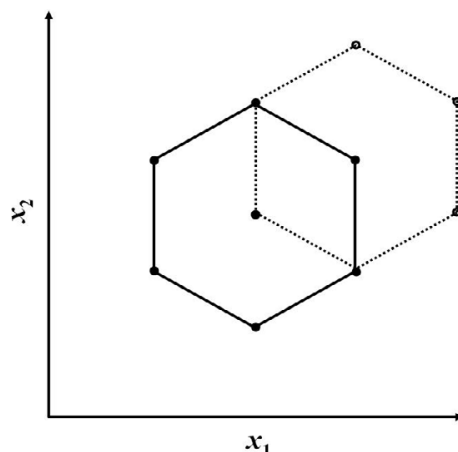
4.3.5 Avaliação e otimização da formação do complexo Cr-PAN por Espectroscopia de Absorção Molecular - UV/Vis

Neste trabalho, a técnica de espectrofotometria de absorção molecular na região espectral ultravioleta-visível (UV-Vis) foi utilizada com o objetivo de avaliar a formação do complexo Cr-PAN. As amostras e o branco foram analisados em um espectrofotômetro de absorção molecular ultravioleta visível Varian®, situado no Laboratório de Instrumentação da UAEQ da UFG-RC utilizando a faixa espectral de 300 a 800 nm e uma cubeta de quartzo de 1cm. Para esse estudo foi utilizado a concentração de 0,5 mg L⁻¹.

Otimizar significa encontrar os valores das variáveis que irão produzir a melhor resposta desejada, isto é, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores. A metodologia de superfície de resposta, utilizada nesse trabalho, baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização (TEÓFILO e FERREIRA, 2006; BARROS NETO et al., 2010).

Dentro desse contexto, a matriz Doehlert é uma alternativa bastante útil a planejamentos experimentais de segunda ordem e descreve um domínio circular para duas variáveis. Assim, os pontos da matriz correspondem aos vértices de um hexágono que possui um ponto central e seis pontos adicionais (TEÓFILO e FERREIRA, 2006) como mostra a figura 3.

Figura 3 - Matriz Doehlert para duas variáveis.



Fonte: TEÓFILO e FERREIRA, 2006

Nesse tipo de matriz, o número de variáveis, assim como qualquer outro valor codificado x_i , necessitam ser decodificados para os valores experimentais dos níveis das variáveis a serem estudadas e para isso, utiliza-se a equação 1 (TEÓFILO e FERREIRA, 2006).

$$x_i = (z_i - z_i^0 / \Delta z_i) \beta_d \quad (1)$$

onde, x_i é o valor codificado do planejamento, z_i o valor experimental no nível, Δz_i é a distância entre o valor experimental no ponto central e o experimental no nível superior ou inferior, β_d é o maior valor limite codificado na matriz para cada fator, z_i^0 é o valor experimental no ponto central.

Diante do exposto, as variáveis (pH e concentração inicial do agente complexante) que influenciam na formação do complexo entre o Cr(III) e o 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), foram otimizadas empregando uma matriz Doehlert, de acordo com os experimentos apresentados na tabela 3. Os dados foram tratados utilizando o software Statistica® 12.0.

Tabela 3 - Dados experimentais para matriz Doehlert para 2 variáveis empregado para otimização da reação de complexação.

Experimento	$x_1 =$ Concentração inicial PAN (mmol L^{-1})	$x_2 =$ pH
1	0,14 (0)	10 (0)
2	0,20 (1)	10 (0)
3	0,16 (0,5)	11 (0,866)
4	0,08 (-1)	10 (0)
5	0,11 (-0,5)	9 (-0,866)
6	0,16 (0,5)	9 (-0,866)
7	0,11 (-0,5)	11 (0,866)

Fonte: Própria autora

Para avaliar a formação do complexo, o sinal analítico medido foi a absorvância das amostras, analisadas em um espectrofotômetro de absorção molecular ultravioleta visível Varian® utilizando uma cubeta de quartzo no comprimento de onda de 442 nm.

4.3.6 Otimização do procedimento de extração e pré-concentração

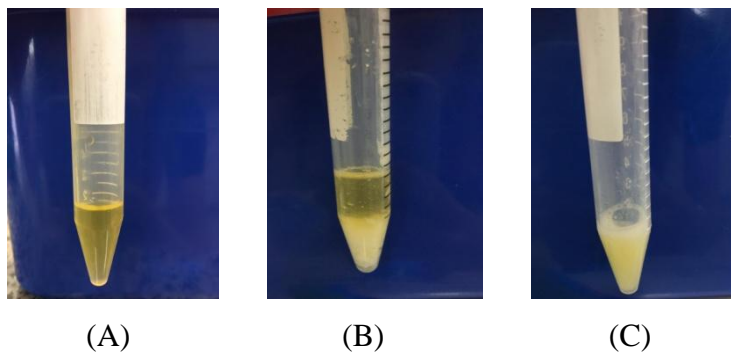
O procedimento de extração e pré-concentração foi realizado em modo *off-line* em tubos do tipo Falcon® com capacidade de volume de 15 mL. Para extração de Cr(III), foram adicionados 1,0 mL da solução padrão de Cr $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, 500 μL do agente complexante PAN e 500 μL de solução tampão ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{NaOH}$) pH 9,5. Em seguida, foram adicionados 900 μL da solução do agente transferidor de fase. Após agitação manual, foram adicionados 600 μL da solução do pareador iônico perclorato de sódio e em seguida avolumou-se com água deionizada até 12,0 mL. No momento em que se adiciona o pareador iônico, a turvação do meio é observada, devido à precipitação e dispersão das micropartículas da fase sólida adsorvente formada (perclorato de cetiltrimetilamônio) (COSTA, 2018).

A solução turva resultante foi submetida à agitação em vortex (Global Trade Technology® modelo XH-D) para promover a extração e posteriormente levada a centrifugação em 7000 rpm durante 20 minutos para a sedimentação da fase sólida no fundo do tubo de centrífuga. Após a separação da fase sólida sedimentada o sobrenadante foi descartado, e ao precipitado foi adicionado 1,0 mL de ácido clorídrico

(HCl) concentrado para solubilização do mesmo e a solução resultante foi analisada por F AAS.

As principais etapas do procedimento SPE-ISS estão ilustradas na Figura 4.

Figura 4 - Ilustração das etapas do procedimento SPE-ISS. **(A)** Solução padrão de Cr contendo complexante, **(B)** formação do adsorvente, **(C)** Solução resultante após adição da solução lixiviadora HCl e pronto para ser analisado no F AAS.



Fonte: Própria autora

A fim de escolher o agente transferidor de fase que levaria às melhores condições para a formação do material adsorvente a ser utilizado no decorrer do trabalho, bem como a concentração do pareador iônico e o tempo de agitação, foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^4 onde foram avaliados: o tipo de agente transferidor de fase (brometo de tetra-*n*-butilamônio - TBAB e brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB, concentração do pareador iônico (perclorato de sódio) e tempo de agitação no vortex. Os resultados obtidos foram avaliados por meio da absorbância obtida após análise do precipitado solubilizado contendo íons cromo por espectrometria de absorção atômica com atomização por chama (Varian®, Victoria, Austrália, modelo SpectrAA-220).

De modo a entender o procedimento de tal planejamento, a tabela 4 mostra a matriz construída fazendo todas as combinações possíveis entre os níveis baixos e altos, os quais foram previamente selecionados para os quatro fatores escolhidos para análise.

Tabela 4 - Matriz do planejamento fatorial 2^4 em termos das variáveis escalonadas e seus dados experimentais utilizados para otimização das condições de extração.

Experimento	Tipo ATF	[ATF] (mol L ⁻¹)	[API] (mol L ⁻¹)	Tempo de agitação (min)
1	CTAB (-)	0,1 (-)	0,1 (-)	1 (-)
2	TBAB (+)	0,1 (-)	0,1 (-)	1 (-)
3	CTAB (-)	1,0 (+)	0,1 (-)	1 (-)
4	TBAB (+)	1,0 (+)	0,1 (-)	1 (-)
5	CTAB (-)	0,1 (-)	1,0 (+)	1 (-)
6	TBAB (+)	0,1 (-)	1,0 (+)	1 (-)
7	CTAB (-)	1,0 (+)	1,0 (+)	1 (-)
8	TBAB (+)	1,0 (+)	1,0 (+)	1 (-)
9	CTAB (-)	0,1 (-)	0,1 (-)	10 (+)
10	TBAB (+)	0,1 (-)	0,1 (-)	10 (+)
11	CTAB (-)	1,0 (+)	0,1 (-)	10 (+)
12	TBAB (+)	1,0 (+)	0,1 (-)	10 (+)
13	CTAB (-)	0,1 (-)	1,0 (+)	10 (+)
14	TBAB (+)	0,1 (-)	1,0 (+)	10 (+)
15	CTAB (-)	1,0 (+)	1,0 (+)	10 (+)
16	TBAB (+)	1,0 (+)	1,0 (+)	10 (+)

ATF: Agente transferidor de fases

API: Agente pareador iônico

Fonte: Própria autora

Após análise deste planejamento, a fim de garantir resultados mais conclusivos optou-se pela realização de um novo planejamento fatorial, onde apenas o agente transferidor de fase CTAB foi avaliado. Assim foi realizado um planejamento 2^3 onde os fatores avaliados foram: concentração do agente transferidor de fase (CTAB), concentração do pareador iônico (NaClO₄) e tempo de agitação no vortex. A tabela 5 mostra a matriz construída fazendo todas as combinações possíveis entre os níveis baixo e alto.

Tabela 5 - Matriz do planejamento 2^3 em termos das variáveis escalonadas e seus dados experimentais, avaliando o CTAB como agente transferidor de fase.

Experimento	[Agente transferidor] (mol L ⁻¹)	[pareador] (mol L ⁻¹)	Tempo de agitação (min)
1	0,1 (-)	0,2 (-)	1 (-)
2	0,5 (+)	0,2 (-)	1 (-)
3	0,1 (-)	0,8 (+)	1 (-)
4	0,5 (+)	0,8 (+)	1 (-)
5	0,1 (-)	0,2 (-)	10 (+)
6	0,5 (+)	0,2 (-)	10 (+)
7	0,1 (-)	0,8 (+)	10 (+)
8	0,5 (+)	0,8 (+)	10 (+)

Fonte: Própria autora

4.3.7 Estudo do efeito principal entre tempo de agitação e concentração do pareador iônico

Após escolher o CTAB como melhor agente transferidor de fase, percebeu-se que havia uma interação significativa entre as variáveis independentes, tempo de agitação e concentração do pareador iônico. Assim, novamente optou-se pelo uso de uma matriz Doehlert para otimização destas variáveis. A tabela 6 apresenta a matriz escolhida com os valores codificados e decodificados.

Tabela 6 - Dados experimentais para matriz Doehlert utilizada para otimização da concentração do pareador iônico e tempo de agitação.

Experimento	$x_1 = \text{Concentração inicial NaClO}_4 \text{ (mol L}^{-1}\text{)}$	$x_2 = \text{tempo de agitação (min)}$
1	0,25 (0)	7,5 (0)
2	0,40 (1)	7,5 (0)
3	0,32 (0,5)	10 (0,866)
4	0,10 (-1)	7,5 (0)
5	0,18 (-0,5)	5 (-0,866)
6	0,32 (0,5)	5 (-0,866)
7	0,18 (-0,5)	10 (0,866)

Fonte: Própria autora

Os resultados obtidos foram avaliados por meio da absorbância obtida após análise do precipitado solubilizado contendo íons cromo por espectrometria de absorção atômica com atomização por chama.

Após este estudo, definiu-se que apesar da concentração do agente transferidor de fase CTAB não ter apresentado efeito significativo dentro da faixa avaliada, seria necessário o estudo do efeito da concentração do mesmo, devido ao fato deste reagente ser de extrema importância na formação da fase extratora. Para isso fixou-se a concentração do pareador iônico, NaClO_4 , em $0,26 \text{ mol L}^{-1}$ e o tempo de agitação em 7,51 minutos, enquanto a concentração do CTAB foi avaliada nos valores de 0,05; 0,1; 0,3; 0,5 e $0,8 \text{ mol L}^{-1}$.

Da mesma forma que nos experimentos anteriores, os resultados obtidos foram avaliados por meio da absorbância obtida após análise da fase sólida lixiviada contendo íons cromo por espectrometria de absorção atômica com atomização por chama.

4.3.8 Avaliação do desempenho analítico

Quando se propõe um método, o mesmo deve ser validado fornecendo informações confiáveis sobre uma amostra (RIBANI et al., 2004). Portanto após a otimização do método proposto, o mesmo teve sua eficiência testada através dos testes de seletividade, da avaliação dos parâmetros: faixa linear de trabalho, coeficiente de determinação, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), fator de pré-concentração (F_{PC}), eficiência de concentração (EC), precisão, além da exatidão.

4.3.9 Seletividade

A possível presença de íons metálicos que coexistam na matriz da amostra juntamente com o cromo pode afetar o desempenho do método desenvolvido. Assim, sob as condições otimizadas, o efeito dos íons Al(III), Mn(II), Zn(II), Fe(III), Ca(II), Cu(II), Pb(II) e Ba(II) foi avaliado para verificar o potencial de interferência destes íons na extração de 0,5 mg L⁻¹ de Cr(III). Tais íons foram escolhidos por apresentarem características similares ao íon Cr³⁺, como carga e/ou raio iônico e/ou características ácidas.

Para avaliação da possível interferência, foram preparadas soluções binárias contendo o íon interferente e o analito, sendo que o analito sempre foi mantido na concentração de 0,5 mg L⁻¹, enquanto o possível interferente mantido na concentração de 0,2 mg L⁻¹. Estas soluções foram submetidas ao procedimento de extração SPE-ISS sob as melhores condições e o sobrenadante analisado por F AAS após diluição com ácido nítrico.

Após análise dos sinais analíticos obtidos, foi calculado o fator de interferência, de acordo com a equação 2.

$$FI = A' / A \quad (2)$$

onde A' é o valor da absorvância relativa ao Cr(III) na presença do interferente e A é a absorvância de Cr(III) sem o referido interferente.

Determinada espécie foi considerada interferente quando promove uma variação positiva ou negativa do sinal analítico maior do que 10% (DEDINA, 1982). Sendo assim, se $FI < 0,90$ ou $FI > 1,10$, tem-se como consequência um decréscimo e um aumento do sinal analítico, respectivamente, provocado pelo interferente, mas na situação em que $FI = 1,00$ considera-se que não há interferência.

4.3.10 Figuras de Mérito

O desempenho analítico do método desenvolvido foi avaliado através dos principais parâmetros de validação. Para isso, curvas analíticas foram construídas e submetidas ao procedimento de extração e/ou pré-concentração, a partir de soluções padrão de Cr(III).

A faixa linear de trabalho é a relação entre o sinal analítico e a concentração do analito na faixa dinâmica de trabalho, essa região inicia pelo limite de quantificação e é delimitada até o ponto em que a concentração do analito atinge o limite de linearidade (BRASIL, 2003).

A sensibilidade do método é a capacidade que o sistema analítico tem de diferenciar duas concentrações próximas. É determinada através da inclinação da curva de calibração, sendo que métodos mais sensíveis apresentam maiores coeficiente angulares (BRASIL, 2003).

O limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, podendo ser determinado pela equação 3 (IUPAC, 2000).

$$LD = 3.\sigma_{branco}/sensibilidade \quad (3)$$

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser quantificada com nível de precisão e exatidão aceitável. Estimado como menor ponto da curva de calibração que se inclui na faixa linear de trabalho, pode ser determinado pela equação a seguir (equação 4) (IUPAC, 2000).

$$LQ = 10.\sigma_{branco}/sensibilidade \quad (4)$$

A precisão do método pode ser expressa como o desvio padrão relativo (DPR) de uma série de medidas. É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma mesma amostra, podendo ser avaliada em dois níveis: repetibilidade (intra-dia) e reprodutibilidade (inter-dia). Considerando uma faixa aceitável de tolerância entre 5 e 15% (BRASIL, 2003). Neste trabalho o desvio padrão relativo foi calculado segundo a equação 5, descrita abaixo.

$$DPR = (\text{desvio do ponto central da curva com pré-concentração}/\text{concentração média determinada}) \times 100 \quad (5)$$

O fator de pré-concentração pode ser avaliado pela razão entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com e sem a etapa de pré-concentração ou pela razão entre o volume inicial e final da amostra na etapa com pré-concentração, como foi o utilizado neste trabalho (FERREIRA et al., 2003).

A eficiência de concentração é definida como o produto do F_{PC} pela frequência analítica (f), sendo determinada como o número de amostras analisadas em uma hora. Portanto o valor obtido mostra o fator de pré-concentração encontrado pelo sistema

durante um minuto, expresso em min^{-1} . O valor de EC pode ser calculado utilizando a equação 6 (COSTA, 2018).

$$EC = F_{PC} \times (f / 60) \quad (6)$$

4.3.11 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos em relação ao valor verdadeiro, podendo ser avaliado através da análise de um material de referência certificado (CRM), pela comparação do método proposto com um método de referência ou por meio de testes de recuperação (BRASIL, 2003).

Portanto, a exatidão do método desenvolvido e otimizado foi avaliada através de testes de recuperação, utilizando o método de adição padrão em 4 diferentes infusões de plantas medicinais (camomila, chá verde, chapéu de couro e melissa), além de amostras de água mineral.

O método também foi avaliado através da análise de material de referência certificado APS-1071 (Alpha Resources 3090 Johnson RD, Stevensville, USA), contendo 100 mg L^{-1} do íon Cr(III).

As análises foram realizadas em triplicata e analisadas em um espectrômetro de absorção atômica com atomização por chama Varian®, Victoria, Austrália, modelo SpectrAA-220.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

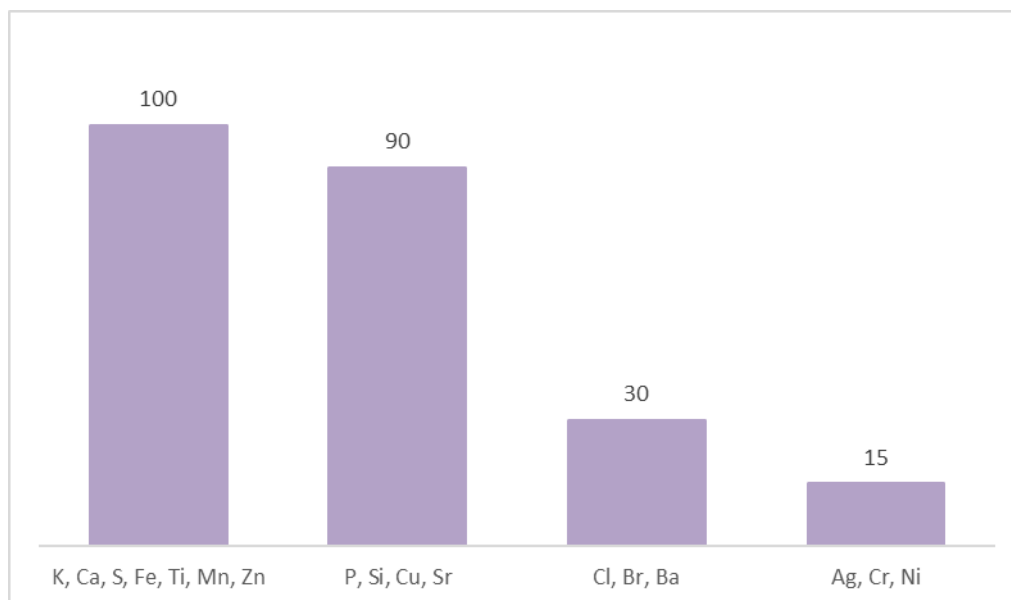
5.1 Análise semi-qualitativa da composição da planta

As técnicas de fluorescência de raios X (FRX ou XRF – do inglês X-Ray Fluorescence) são técnicas de análises não destrutivas baseadas na medida da intensidade dos raios X característicos emitidos pelos elementos químicos constituintes da amostra. A fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF) é amplamente utilizada em análises semi-qualitativas, onde as radiações características dos elementos existentes na amostra são registradas por um detector, onde este produz um pulso eletrônico cuja amplitude é proporcional à energia de radiação emitida pela amostra (BECKHOFF, 2006).

Para iniciar então o estudo sobre a composição inorgânica das plantas medicinais avaliadas, foram selecionadas algumas plantas que são bastante utilizadas como medicamento. A técnica de EDXRF permitiu a análise da composição inorgânica das

mesmas e a figura 5 apresenta a porcentagem com que cada um dos constituintes inorgânicos foi encontrado no total das amostras analisadas.

Figura 5 - Gráfico das porcentagens dos constituintes inorgânicos encontrados nas amostras analisadas.



Fonte: Própria autora

De acordo com a figura 5 foi possível observar que K, Ca, S, Fe, Ti, Mn e Zn estavam presentes em todas as amostras analisadas, ou seja, em 100% das amostras, enquanto P, Si, Cu e Sr estavam presentes em 90% das amostras. Já Ni, Cr, Ag, Ba, Br e Cl foram observadas em menor quantidade nas amostras.

Os elementos oxigênio (O), carbono (C) e hidrogênio (H) que fazem parte da composição das plantas, não aparecem nos resultados, devido a uma limitação do equipamento utilizado nesta análise, uma vez que o canal de leitura utilizado abrange apenas os elementos com número atômico de 11 a 92.

As plantas medicinais podem conter elementos químicos que podem ser disponibilizados para o corpo humano, mas nem todos possuem funções biológicas conhecidas, todavia a maioria deles é responsável por importantes atividades no metabolismo humano.

FRANICISCONI (2004) realizou um estudo para determinar os constituintes inorgânicos de plantas medicinais, onde foram analisadas diversas plantas entre elas calêndula, passiflora, melissa e camomila. Foram identificados Ba, Br, Ca, Co, Cl, Cr, Fe, Mn, Na, Zn, Cu e Ni em todas as 4 amostras. O Se foi encontrado somente nas

amostras de passiflora e camomila, enquanto Pb foi encontrado nas amostras de calêndula e passiflora e por último, o Cd foi encontrado nas plantas calêndula, melissa e camomila.

A contaminação de metais pesados no solo pode ocorrer naturalmente ou como resultado de atividades antrópicas, como mineração, fundição, combustão de combustíveis fósseis e agricultura. Através da raiz os metais podem ser facilmente liberados para planta, por um processo de difusão mediado pela membrana celular (MALEKI, 2017). Além da contaminação pelo solo a entrada de metais em células vegetais através da folhagem pode ser realizada através dos estômatos e cutícula das folhas, devido à poluição atmosférica (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 1984).

Com base nisso, alguns íons metálicos foram selecionados e analisados por espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) nas infusões preparadas.

5.2 Análise Quantitativa da composição da planta

Os elementos selecionados para análise no F AAS foram: chumbo (Pb), cromo (Cr), cádmio (Cd) e ferro (Fe). Os íons Cd e Pb foram escolhidos, pois apesar de não terem sido detectados na análise por EDX, seu estudo é importante devido às suas toxicidades, uma vez que podem ser absorvidos pelas plantas por meio do solo e poluição atmosférica.

Em três amostras analisadas (carqueja, chapéu de couro e melissa), foram detectadas concentrações de ferro acima do limite de detecção da técnica. Sendo que as concentrações encontradas foram respectivamente, 0,0052; 0,0060 e 0,0058 mg g⁻¹. Essas concentrações podem estar relacionadas com o solo, pois o Fe é um elemento presente em maior concentração no solo, além de ser emitido por indústrias siderúrgicas, podendo estar presente na atmosfera das regiões de cultivo da planta.

Alguns íons metálicos como o Cu, Mn, Cr e Fe são elementos essenciais para as plantas, importantes para o seu crescimento, reações de oxidação-redução e muitos outros processos metabólicos. Já os metais não essenciais como Pb, Cd, Hg e As não possuem função biológica conhecida nas plantas, sendo tóxicos para as plantas mesmo que em baixas concentrações (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 1984).

De acordo com LAJAYER, 2017 várias atividades humanas podem levar ao acúmulo de metais pesados em ambientes naturais, como mineração, metalurgia, uso de fertilizantes químicos contendo metais pesados além de tráfego de veículos.

Os íons Pb, Cr e Cd não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas, o que não pode ser considerado como a ausência destes íons nas amostras, uma vez que os mesmos podem estar presentes em concentrações abaixo do limite de detecção da técnica utilizada. Assim fica clara a importância do desenvolvimento de métodos de pré-concentração, que permitam a detecção destes íons de forma simples e segura, mesmo quando presentes em baixas concentrações.

5.3 Otimização do complexo Cr-PAN

A espectrofotometria de absorção molecular na região espectral ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma técnica simples, de fácil operação, sensível e apropriada para análises de rotina na indústria. A técnica consiste em uma radiação contínua que passa através de um material transparente. Uma porção de radiação pode ser absorvida, e como resultado desta absorção de energia, átomos ou moléculas passam de um estado de baixa energia (estado fundamental) para um estado de mais alta energia (estado excitado). Portanto a quantidade de luz absorvida por uma molécula é em função do comprimento de onda da luz.

Logo, para que um composto possa ser detectado com radiações na região do UV-Vis, é necessário que esse composto possua elétrons capazes de serem excitados, ou seja, elétrons pi (π) ou elétrons livres (não-ligantes). Os elétrons sigma não podem ser excitados, porque a transição de elétrons de uma ligação sigma acarretaria a quebra da ligação e, conseqüentemente, a perda da estrutura característica do composto (SKOOG, 2002).

A fase extratora é composta por um agente transferidor de fase catiônico e um agente pareador iônico, ambos possuem grupos alquila que extraem o analito da amostra por meio de interações hidrofóbicas.

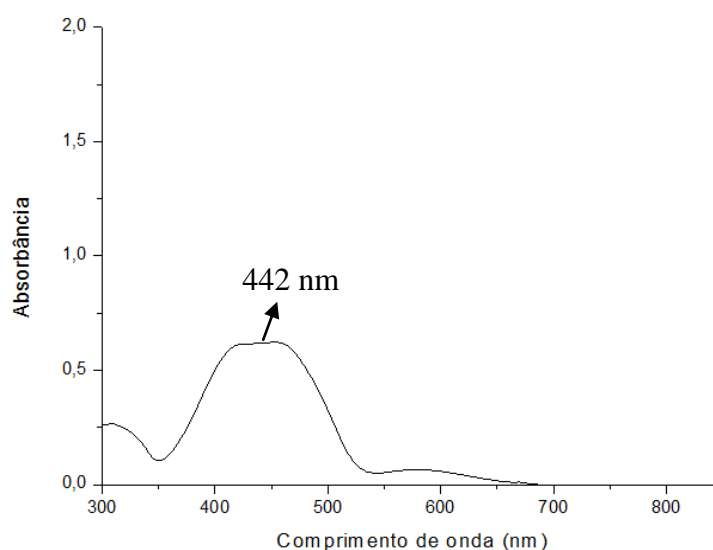
Para que ocorra a interação entre a fase extratora e a amostra é necessário que a amostra contenha grupos hidrofóbicos adequados. Uma vez que o íon metálico não possui esses grupos, é necessária a formação de um complexo com características hidrofóbicas. Assim, o íon metálico se liga ao complexante e o complexo formado, é adsorvido pela fase sólida formada entre o agente transferidor de fase e o pareador iônico, garantindo uma extração eficiente do analito.

Neste trabalho, o reagente PAN foi escolhido como agente complexante devido a possibilidade de complexação somente com o Cr(III) excluindo o Cr(IV) que pode também estar presente na amostra. O PAN foi o primeiro azo derivado da piridina usado

com fins analíticos (UENO et al., 1992), ele complexa os metais através do nitrogênio do grupo azo, do nitrogênio do anel heterocíclico e do oxigênio da hidroxila. Assim, considerando que a reação de complexação é de extrema importância para eficiência da extração, achou-se necessário o estudo de otimização da etapa de formação do complexo Cr-PAN.

A fim de se obter o comprimento de onda de máxima absorção para o complexo formado, foi realizada uma varredura utilizando a espectroscopia de absorção molecular na região do UV-Vis, e como pode ser observada na figura 6, a máxima absorção do complexo ocorre em 442 nm.

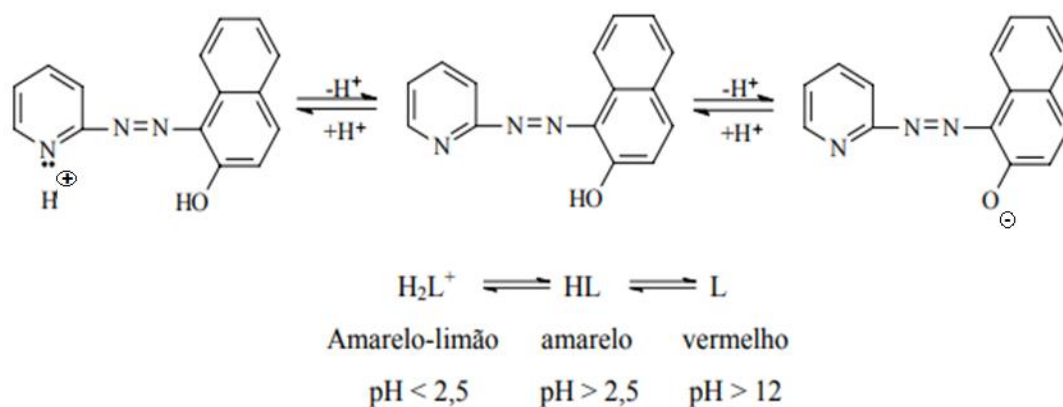
Figura 6 - Espectro de varredura para o complexo Cr-PAN.



Fonte: Própria autora

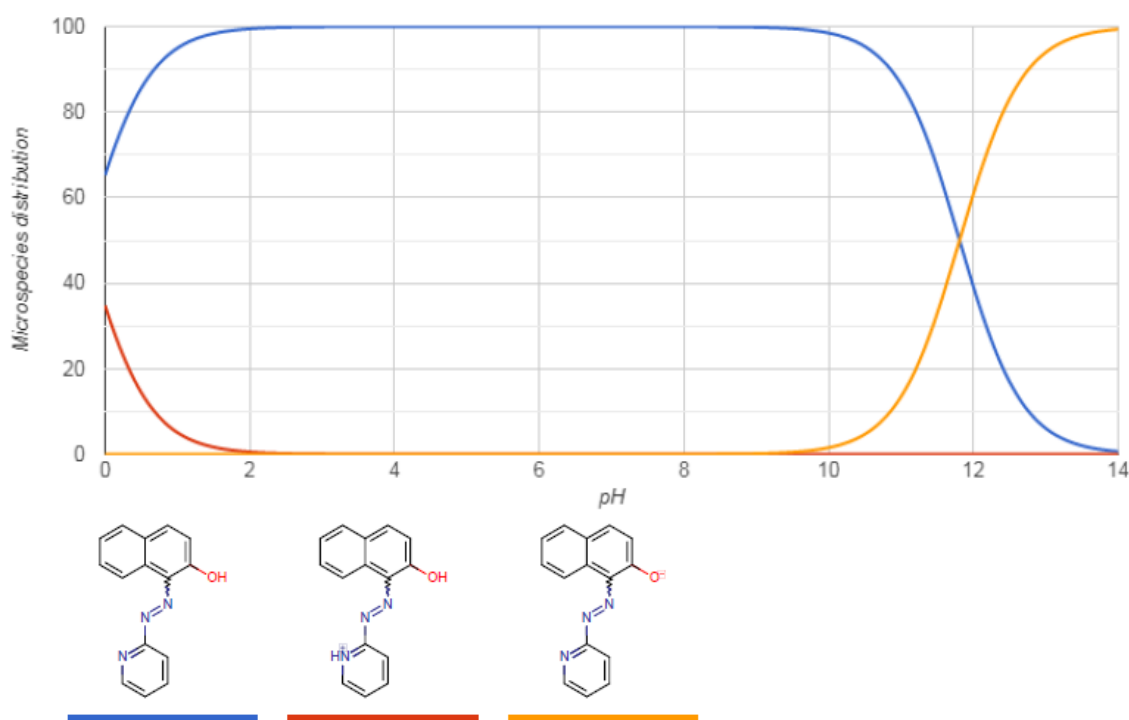
As reações de formação de compostos de coordenação entre íons metálicos e o ligante PAN é extremamente dependente da variação da concentração hidrogeniônica do meio reacional. Isto se deve a protonação em meio ácido do átomo de nitrogênio do grupo piridina, e consequente ionização do hidrogênio do grupo hidroxila em meio básico (PEASE e WILLIAMS, 1959; GAO et al., 1997), como mostra as figuras 7 e 8. Sendo de extrema importância a escolha do pH adequado para coordenação com o íon metálico.

Figura 7 – Formas adquiridas pelo ligante PAN dependendo do pH do meio.



Fonte: COO et al., 1998; SANDELL e ONISH, 1978

Figura 8 - Distribuição das espécies para o agente complexante PAN.



Fonte: CHEMICALIZE, 2019

A concentração do complexante também é um fator importante para o método proposto neste trabalho, pois moléculas do complexante em excesso podem competir com o complexo nos sítios ativos de adsorção da fase sólida ou estar disponível para complexar outros metais, presentes concomitantemente na amostra e atuar como interferentes na determinação.

Nesse sentido, uma matriz Doehlert foi utilizada para otimizar as condições de formação do complexo, tais como: concentração do complexante e pH do meio reacional. Nesse estudo, fixou-se a quantidade de analito em 1 mL de Cr^{3+} ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$). O pH do meio foi ajustado pelo uso de um tampão adequado, variando entre 9 e 11, como mostra a tabela 7. Esses valores de pH foram escolhidos com base no trabalho de HASSANLOUEI e colaboradores (2017), que realizou um estudo sobre o efeito do pH, utilizando o PAN como agente complexante, onde se percebeu um aumento de sinal em pH 8 e que a partir deste valor, o sinal permaneceu constante até o pH 10.

Os resultados de absorvância encontrados neste trabalho foram analisados através da absorvância relativa, calculada segunda a equação 7.

$$\text{Absorvância relativa} = (AE/MACE) \times 100 \quad (7)$$

onde, AE é a absorvância do experimento e MACE é maior absorvância observada no conjunto dos experimentos.

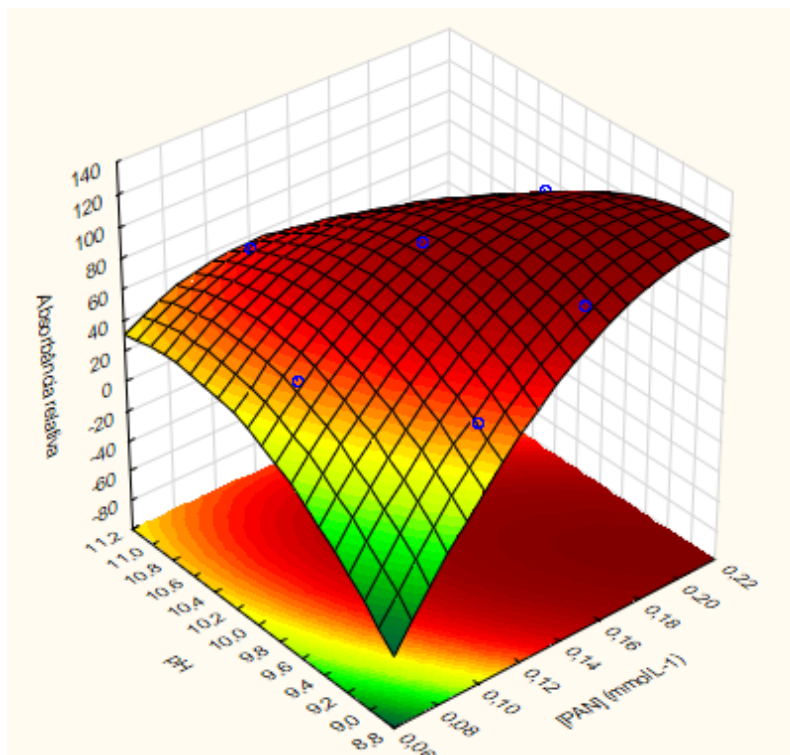
Tabela 7 - Dados experimentais para matriz Doehlert para 2 variáveis utilizada para otimização da formação do complexo (n=3).

Experimento	$x_1 =$ Concentração inicial PAN (mol L^{-1})	$x_2 =$ pH	Absorvância relativa (%)
1	0,14 (0)	10 (0)	$100 \pm 2,1$
2	0,20 (1)	10 (0)	$99,4 \pm 11,3$
3	0,16 (0,5)	11 (0,866)	$56,3 \pm 6,4$
4	0,08 (-1)	10 (0)	$47,9 \pm 9,3$
5	0,11 (-0,5)	9 (-0,866)	$52,3 \pm 4,6$
6	0,16 (0,5)	9 (-0,866)	$95,6 \pm 5,8$
7	0,11 (-0,5)	11 (0,866)	$67,9 \pm 5,6$

Fonte: Própria autora

Os resultados obtidos através da matriz acima são apresentados na Figura 9.

Figura 9 - Superfície de resposta obtida no planejamento Doehlert para otimização das condições de formação do complexo.



Fonte: Própria autora

A função polinomial que descreve a superfície de resposta e relaciona as variáveis pH e concentração de PAN, está representada na equação 8, apresentada a seguir:

$$Abs = - 29,4474 + 61,5620 ([PAN]) - 62,8916 [PAN]^2 + 5,2387 (pH) - 0,2366 (pH)^2 - 4,0917 ([PAN])(pH) + 0 \quad (8)$$

O modelo resultante apresentou ajuste máximo de 98% de variação de acordo com o teste de Análise de Variância (ANOVA).

Aplicando-se o critério de Lagrange, que se baseia no cálculo do determinante Hessiano (H) da função que descreve a superfície de resposta, descrito pela equação 9, é possível localizar o ponto crítico da equação de segunda ordem.

$$H(A,B) = (\partial^2 Y / \partial A^2) \times (\partial^2 Y / \partial B^2) - (\partial^2 Y / \partial A \partial B)^2 \quad (9)$$

O resultado obtido indica que existe um ponto de máximo na superfície de resposta e que este ponto de máximo pode ser obtido fazendo-se as derivadas parciais da equação 9, iguais a zero, como mostra a equação 10, descrita abaixo.

$$\frac{\partial Abs}{\partial ([PAN])} = \frac{\partial Abs}{\partial (pH)} \quad (10)$$

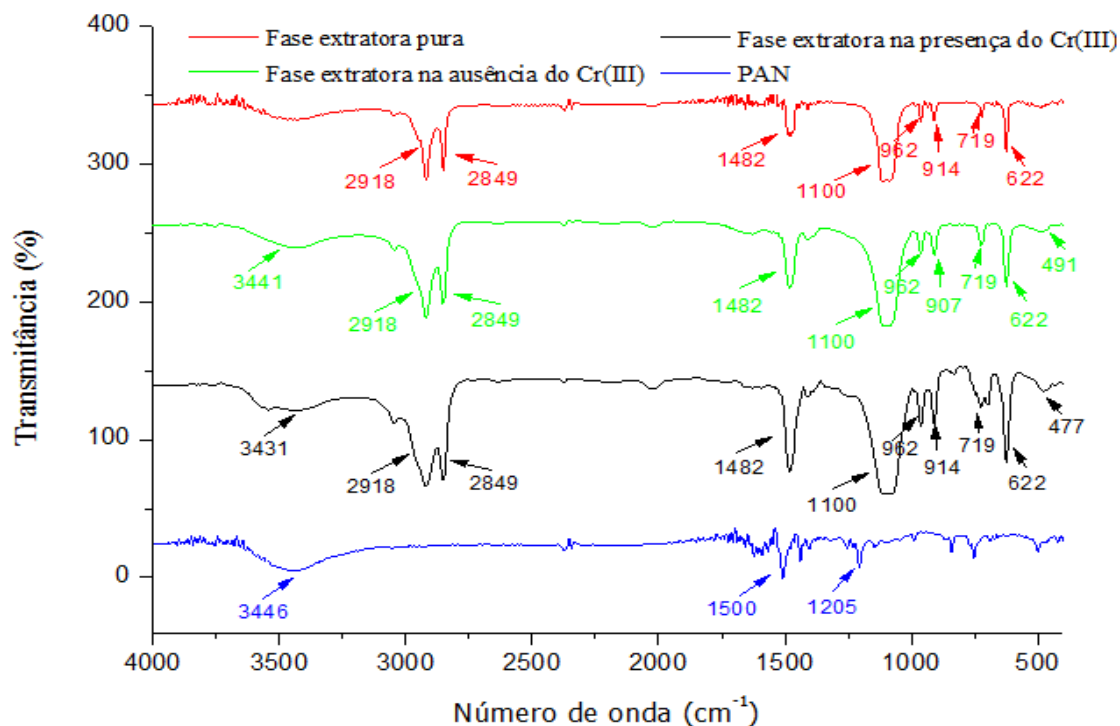
Assim, os máximos foram calculados como sendo a concentração do complexante PAN igual a $0,18 \text{ mol L}^{-1}$ e o pH do meio igual a 9,5.

5.4 Caracterização do material adsorvente

5.4.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (IV)

Para elucidação dos grupos funcionais associados ao procedimento de extração, são apresentados na Figura 10 os espectros de absorção no infravermelho da fase extratora formada sem o íon Cr(III) adsorvido e da fase extratora após adsorção do analito.

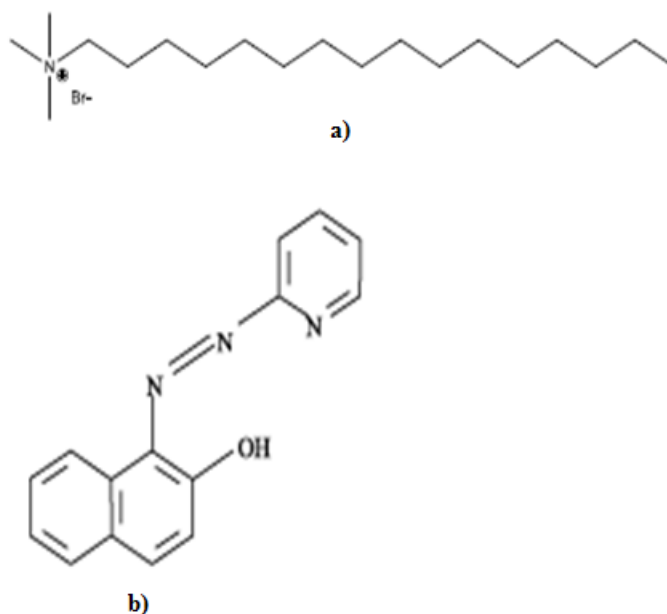
Figura 10 - Espectros de absorção no infravermelho médio com Transformada de Fourier (FT-IR) da fase extratora na presença e ausência do analito.



Fonte: Própria autora

Nos espectros apresentados, observam-se poucas bandas que são típicas de grupamentos alquila, como se pode observar na figura 11. Verifica-se também a presença de bandas características de funções oxigenadas, geralmente em 3500 e 1200 cm^{-1} , que podem ser atribuídas à presença de água no material e do grupamento fenol presente no espectro do agente complexante PAN, respectivamente.

Figura 11 - Estrutura química do a) Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB), b) 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN)



Fonte: Própria autora

As bandas encontradas na região de 2800 a 2990 cm^{-1} correspondem ao estiramento das ligações C–H dos grupos metila com hibridização do tipo sp^3 . Portanto a banda de 2922 cm^{-1} pode estar associada ao estiramento assimétrico do grupo $-\text{CH}_3$ terminal, enquanto 2856 cm^{-1} para o estiramento simétrico dos grupos $(-\text{CH}_2-)$ (BARBOSA, 2007).

As bandas entre 1470 e 1430 cm^{-1} correspondem à deformação angular de $(\text{CH}_2)_n$, sendo que para $n > 3$ o espectro também apresenta uma banda na região por volta de 720 cm^{-1} , enquanto a banda entre 1180 a 1280 cm^{-1} está associada ao estiramento da ligação C–N de alifáticos, onde na maioria dos casos a posição da banda pode ser alterada por efeitos de conjugação (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2006; STUART, 2004).

Para o espectro do agente complexante a banda entre 1450 e 1500 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=C de aromáticos, que também é característico de

compostos aromáticos. Também são observadas fortes bandas de absorção resultantes de deformação angular C-H fora do plano do anel na região de 670-900 cm^{-1} (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2006).

Percebe-se um leve aumento de intensidade da banda de 482 cm^{-1} na região observada no espectro da fase extratora adsorvida com Cr(III), podendo ser atribuída a interação entre o metal e os grupos funcionais (Sítios Ativos) presentes na fase extratora (STUART, 2004).

Ao comparar os espectros obtidos com a fase sólida isolada, e a fase sólida contendo o complexo Cr-PAN adsorvido, observa-se que ambos foram praticamente idênticos, não apresentando bandas que pudessem ser atribuídas à presença do complexo na superfície do material. Assim, levando em consideração o fato de que a técnica FT-IR não apresenta alta sensibilidade em se tratando de aspectos analíticos, provavelmente as quantidades empregadas do complexante e do metal durante o procedimento de extração não foram suficientes para promover um sinal de absorção detectável frente à quantidade majoritária da fase sólida no meio (COSTA, 2018).

5.4.2 Fluorescência de Raio X por Energia dispersiva (EDXRF)

A técnica de EDXRF é rápida, simples e não destrutiva, podendo ser utilizada para análise elementar ou caracterização de uma amostra. A amostra absorve os raios X emitidos, promovendo os elétrons a níveis mais energéticos, assim que eles voltam a seu estado fundamental emitem a energia absorvida, sendo específica para cada elemento químico permitindo assim a sua identificação e quantificação (CARNEIRO e NASCIMENTO FILHO, 1996).

A fase extratora na ausência e na presença do íon Cr(III) foram analisadas por EDX, conforme é apresentado na tabela 8.

Tabela 8 - Teores de elementos inorgânicos identificados na fase extratora formada sem e com a presença do íon Cr(III).

Elemento	Ausência do íon Cr(III) (%)	Presença do íon Cr(III) (%)
Cl	95,87	90,75
Br	3,96	8,84
Zn	0,093	0,191
Cu	0,086	--
Cr	--	--

-- não detectado

Fonte: Própria autora

Analisando os dados, percebeu-se que íon Cr(III) não foi encontrado na fase extratora. Entretanto, não se pode dizer que o mesmo não foi adsorvido, pois a concentração utilizada nesse procedimento é baixa não sendo possível a detecção do mesmo no equipamento utilizado.

Os elementos Cl e Br foram identificados devido à presença destes na estrutura do pareador iônico NaClO₄ e do agente transferidor de fases CTAB, respectivamente, que são os responsáveis pela formação da fase extratora. A partir da análise dos dados, também é possível perceber a existência dos metais Cu e Zn que podem ter sido detectados devido à composição do filtro de polipropileno utilizado durante a análise. A análise em branco dos filtros foi realizada e percebe-se que o mesmo não é 100% puro, tendo o Cu e Zn em sua composição.

5.5 Otimização das condições de extração

Para iniciar o desenvolvimento da metodologia SPE-ISS para extração de íons metálicos, a etapa mais importante é a escolha do agente transferidor de fase mais adequado.

Nesse caso, foram testados dois agentes transferidores de fase diferentes, o brometo de tetra-*n*-butilamônio (TBAB) e o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) como mostra a tabela 9. Em todos os ensaios o NaClO₄ foi utilizado como pareador iônico. Os efeitos das variáveis estão representados graficamente pelo diagrama de Pareto (figura 12).

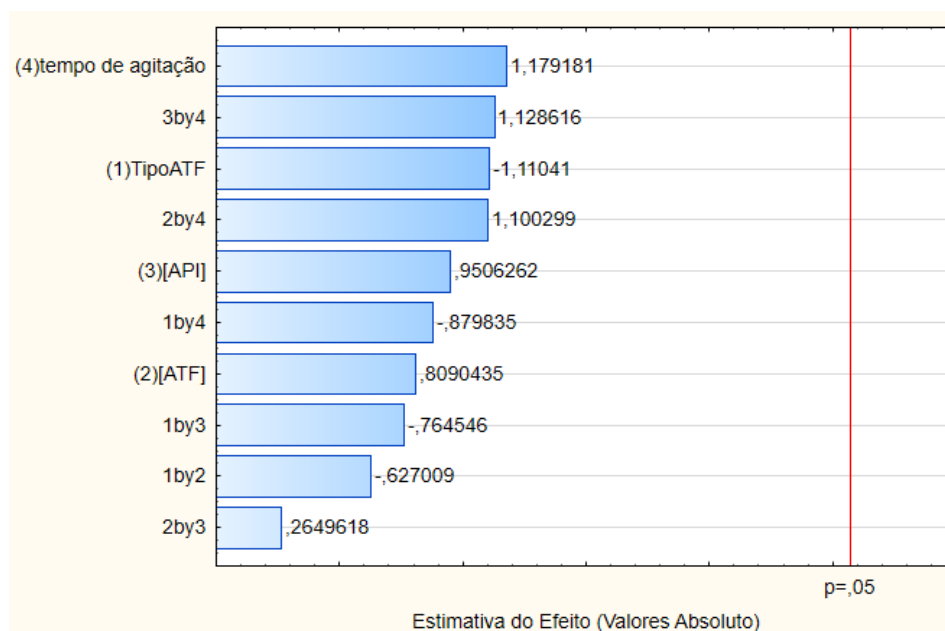
Tabela 9 - Matriz do planejamento fatorial 2^4 em termos das variáveis escalonadas e seus dados experimentais.

Experimento	Tipo ATF	[ATF] (mol L ⁻¹)	[API] (mol L ⁻¹)	Tempo de agitação (min)	Absorbância relativa (%)	Observações
1	CTAB (-)	0,1 (-)	0,1 (-)	1 (-)	11,6 ± 1,3	
2	TBAB (+)	0,1 (-)	0,1 (-)	1 (-)	0	Não ppt
3	CTAB (-)	1,0 (+)	0,1 (-)	1 (-)	10,6 ± 4,0	
4	TBAB (+)	1,0 (+)	0,1 (-)	1 (-)	12,1 ± 2,0	
5	CTAB (-)	0,1 (-)	1,0 (+)	1 (-)	13,4 ± 3,3	
6	TBAB (+)	0,1 (-)	1,0 (+)	1 (-)	12,1 ± 1,4	
7	CTAB (-)	1,0 (+)	1,0 (+)	1 (-)	0	Não solubilizou
8	TBAB (+)	1,0 (+)	1,0 (+)	1 (-)	0	Não separou
9	CTAB (-)	0,1 (-)	0,1 (-)	10 (+)	10,5 ± 0,3	
10	TBAB (+)	0,1 (-)	0,1 (-)	10 (+)	0	Não ppt
11	CTAB (-)	1,0 (+)	0,1 (-)	10 (+)	11,4 ± 1,7	
12	TBAB (+)	1,0 (+)	0,1 (-)	10 (+)	14,9 ± 1,2	
13	CTAB (-)	0,1 (-)	1,0 (+)	10 (+)	15,5 ± 2,1	
14	TBAB (+)	0,1 (-)	1,0 (+)	10 (+)	15 ± 0,6	
15	CTAB (-)	1,0 (+)	1,0 (+)	10 (+)	100 ± 1,1	Excesso de ppt
16	TBAB (+)	1,0 (+)	1,0 (+)	10 (+)	9,10 ± 2,6	

PPT: precipitado

Fonte: Própria autora

Figura 12 – Diagrama de Pareto utilizado para triagem das variáveis do sistema de extração SPE-ISS.



Fonte: Própria autora

De acordo com os resultados da ANOVA, o modelo estatístico não apresentou falta de ajuste ($F_{cal} < F_{tab}$) para a variável resposta analisada. Assim, percebe-se que nenhuma variável apresentou efeito significativo. Esse comportamento pode estar relacionado com a diferença de sinal obtida para os dois agentes transferidores de fase utilizados, como pode ser observado na tabela 9.

Através dos resultados apresentados, é possível identificar um melhor desempenho do CTAB como agente transferidor de fase (experimentos 1 e 2), uma vez que no experimento 2 utilizando o TBAB não houve a formação da fase extratora.

Os experimentos 2 e 10, indicam que mesmo com o aumento do tempo de agitação não houve a formação da fase extratora. Observando o experimento 8 percebe-se que quando há o aumento da concentração do TBAB e do API, acontece a formação da fase extratora, porém a sedimentação da mesma não é observada, impossibilitando a análise deste experimento.

Já quando se observa o experimento 15, percebe-se o bom desempenho do CTAB frente à extração, pois tendo sido as variáveis mantidas no nível alto, ocorreu a formação de um excesso de fase extratora.

Assim, uma vez que o experimento não indicou nenhuma variável significativa, mas levando-se em conta as observações descritas acima, foi realizada a construção de

um novo planejamento fatorial a fim de afirmar o melhor desempenho do CTAB, conforme descrito na tabela 10.

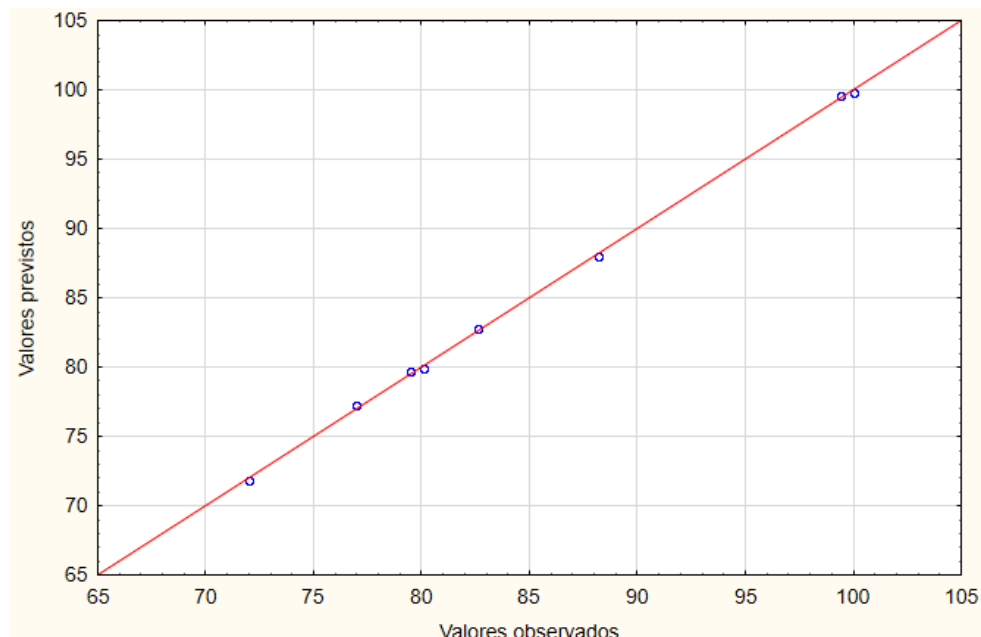
Tabela 10 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 em termos das variáveis escalonadas e seus dados experimentais para o CTAB.

Experimento	[CTAB] (mol L ⁻¹)	[NaClO ₄] (mol L ⁻¹)	Tempo de agitação (min)	Absorbância relativa (%)
1	0,1 (-)	0,2 (-)	1 (-)	88,2 ± 3,5
2	0,5 (+)	0,2 (-)	1 (-)	99,4 ± 7,0
3	0,1 (-)	0,8 (+)	1 (-)	79,5 ± 9,2
4	0,5 (+)	0,8 (+)	1 (-)	72 ± 4,8
5	0,1 (-)	0,2 (-)	10 (+)	82,6 ± 9,2
6	0,5 (+)	0,2 (-)	10 (+)	100 ± 10,5
7	0,1 (-)	0,8 (+)	10 (+)	80,1 ± 0,9
8	0,5 (+)	0,8 (+)	10 (+)	77 ± 3,1

Fonte: Própria autora

Após realizar os experimentos, os dados obtidos foram tratados inicialmente, verificando a adequação do modelo estatístico escolhido. Então, a normalidade dos erros foi verificada através do gráfico de valores observados versus valores previstos, representado na figura 13.

Figura 13 - Gráfico de valores observados versus valores previstos para o agente transferidor de fases CTAB.

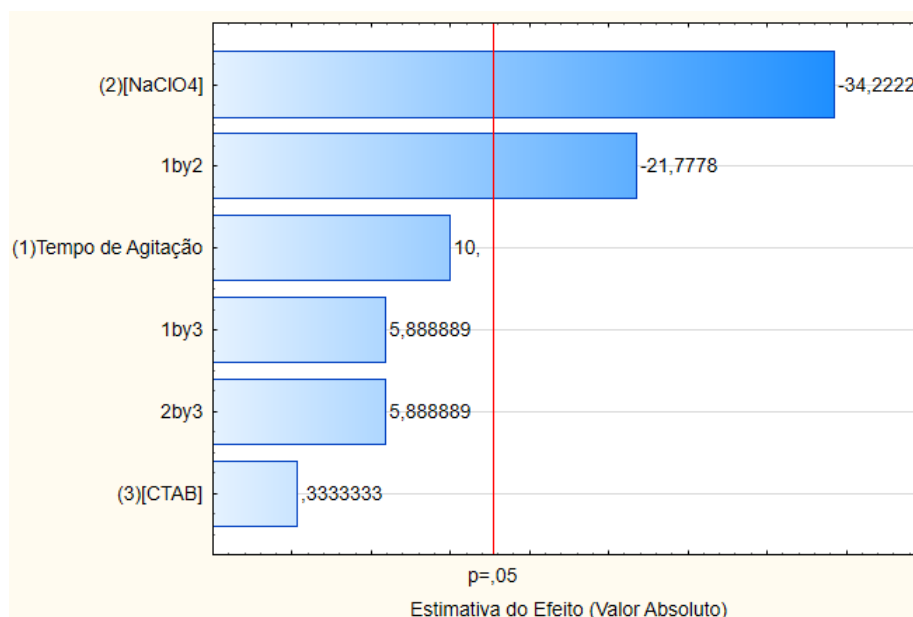


Fonte: Própria autora

A figura 13 apresentou valores satisfatórios, que mostram que quanto mais próximos os pontos estiverem da reta, mais próximos os valores observados estão dos valores previstos, portanto percebe-se que os valores seguem uma distribuição normal, sendo a variância constante (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Confirmada a normalidade dos erros, foi construído o diagrama de pareto, apresentado na figura 14, o qual apresenta os efeitos que são estatisticamente importantes. Sendo que, os efeitos cujo retângulo estiverem à direita da linha divisória ($p < 0,05$) devem ser considerados no modelo matemático (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

Figura 14 - Diagrama de Pareto utilizado para triagem das variáveis do sistema de extração SPE-ISS utilizando CTAB como agente transferidor de fase.



Fonte: Própria autora

Os valores ao lado da barra azul representam a estatística do teste t , que comparam as médias dos resultados. A significância dos resultados ($p > 0,05$) representa o teste F que faz a comparação das variâncias, controlada através do mesmo (CALADO e MONTGOMERY, 2003).

A concentração do agente transferidor de fases CTAB apesar de ser de extrema importância na formação da fase extratora não foi significativa. O que pode ser explicada pela possibilidade de o agente transferidor de fases, CTAB, estar em excesso e o pareador iônico NaClO_4 como reagente limitante (COSTA, 2018).

Observando ainda a figura 14 é possível perceber que a variável concentração do pareador iônico (NaClO_4) foi significativa, além da interação entre esta variável e o tempo de agitação no vortex.

Uma vez que a interação (1:2) apresentou-se estatisticamente significativa no modelo proposto, porém, seu efeito é secundário, ou seja, menor que o efeito da variável principal, pode-se concluir que a otimização multivariada se torna mais adequada do que a avaliação individual dos fatores. Desta forma, foi escolhido fazer uma matriz Doehlert para otimizar as variáveis concentração do pareador iônico e tempo de agitação utilizando a concentração do CTAB em $0,3 \text{ mol L}^{-1}$, como mostra a tabela 11.

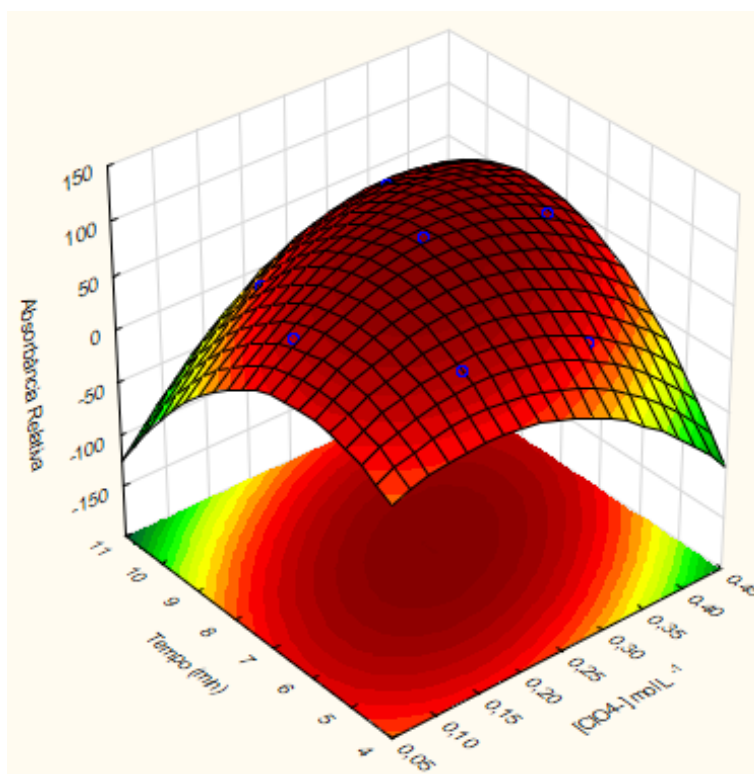
Tabela 11 - Dados experimentais da matriz Doehlert para 2 variáveis para otimização das variáveis significativas para a formação da fase sólida (n=3).

Experimento	x_1 = Concentração inicial NaClO_4 (mol L^{-1})	x_2 = tempo de agitação (min)	Absorbância relativa (%)
1	0,25 (0)	7,5 (0)	$100 \pm 4,89$
2	0,40 (1)	7,5 (0)	$71,26 \pm 9,75$
3	0,32 (0,5)	10 (0,866)	$66,68 \pm 11,38$
4	0,10 (-1)	7,5 (0)	$59,77 \pm 3,25$
5	0,18 (-0,5)	5 (-0,866)	$64,37 \pm 5,51$
6	0,32 (0,5)	5 (-0,866)	$36,78 \pm 2,44$
7	0,18 (-0,5)	10 (0,866)	$22,99 \pm 0,01$

Fonte: Própria autora

A superfície de resposta obtida é apresentada na figura 15.

Figura 15 - Superfície de resposta para otimização das variáveis significativas para a formação da fase sólida.



Fonte: Própria autora

O modelo resultante apresentou ajuste máximo de 99%, variação explicada de acordo com o teste de Análise de Variância (ANOVA). A superfície apresentou um ponto de máximo, e aplicando-se o critério de Lagrange sobre a função que descreve o modelo, pode-se observar que o ponto crítico correspondente ao ponto de máximo foi alcançado, do qual foi possível obter as condições otimizadas. Esses valores críticos indicam que as condições ótimas de extração pelo método SPE-ISS são 0,26 mol L⁻¹ de NaClO₄ e 7,51 minutos de agitação no vortex.

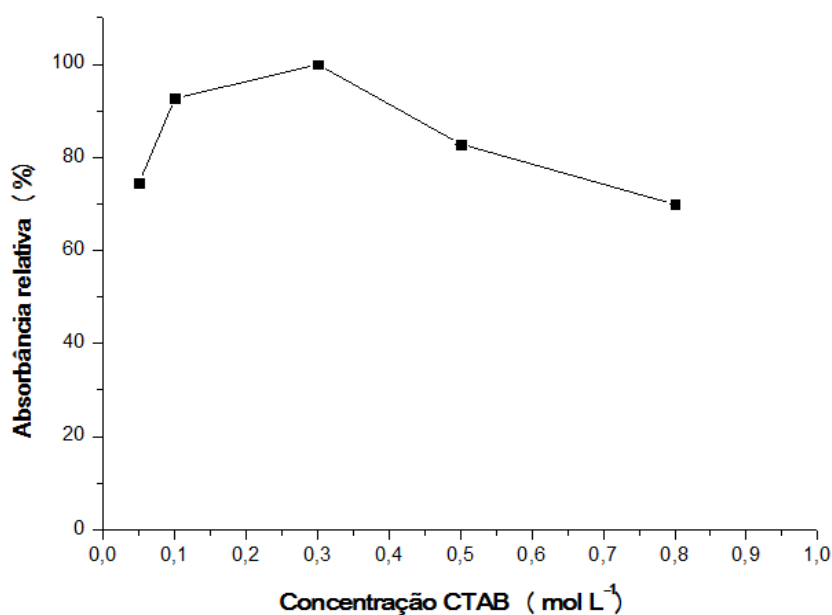
A função polinomial que descreve a superfície de resposta dessa modelagem está representada na equação 11, mostrada a seguir:

$$Abs = - 212,9010 + 96,9556 ([ClO_4^-]) - 1532,6667 ([ClO_4^-])^2 + 79,9090 (Tempo) - 6,9878 (Tempo)^2 + 95,0400 ([ClO_4^-])(Tempo) + 0 \quad (11)$$

$$\partial Abs / \partial ([ClO_4^-]) = \partial Abs / \partial (tempo) \quad (12)$$

Apesar da concentração do agente transferidor de fase não apresentar efeito significativo, teve-se o interesse de investigar seu efeito de forma univariada, como mostra a figura 16. Esse refinamento foi realizado, a fim de fixar a concentração de CTAB e obter as melhores condições para formação da fase sólida.

Figura 16 - Gráfico para otimização univariada da concentração de CTAB (n=3).



Fonte: Própria autora

Observa-se que quando aumenta-se a concentração do CTAB até $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ há um aumento do sinal, entretanto se este valor continuar a ser aumentado, percebe-se um decaimento do sinal analítico. Como foi dito anteriormente o aumento da concentração do CTAB promove melhores resultados, uma vez que o mesmo produz excesso de fase extratora, conseqüentemente melhores resultados, com isso escolheu-se a concentração de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ como melhor concentração para promover a extração.

5.6 Avaliação do desempenho analítico

5.6.1 Seletividade

Com as condições operacionais obtidas para melhor extração do íon Cr(III) pela fase extratora formada *in situ*, partiu-se para o estudo do efeito de espécies concomitantes que podem agir como interferentes frente ao método desenvolvido.

A especificidade da extração pode ser modificada de acordo com o pH do meio que é um parâmetro que influencia na formação do complexo metal-PAN. Como discutido anteriormente, devido às possibilidades de protonação do mesmo, as reações de complexação utilizando PAN são extremamente dependes do pH do meio. Assim, considerando que o PAN, possui habilidade para complexar com 54 metais, como mostra a figura 17, alguns íons metálicos foram selecionados como interferentes.

Figura 17 - Íons metálicos que reagem com PAN.

número atômico
 símbolo químico
 nome
 peso atômico
 (ou número de massa de isotopo mais estável)

Fonte: Adaptado de (PONCE, 1995).

Com base nos dados obtidos pelo EDXRF foram testados os íons Al(III), Mn(II), Zn(II), Fe(III), Ca(II), Cu(II), Pb(II) e Ba(II), uma vez que os mesmos são considerados essenciais para a planta. A tabela 12 representa as concentrações utilizadas dos interferentes e analito em cada experimento, além do fator de interferência calculado.

Tabela 12 – Fator de interferência calculado para as espécies analisadas.

Espécies	Concentração (mg L ⁻¹)	Concentração do analito Cr (III) (mg L ⁻¹)	Fator de interferência
Al(III)	0,2	0,5	0,632 ± 0,0025
Mn(II)	0,2	0,5	1,1519 ± 0,0028
Zn(II)	0,2	0,5	0,439 ± 0,0012
Fe(III)	0,2	0,5	0,844 ± 0,0011
Ca(II)	0,2	0,5	0,008 ± 0,0004
Cu(II)	0,2	0,5	0,975 ± 0,0009
Pb(II)	0,2	0,5	1,038 ± 0,0049
Ba(II)	0,2	0,5	0,941 ± 0,0028

Fonte: Própria autora

Através da comparação do sinal analítico da solução contendo apenas Cr(III) e o sinal analítico da solução contendo o analito e os íons interferentes, observa-se que a presença de contaminantes provoca interferência negativa no processo de extração, pois valores de **FI** menores que 0,90 foram obtidos no estudo. A interferência foi observada devido à presença dos íons dos metais Al, Zn, Fe e Ca.

A redução do sinal analítico pode ser atribuída à possibilidade de reação desses íons metálicos com o reagente PAN no pH utilizado, portanto, há competição de outros cátions na formação do complexo metal-PAN, além da competição pelos sítios adsorptivos presentes na fase sólida.

SOUZA (2016), em seu trabalho de determinação de cobre em amostras de aguardente de cana-de-açúcar, usando o PAN como agente complexante, apontou que os íons Fe(III) e Ni(II) interferiram negativamente na reação. Já ANJOS e colaboradores (2007) observou interferência de Zn(II) e Co(II) na determinação de Mn(II) por espectrometria de absorção atômica por chama utilizando também o PAN como agente complexante, onde percebeu-se que estes íons tornam-se interferentes em concentrações 10 vezes maior que a concentração de Mn.

Além disso, uma vez que estes íons podem formar complexos com o PAN, estes complexos também serão extraídos e chegarão à chama para análise. Assim, a diminuição do sinal analítico também pode estar relacionada a dificuldades na atomização do analito, uma vez que o íon metálico adsorvido é conduzido ao nebulizador e posteriormente ao queimador juntamente com os demais íons utilizados nesse estudo, podendo então formar novos compostos, devido à afinidade pelos átomos de oxigênio presentes na chama interferindo no sinal analítico do íon Cr (SKOOG et al., 2002).

5.6.2 Figuras de Mérito

O desempenho analítico do método desenvolvido foi avaliado, sob as condições otimizadas, através dos principais parâmetros de validação, apresentados na tabela 13.

Tabela 13 - Figuras de mérito do método desenvolvido.

Figuras de mérito	Valores
Faixa linear de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5,5– 5000
Coefficiente de determinação (R^2)	0,9931
Sensibilidade	0,00003
Limite de detecção (LD) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,66
Limite de Quantificação (LQ) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5,5
Desvio padrão relativo (DPR) intra-dia (%)	0,001
Desvio padrão relativo (DPR) inter-dia (%)	0,0004
Fator de pré-concentração (F_{PC})	12
Frequência analítica (amostra hora $^{-1}$)	1,87
Eficiência de concentração (EC) (min $^{-1}$)	0,37
Equação da reta	$Abs = 3 \times 10^{-5} [Cr(III)] + 0,0123$

Fonte: Própria autora

O coeficiente de determinação obtido para a curva de calibração após a etapa de extração por SPE-ISS mostrou-se satisfatório garantindo a linearidade. A precisão intra-dia foi determinada a partir de 10 medidas de uma solução de Cr(III) $500 \mu\text{g L}^{-1}$, já a precisão inter-dia foi determinada a partir da medida de uma solução de Cr(III) $500 \mu\text{g L}^{-1}$ realizada em três dias, obtendo como resposta um DPR de 0,001 para a precisão intra-dia e 0,0004% para a precisão inter-dia, indicando uma excelente repetibilidade e reprodutibilidade, respectivamente. Uma vez que os valores de DPR obtidos foram inferiores a 5%.

O valor de LD calculado foi comparado com outras metodologias desenvolvidas para a extração e pré-concentração de Cr(III) utilizando F AAS. SOUSA NETO e colaboradores (2019) encontraram um limite de detecção de $19,20 \mu\text{g L}^{-1}$, ALVES e COELHO (2013) relataram um LD de $1,92 \mu\text{g L}^{-1}$.

JAMALI e colaboradores (2017) desenvolveu um método SPE-ISS para determinar Co(II), já JAMALI e BOROMANDI (2014) também desenvolveu um método SPE-ISS para determinar Cd(II) utilizando o CTAB como ATF e como técnica de detecção o F AAS, onde foram encontrados LD de $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,3 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

O F_{PC} é de extrema importância na avaliação de um sistema de pré-concentração, sendo que um alto valor de F_{PC} não está necessariamente associado com

uma alta eficiência no processo de pré-concentração. Como na fase sólida formada in situ há a presença de compostos orgânicos que podem interferir no método desenvolvido foi necessário calcular o F_{PC} através da razão entre o volume inicial e final da solução da curva com pré-concentração que foi de 12, como descrito na tabela 13.

A EC fornece informações sobre a eficiência do sistema de pré-concentração, entretanto, não está necessariamente associado a um elevado fator de pré-concentração. Portanto a EC calculada para o presente trabalho foi de $0,4 \text{ min}^{-1}$. Podendo ser considerados satisfatórios devido à eficiência de concentração geralmente obtidos para procedimentos em batelada se aproximarem de 4,0 (FANG, 1993).

5.6.3 Exatidão

A exatidão do método proposto foi verificada através de testes de recuperação nas infusões de 4 diferentes plantas medicinais (camomila, chá verde, chapéu de couro e melissa), além de amostras de água mineral, utilizando os parâmetros otimizados. Os resultados estão apresentados nas tabelas 14 e 15.

Tabela 14 - Teste de recuperação de Cr(III) em amostras de infusões.

Amostra	Cr(III) $\mu\text{g L}^{-1}$		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	
Camomila	500	$540 \pm 42,4$	108
Chá verde	500	$434 \pm 8,0$	87
Chapéu de couro	500	$385 \pm 25,2$	77
Melissa	500	$440 \pm 9,1$	88

Fonte: Própria autora

Tabela 15 - Teste de recuperação de Cr(III) em amostras de água mineral.

Amostra	Cr(III) $\mu\text{g L}^{-1}$		Recuperação (%)
	Adicionado	Encontrado	
Água 1	500	$580 \pm 34,6$	116
Água 2	500	$458 \pm 93,1$	92
Água 3	500	$420 \pm 18,0$	84
Água 4	500	$545 \pm 25,2$	109

Fonte: Própria autora

Os resultados de recuperação apresentados evidenciam que o método proposto não apresenta problemas relacionados ao efeito de matriz, visto que a recuperação dos íons Cr(III) nas amostras analisadas se encaixam dentro da faixa aceitável de 80-120% (ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, 1987). Exceto para a infusão da planta de chá verde onde apresentou uma recuperação de 77%, sendo abaixo da faixa aceitável.

A exatidão do método proposto também foi verificada a partir do uso de um padrão certificado para águas APS-1071 (Alpha Resources 3090 Johnson RD, Stevensville, USA). Os resultados estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16 - Avaliação da exatidão do método proposto, empregando material de referência certificado de água.

Amostra	Método proposto Cr(III) mg L⁻¹	Valor certificado Cr(III) mg L⁻¹
APS – 1071	100 ± 0,0009	100 ± 0,5

Fonte: Própria autora

O valor encontrado para a análise do material certificado aponta uma alta confiabilidade para o método desenvolvido, apresentando coerência com o valor de referência.

O resultado para concentração de cromo foi comparado através do teste de hipótese (*t* de Student) avaliando a diferença entre o valor obtido experimentalmente e o valor tabelado ao nível de 95% de confiança. Portanto foi verificado um valor de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{tabelado}}$, podendo afirmar que os valores são concordantes entre si, confirmando a viabilidade analítica do método proposto, com 100,5% de exatidão.

6 CONCLUSÃO

A SPE-ISS é uma técnica simples que possibilitou a análise de cromo, com exatidão e precisão aceitáveis, onde o processo ocorre através da extração seletiva da espécie Cr(III) através da formação do complexo com o PAN. O agente complexante utilizado para complexar o íon Cr mostrou-se eficaz, formando os grupos hidrofóbicos necessários para que haja interação com o adsorvente formado *in situ*, apresentando

resultados satisfatórios que possuem concordância com os dados encontrados na literatura.

A simplicidade do método proposto garante que a frequência analítica pode ser melhorada, uma vez que a etapa mais demorada do processo é a centrifugação, onde pode ser centrifugada várias amostras ao mesmo tempo.

As técnicas multivariadas foram utilizadas por apresentarem vantagens quando se tem vários fatores a serem estudados, pois é classificado como um método do tipo simultâneo, onde as variáveis de interesse que realmente apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo. Além de investigar as influências das variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação entre elas.

Como há um grande consumo deste tipo de produto, o método proposto tem uma grande importância, pois a planta além de conter íons importantes para seu crescimento podem acumular outros que quando consumidos pelos seres humanos podem causar danos à saúde. Assim a pré-concentração desses metais facilitam a detecção e extração, diminuindo assim esses danos.

A técnica SPE-ISS é um método novo, simples e rápido que contribuirá para o desenvolvimento da química analítica verde, pois respeita o meio ambiente e o analista, minimizando o tempo de preparo da amostra e a quantidade de reagentes utilizados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J. S.; ANUNCIÇÃO, T. A.; BRANDÃO, G. C.; DANTAS, A. F.; LEMOS, V. A.; TEIXEIRA, L. S. G. Ultrasound-assisted single-drop microextraction for the determination of cádmium in vegetable oils using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, n. 107, p. 159-163, 2015.

ALVES, V. N.; COELHO, N. M. M.; Selective extraction and preconcentration of chromiun using *Moringa oleifera* as biosorbent and flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v.109, p.16-22, 2013.

ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, Recommendations for the definition, estimation and use of limit detection. *Analist*. v. 112, 199 p. **1987**.

ANJOS, A. P.; CORNEJO-PONTES, L.; CADORE, S.; BACCAN, N.; Determination of Manganese by Flame Atomic Absorption Spectrometry after its Adsorption onto Naphthalene Modified with 1-(2-Pyridylazo)-2-Naphthol (PAN). **Talanta**, v. 71, p. 1252-1256, 2007.

BARBOSA, L. C. D. A. Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos, Viçosa: UFV, **2007**.

BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.; BRUNS, R. E.; Como fazer experimentos. Editora Bookman, 4^o Edição, **2010**.

BECKHOFF, B; KANNGIEBER, B.; LANGHOFF, N.; WEDELL, R.; WOLFF, H.; Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis. Springer, Berlim, p. 899, **2006**.

BETTEGA. P.V.C., CZLUSNIAK, G.R., PIVA, R., NAMBA, E.L., RIBAS, C.R., GRÉGIO, A.M.T.; Phytotherapy: from greenhouses to drugstore's bench. **Arch Oral Res**, v. 7, n. 1, p. 89-97, 2011.

BORGES, D. L. G., CURTIS, A. J., WELZ, B., HEITMANN, U.; Fundamentos de espectrometria de absorção atômica com fonte contínua. **Analytica**, v. 18, p. 58- 66, 2005.

BRASIL. Ministério de saúde. Serviço Nacional de Fiscalização da Medicina e da Farmácia. Portaria n ° 22 de 30.10.67. Estabelece normas para o emprego de preparações fitoterápicas. **Diário Oficial da União**, 16.11.1967.

BRASIL. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria SNVS n ° 19 de 30.1.92. Proíbe o uso do confrei em preparações para uso interno. In: Boletim da Sobravime, 5: 2, dez. 1991 e jan. 1992b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n ° 17, de 24.02.2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 de fevereiro de 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n° 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil**, Poder Executivo , Brasília, DF., 02 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n° 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União [República Federativa do Brasil]**, Brasília, 18 mar. 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 136 p.: il. – (Série C. Projetos, Programas e Relatórios, 1^a edição).

BURHAM, N.; Separation and preconcentration system for lead and cadmium determination in natural samples using 2-aminoacetylthiophenol modified polyurethane foam. **Desalination**, v. 249, p. 1199 – 1205, 2009.

CALADO, V., MONTGOMERY, D. C.; Planejamento de experimentos usando o *Statistica*. Rio de Janeiro: E-Papers, 260 p., **2003**.

CAMEL, V.; Solid phase extraction of trace elements – Review. **Spectrochimica Acta Part B.**, v. 58, p. 1177-1233, 2003.

CARNEIRO, A. R. V., NASCIMENTO FILHO, V. F.; Analise quantitativa de amostras geológicas utilizando a técnica de fluorescência de raios X por dispersão de energia. **Scientia Agricola**, v. 53, n. 1, 1996

CARVALHO, A. C. B., NUNES, D. S. G., BARATELLI, T. G., SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q., NETTO, E. M.; Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, Ano V, n. 11, Junho de 2007.

CHEN, S.; ZHU, S.; HE, Y.; LU, D.; Speciation of chromium and its distribution in tea leaves and teainfusion using titanium dioxide nanotubes packed microcolumncoupled with inductively coupled plasma mass spectrometry, **Food Chemistry**, v. 150, p. 254 – 259, 2014.

CHENG, K. L., BRAY, R. H.; 1-(2-Pyridilazo)-2-Naphthol as a possible analytical reagent. **Analytical Chemistry**, v. 27, p. 782-785, 1955.

COO, L. D. L. C.; CRDWELL, T. J.; CATTRALL, R. W.; KOLEV, S. D.; Spectrophotometric Study of the Solubility and the Protolytic of 1-(-2-pyridylazo)-2-naphthol in Different Ethanol-water Solutions, **Analytica Chimica Acta**, vol. 360, p. 153- 159, 1998.

COSTA, B. E. S., **Especiação química de arsênio em amostras de arroz empregando extração por fase sólida *in-situ* e determinação por FI-HG AAS**. 2018. Tese (Doutorado em química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

CHEMICALIZE. Disponível em: <<https://www.chemicalize.com/#/calculation>>. Acesso em: 28 Ago. 2019.

CHOW, P. Y. T., CHUA, T. H., TANG, K. F.; Dilute Acid Digestion Procedure for the Determination of Lead, Copper and Mercury in Traditional Chinese Medicines by Atomic Absorption Spectrometry. **Analyst**, v. 120, p. 1221-1223, 1995.

D'ALAUARD, F. M. D.; Toxic Metal Contamination of Folk Remedy, **Journal of the American Medical Association**, v. 22, 1984.

DAVIS, A. C., WU, P., ZHANG, X., HOU, X., JONES, B. T.; Determination of Cadmium in Biological Samples. **Applied Spectroscopy Reviews**; v. 41 p. 35-75, 2006.

DEDINA, J. Interference of volatile hydride forming elements in selenium determination by atomic absorption spectrometry with hydride generation. **Analytical Chemistry**, v. 54, p. 2097-2102, 1982.

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

DI STASI, L.C.; **Plantas medicinais: verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber**. São Paulo: UNESP, 2007.

ESPINOZA, E. O., MANN, M. J., BLEASDELL, B.; Arsenic and mercury in traditional chnese herbal balls. **The New England Journal of Medicine**, v. 333, p. 803-804, 1995.

FANG, Z. Flow Injection Separation and Preconcentration. VCH Publishers, Nova Iorque, p. 59, **1993**.

FERREIRA, S. L. C., LEMOS, V. A., MOREIRA, B. C., COSTA, A. C. S., SANTELLI, R. E.; An online continuous flow system for copper enrichment and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, p.259-264, 2003.

FRANCISCO, K.S.F.; Fitoterapia: Uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, v. 4, n.1, p. 18-24, 2010.

FRANICISCONI, L. S.; **Determinação dos constituintes inorgânicos em plantas medicinais e seus extratos**. 2014. Dissertação (mestrado em Ciências na área de tecnologia nuclear), Autarquia associada á Universidade de São Paulo, São Paulo.

FIROUZABADI, Z. D., SHABANI, A. M. H., DADFARNIA, S., EHRAMPOUSH, M. H.; Preconcentration and speciation of thallium by ferrofluid based dispersive solid phase extraction and flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 130, p. 428 – 435, 2017.

GAO, J., PENG, B., FAN, H., KANG, J., WANG, X.; Spectrophotometric Determination of Palladium after Solid-Liquid with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol at 90 °C, **Talanta**, vol. 44, p. 837-842, 1997

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

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

HARRIS, D. C. Análise Química Quantitativa. Editora LTC, 5a ed., Rio de Janeiro, **2008**.

HASSANLOUEI, S., ABDOLMOHAMMAD-ZADEH, H., ZAMANI-KALAJAHI, M.; Preparation of ionic liquid-modified SiO₂@Fe₃O₄ nanocomposite as a magnetic sorbent for use in solid-phase extraction of zinc(II) ions from milk and water samples. **The Royal Society of Chemistry**, v. 7, p. 23293–23300, 2017.

IUPAC. IUPAC Recommendations. In: _____ **Pure Appl. Chem.** [S.l.]: [s.n.], v. 72, 2000. p. 1453-1470.

JAMALI, M. R.; BOROMANDI, A.; Preconcentration and Determination of Cadmium in Water and Food Samples by in situ Surfactant-Based Solid-Phase Extraction and Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 1078-1085, 2014.

JAMALI, M. R., SOLEIMANI, B., RAHNAMA, R.; A novel separation/preconcentration procedure using in situ sorbent formation microextraction for the determination of cobalt (II) in water and food samples by flame atomic absorption spectrometry. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S3150-S3155, 2017.

JARDIM, I. C. S. F.; Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas, **Scientia Chromatographica**, v. 2, N°1, 13-25, 2010.

KABATA-PENDIAS, A., PENDIAS, H.; Trace elements in soils and plants. CRC Press, New York, 3ª Ed., **1984**.

KALNY, P., FIJALEK, Z., DASZCZUK, A., OSTAPCZUK, P.; Determination of selected microelements in polish herbs and their infusions. **Science of The Total Environment**, v. 381, p. 99 – 104, 2007.

KLAASSEN, C. D.; Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons; Sixth Edition; McGraw-Hill; USA; **2001**;

LAJAYER, B. A.; KHADEM, N., MAGHSOODI, M. R.; GHORBANPOUR, M.; Phytoextraction of heavy metals from contaminated soil, water and atmosphere using ornamental plants: mechanisms and efficiency improvement strategies. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, 2017.

LAJUNEN, L. H. J. Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra, **1992**.

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

LIMA JR, J.F., DIMENSTEIN, M.A.; Fitoterapia na Saúde Pública em Natal/RN: visão do odontólogo. **Saúde Rev**, v. 8, p. 1937-1944, 2006.

LUKINA, A. O., BOUTIN, C., ROWLAND, O., CARPENTER, D. J.; Evaluating trivalent chromium toxicity on wild terrestrial and wetland plants. **Chemosphere**, v. 162, p. 355 – 364, 2016.

MACHADO, L. L.; **Cadmio, chumbo e mercúrio em medicamentos fitoterápicos**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília, Brasília.

MALEKI, M., GHORBANPOUR, M., KARIMAN, K.; Physiological and antioxidative responses of medicinal plants exposed to heavy metals stress. **Plant Gene**, v. 11, p. 247-254, 2017.

MALLOTIS, G. "*Chromium*". Uses e Markets, published by industrial minerals information LTDA. **Worcester**. p.1-161. England, 1999.

MARTHE, D. B.; **Determinação de Al, Cu, Fe, Pb e Zn em amostras de Alcachofra e catuaba por espectrometria de absorção atômica**. 2011. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARQUES, L. C.; **Produção e comercialização de fitoterápicos no Paraná: uma abordagem de vigilância Sanitária**. 1992. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MARQUES, L. C.; BÓRIO, E. B. L. Levantamento das condições de produção fitoterápica em Curitiba. **Tribuna Farmacêutica**, 57/59 (1,2,3), 87-94, 1991.

MOHAMMADI, S. Z.; AFZALI, D.; HESHMATI, Z. Ligand-less in situ surfactant-based solid phase extraction for preconcentration of silver from natural water samples prior to its determination by atomic absorption spectroscopy. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 95, p. 1299-1308, 2013.

NAGESWARA RAO, R., KUMAR TALLURI, M.V.N.; An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1–13, 2007.

OLIVEIRA, C. R. M., OLIVA, M. A. PEREIRA, E. G.; Efeito do Material Particulado de Ferro no Teor de Pigmentos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 681-683, jul. 2007.

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

PEASE, B. F., WILLIAMS, M. B., Spectrophotometric Investigation of the Analytical Reagent 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol and its Copper Chelate, **Analytical Chemistry**, vol. 31, p. 1044-1047, 1959.

PONCE, L. P. C., **Determinação de cádmio, zinco e cobalto em amostras ambientais por espectrometria de absorção atômica de chama, após procedimento de extração líquido-sólido utilizando naftaleno modificado com PAN**. 1995, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p 771-780, 2004.

ROCHA, A. F.; **Cádmio, Chumbo, Mercúrio – A problemática destes metais pesados na Saúde Pública**, 2009. Monografia, Universidade do porto, Porto.

SANDELL, E. B., ONISH, H., Photometric Determination of Traces of Metals – Parte I, Fourth Edition, John Wiley & Sons, New York, **1978**

SILVA, R. A. D. Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Nacional, pp. 1149, **1929**.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X., KIEMLE, D.; Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos S. A., 6. ed., **2006**.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de Análise Instrumental, Bookman, São Paulo, 5ª Ed., **2002**.

SOUZA, J. C.; TOCI, A. T.; BELUOMINI, M. A.; EIRAS, S. P.; Spectrophotometric determination of copper(II) in sugarcane spirit using 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol and a homogeneous ternary mixture of the solvents water, ethanol and methyl isobutyl ketone. **Revista Virtual de Química**, v. 8, p. 687-701, 2016.

SOUSA NETO, J. A.; OLIVEIRA, J. A. N.; SIQUEIRA, L. M. C.; ALVES, V N; Selective extraction and determination of chromium concentration using *Luffa cylindrical* fibers as sorbent and detection by FAAS. **Hindawi**, v. 2019, 2019.

STUART, B.; Infrared Spectroscopy: Fundamentals and applications, **John Wiley & Sons, Inc.**, 1ª ed., 2004.

TABRIZI, A. B. Development of a cloud point extraction-spectrofluorimetric method for trace copper(II) determination in water samples and parenteral solutions. **Journal of Hazardous Materials**, p. 260-264, 2007.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.; Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas Para Cálculos De Planejamento Experimentais, Um Tutorial. **Química Nova**, 2006, 29338.

UENO, K.; IMAMURA, T.; CHENG, K. L.; Handbook of Organic Analytical Reagents, CRC Press, Flórida, p. 185, **1992**.

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

VULCANO, I. R. C., SILVEIRA, J. N., ALVAREZ-LEITE, E. M.; Teores de chumbo e cádmio em chás comercializados na região metropolitana de Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, 2008.

WELZ, B.; SPERLING, M., Atomic Absorption Spectrometry, 3ª ed., VCH, Weinheim, 1999.

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

YASINI, P.; SHEMIRANI, F.; KHANI, R.; Combination of In Situ Surfactant-based Solid Phase Extraction and Central Composite Design for Preconcentration and Determination of Manganese in Food and Water Samples, **Food Analytical Methods**, v. 5, p.1303-1310, 2012.

YOUSEFI, S. R.; SHEMIRANI, F; Novel method for in-situ surfactant-based solid-phase extraction: application to the determination of Co(II) and Ni(II) in aqueous samples, **Microchim Acta**, v. 173, 415–421, 2011.