



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Química de Araraquara**



Dissertação de Mestrado

**"DETERMINAÇÃO DE BORO, ENXOFRE E FÓSFORO EM PLANTAS
MEDICINAIS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA
RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA"**

Marcos André Bechlin

**ARARAQUARA - SP
2013**

Marcos André Bechlin

**“DETERMINAÇÃO DE BORO, ENXOFRE E FÓSFORO EM PLANTAS
MEDICINAIS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA
RESOLUÇÃO COM FONTE CONTÍNUA”**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto

**ARARAQUARA - SP
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

3391d Bechlin, Marcos André
Determinação de boro, enxofre e fósforo em plantas
medicinais por espectrometria de absorção atômica de alta
resolução com fonte contínua / Marcos André Bechlin. –
Araraquara : [s.n], 2013
63 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: José Anchieta Gomes Neto

Química analítica. 2. Plantas medicinais. 3. Enxofre.
4. HR-CS F AAS. I. Título.

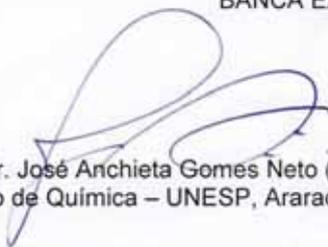
Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

MARCOS ANDRÉ BECHLIN

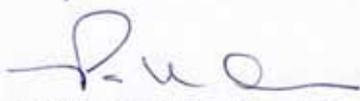
Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 19 de fevereiro de 2013.

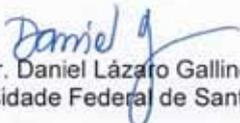
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Archieta Gomes Neto (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Paula Cristina Garcia Manoel Crnkovic
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP



Prof. Dr. Daniel Lázaro Gallindo Borges
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis - SC

Marcos André Bechlin

1. Dados pessoais

1.1 Data de nascimento: 02/02/1989

1.2 Nacionalidade: Brasileiro

1.3 Naturalidade: Toledo – PR

1.4 Filiação: Sadi Clovis Bechlin

Lourdes Ana Pasuch Bechlin

1.5 Profissão: Químico

2. Formação acadêmica

2.1 Graduação em Química – Bacharelado

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste, Toledo – PR.

Período: 03/2007 – 12/2010.

2.2 Mestrado em Química

Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara – SP.

Período: 03/2011 – 02/2013.

3. Artigos aceitos e submetidos para publicação

3.1 BECHLIN, M. .A, GOMES NETO, J. A., NÓBREGA, J. A. Evaluation of lines of boron, phosphorus and sulfur by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry for plant analysis. Artigo aceito para publicação no Microchemical Journal, DOI: 10.1016/j.microc.2012.03.013.

4. Principais trabalhos apresentados em congressos

4.1 BECHLIN, M. A.; RÊGO, J. F. do; VIRGILIO, A.; NÓBREGA, J. A.; GOMES NETO, J. A. Determination of cadmium in medicinal plants by solid sampling high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. 12th Rio

Symposium on Atomic Spectrometry, 2012, Foz do Iguaçu - PR.

- 4.2 BECHLIN, M. A., GOMES NETO, J. A., NÓBREGA, J. A. Avaliação do efeito do somatório de absorbância de linhas e da integração de sinais sobre a sensibilidade na determinação de P e S em plantas por HR-CS F AAS. 16° Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão - SP.
- 4.3 SANTOS, B. A. S., BECHLIN, M. A., GOMES NETO, NÓBREGA, J. A., VIRGILIO, A., OLIVEIRA, A. P. Uso de razão de absorbâncias em HR-CS-AAS para detecção de interferências. 16° Encontro Nacional de Química Analítica, 2011, Campos do Jordão - SP.
- 4.4 BECHLIN, M. A., BESSEGATO, G. G., LINDINO, C. A. Emprego do complexo hexacianoferrato(III) de potássio em meio básico na remoção do ácido sulfídrico de biogás. XVIII Encontro de Química da Região Sul, 2010, Curitiba - PR.
- 4.5 BECHLIN, M. A., BESSEGATO, G. G., LINDINO, C. A., BARICCATTI, R. A. Quantificação do teor de metano e gás carbônico em biogás produzido a partir de dejetos suínos. XVIII Encontro de Química da Região Sul, 2010, Curitiba - PR.
- 4.6 BECHLIN, M. A., BESSEGATO, G. G., LINDINO, C. A., BARICCATTI, R. A. Comparação entre curvas de destilação de gasolinas adulteradas com diferentes teores de etanol. XVII Encontro de Química da Região Sul, 2009, Rio Grande - RS.
- 4.7 BECHLIN, M. A., LINDINO, C. A. Determinação de gás metano e gás sulfídrico em biogás produzido a partir de dejetos suínos na região de Toledo. XIX Encontro Anual de Iniciação Científica, 2010, Guarapuava - PR.
- 4.8 BECHLIN, M. A., BESSEGATO, G. G., LINDINO, C. A., BARICCATTI, R. A. Controle de Qualidade de Gasolinas comercializadas no Oeste do Paraná. XVIII Encontro Anual de Iniciação Científica, 2009, Londrina - PR.

*Dedico este trabalho a Deus,
A meus pais,
A minha família, e
A minha esposa Luciana,
sem você não teria conseguido!*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus por ter me acolhido nos momentos difíceis, por sempre iluminar o meu caminho e pela vida cheia de saúde e alegrias.

A minha mãe Lourdes (*in memoriam*) por ter me ensinado tudo o que eu precisava saber para ser quem sou hoje, por ter me ensinado a ler, pelo carinho enfim, por tudo. Sinto sua falta e onde quer que estejas saiba que esse trabalho é seu também. TE AMO MÃE!

Ao meu pai Sadi pelo apoio, carinho e preocupação, pelas lições que me ensinou e pelas noites em claro trabalhando para que eu pudesse estudar e nunca nos faltasse nada. OBRIGADO por tudo!

A meu irmão André pelas conversas, conselhos, ajudas, por ser até hoje a pessoa cujos passos procuro seguir. Não existem palavras para expressar a eterna gratidão que terei por você. Obrigado por ser o melhor irmão que eu poderia ter.

A minha cunhada Kathia pelo apoio, conversas, dicas e por ter me apresentado a Química.

A minha avó Iracema, ao meu tio Maninho (Paulo) pela preocupação, carinho e cuidados, além dos exemplos de superação e de vida que representam.

A todos meus outros familiares pela contribuição sempre positiva.

A Celi, Dirceu e Gabriela por terem me adotado como um filho e irmão e pela força que sempre me deram, vocês são muito especiais pra mim.

A minha namorada, noiva e agora esposa Luciana pelo carinho, dedicação, apoio, cuidados e preocupação. Não tenho palavras pra descrever o quanto sua presença foi importante e quanto suas palavras nos dias difíceis me fizeram seguir em frente. Você é um anjo na minha existência! TE AMO MUITO MINHA VIDA!!!

Ao meu orientador Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto pela orientação, amizade e compreensão. Obrigado por ter me aceitado como aluno sem me conhecer e confiar no meu trabalho. Aprendi e cresci muito nestes dois anos e que os próximos sejam ainda melhores. Obrigado Professor!

Aos meus amigos do GEA: Rodrigo, Tiago, Jardes, Alex, Kelber, Ariane, Mariana, Silvana e Bruno pelas conversas, momentos de descontração e auxílio nesse trabalho.

Aos meus irmãos adotivos Felipe e Guilherme pelas discussões sobre a Química, pela ajuda sem limites, pelo apoio, pelas conversas e pela companhia nos almoços do bandeirão. Obrigado!

Aos membros da banca pela presença.

A UNESP pela estrutura cedida.

Ao CNPq pelo apoio financeiro na execução desse projeto.

E a todas as pessoas que contribuíram de maneira positiva ou negativa, para que hoje eu pudesse estar aqui.

*O Senhor é meu pastor,
e nada me faltará...*
(Salmo 23)

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo a determinação do microelemento boro e dos macroelementos enxofre e fósforo em plantas medicinais por espectrometria de absorção atômica em chama de alta resolução com fonte contínua (HR-CS F AAS). Para a determinação do boro foram avaliadas duas linhas atômicas ($\lambda_1= 249,773$ nm e $\lambda_2= 249,677$ nm), para o enxofre duas linhas moleculares da molécula CS ($\lambda_1= 257,595$ nm e $\lambda_2= 257,958$ nm) e, para o fósforo três linhas moleculares da molécula PO ($\lambda_1= 246,400$ nm; $\lambda_2= 247,620$ nm e $\lambda_3= 247,780$ nm). Para incrementar a sensibilidade na determinação de B, P e S, estudaram-se duas metodologias instrumentais: a integração da absorbância no comprimento de onda (WIA) e o somatório de absorbâncias. O aumento da área de integração mostrou ser mais eficiente no ganho de sensibilidade do que a estratégia do somatório de absorbâncias de diferentes linhas devido ao erro acumulado pela soma ser superior ao aumento do sinal analítico. As condições otimizadas de análise apresentaram limite de detecção de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ($5,8 \text{ mg kg}^{-1}$) e $13,7 \text{ mg L}^{-1}$ (172 mg kg^{-1}) nos comprimentos de onda $249,773$ nm e $247,620$ nm, com áreas de integração de 3 e 5 *pixels*, respectivamente, para B e P. Para S o menor limite de detecção foi obtido pela soma das absorbâncias e área de integração de 1 *pixel*, porém devido ao extenso tratamento de dados manual envolvido e o pequeno incremento em sensibilidade (10%), utilizou-se para as determinações a linha $257,595$ nm com área de integração de 5 *pixels* que apresentou limite de detecção de $34,7 \text{ mg L}^{-1}$ (440 mg kg^{-1}). Titânio foi empregado como agente de liberação para impedir a interferência do cálcio na produção da molécula diatômica de PO. A avaliação da exatidão do método foi realizada pela análise de materiais certificados, cujos valores encontrados experimentalmente foram concordantes com os certificados a um nível de 95% de confiança para P e S e, 98% para o B. A metodologia permitiu a determinação da concentração de boro em 11 amostras e de P e S em 17 amostras. O desvio padrão relativo ($n=12$) para a amostra de Poejo (*Mentha longifolia*) contendo $9,7 \text{ mg kg}^{-1}$ B; $2755,1 \text{ mg kg}^{-1}$ P e $2503,0 \text{ mg kg}^{-1}$ S foram de 3%, 5% e 4%, respectivamente. A concentração destes elementos nas amostras de plantas medicinais analisadas variou entre $8,5 - 34,5 \text{ mg kg}^{-1}$ de B, $671,9 - 3910,9 \text{ mg kg}^{-1}$ de P e $721,0 - 7653,9 \text{ mg kg}^{-1}$ de S, valores estes que estão de acordo com os relatados pela literatura para matrizes vegetais.

Palavras-chave: Boro. Enxofre. Fósforo. HR-CS F AAS. Plantas medicinais.

ABSTRACT

The goal of this work was the determination of the microelement boron and macroelements phosphorus and sulfur in medicinal plants by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry (HR-CS F AAS). For boron determination, two atomic lines were evaluated ($\lambda_1 = 249,773$ nm and $\lambda_2 = 249,677$ nm), to sulfur two molecular lines of CS molecule ($\lambda_1 = 257,595$ nm and $\lambda_2 = 257,958$ nm) and, to phosphorus three molecular lines of PO molecule ($\lambda_1 = 246,400$ nm; $\lambda_2 = 247,620$ nm and $\lambda_3 = 247,780$ nm). To improve sensitivity in the determination of B, P and S two instrumental methodologies were also studied, the wavelength integrated absorbance (WIA) and the summation of absorbance. The increase in integration area showed better results in gain of sensitivity in comparison to the sum of absorbance of different lines due to the accumulated error to be superior of the improvement in the analytical signal. The optimized conditions of analysis presented limit of detection of $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ($5,8 \text{ mg kg}^{-1}$) and $13,7 \text{ mg L}^{-1}$ (172 mg kg^{-1}) on the wavelengths $249,773$ nm and $247,620$ nm, with integration areas of 3 and 5 *pixels*, respectively, for B and P. For S the best limit of detection was obtained for the sum of absorbance and integration area of 1 *pixel*, however, due to the laborious manual data treatment and the little increment in sensitivity (10%) the line $257,595$ nm with integration area of 5 *pixels* was used to determinations, and presented limit of detection of $34,7 \text{ mg L}^{-1}$ (440 mg kg^{-1}). Titanium was employed as releasing agent to prevent the interference from calcium in the formation of the diatomic molecule of PO. The accuracy was evaluated by the analysis of two certified materials, experimental values were in agreement with certified values at 95% confidence level to P and S, and 98% confidence level to B. The methodology allows the determination of boron content in 11 samples and, the contents of P and S in 17 samples. The standard deviation ($n=12$) to the sample of Poejo (*Mentha longifolia*) with $9,7 \text{ mg kg}^{-1}$ B; $2755,1 \text{ mg kg}^{-1}$ P and $2503,0 \text{ mg kg}^{-1}$ S were of 3%, 5% and 4%, respectively. The concentration of these elements in medicinal plants samples analyzed ranged between $8,5 - 34,5 \text{ mg kg}^{-1}$ of B, $671,9 - 3910,9 \text{ mg kg}^{-1}$ of P and $721,0 - 7653,9 \text{ mg kg}^{-1}$ of S, these values were in agreement with those reported in the literature for plants matrices.

Keywords: Boron. Phosphorus. Sulfur. HR-CS F AAS. Medicinal plants.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. (1) Lâmpada de arco curto de xenônio; (2) Lâmpada de neônio; (3) Espelhos elipsoidais; (4) Atomizador; (5) Fenda de entrada do monocromador; (6) Espelhos parabólicos; (7) Prisma em arranjo Littrow; (8) Espelhos de deflexão e fenda intermediária; (9) Rede Echelle; (10) Detector CCD22
- Figura 2** - Espectro de estruturas finas. (a) Espectro obtido para uma solução 1% (v/v) de H₂SO₄ empregando a HR-CS AAS; (b) Banda de absorção de CS entre 245 e 275 nm, subníveis vibracionais; (c) Banda de transição vibracional mais intensa ao redor de 258 nm; (d) Subestrutura da banda de CS centrada em 257,595 nm.....30
- Figura 3** - Espectrômetro de absorção atômica em chama de alta resolução com fonte contínua Analytik Jena ContrAA 300.36
- Figura 4** - Espectro característico obtido com padrão de 100 mg L⁻¹ B por HR-CS F AAS para o dublete do boro, linha principal ($\lambda=249,773$ nm) e linha secundária ($\lambda=249,677$ nm).....42
- Figura 5** - Curvas de calibração para a linha principal do boro ($\lambda= 249,773$ nm) obtidas pela variação da área de integração entre 1 e 9 *pixels*.....43
- Figura 6** - Curvas de calibração obtidas para a linha principal (λ_1), linha secundária (λ_2) e soma de linhas ($\lambda_1+ \lambda_2$) para o boro com área de integração igual a 3 *pixels*.44
- Figura 7** - Espectros característicos obtidos com padrão de 2000 mg L⁻¹ P por HR-CS F AAS para as linhas moleculares de PO: a) 247,780 nm; b) 246,400 nm; c) 247,620 nm.47
- Figura 8** - Curvas de calibração para a linha molecular de PO ($\lambda= 247,620$ nm) obtidas pela variação da área de integração entre 1 e 9 *pixels*.....48
- Figura 9** - Curvas de calibração obtidas para as linhas 246,400 nm (λ_1), 247,620 nm (λ_2), 247,780 nm (λ_3) e soma de linhas para o fósforo com área de integração igual a 5 *pixels*.....49
- Figura 10** – Espectros de absorção molecular de CS relativo a 2000 mg L⁻¹ S obtido por HR-CS F AAS para as linhas a) 257,595 nm e b) 257,958 nm.51

Figura 11 - Curvas de calibração para enxofre empregando a linha molecular de CS ($\lambda = 257,595$ nm) obtidas em diferentes áreas de integração (1 a 9 <i>pixels</i>).....	52
Figura 12 - Curvas de calibração para enxofre empregando as linhas 257,595 nm (λ_1), 257,958 nm (λ_2) e soma de linhas ($\lambda_1 + \lambda_2$) para o enxofre com área de integração igual a 5 <i>pixels</i>	53
Figura 13 - Curvas de calibração obtidas empregando as linhas 249,773 nm; 247,620 nm e 257,595 nm com áreas de integração de 3; 5 e 5 <i>pixels</i> , para B, P e S, respectivamente.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros instrumentais utilizados.	37
Tabela 2 - Intervalo de trabalho (mg L^{-1}), sensibilidade (b), coeficiente de correlação linear (r), concentração característica (C_0 , mg L^{-1}), limite de detecção (LOD, mg L^{-1}) e desvio relativo padrão (RSD, %) para as linhas atômicas principal, secundária e soma, em diferentes números de pixels para o B.....	40
Tabela 3 - Intervalo de trabalho (mg L^{-1}), sensibilidade (b), coeficiente de correlação linear (r), concentração característica (C_0 , mg L^{-1}), limite de detecção (LOD, mg L^{-1}) e desvio relativo padrão (RSD, %) para as três linhas moleculares de PO analisadas e para todas as possibilidades de soma, em diferentes áreas de integração.	45
Tabela 4 - Intervalo de trabalho (mg L^{-1}), sensibilidade (b), coeficiente de correlação linear (r), concentração característica (C_0 , mg L^{-1}), limite de detecção (LOD, mg L^{-1}) e desvio relativo padrão (RSD, %) para as linhas moleculares de CS analisadas e para o somatório de linhas, em diferentes áreas de integração.....	50
Tabela 5 – Resultados da determinação de B, P e S no material certificado <i>Trace Elements in Spinach Leaves</i> preparado via incineração.....	54
Tabela 6 - Resultados da determinação de B, P e S no material certificado <i>Trace Elements in Spinach Leaves</i> preparado por digestão em via úmida.	54
Tabela 7 - Resultados da determinação de B, P e S (mg kg^{-1}) nos materiais certificados <i>Apple Leaves (1515)</i> e <i>Trace elements in Spinach Leaves (1570a)</i> preparados pelo método proposto.	55
Tabela 8 - Resultados ($\text{mg kg}^{-1} \pm \text{SD}$) para determinação de B, P e S ($n=3$) em amostras de plantas medicinais empregando o método proposto.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AAS – Do inglês *atomic absorption spectrometry*, espectrometria de absorção atômica

AFS – Do inglês *atomic fluorescence spectrometry*, espectrometria de fluorescência atômica

b – Coeficiente angular

C_0 – Concentração característica

CCD – Do inglês *charge coupled device*, dispositivo de carga acoplada

CP – Do inglês *central pixel*, pixel central

CS – Monossulfeto de carbono

DRC – Do inglês *dynamic reaction cell*, célula de reação dinâmica

EDL – Do inglês *electrodeless discharge lamp*, lâmpada de descarga sem eletrodo

ETV – Do inglês *electrothermal vaporization*, vaporização eletrotérmica

F AAS – Do inglês *flame atomic absorption spectrometry*, espectrometria de absorção atômica em chama

HCL – Do inglês *hollow cathode lamp*, lâmpada de cátodo oco

HR-CS AAS – Do inglês *high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry*, espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua

HR-CS F AAS – Do inglês *high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry*, espectrometria de absorção atômica em chama de alta resolução com fonte contínua

HR-CS GF AAS - Do inglês *high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*, espectrometria de absorção atômica em forno de grafite de alta resolução com fonte contínua

HR-ICP-MS – Do inglês *high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry*, espectrometria de massas de alta resolução com plasma indutivamente acoplado

ICP-MS – Do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*, espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

ICP OES – Do inglês *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

INAA – Do inglês *instrumental neutron activation analysis*, análise instrumental por ativação neutrônica

LOD – Do inglês *limit of detection*, limite de detecção

LOQ – Do inglês *limit of quantification*, limite de quantificação

LS – Do inglês *line source*, fonte de linha

LS AAS – Do inglês *line source atomic absorption spectrometry*, espectrometria de absorção atômica com fonte de linha

NO – Monóxido de nitrogênio

PO – Monóxido de fósforo

r – Coeficiente de correlação linear

NMR – Do inglês *nuclear magnetic resonance*, ressonância magnética nuclear

RSD% – Do inglês *relative standard deviation percentile*, desvio padrão relativo percentual

SD – Do inglês *standard deviation*, desvio padrão

UV-Vis – Ultravioleta–visível

WIA – Do inglês *wavelength integrated absorbance*, absorbância integrada no comprimento de onda

XRF – Do inglês *X-ray fluorescence*, fluorescência de raio-X

λ - Comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Espectrometria de absorção atômica: da fonte de linhas a fonte contínua	19
1.2 Importância da determinação elementar em plantas medicinais e fitoterápicos	24
1.3 Boro e sua determinação	26
1.4 Enxofre e sua determinação	27
1.5 Fósforo e sua determinação	31
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral	34
2.2 Objetivos específicos	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1. Reagentes e soluções	35
3.2. Instrumentação	36
3.3. Preparo das amostras	37
3.4 Procedimento analítico.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Otimização das condições para análise de B.....	40
4.2 Otimização das condições para análise de P	45
4.3 Otimização das condições para análise de S.....	49
4.4 Resultados obtidos para os diferentes procedimentos de preparo da amostra	53
4.5 Determinação de B, P e S em amostras de plantas medicinais.....	56
5 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das formas mais antigas de prática da medicina pela humanidade. Atualmente estas plantas são consumidas na forma de chás, infusões ou de medicamentos fitoterápicos. Segundo estudos da Organização Mundial de Saúde (OMS) aproximadamente 80% da população mundial faz uso deste tipo de tratamento, de forma que o comércio de plantas medicinais e fitoterápicos movimenta anualmente 21,7 bilhões de dólares, com uma taxa de crescimento anual da ordem de 15%, contra 4% do mercado de medicamentos sintéticos (CARVALHO *et al.* 2011).

Em 2006, o governo brasileiro com o objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, além de promover o uso sustentável da biodiversidade e desenvolver a cadeia produtiva e a indústria nacional, instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Decreto nº 5813 de 22/06/2006) (BRASIL, 2006a). No mesmo ano, o Ministério da Saúde aprovou a Portaria 971 instituindo a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006b).

Apesar do volume de plantas medicinais comercializadas, e das políticas de incentivo ao consumo implementadas pelo governo, poucos estudos específicos foram realizados sobre o potencial toxicológico, os princípios ativos e a composição elementar das principais plantas medicinais consumidas no Brasil.

O conhecimento destas informações é importante, uma vez que a presença de alguns elementos considerados tóxicos como chumbo, cádmio, boro, entre outros, em elevadas concentrações, podem causar danos à saúde dos consumidores. Já a presença de outros elementos, como enxofre é de grande importância, pois a maior parcela deste elemento absorvido pelos seres humanos provem das plantas.

Dessa forma o estudo da composição elementar destas espécies vegetais é necessário para que se conheçam as composições inorgânicas e para que uma política de controle de qualidade dos produtos comercializados e fornecidos à população pelo SUS possa ser implantada pela vigilância sanitária.

O desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a análise elementar das plantas comercializadas e que apresentem boa sensibilidade, seletividade,

precisão e exatidão é de grande importância. Várias técnicas analíticas espectroscópicas ou espectrométricas atendem essas exigências e podem ser empregadas na análise de um material vegetal, dentre elas podem ser citadas a espectrometria de absorção atômica, a espectrometria de emissão atômica, a espectrometria de massas e a espectrofotometria.

Cada uma destas técnicas apresenta suas particularidades que as tornam atrativas. Espectrômetros de emissão atômica são capazes de realizar a determinação de vários analitos em uma única medida. A espectrometria de massas além da determinação simultânea pode quantificar os diferentes isótopos de um mesmo elemento. A espectrofotometria é uma técnica robusta e de baixo custo, no entanto, sofre muitas interferências e necessita de um extenso preparo da amostra. A espectrometria de absorção atômica, por sua vez, se destaca na aplicação para análises foliares e de matérias vegetais por ter sensibilidade adequada para determinar as concentrações dos vários elementos normalmente encontrados nesse tipo de matriz. Além disso, é uma técnica robusta e com custo relativamente baixo quando comparada às outras técnicas espectrométricas.

A espectrometria de absorção atômica sofreu uma reestruturação de seu arranjo instrumental na última década dando origem à espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS), que trouxe novas perspectivas para a técnica, como a possibilidade de usar o somatório de várias linhas de um mesmo elemento, aumentar a sensibilidade por meio da integração da absorbância no comprimento de onda, explorar o ambiente espectral na vizinhança da linha analítica de interesse, entre outros (WELZ *et al.* 2009).

Com base nisso, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de método para determinação sequencial de três elementos constituintes de plantas medicinais (B, P e S) empregando as potencialidades da HR-CS AAS.

1.1 Espectrometria de absorção atômica: da fonte de linhas a fonte contínua

O princípio de funcionamento da técnica se baseia na absorção de radiação em um comprimento de onda específico por átomos gasosos de um determinado elemento no estado fundamental. Em espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS), os brancos, soluções analíticas e amostras são aspiradas e passam por um sistema de nebulização onde as soluções são convertidas em um aerossol,

que se mistura com os gases combustível e oxidante e é transportado até a chama (WELZ; SPERLING, 1999), onde ocorre a produção de átomos no estado fundamental que podem absorver energia e passar para um estado excitado. Um determinado átomo absorve comprimentos de onda específicos, correspondentes às energias necessárias para que as transições eletrônicas do estado fundamental para o estado excitado ocorram, sendo estas características para cada elemento.

Somente algumas transições eletrônicas são possíveis e estas definem o espectro de linhas de absorção/emissão de cada elemento. No entanto, a fração de átomos que são excitados para um determinado nível de energia é dependente da temperatura, sendo esta fração determinada pela distribuição de Boltzmann:

$$\frac{N^*}{N_0} = \frac{g^* e^{-\Delta E/kT}}{g_0}$$

Onde, N^* é o número de átomos no estado excitado; N_0 o número de átomos no estado fundamental; E a energia específica da excitação; k a constante de Boltzmann ($k = 1,38966 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$), g_0 e g^* são fatores estatísticos e T a temperatura absoluta.

Com base no descrito acima chega-se a lei de Lambert-Beer, na qual a absorbância (A) é proporcional à população N de átomos no estado fundamental em um volume de observação de comprimento l .

$$A = \log \frac{\phi_0(\lambda)}{\phi_{tr}(\lambda)} = 0,43Nlk(\lambda)$$

Onde, $\phi_0(\lambda)$ é a potência radiante emitida em λ ; $\phi_{tr}(\lambda)$ a potência radiante transmitida em λ ; N o número de átomos livres na camada absorvedora; l o comprimento da camada absorvedora e $k(\lambda)$ o coeficiente de absorção atômica espectral (OLIVEIRA, 2010). A proporcionalidade entre a absorbância e a quantidade de analito dada pela lei de Lambert-Beer será linear em um determinado intervalo de concentrações.

A absorção atômica foi proposta como técnica analítica para determinação elementar por Alan Walsh em 1952. Os primeiros espectrômetros possuíam fontes de radiação contínua, porém, devido às limitações da parte óptica existentes na época não se obtiveram bons resultados analíticos com este tipo de lâmpada, pois, os monocromadores não possuíam a resolução apropriada para uso de lâmpadas de fonte contínua que é da ordem de 2 pm (WELZ; SPERLING, 1999). O próprio Walsh propôs o uso de fontes de emissão de linhas (LS) empregando lâmpadas de cátodo

oco (HCL), estas apresentam um perfil de emissão estreito que se adéqua aos monocromadores de baixa resolução. O uso deste arranjo instrumental possibilita excelentes limites de detecção, alta sensibilidade e seletividade, tornando a técnica apropriada para determinações de elementos-traço, porém, no modo monoelementar (VIRGILIO, 2010).

Nos anos seguintes algumas melhorias e inovações foram feitas. Em 1959, L'vov desenvolveu um sistema de atomização eletrotérmico em tubos de grafite em substituição à chama. Na década de 1960 a instrumentação da AAS foi aperfeiçoada pelo desenvolvimento de lâmpadas de fonte de linhas mais intensas (lâmpadas de descarga sem eletrodo (EDL)) e corretores de fundo.

Na tentativa de tornar a LS AAS uma técnica multielementar foram desenvolvidas lâmpadas de cátodo oco que podiam ser aplicadas na determinação de mais de um elemento. Porém, a expansão da técnica ficou limitada ao pequeno número de lâmpadas multielementares possível de serem produzidas devido a fatores como: a grande limitação quanto à combinação dos elementos numa única lâmpada e a redução de sensibilidade quando comparadas às correspondentes monoelementares e a diminuição do tempo de vida útil da lâmpada multielementar (SNEDDON; FARAH; FARAH, 1993).

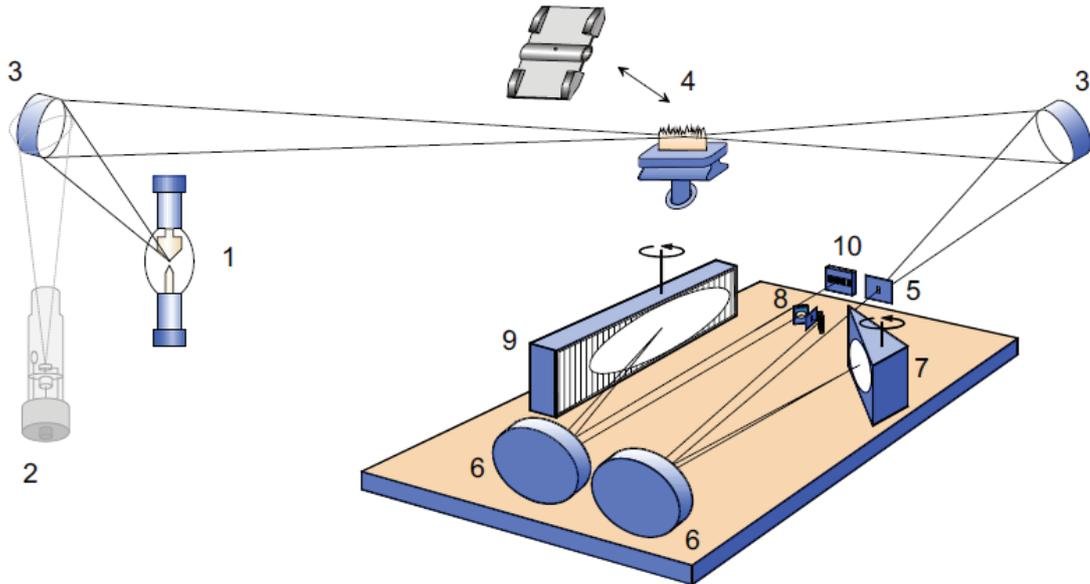
Apesar do bom desempenho analítico da técnica AAS com fonte discreta, as limitações existentes fizeram com que a ideia de utilizar uma fonte contínua como fonte primária de radiação continuasse sendo explorada por vários pesquisadores, estes empregaram em seus estudos novas lâmpadas mais potentes ou monocromadores com maior resolução, modificando o arranjo instrumental comum a fonte de linhas. Com esses equipamentos os pesquisadores conseguiram resultados próximos aos da LS AAS na determinação de diversos elementos (O'HAVER, 1984; FERNANDO; CALLOWAY; JONES, 1992; WELZ *et al.* 2003).

Com base nestes estudos comprovou-se que não seria possível substituir a fonte de linhas por uma fonte contínua sem que houvesse uma reconfiguração e evolução do arranjo instrumental do equipamento (WELZ *et al.* 2003).

O avanço tecnológico das últimas décadas possibilitou o desenvolvimento destes novos arranjos instrumentais dando origem à espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS), que emprega como fonte de radiação uma lâmpada de arco curto de xenônio operando no modo "hot spot", um monocromador de alta resolução Littrow com grade Echelle e um detector

de dispositivo de carga acoplada (CCD). A Figura 1 apresenta o esquema de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua.

Figura 1 - Representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. (1) Lâmpada de arco curto de xenônio; (2) Lâmpada de neônio; (3) Espelhos elipsoidais; (4) Atomizador; (5) Fenda de entrada do monocromador; (6) Espelhos parabólicos; (7) Prisma em arranjo Littrow; (8) Espelhos de deflexão e fenda intermediária; (9) Rede Echelle; (10) Detector CCD.



Fonte. WELZ *et al.* 2005.

Os primeiros experimentos realizados em espectrometria de absorção atômica utilizando fontes de radiação contínua empregavam lâmpadas de deutério ou lâmpadas de arco de xenônio. Uma limitação intrínseca a estas lâmpadas é um decréscimo acentuado da radiação emitida em $\lambda < 280$ nm. Além disso, a lâmpada de arco de xenônio é significativamente menos intensa do que uma lâmpada de cátodo oco, e a utilização de um monocromador de alta resolução reduz a intensidade da radiação transmitida (WELZ *et al.* 2005).

Uma forma encontrada para solucionar o problema da menor intensidade da lâmpada de arco de xenônio em comparação às lâmpadas de cátodo oco consistiu no emprego de uma lâmpada de arco curto de xenônio operando no modo “hot-spot”. Nesta lâmpada ocorre a formação de um micro-plasma entre os eletrodos e nesta região a temperatura atinge cerca de 10000 K, o que resulta em um aumento significativo da intensidade da radiação, particularmente na região do ultravioleta. Esse aumento é de uma a três ordens de grandeza para comprimentos de onda de

muitos elementos quando comparados com os correspondentes empregando fonte de linhas.

Outras vantagens da utilização dessa lâmpada são: a diminuição dos custos analíticos, a versatilidade em relação ao amplo intervalo espectral de emissão, possibilidade de uso de uma única lâmpada, o caráter multielementar com análise sequencial rápida e a possibilidade de analisar novos elementos para os quais as fontes discretas ainda não estão disponíveis (VIRGILIO, 2010).

O conjunto monocromador-detector é de fundamental importância para a HR-CS AAS. A radiação atenuada é direcionada ao monocromador duplo de alta resolução. Esse monocromador em arranjo Littrow possui dois elementos dispersores em série: o primeiro consiste num prisma que atua como pré-dispersor da radiação e seleciona a região espectral de interesse. O segundo é uma rede Echelle que possui alto poder de dispersão e fornece a alta resolução no intervalo espectral selecionado da ordem de 2 pm por pixel (unidade fotossensível do detector) (WELZ *et al.* 2005).

O detector utilizado na HR-CS AAS são os dispositivos de carga acoplada (CCD). Um dispositivo de carga acoplada possui vários pontos fotossensíveis (pixels) que podem ser distribuídos linearmente ou bidimensionalmente. A radiação dispersa por um monocromador do tipo Echelle gera um espectro bidimensional: comprimento de onda *versus* ordem de difração. Este detector é capaz de armazenar vários espectros em pequenos intervalos de tempo, da ordem de 10 ms, dessa maneira se o mesmo é iluminado por um período de 3 s diversos espectros são obtidos produzindo espectros tridimensionais que fornecem informações mais detalhadas sobre o ambiente espectral que circunda o sinal de absorção atômica gerado pelo analito (WELZ *et al.* 2003).

Entre outras vantagens trazidas para a espectrometria de absorção atômica pelo desenvolvimento deste novo arranjo instrumental cita-se: melhoria na razão sinal/ruído devido à elevada intensidade da fonte de radiação; a possibilidade de empregar linhas de absorção secundárias ou alternativas para determinações dos analitos em maiores concentrações; a possibilidade de correção simultânea da radiação de fundo nas proximidades da raia analítica; a capacidade de aplicação da padronização interna para correção de variações na composição da chama.

Parte das grandes inovações da HR-CS AAS consiste na possibilidade de determinação de não-metals por meio do espectro de moléculas diatômicas e o uso da absorvância integrada no comprimento de onda.

O espectro de absorção de moléculas é resultado de transições de diferentes estados. Esse sistema possui basicamente duas componentes: vibracional (na região do infravermelho) e rotacional (região de micro-ondas e infravermelho remoto) que apresentam um elevado grau de complexidade e números de estados possíveis. Conseqüentemente, o espectro de absorção molecular possui um número maior de linhas que o atômico, ou intervalos de comprimento de onda maiores (bandas). A espectrometria de absorção molecular é possível para moléculas diatômicas, estáveis em altas temperaturas e que possuam estrutura rotacional fina como PO, CS e NO, que podem ser comparadas a linhas atômicas e, portanto, possíveis de serem resolvidas pelo espectrômetro de alta resolução (WELZ *et al.* 2009).

O uso da absorvância integrada no comprimento de onda (WIA, do inglês *wavelength integrated absorbance*) é uma ferramenta que permite selecionar *pixels* adicionais ao *pixel* central (CP) do pico gerando um incremento do sinal obtido e, conseqüentemente, aumentando a sensibilidade.

Outra metodologia que pode ser empregada para essa finalidade é a soma das absorvâncias obtidas em diferentes comprimentos de onda. Este método se baseia na realização de medidas em vários comprimentos de onda para um determinado analito e a posterior soma das absorvâncias obtidas em cada um destes para incremento do sinal analítico (HEITMANN *et. al.* 2007).

A comercialização de equipamentos de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua trouxe novas perspectivas para a área de espectrometria atômica, devido ao potencial do arranjo instrumental, sendo o desenvolvimento e avaliação de novos métodos de análise para aplicação da técnica úteis para gerar novas tecnologias analíticas.

1.2 Importância da determinação elementar em plantas medicinais e fitoterápicos

Devido à dificuldade de acessibilidade aos medicamentos sintéticos produzidos industrialmente, principalmente pela população de baixa renda por causa do custo destes, e a crescente busca por tratamentos alternativos uma grande

parcela da população mundial faz uso de alguma planta medicinal ou fitoterápico no tratamento de enfermidades (MATO GROSSO, 2005).

Os países em desenvolvimento são aqueles que mais fazem uso de medicamentos de origem natural, porém, mesmo em países desenvolvidos como Alemanha e Estados Unidos há uma grande demanda deste tipo de produto.

Estes medicamentos são comumente empregados no tratamento de resfriados, gripes, dores de cabeça, doenças do trato digestivo ou intestinal, insônia, nervosismo, entre outros (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005), sendo as ervas mais utilizadas no Brasil o boldo, a carqueja e a hortelã (MATO GROSSO, 2005).

No entanto, o consumo de grandes quantidades deste de plantas *in natura* ou processada ou o uso em conjunto de algumas plantas pode causar reações adversas. Além disso, alguns destes produtos manufaturados podem estar contaminados por metais tóxicos devido à predisposição de algumas plantas em acumular certos elementos em seus tecidos.

Para garantir um produto de qualidade e que não ofereça riscos à população a Organização Mundial da Saúde publicou em 1998 um documento intitulado “*Quality control methods for medicinal plants materials*” (WORLD WEALTH ORGANIZATION, 1998). Após isto muitos países como Austrália, Canadá e França criaram suas próprias legislações instituindo padrões de qualidade a serem cumpridos pelas empresas para comercialização dos seus produtos (CALIXTO, 2000).

No Brasil, após a implantação das políticas nacionais de incentivo ao consumo e distribuição pelo SUS de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reformulou as normas para registro e comercialização destes produtos, exigindo testes mais específicos e aprofundados para liberação da venda (CARVALHO *et al.* 2011).

Dentre os vários parâmetros que devem ser avaliados e podem ser utilizados como meio para o controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos podemos citar a determinação do teor de cinzas, de óleos voláteis, de resíduos de pesticidas, a composição elementar, entre outros (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2008).

No que se refere à composição elementar sabe-se que todo material vegetal é composto por três classes de elementos: macronutrientes (C, N, O, P, S, K, Ca e Mg); micronutrientes (Cu, Fe, Mn, Mo, B, Zn e Cl) e os elementos traços (Pb, Cd, Cr,

Ni, V, entre outros) (MALAVOLTA, 2006). Neste trabalho serão abordadas as determinações dos macroelementos P e S e do microelemento B.

1.3 Boro e sua determinação

O boro é um elemento pertencente ao grupo 13 da tabela periódica apresentando algumas propriedades de metais e outras de não-metais, estando amplamente disperso pela litosfera e hidrosfera (HOUSECROFT, 2005). O boro pode ser encontrado em solos, materias cerâmicos, vidros, semicondutores, materias vegetais, entre outros materiais.

O boro desempenha um papel importante nas plantas, sendo um dos micronutrientes necessários ao desenvolvimento e crescimento. Suas principais funções em tecidos vegetais são a organização da parede celular e participação na atividade metabólica. O boro possui uma estreita faixa entre a toxicidade e a essencialidade para as plantas: quando há deficiência desse elemento no solo a planta tem seu crescimento afetado, no entanto, quando em excesso há uma redução da produtividade de grãos (SREBNIK; DEMBITSKY; ABU ALI, 2005). Em plantas o boro é encontrado em concentrações de aproximadamente 40 mg kg^{-1} (FARAGO, 1994).

De acordo com estudos realizados, doses entre 15 e 20 gramas são letais para o ser humano; já doses entre 0,1 e 5,5 gramas, dependendo do peso e idade, causam inflamações da mucosa, congestão, dermatites e problemas renais (BAKIRDERE; ÖRENAY; KORKMAZ, 2010). Devido a essa baixa toxicidade para os seres humanos o boro tem sido usado em inseticidas, fungicidas e em alguns medicamentos, mas seu uso prolongado não é recomendado devido aos efeitos colaterais que pode causar (HOUSECROFT, 2005).

A dose diária necessária para suprir as necessidades do corpo humano está na faixa entre 1,0 e 3,0 mg por dia (NIELSEN *apud* SHAABAN, 2010), sendo o boro proveniente de diferentes fontes da dieta alimentar como sucos, chocolate, frutas, verduras, entre outros (MEACHAM *et al.* 2010).

Dessa forma, torna-se interessante quantificar as concentrações de boro presentes em diversas matrizes como, por exemplo, em plantas, uma vez que algumas possuem predisposição em armazenar este elemento em seus tecidos. Para este fim diversas técnicas analíticas podem ser empregadas, dentre elas

podemos citar a espectrometria de absorção atômica (RESANO *et al.* 2007), a espectrometria de emissão atômica (CARRILHO *et al.* 2002) e a espectrofotometria (CARRERO, *et al.* 2005). No entanto, algumas dessas técnicas sofrem interferências espectrais e não-espectrais gerando erros nas determinações (SAH; BROWN, 1997).

A espectrometria de absorção atômica sofre menos interferências espectrais quando comparada a outras técnicas na determinação do boro, porém, devido à formação de óxidos e carbetos de boro altamente estáveis, apenas uma pequena quantidade do elemento é atomizada, e a sensibilidade da técnica, seja no modo chama ou forno de grafite, é baixa, sendo o boro um dos últimos elementos em escala de sensibilidade em AAS (WELZ; SPERLING, 1999). Devido à maior intensidade luminosa da lâmpada de arco curto de xenônio em relação as lâmpadas de cátodo oco, aliada à possibilidade de realizar a integração da absorbância no comprimento de onda na HR-CS F AAS, a determinação de boro se tornou mais sensível, possibilitando a análise de amostras com menores concentrações do analito (WELZ *et al.* 2005).

Na literatura são encontrados diversos trabalhos sobre a determinação de boro em matrizes variadas, no entanto, a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua possui apenas uma aplicação para determinação de boro em folhas de laranjeira e cana-de-açúcar (OLIVEIRA *et al.* 2010).

1.4 Enxofre e sua determinação

O enxofre é um não-metal pertencente ao grupo 16 da tabela periódica, sendo o décimo quinto elemento mais abundante da crosta terrestre (WELZ *et al.* 2009). O mesmo tem grande uso nas indústrias na forma de ácido sulfúrico, além de ser encontrado em outras matrizes, como combustíveis fósseis, fertilizantes, borrachas, entre outros (HOUSECROFT, 2005).

Este elemento está presente em todos os seres vivos, sendo essencial para a manutenção dos organismos fazendo parte de aminoácidos, proteínas, enzimas, coenzimas, vitaminas e outras biomoléculas (KOMARNISKY; BASU, 2005). No entanto, seres humanos e outros animais não são capazes de utilizar o enxofre inorgânico para sintetizar essas biomoléculas, somente tecidos vegetais apresentam

essa capacidade, e dessa forma, as plantas se tornam uma importante fonte de enxofre para os animais (KOMARNISKY; CHRISTOPHERSON; BASU, 2003).

O S é um elemento essencial para as plantas sendo considerado um macronutriente e exigido em quantidades relativamente elevadas pelas culturas. Este elemento pode ser absorvido pelas folhas, embora com baixa eficiência, em sua forma gasosa (SO_2), sendo também absorvido ativamente pelas raízes em sua forma mais oxidada (SO_4^{2-}) e na forma orgânica como os aminoácidos cisteína, cistina e metionina, estes são utilizados na síntese de proteínas que desempenham funções vitais no metabolismo e em reações enzimáticas das plantas. Alguns compostos voláteis de enxofre contribuem para o odor característico que se desprende da cebola, alho, mostarda e outros produtos vegetais. Além disso, este elemento está presente em coenzimas como a ferredoxina, que atuam diretamente na fotossíntese e na fixação biológica do N_2 . Devido à sua presença fundamental em vários compostos e reações, a falta de enxofre provoca uma série de distúrbios metabólicos como diminuição da fotossíntese e da atividade respiratória, queda na síntese de proteínas, redução no teor de gorduras e de açúcares redutores e aumento no teor de carboidratos (MALAVOLTA; VITTI; OLIVEIRA, 1997).

Devido a sua presença em diversas matrizes e, principalmente, nos animais e plantas a determinação e quantificação do enxofre é de grande interesse para muitas áreas como a medicina, meio ambiente e agricultura, indústrias alimentícias, entre outros.

A determinação do enxofre pode ser realizada empregando técnicas analíticas clássicas como a gravimetria e a turbidimetria (VIRGILIO, 2010) ou técnicas instrumentais como a fluorescência de raios-X (XRF), análise por ativação neutrônica (INAA), a espectrofotometria UV-Vis, a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de absorção atômica, entre outras (HUANG *et al.* 2006a). Dentre estas técnicas a empregada mais comumente nas determinações é a espectrofotometria UV-Vis.

Essas técnicas, no entanto, possuem limitações. A INAA apresenta uma baixa sensibilidade devido ao curto tempo de vida e pequena ativação do radionuclídeo ^{37}S . A sensibilidade da espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado é afetada pelo alto potencial de ionização do enxofre (10,36 eV) e pela interferência isobárica dos íons $^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$, $^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$ e $^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$ com os íons de interesse

para análise de enxofre $^{32}\text{S}^+$, $^{33}\text{S}^+$ e $^{34}\text{S}^+$. Para contornar estas interferências, pode ser utilizada uma célula de colisão e reação (DRC), porém isso eleva muito o custo analítico. Já a técnica de ICP OES apresenta bons resultados na quantificação do enxofre, porém as linhas de emissão mais sensíveis se encontram na região do UV no vácuo sendo necessária a utilização de equipamentos adequados para realização de tal análise (WELZ *et al.* 2009).

No caso da espectrometria de absorção atômica o enxofre apresenta o mesmo problema que o encontrado em ICP OES, pois a principal linha de ressonância deste elemento está em 180,67 nm, e as secundárias em 181,97 nm e 182,56 nm, estando ambas numa região do espectro eletromagnético não acessível para a instrumentação convencional. Vários métodos indiretos foram propostos para a determinação de S por AAS, mas a maioria ou é relativamente complexa ou consome muito tempo e por isso esses métodos não são utilizados em análises de rotina (LEPRI, 2009).

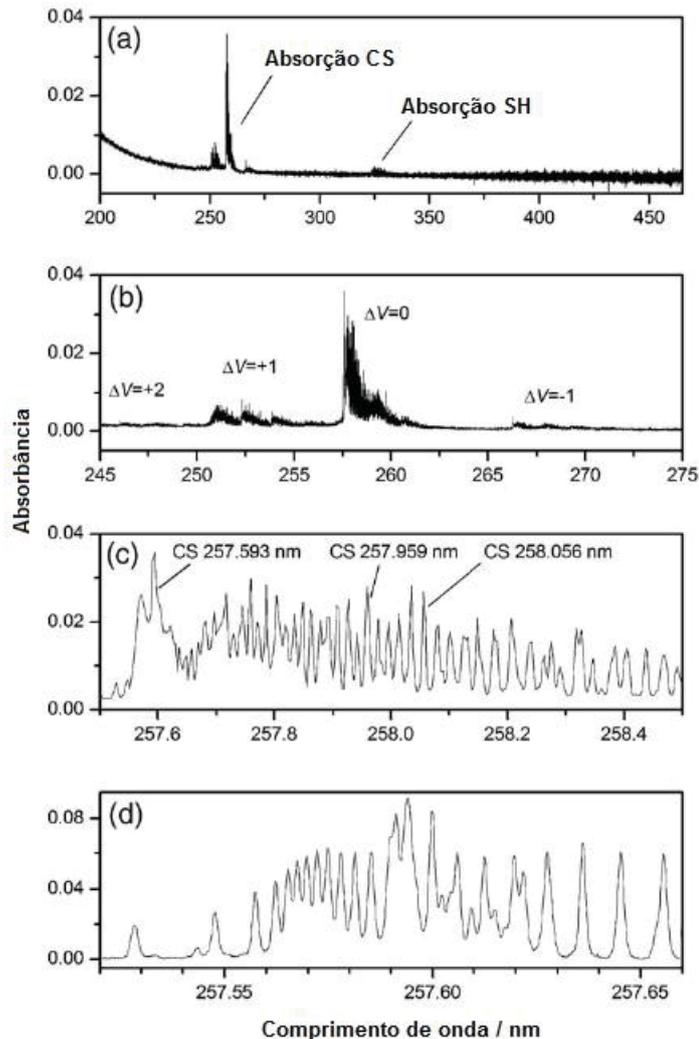
Alternativamente à determinação por absorção atômica vários trabalhos foram realizados utilizando moléculas diatômicas estáveis contendo enxofre, tais como SnS, InS e AIS, empregando a instrumentação comum e usando como fontes de radiação lâmpadas de cátodo oco ou de deutério. No entanto, dificuldades foram encontradas para seleção do comprimento de onda necessário, na correção de fundo e pelas interferências espectrais, impossibilitando o uso dessas metodologias para análises de rotina (HUANG *et al.* 2006a).

O desenvolvimento da HR-CS AAS permitiu determinações por meio dos espectros de estrutura fina das moléculas diatômicas CS e SH sem a necessidade da adição prévia de agentes metálicos formadores, uma vez que os elementos precursores dessas moléculas estão presentes na chama.

O espectro obtido a partir de moléculas diatômicas é bem distinto do obtido para um átomo, isso porque em átomos observa-se somente a absorção de radiação causada pela transição eletrônica. No entanto, em moléculas, cada transição eletrônica apresenta inúmeros estados energéticos intermediários referentes as transições vibracionais que a molécula pode apresentar, e cada estado vibracional é também subdividido em vários níveis de transição rotacional. Dessa maneira, ao absorver a radiação a molécula é capaz de absorver diversas quantidades de energia diferentes referentes às várias transições vibracionais e rotacionais que

podem ocorrer. A Figura 2 apresenta um espectro obtido para a molécula diatômica de CS.

Figura 2 - Espectro de estruturas finas. (a) Espectro obtido para uma solução 1% (v/v) de H₂SO₄ empregando a HR-CS AAS; (b) Banda de absorção de CS entre 245 e 275 nm, subníveis vibracionais; (c) Banda de transição vibracional mais intensa ao redor de 258 nm; (d) Subestrutura da banda de CS centrada em 257,595 nm.



Fonte. Adaptado de HUANG *et al.* 2006a.

Devido à menor sensibilidade encontrada para a molécula de SH em comparação à molécula de monossulfeto de carbono (CS) (VIRGILIO, 2010), a primeira não foi empregada até o momento para uso em determinações.

O principal requisito para a produção das moléculas de CS é o emprego de uma mistura ar/acetileno rica em combustível (chama redutora) para que esteja presente na chama uma alta concentração de carbono que é o precursor da

molécula. Para a produção de CS em espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua em forno de grafite é necessário o uso de uma mistura 96% Ar/ 4% CH₄ durante a etapa de pirólise (HEITMANN *et al.* 2006).

A determinação de enxofre empregando as bandas de absorção molecular de estruturas finas da molécula de CS ($\lambda = 257,595 \text{ nm}$, $257,958 \text{ nm}$ e $258,056 \text{ nm}$) já foi empregada em HR-CS F AAS para amostras de vinho (HUANG *et al.* 2005), ligas metálicas (HUANG *et al.* 2006a), folhas de laranjeira e cana-de-açúcar (OLIVEIRA, 2010), carvão (BAYSAL; AKMAN, 2011), derivados de petróleo (KOWALEWSKA, 2011) e fertilizantes (VIRGILIO *et al.* 2011). E, empregando a HR-CS GF AAS em amostras de plantas e ligas metálicas (HEITMANN *et al.* 2006), amostras biológicas (FERREIRA *et al.* 2010), amostras biológicas, petroquímicas, polietileno e ligas metálicas (RESANO; FLÓREZ, 2012).

Devido as bandas moleculares apresentarem diversas linhas com sensibilidades muito próximas, torna-se interessante explorar o somatório das absorbâncias de diferentes comprimentos de onda aliado a variação da integração da absorbância no comprimento de onda para melhoria dos parâmetros de desempenho analítico.

1.5 Fósforo e sua determinação

O fósforo é o décimo primeiro elemento em abundância na crosta terrestre, apresenta características de um elemento não metálico e faz parte do grupo 15 da tabela periódica. Devido à grande necessidade de fósforo para a nutrição de plantas cerca de 90% da produção global deste elemento é empregada na fabricação de fertilizantes (LEE, 1996).

Esse elemento é essencial para muitos processos biológicos e um importante constituinte de todas as células vivas, fazendo parte da estrutura que constrói o DNA e o RNA, além de armazenar a energia na forma de ATP e nos seres vertebrados ser o principal componente dos ossos (HEITMANN *et al.* 2006).

O fósforo é um elemento essencial para as plantas, sendo muitas vezes a sua falta responsável pela limitação do crescimento de uma cultura. Além das funções já citadas acima, nas plantas o P está diretamente ligado à fotossíntese sendo o responsável por armazenar a energia produzida no processo; participa da respiração e da constituição das membranas celulares (MALAVOLTA, 1976).

Dada a grande importância deste elemento sua determinação é de grande valia para vários setores como agrícola, ecológico, médico, metalúrgico, alimentício e ambiental (HUANG *et al.* 2006b).

Assim como para o enxofre, uma grande variedade de métodos analíticos pode ser empregada para quantificação do fósforo. Entretanto, por diversas razões, o P é um elemento difícil de ser determinado até mesmo pelas técnicas instrumentais mais sensíveis existentes atualmente (RESANO; BRICEÑO; BELARRA, 2009).

As técnicas empregadas para esse fim variam desde a gravimetria, volumetria e espectrofotometria UV-Vis até as modernas técnicas instrumentais espectrometria de fluorescência atômica (AFS), ressonância magnética nuclear (NMR), espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, espectrometria de absorção atômica, entre outras (WELZ *et al.* 2009).

O fósforo é um dos poucos elementos que, ainda hoje, tem sua determinação realizada amplamente empregando a espectrofotometria UV-Vis, principalmente pelo método baseado na formação do complexo azul de molibdênio. Esse método tem como principais vantagens o baixo custo de sua instrumentação e a aplicabilidade em uma grande gama de situações. No entanto, este método exige um preparo extensivo da amostra e sofre interferências de elementos tais como arsênio, cromo e silício que formam compostos análogos ao formado pelo P, interferindo no resultado analítico (HUANG *et al.* 2006b).

A determinação por ICP-MS apresenta perda de sensibilidade devido ao alto potencial de ionização do fósforo (10,5 eV). Além disso, a determinação por meio do isótopo (^{31}P) sofre interferência de espécies como $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ e $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$, e do alto background gerado pelos picos adjacentes de $^{16}\text{O}_2^+$ e $^{32}\text{S}^+$. Essas interferências podem ser reduzidas pelo uso da vaporização eletrotérmica (ETV) para introdução da amostra, ou por equipamentos com alta resolução (HR-ICP-MS), fato esse que aumenta o custo e complexidade das análises (WELZ *et al.* 2009).

O principal problema na determinação deste elemento por espectrometria de absorção, emissão ou fluorescência atômica é o fato de que as linhas de ressonância deste elemento situam-se entre 167,7 nm e 178,8 nm, ou seja, na região do ultravioleta no vácuo onde há intensas bandas de absorção de moléculas de água e oxigênio, sendo necessário para a realização destas medidas o uso de

equipamentos onde o monocromador seja mantido no vácuo, ou preenchido com um gás inerte como o Ar (HUANG *et al.* 2006b).

Como meio alternativo para determinação deste elemento, L'vov e Khatsyzov propuseram o uso do dublete das linhas não ressonantes do fósforo em 213,5 e 213,6 nm como linhas alternativas para a determinação. No entanto, apenas uma pequena parte do fósforo é atomizado em condições de análise comuns a outros elementos, apresentando assim pequena sensibilidade. Para elevar a sensibilidade é necessário o uso de chama acetileno/óxido nitroso ou de altas temperaturas de atomização aliadas ao emprego de modificadores químicos em forno de grafite (HUANG *et al.* 2006b).

Ao contrário do enxofre, nenhum trabalho foi realizado empregando a instrumentação convencional para determinação de fósforo por meio de moléculas diatômicas de PO. Com o advento da HR-CS AAS o potencial de determinações envolvendo essa molécula passou a ser explorado.

A molécula diatômica de PO é distinta das outras moléculas estudadas por apresentar três diferentes transições eletrônicas. Sendo assim, possui uma grande quantidade de linhas que podem ser usadas para determinação e apresentam diferentes sensibilidades (WELZ, 2005).

Alguns estudos já foram realizados até o momento empregando a molécula diatômica de PO para quantificação de fósforo em amostras de ligas metálicas (HUANG *et al.* 2006b) e insumos agroindustriais (FERREIRA, 2011) utilizando a HR-CS F AAS e em amostras biológicas (RESANO; BRICEÑO; BELARRA, 2009) empregando a HR-CS GF AAS.

Assim como para a molécula diatômica de CS existem diversas linhas com sensibilidades próximas, para a molécula de PO e a utilização da WIA e do somatório de absorbâncias de diferentes linhas passa a ser uma alternativa para melhoria dos parâmetros de desempenho analítico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de método para determinação multielementar dos elementos boro, enxofre e fósforo em amostras de plantas medicinais empregando a espectrometria de absorção atômica e de absorção molecular por HR-CS F AAS.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliação de diferentes procedimentos para preparo de amostras de plantas medicinais que atendam á necessidade para determinação conjunta de B, P e S;
- Avaliação das potencialidades do arranjo instrumental da HR-CS F AAS visando à determinação sequencial de B, P e S, por meio da linha atômica do B e das linhas moleculares de PO e CS;
- Explorar o potencial da técnica para aumento da sensibilidade visando análise de plantas medicinais com baixas concentrações de B, P e S por meio do somatório das absorbâncias de diferentes comprimentos de onda desses elementos e pela variação da área de integração do sinal obtido;
- Desenvolvimento de um método analítico para determinar B, P e S em plantas medicinais por HR-CS F AAS, estabelecendo os principais parâmetros de desempenho analítico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e soluções

Todas as soluções empregadas durante os experimentos foram preparadas em água deionizada de alta pureza obtida a partir de um sistema de osmose reversa Millipore Rios 5TM combinado com deionizador Millipore Milli-QTM academic[®] 18,2 MΩ cm (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Solução estoque 1000 mg L⁻¹ B foi preparada pela dissolução de 5,719 g de H₃BO₃ (Spectrum, Gardena, CA, EUA) em água e o volume foi completado para 1000 mL. A solução foi padronizada com padrão espectroscópico Chemis[®] 1000 mg L⁻¹ B.

Solução estoque 5000 mg L⁻¹ P foi preparada pela dissolução de 34,874 g Na₂HPO₃·5H₂O (Riedel-De Häen, Seelze, Alemanha) em água e o volume foi completado para 1000 mL. A solução foi padronizada com padrão espectroscópico Chemis[®] 1000 mg L⁻¹ P.

Solução estoque 5000 mg L⁻¹ S foi preparada pela dissolução de 38,434 g MgSO₄·7H₂O (Spectrum, Gardena, CA, EUA) em água e o volume foi completado para 1000 mL. A solução foi padronizada pela precipitação de sulfato de bário e pesagem do composto devidamente isolado e purificado.

Solução 5000 mg L⁻¹ Ti foi preparada pela diluição de um padrão Titrisol[®] (Merck, Alemanha) em 200 mL de água.

Soluções de trabalho multielementares (1,0 – 100,0 mg L⁻¹ B; 50,0 – 2000 mg L⁻¹ P; 50,0 – 2000 mg L⁻¹ S) foram preparadas diariamente pela diluição apropriada da solução estoque em meio 1% (v/v) HNO₃ (Spectrum, Gardena, CA, EUA).

Para a digestão das amostras de plantas medicinais empregaram-se ácidos nítrico 70% (m/m) e clorídrico 37% (m/m) (Spectrum, Gardena, CA, EUA) e peróxido de hidrogênio 30% (Merck, Alemanha) ambos com elevado grau de pureza.

Todas as soluções foram armazenadas em frascos de polipropileno de alta densidade (Nalgene[®], Rochester, NY, EUA). Frascos plásticos e vidrarias foram descontaminados por imersão em banho 10% (v/v) HNO₃ por no mínimo 24 horas e posterior lavagem com água deionizada em abundância.

3.2. Instrumentação

Todas as medidas foram realizadas empregando um espectrômetro de absorção atômica em chama de alta resolução com fonte contínua ContrAA 300 (Analytik Jena, Jena, Alemanha) equipado com uma lâmpada de arco curto de xenônio operando no modo “hot-spot” modelo XBO 301 (GLE, Berlin, Alemanha) como fonte de radiação e queimador com caminho óptico de 50 mm (Figura 3). Todas as medidas foram feitas em sete replicatas ($n=7$) com taxa de aspiração fixada em $5,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Figura 3 - Espectrômetro de absorção atômica em chama de alta resolução com fonte contínua Analytik Jena ContrAA 300.



Fonte: Autor.

Para atomização do boro empregou-se chama acetileno-óxido nitroso e para produção das moléculas de PO e CS chama ar-acetileno. Acetileno grau de pureza 99,7% (Air Liquid, SP, Brasil) e óxido nitroso grau de pureza 99,5% (Air Liquid, SP, Brasil) foram usados como combustível e oxidante, respectivamente. Os parâmetros instrumentais vazão dos gases combustível e oxidante e altura de observação para os comprimentos de onda avaliados são apresentados na Tabela 1, estes parâmetros foram determinados através de otimização realizada empregando o software do equipamento para maximização das absorbâncias obtidas.

Tabela 1 - Parâmetros instrumentais utilizados.

λ B (nm)	Vazão (L h ⁻¹)		Altura de observação (mm)	
	Acetileno	Óxido nítrico		
249,773	245	462	6	
249,677	245	462	6	
λ CS (nm)	Vazão (L h ⁻¹)		Altura de observação (mm)	
	Acetileno	ar		
257,595	120	594	7	
257,958	120	594	7	
λ PO (nm)				
	246,400	90	594	7
	247,620	100	594	9
	247,780	90	594	6

Fonte: Autor.

3.3. Preparo das amostras

As amostras analisadas foram secas em estufa com circulação forçada de ar TE-394/2 (Tecnal[®], Piracicaba, SP) por um período de 72 horas a 70°C e em seguida moídas em moinho de facas Willey 648 (Tecnal[®], Piracicaba, SP) empregando peneira de 20 mesh. Para a digestão das amostras foi utilizado um bloco digestor para tubos de 400 mL com 15 posições TE – 040/25 (Tecnal[®], Piracicaba, SP). Para a incineração das amostras foi empregada uma mufla EDG[®] 7000. Os reagentes e amostras foram pesados em balança analítica Bel Mark 210 A com precisão de $\pm 0,0001$ g.

Foram analisadas as seguintes amostras adquiridas no comércio de Araraquara – SP: Sene (*Senna alexandrina*), Hortelã (*Mentha s.p.*), Ginkgo Biloba (*Ginkgo biloba L.*), Melissa (*Melissa officinalis*), Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*), Ginseng (*Panax ginseng*), Guaco (*Mikania glomerata*), Camomila (*Matricaria chamomilla*), Poejo (*Mentha longifolia*), Graviola (*Annona muricata*), Erva Doce (*Pimpinella anisum*), Pata de Vaca (*Bauhinia forficata*), Erva Cidreira (*Lippia alba*), Boldo do Chile (*Plectranthus barbatus*), Centelha Asiática (*Centella asiatica*), Chapéu de Couro (*Echinodorus grandiflorus*), Carqueja (*Baccharis crispa Spreng*), Cascara Sagrada (*Rhamnus purshiana*) e Cavalinha (*Equisetum arvense*).

Para avaliação da exatidão do método foram analisados dois materiais certificados: *Trace Elements in Spinach Leaves* (1570a) e *Apple Leaves* (1515) (NIST, Gaithersburg, MD, EUA).

Dois métodos de preparo foram testados para avaliar qual o melhor para preparar as amostras de materiais vegetais, levando em conta a sensibilidade da HR-CS F AAS. Este estudo foi realizado com o material certificado *Trace Elements in Spinach Leaves* (1570a).

Procedimento 1: Cinco gramas de amostra moída foram pesados e colocados em uma cápsula de porcelana, em seguida incinerada em mufla a uma temperatura de 500°C por 2 horas, com uma rampa de aquecimento de 5°C min⁻¹. Após esse processo a amostra foi resfriada e umidificada com algumas gotas de água. Foram adicionados 5 mL de HCl 6 mol L⁻¹ e a solução evaporada até próximo da secura, ao resíduo foram adicionados 10 mL de HCl 2 mol L⁻¹, a solução foi então aquecida e filtrada em balões de 25 mL que foram então avolumados. Adaptado de Oliveira (2010).

Procedimento 2: Dois gramas da amostra moída foram pesados e colocados em um tubo de digestão de 400 mL, a este foram adicionados 3,5 mL de H₂O₂, os tubos foram vedados e deixados em repouso por um período de 18 horas, em seguida adicionou-se 10 mL de HNO₃ e a temperatura do bloco digestor foi elevada a 90°C permanecendo neste patamar por 2 horas, em seguida elevou-se a temperatura para 150°C ficando nesta condição por mais 2 horas. A solução foi evaporada até próximo da secura, o resíduo foi retomado em água deionizada e, em seguida, filtrado. Adaptado de Zarcinas et al. *apud* Zheljaskov e McNeil (2008).

Após a avaliação dos métodos de preparo, todas as amostras foram digeridas em triplicata ($n=3$) empregando o procedimento 2 e com a adição de 5 mL de uma solução 5000 mg L⁻¹ Ti após a filtragem, sendo em seguida o volume completado para 25 mL com água. A adição de Ti foi realizada somente nas amostras, pois, a análise dos brancos das mesmas não apresentou interferência deste elemento nas linhas de interesse dos analitos.

3.4 Procedimento analítico

Foram realizadas medidas nas linhas atômicas principal (249,773 nm) e secundária (249,677 nm) do boro, em três linhas moleculares de PO (246,400 nm,

247,620 nm e 247,780 nm) e em duas linhas moleculares de CS (257,595 nm e 257,958 nm). Avaliou-se também todas as possibilidades de somatório de absorvância das linhas atômicas e moleculares para cada um dos três elementos visando incrementos na sensibilidade.

Avaliaram-se ainda os parâmetros de desempenho analítico obtidos pelo incremento da área de integração da absorvância no comprimento de onda para áreas de 1 *pixel* (central pixel, CP); 3 *pixels* (CP±1); 5 *pixels* (CP±2); 7 *pixels* (CP±3) e 9 *pixels* (CP±4). A WIA foi aplicada para as linhas individualmente e para a soma das mesmas.

Obtiveram-se os seguintes parâmetros de desempenho analítico, tanto para a WIA como para o somatório de absorvâncias: sensibilidade, coeficiente de correlação linear (r), concentração característica (C_0), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e precisão (RSD%). Os limites de detecção e quantificação foram calculados de acordo com as recomendações da IUPAC (CURRIE, 1999).

Para a análise das amostras foram obtidas curvas de calibração nas seguintes faixas de concentração: 1,0 – 100 mg L⁻¹ B (0,0; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0), 50 – 2000 mg L⁻¹ P (0,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0; 800,0; 1000,0; 2000,0) e 50 – 2000 mg L⁻¹ S (0,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0; 800,0; 1000,0; 2000,0), nas linhas 249,773 nm (B); 247,620 nm (PO) e 257,595 nm (CS) com áreas de integração de 3, 5 e 5 *pixels*, respectivamente e com tempo de integração de 3 segundos para todas as medidas. A vazão da amostra foi fixada em 5 mL min⁻¹.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Enxofre e fósforo são essenciais para o desenvolvimento de vegetais, sendo encontrados em concentrações na faixa de 3000 mg kg⁻¹ e 2000 mg kg⁻¹, respectivamente (MALAVOLTA, 2006). O boro é um micronutriente cujo concentração média nas plantas é de 40 mg kg⁻¹ (FARAGO, 1994).

Devido as dificuldades na determinação de B, P e S em plantas e visando a análise sequencial numa única alíquota de material vegetal, massas mais elevadas precisaram ser utilizadas, além disso, a otimização das condições operacionais para melhoria da sensibilidade foi necessária para viabilizar essas determinações.

4.1 Otimização das condições para análise de B

Em HR-CS F AAS duas metodologias podem ser empregadas para incremento da sensibilidade da técnica: a integração da absorbância no comprimento de onda e a soma das absorbâncias em diferentes comprimentos de onda.

Para determinar a melhor condição para determinação do boro foram construídas curvas analíticas nas duas principais linhas atômicas deste elemento (249,773 nm e 249,677 nm) avaliando diferentes áreas de integração e a soma de absorbâncias das diferentes linhas deste elemento.

O intervalo de trabalho e os principais parâmetros de desempenho analítico (sensibilidade, coeficiente de correlação linear, concentração característica, limite de detecção e desvio relativo padrão) obtidos para o elemento boro estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Intervalo de trabalho (mg L⁻¹), sensibilidade (b), coeficiente de correlação linear (r), concentração característica (C₀, mg L⁻¹), limite de detecção (LOD, mg L⁻¹) e desvio relativo padrão (RSD, %) para as linhas atômicas principal, secundária e soma, em diferentes números de pixels para o B.

1 pixel (CP)					
λ B (nm)	Inter. de trab.	b / r	C ₀	LOD	RSD
249,773	1 – 100	1,9x10 ⁻⁴ / 0,9989	23,5	0,5	4,6
249,677	2 – 100	9,7x10 ⁻⁵ / 0,9990	45,5	3,4	5,4
249,773+249,677	2 – 100	2,8x10 ⁻⁴ / 0,9989	15,5	1,2	6,2

Tabela 2. Continuação

3 pixels (CP±1)					
λ B (nm)	Inter. de trab.	b / r	C ₀	LOD	RSD
249,773	1 – 100	5,2x10 ⁻⁴ / 0,9989	8,5	0,5	4,4
249,677	2 – 100	2,7x10 ⁻⁴ / 0,9990	16,5	2,9	5,3
249,773+249,677	2 – 100	7,8x10 ⁻⁴ / 0,9989	5,6	1,0	6,9
5 pixels (CP±2)					
λ B (nm)	Inter. de trab.	b / r	C ₀	LOD	RSD
249,773	1 – 100	7,5x10 ⁻⁴ / 0,9989	5,9	0,6	4,3
249,677	2 – 100	3,8x10 ⁻⁵ / 0,9992	11,5	3,0	5,2
249,773+249,677	2 – 100	1,1x10 ⁻³ / 0,9990	3,9	1,1	6,4
7 pixels (CP±3)					
λ B (nm)	Inter. de trab.	b / r	C ₀	LOD	RSD
249,773	1 – 100	8,7x10 ⁻⁴ / 0,9988	5,1	1,0	4,1
249,677	2 – 100	4,4x10 ⁻⁴ / 0,9993	10,0	3,3	5,3
249,773+249,677	2 – 100	1,3x10 ⁻³ / 0,9990	3,3	1,3	5,7
9 pixels (CP±4)					
λ B (nm)	Inter. de trab.	b / r	C ₀	LOD	RSD
249,773	1 – 100	9,1x10 ⁻⁴ / 0,9987	4,8	1,5	5,6
249,677	2 – 100	4,6x10 ⁻⁴ / 0,9993	9,5	3,8	6,8
249,773+249,677	2 – 100	1,4x10 ⁻³ / 0,9991	3,2	1,6	5,6

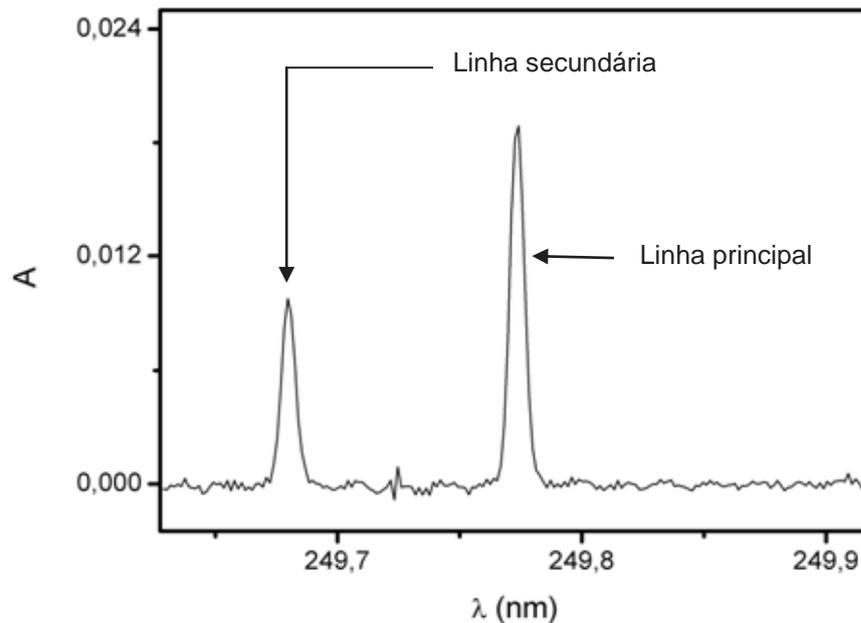
Fonte: Autor.

Com base nos dados da Tabela 2 observa-se que o coeficiente angular das curvas de calibração, que indica a sensibilidade, variou de 1,9x10⁻⁴ a 9,1x10⁻⁴ para a linha principal (249,773 nm), de 9,7x10⁻⁵ a 4,6x10⁻⁴ para a linha secundária e de 2,8x10⁻⁴ a 1,4x10⁻³ para a soma das absorvâncias e a concentração característica foi reduzida de 23,5 para 4,8 mg L⁻¹ (249,773 nm), de 45,5 para 9,5 mg L⁻¹ (249,677 nm) e, de 15,5 para 3,2 mg L⁻¹ (249,773 nm + 249,677 nm) quando se variou a área de integração de 1 a 9 *pixels*. O coeficiente de correlação linear foi superior a 0,998 para todas as condições.

Os melhores parâmetros de desempenho analítico foram obtidos com área de integração equivalente a 3 *pixels* para as linhas isoladas e para a soma de linhas. Isso se deve ao estreito perfil do pico de absorção do boro, pois para maiores áreas de integração o ganho em absorvância é pequeno em comparação ao ruído

agregado já que os *pixels* mais distantes do centro do pico se encontram em regiões de maior flutuação do sinal analítico (HEITMANN *et al.* 2007), como observado na Figura 4.

Figura 4 - Espectro característico obtido com padrão de 100 mg L⁻¹ B por HR-CS F AAS para o dublete do boro, linha principal ($\lambda=249,773$ nm) e linha secundária ($\lambda=249,677$ nm).

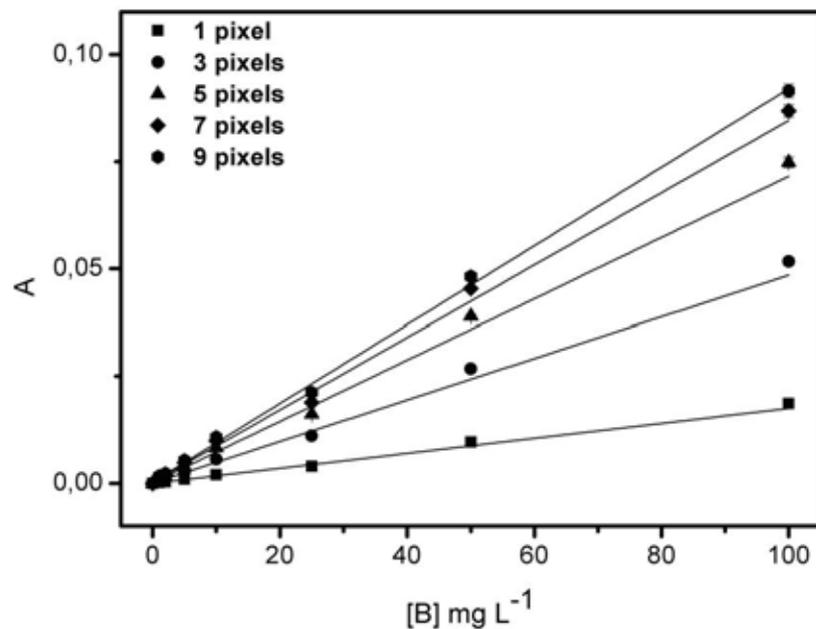


Fonte: Autor.

A análise da Tabela 2 revela que variando a WIA para a linha principal de CP para CP \pm 1 há um ganho de aproximadamente 3 vezes na sensibilidade, enquanto que de CP \pm 1 para CP \pm 2 apresenta um ganho de apenas 1,4 vezes. Aumentar a área de integração além de 3 *pixels* contribui muito pouco para o ganho em sensibilidade (Figura 5). Quanto maior a área utilizada o aumento da absorbância integrada é inferior ao incremento do erro associado às medidas por causa da redução da relação sinal/ruído nas áreas mais distantes do centro do pico devido ao pequeno sinal analítico, próximos ao ruído instrumental, referente a estes *pixels*.

Variando a área de integração, tem-se que para todos os números de *pixels* avaliados o limite de detecção para a linha principal sempre demonstrou os menores níveis, estando abaixo até mesmo dos valores obtidos para a soma de linhas. Neste ponto é importante frisar que o desvio padrão utilizado para cálculo do limite de detecção e de quantificação corresponde ao desvio padrão resultado da propagação de erros, ou seja, $\Sigma SD^{branco} = (SD_{\lambda_1}^2 + SD_{\lambda_2}^2)^{1/2}$, onde λ_1 e λ_2 são os comprimentos de onda do dublete do boro (249,773 e 249,677 nm).

Figura 5 - Curvas de calibração para a linha principal do boro ($\lambda = 249,773$ nm) obtidas pela variação da área de integração entre 1 e 9 *pixels*.



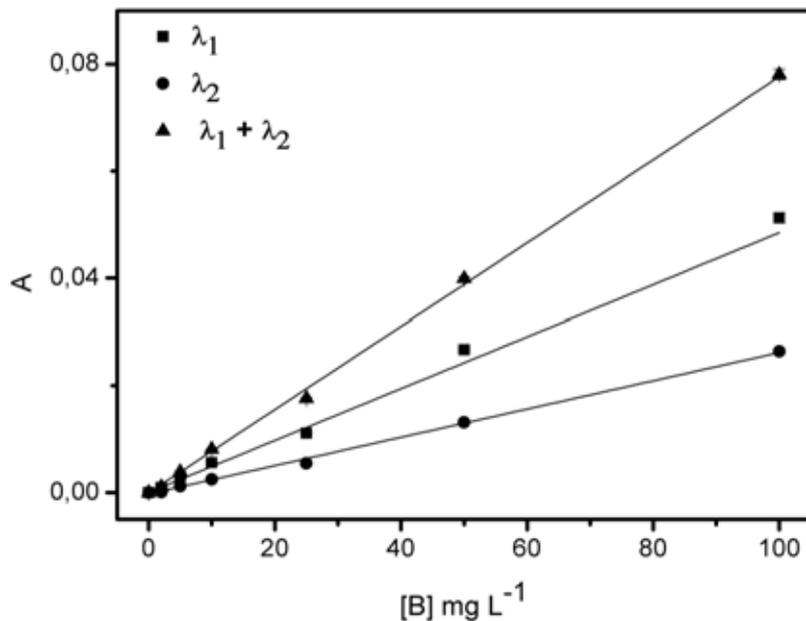
Fonte: Autor.

Já a concentração característica (C_0) tem seus menores valores para as linhas principal, secundária e somadas com área de integração de 9 *pixels*, no entanto, o limite de detecção não apresenta o mesmo comportamento: decresce até certo incremento da área de integração e, em seguida, passa a crescer. Essa diferença de comportamento entre C_0 e LOD deve-se a dependência da concentração característica com o coeficiente angular ($C_0 = \frac{0,0044}{b}$) o qual cresce com o aumento da área de integração. Como o LOD é dependente da sensibilidade e do desvio padrão (SD) de 12 medidas do branco, para que se obtenham melhores LOD é preciso que o aumento do coeficiente angular para maiores áreas de integração seja superior ao aumento do desvio padrão. No entanto, para WIA maior que 3 *pixels* (B) e 5 *pixels* (P e S), há uma maior flutuação do sinal analítico próximo ao zero nas medidas do branco devido à maior área englobada na integração e o aumento do desvio padrão é maior que o incremento do coeficiente angular obtendo-se maiores valores de LOD apesar da melhoria da sensibilidade e de C_0 .

O somatório de linhas não contribuiu significativamente para ganhos em LOD devido à diferença de sensibilidade entre as linhas da ordem de duas vezes. Nesta situação a contribuição da linha secundária para a absorbância total foi inferior ao erro agregado pelo somatório das linhas. Na Figura 6 são apresentadas curvas de

calibração obtidas para as linhas isoladas e para a soma das duas linhas atômicas. Nota-se que há um ganho em sensibilidade de 1,5 vezes em relação à linha principal. Este aumento é inferior aquele observado quando se aumenta a área de integração o que indica vantagens no emprego da WIA comparativamente ao somatório de absorbâncias.

Figura 6 - Curvas de calibração obtidas para a linha principal (λ_1), linha secundária (λ_2) e soma de linhas ($\lambda_1 + \lambda_2$) para o boro com área de integração igual a 3 *pixels*.



Fonte: Autor.

A concentração característica calculada para a linha principal para área de integração equivalente a 3 *pixels* foi de 8,5 mg L⁻¹. Esse valor encontra-se próximo do sugerido no manual de operação fornecido pelo fabricante (6,6 mg L⁻¹) e cerca de 1,8 vezes mais sensível que o obtido em espectrometria de absorção atômica em chama com fonte de linhas (15 mg L⁻¹) para o mesmo comprimento de onda, o que demonstra o potencial e a maior sensibilidade apresentada pela HR-CS AAS (WELZ; SPERLING, 1999).

Desta forma, devido aos melhores resultados associados à linha principal com área de integração de 3 *pixels*, esta condição foi escolhida para os estudos subsequentes envolvendo a análise de plantas medicinais.

4.2 Otimização das condições para análise de P

A determinação do fósforo foi efetuada por meio da molécula diatômica de monóxido de fósforo (PO). O espectro molecular, como discutido anteriormente, apresenta um maior número linhas, sendo que várias destas apresentam sensibilidades próximas. Dessa forma foram selecionados três diferentes comprimentos de onda (246,400 nm; 247,620 nm e 247,780 nm) e avaliaram-se as diferentes áreas de integração e todas as combinações de soma de absorvâncias dessas linhas.

A Tabela 3 apresenta o intervalo de trabalho das curvas de calibração e os principais parâmetros de desempenho analítico associados as linhas moleculares de PO para escolha da melhor condição de análise.

Tabela 3 - Intervalo de trabalho (mg L^{-1}), sensibilidade (b), coeficiente de correlação linear (r), concentração característica (C_0 , mg L^{-1}), limite de detecção (LOD, mg L^{-1}) e desvio relativo padrão (RSD, %) para as três linhas moleculares de PO analisadas e para todas as possibilidades de soma, em diferentes áreas de integração.

1 pixel (CP)						
λ PO (nm)	Inter. de trab.	b / r	C_0	LOD	RSD	
246,400	50 – 2000	$4,6 \times 10^{-6} / 0,9985$	964,1	32,9	4,8	
247,620	50 – 2000	$3,0 \times 10^{-6} / 0,9968$	1455,0	32,0	2,6	
247,780	50 – 2000	$3,8 \times 10^{-6} / 0,9988$	1171,8	39,7	4,8	
246,400+247,620	50 – 2000	$7,6 \times 10^{-6} / 0,9981$	579,8	21,6	4,4	
246,400+247,780	50 – 2000	$8,3 \times 10^{-6} / 0,9988$	528,9	23,7	5,2	
247,620+247,780	50 – 2000	$6,8 \times 10^{-6} / 0,9981$	649,1	26,5	2,8	
246,400+247,620+247,780	50 – 2000	$1,1 \times 10^{-5} / 0,9984$	388,0	18,5	3,5	
3 pixels (CP±1)						
λ PO (nm)	Inter. de trab.	b / r	C_0	LOD	RSD	
246,400	50 – 2000	$1,3 \times 10^{-5} / 0,9986$	332,3	27,2	4,7	
247,620	50 – 2000	$8,4 \times 10^{-6} / 0,9974$	523,9	16,4	2,0	
247,780	50 – 2000	$1,1 \times 10^{-5} / 0,9989$	394,0	39,3	4,1	
246,400+247,620	50 – 2000	$2,3 \times 10^{-5} / 0,9982$	190,1	17,3	4,0	
246,400+247,780	50 – 2000	$2,4 \times 10^{-5} / 0,9988$	181,4	20,7	4,8	
247,620+247,780	50 – 2000	$1,9 \times 10^{-5} / 0,9983$	226,8	18,6	1,9	
246,400+247,620+247,780	50 – 2000	$3,3 \times 10^{-5} / 0,9985$	134,8	15,6	3,1	

Tabela 3. Continuação

5 pixels (CP±2)					
λ PO (nm)	Inter. de trab.	b / r	C ₀	LOD	RSD
246,400	50 – 2000	$2,0 \times 10^{-5} / 0,9984$	211,3	28,1	4,5
247,620	50 – 2000	$1,2 \times 10^{-5} / 0,9974$	358,0	13,7	2,2
247,780	50 – 2000	$1,7 \times 10^{-5} / 0,9989$	251,1	48,8	4,8
246,400+247,620	50 – 2000	$3,2 \times 10^{-5} / 0,9982$	135,1	16,7	4,0
246,400+247,780	50 – 2000	$3,8 \times 10^{-5} / 0,9987$	116,4	24,9	5,0
247,620+247,780	50 – 2000	$3,0 \times 10^{-5} / 0,9984$	147,6	21,1	2,6
246,400+247,620+247,780	50 – 2000	$5,0 \times 10^{-5} / 0,9985$	87,8	17,4	3,3
7 pixels (CP±3)					
λ PO (nm)	Inter. de trab.	b / r	C ₀	LOD	RSD
246,400	50 – 2000	$2,6 \times 10^{-5} / 0,9981$	172,1	30,5	5,1
247,620	50 – 2000	$1,5 \times 10^{-5} / 0,9978$	301,6	15,6	3,1
247,780	50 – 2000	$2,3 \times 10^{-5} / 0,9989$	191,3	76,1	5,7
246,400+247,620	50 – 2000	$4,0 \times 10^{-5} / 0,9981$	109,6	17,9	4,8
246,400+247,780	50 – 2000	$4,8 \times 10^{-5} / 0,9986$	90,6	33,6	5,7
247,620+247,780	50 – 2000	$3,8 \times 10^{-5} / 0,9985$	117,0	31,1	4,3
246,400+247,620+247,780	50 – 2000	$6,3 \times 10^{-5} / 0,9985$	69,7	22,3	4,1
9 pixels (CP±4)					
λ PO (nm)	Inter. de trab.	b / r	C ₀	LOD	RSD
246,400	50 – 2000	$2,9 \times 10^{-5} / 0,9978$	150,8	37,0	6,1
247,620	50 – 2000	$1,6 \times 10^{-5} / 0,9983$	278,1	17,5	6,7
247,780	50 – 2000	$2,8 \times 10^{-5} / 0,9990$	160,1	96,7	5,8
246,400+247,620	50 – 2000	$4,5 \times 10^{-5} / 0,9981$	97,8	21,2	6,9
246,400+247,780	50 – 2000	$5,7 \times 10^{-5} / 0,9986$	77,7	42,0	6,7
247,620+247,780	50 – 2000	$4,3 \times 10^{-5} / 0,9988$	101,6	37,4	7,4
246,400+247,620+247,780	50 – 2000	$7,2 \times 10^{-5} / 0,9986$	60,7	26,9	5,7

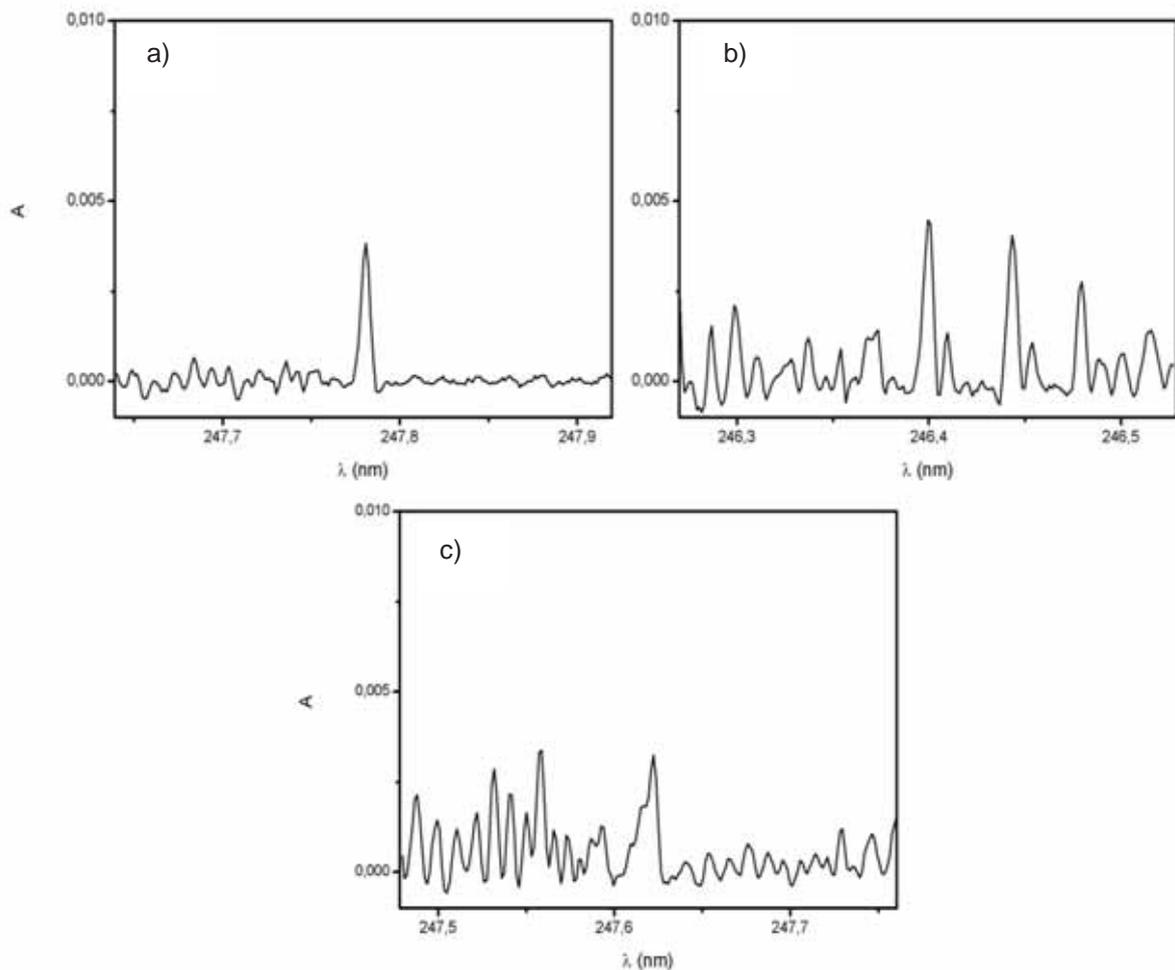
Fonte: Autor.

A análise destes resultados revela que para todas as situações o coeficiente de correlação linear foi $>0,997$. Quando a área de integração variou de 1 para 9 *pixels*, os coeficientes angulares das curvas aumentaram 6,3 vezes para a linha 246,400 nm; 5,3 vezes para a linha 247,620 nm e 7,4 vezes para a linha 247,780 nm. O coeficiente angular máximo foi obtido para a soma das três linhas ($7,2 \times 10^{-5}$),

porém esta situação forneceu elevado desvio padrão, tornando o somatório de linhas menos vantajoso que a WIA.

Na Figura 7 são apresentados os espectros de absorção molecular associado as três linhas moleculares avaliadas de PO. Em todos os espectros é possível observar várias linhas características de estruturas de banda fina (transições rotacionais e vibracionais) geradas por moléculas diatômicas.

Figura 7 - Espectros característicos obtidos com padrão de $2000 \text{ mg L}^{-1} \text{ P}$ por HR-CS F AAS para as linhas moleculares de PO: a) 247,780 nm; b) 246,400 nm; c) 247,620 nm.



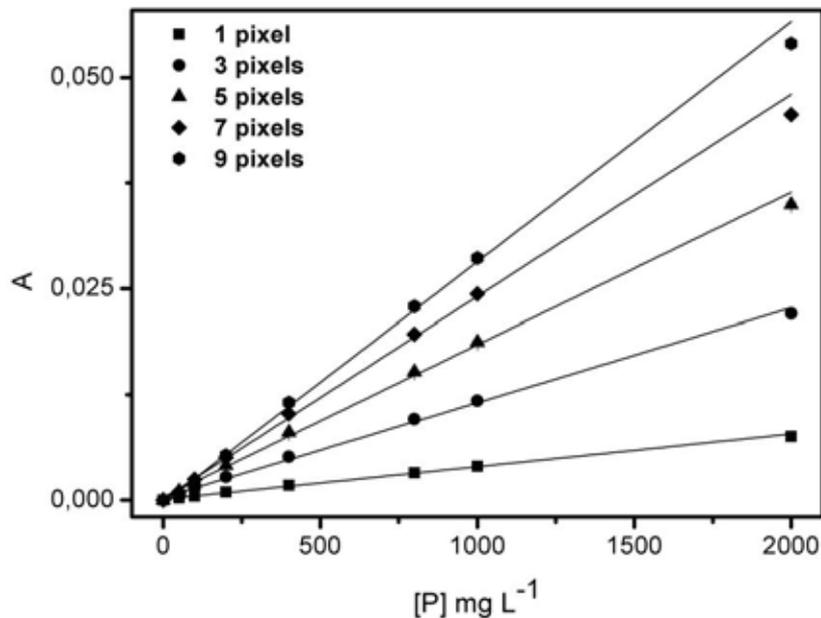
Fonte: Autor.

A melhor condição analítica foi encontrada para a linha 247,620 nm e área de integração equivalente a 5 *pixels*, fornecendo um LOD de $13,7 \text{ mg L}^{-1}$. Este valor é cerca de 14% menor do que obtido para a soma de todas as linhas nas mesmas condições. A obtenção deste melhor resultado para $CP \pm 2$ se deve ao perfil mais

largo do pico de absorção apresentado por esta linha, pois, nesse caso a integração até 5 *pixels* gera ganhos de sinal que suplantam o incremento do ruído.

A Figura 8 apresenta curvas de calibração obtidas para diferentes áreas de integração. É possível notar que há incrementos significativos de absorbância até 7 *pixels* devido ao perfil mais largo do pico, no entanto em áreas maiores que $CP \pm 2$ os desvios das medidas aumentam (Tabela 3), porque a integração inclui ruídos elevados. Dessa forma tem-se que a área de integração equivalente à 5 *pixels* foi a melhor condição analítica.

Figura 8 - Curvas de calibração para a linha molecular de PO ($\lambda = 247,620$ nm) obtidas pela variação da área de integração entre 1 e 9 *pixels*.

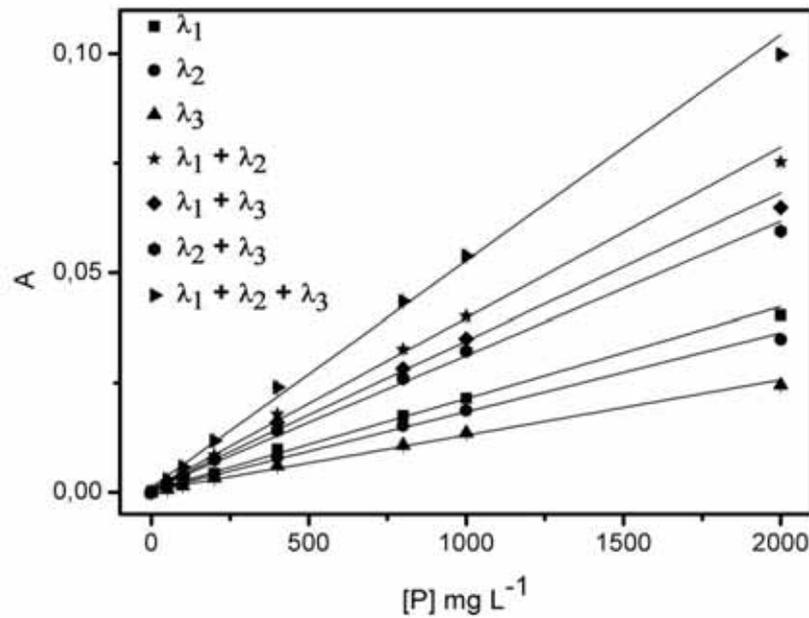


Fonte: Autor.

Na Figura 9 são apresentadas as curvas de calibração obtidas pelo somatório de linhas para todas as possibilidades de soma das absorbâncias das três linhas selecionadas. Devido à existência de um maior número de linhas moleculares com sensibilidades próximas, o uso do somatório de linhas é mais eficaz do que para linhas atômicas. No entanto, um maior número de linhas deve ser somado para que melhores resultados sejam obtidos (RESANO; BRICEÑO; BELARRA, 2009). Contudo o programa de controle do equipamento não faz os cálculos para somatório de absorbâncias automaticamente, assim o tempo gasto e o extenso tratamento manual de dados necessário após as medidas torna essa prática desfavorável para o seu uso em rotinas analíticas. No caso do estudo realizado os melhores

parâmetros de desempenho analítico foram obtidos com a linha 247,620 nm, isoladamente.

Figura 9 - Curvas de calibração obtidas para as linhas 246,400 nm (λ_1), 247,620 nm (λ_2), 247,780 nm (λ_3) e soma de linhas para o fósforo com área de integração igual a 5 *pixels*.



Fonte: Autor.

Com base nos resultados obtidos para as várias possibilidades avaliadas para melhoria da sensibilidade optou-se por trabalhar com a linha 247,620 nm com área de integração de 5 *pixels* para as análises subsequentes envolvendo plantas medicinais.

4.3 Otimização das condições para análise de S

Para a determinação do enxofre foram avaliadas duas linhas moleculares (257,595 nm e 257,958 nm) da banda de transição eletrônica da molécula diatômica de monossulfeto de carbono (CS). Ambas as linhas foram escolhidas, como para o fósforo, por serem as mais sensíveis.

Na Tabela 4 são expostos os resultados obtidos para as curvas de calibração construídas para avaliar a melhor condição analítica para enxofre via moléculas de CS usando a soma de absorbâncias e a integração da absorbância nos comprimentos de onda.

Tabela 4 - Intervalo de trabalho (mg L^{-1}), sensibilidade (b), coeficiente de correlação linear (r), concentração característica (C_0 , mg L^{-1}), limite de detecção (LOD, mg L^{-1}) e desvio relativo padrão (RSD, %) para as linhas moleculares de CS analisadas e para o somatório de linhas, em diferentes áreas de integração.

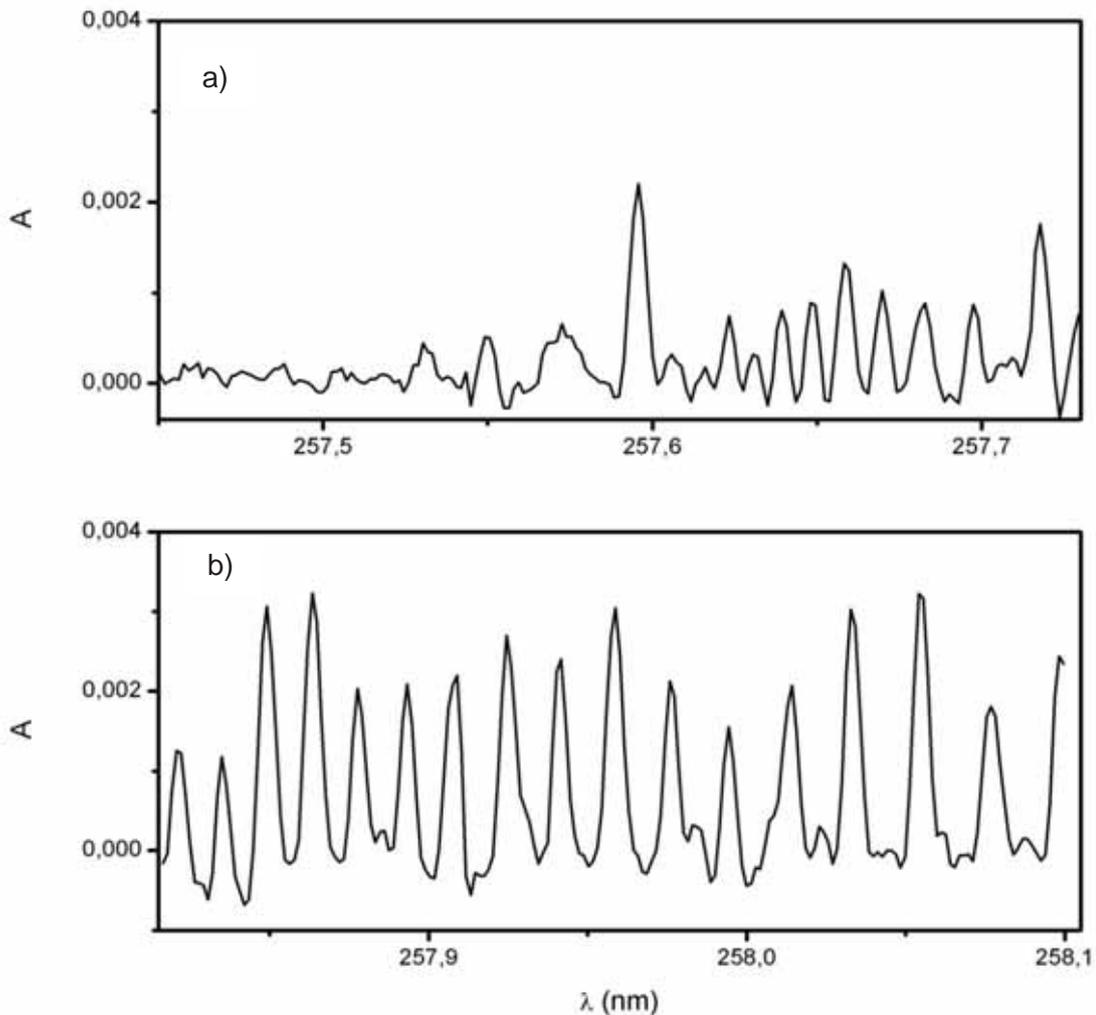
1 pixel (CP)					
λ CS (nm)	Inter. de trab.	b / R	C_0	LOD	RSD
257,595	50 – 2000	$2,2 \times 10^{-6} / 0,9997$	1955,5	40,0	5,9
257,958	50 – 2000	$1,7 \times 10^{-6} / 0,9983$	2614,4	53,5	14,6
257,595+257,958	50 – 2000	$3,9 \times 10^{-6} / 0,9997$	1119,0	30,5	10,4
3 pixels (CP\pm1)					
λ CS (nm)	Inter. de trab.	b / R	C_0	LOD	RSD
257,595	50 – 2000	$6,2 \times 10^{-6} / 0,9996$	636,3	38,7	4,4
257,958	50 – 2000	$4,4 \times 10^{-6} / 0,9980$	1006,2	54,9	10,5
257,595+257,958	50 – 2000	$1,0 \times 10^{-5} / 0,9994$	416,3	31,2	6,7
5 pixels (CP\pm2)					
λ CS (nm)	Inter. de trab.	b / R	C_0	LOD	RSD
257,595	50 – 2000	$8,6 \times 10^{-6} / 0,9996$	509,1	34,7	4,6
257,958	50 – 2000	$5,3 \times 10^{-6} / 0,9969$	832,9	73,8	10,7
257,595+257,958	50 – 2000	$1,4 \times 10^{-5} / 0,9994$	315,9	39,3	6,2
7 pixels (CP\pm3)					
λ CS (nm)	Inter. de trab.	b / R	C_0	LOD	RSD
257,595	50 – 2000	$9,6 \times 10^{-6} / 0,9997$	470,1	49,8	5,4
257,958	50 – 2000	$4,1 \times 10^{-6} / 0,9963$	1069,0	138,5	22,8
257,595+257,958	50 – 2000	$1,4 \times 10^{-5} / 0,9993$	320,0	54,5	9,0
9 pixels (CP\pm4)					
λ CS (nm)	Inter. de trab.	b / R	C_0	LOD	RSD
257,595	50 – 2000	$9,9 \times 10^{-6} / 0,9997$	441,7	51,2	5,8
257,958	50 – 2000	$2,1 \times 10^{-6} / 0,9761$	2116,4	346,3	24,8
257,595+257,958	50 – 2000	$1,2 \times 10^{-5} / 0,9988$	365,4	72,3	11,9

Fonte: Autor.

Observa-se um aumento de 4,5 vezes na sensibilidade da linha 257,595 nm quando a área de integração varia de 1 a 9 *pixels*. Para a linha 257,958 nm ocorre um aumento de aproximadamente 3 vezes em sensibilidade de 1 a 5 *pixels*. A partir deste ponto há um decréscimo do coeficiente angular em função do perfil do sinal de absorção molecular que é ligeiramente mais estreito do que o associado a linha 257,595 nm (Figura 10).

As linhas moleculares de CS, assim como as linhas estudadas para a molécula de PO, apresentam um perfil de pico largo de forma que os melhores parâmetros de desempenho analítico foram obtidos com uma área de integração igual a $CP \pm 2$.

Figura 10 – Espectros de absorção molecular de CS relativo a $2000 \text{ mg L}^{-1} \text{ S}$ obtido por HR-CS F AAS para as linhas a) $257,595 \text{ nm}$ e b) $257,958 \text{ nm}$.

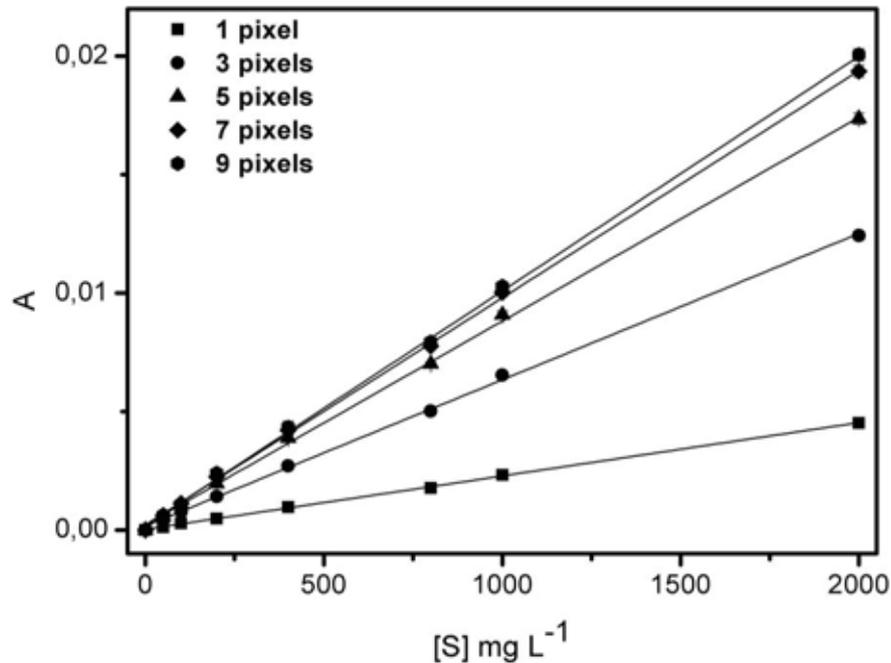


Fonte: Autor.

A Figura 11 apresenta curvas de calibração para o enxofre obtidas para diferentes áreas de integração. Incrementos significativos em sensibilidade são observados para áreas de integração de até 5 *pixels*, a partir deste ponto o ganho em absorvância é pequeno, sendo a utilização de um número maior de *pixels* desvantajosa. É possível observar que quando a área de integração é variada de 7 para 9 *pixels* se tem um ganho de apenas 0,03 em sensibilidade, sendo a

quantidade de ruído somada nesse caso muito superior ao sinal analítico, gerando aumentos no limite de detecção e no RSD.

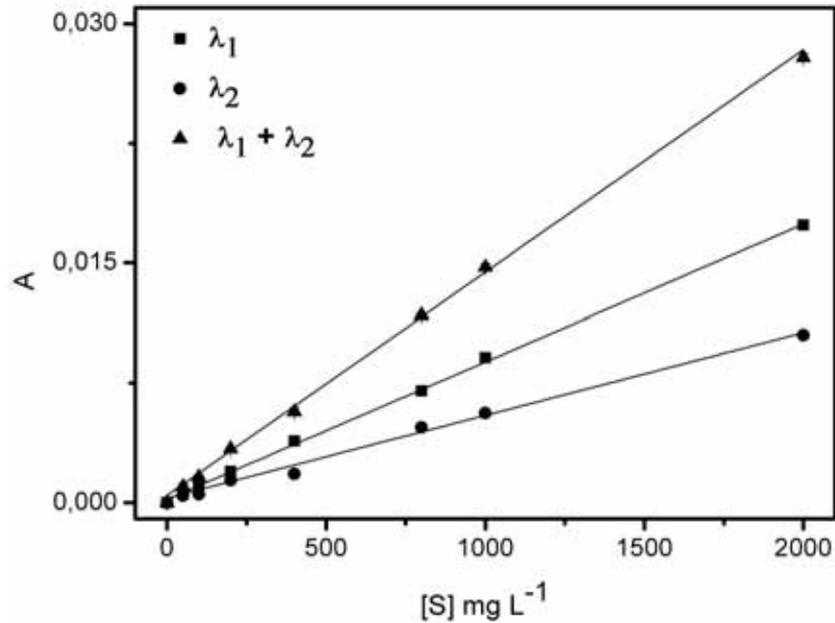
Figura 11 - Curvas de calibração para enxofre empregando a linha molecular de CS ($\lambda=257,595$ nm) obtidas em diferentes áreas de integração (1 a 9 *pixels*).



Fonte: Autor.

A Figura 12 ilustra curvas de calibração obtidas para o somatório de absorbância das linhas. Observa-se que a soma das linhas praticamente dobra o sinal analítico obtido, sendo os parâmetros de desempenho analítico para pequenas áreas de integração melhores que as encontradas para as linhas isoladas, ou seja, a soma dos erros associados a cada linha é inferior ao ganho em sensibilidade. No entanto, a linha 257,595 nm e área de integração de 5 *pixels* resultou em limite de detecção de 34,7 mg L⁻¹ (440 mg kg⁻¹), correspondendo a um concentração de enxofre cerca de 7 vezes abaixo dos usualmente encontrados em materiais vegetais (240 mg L⁻¹; 3000 mg kg⁻¹).

Figura 12 - Curvas de calibração para enxofre empregando as linhas 257,595 nm (λ_1), 257,958 nm (λ_2) e soma de linhas ($\lambda_1 + \lambda_2$) para o enxofre com área de integração igual a 5 *pixels*.



Fonte: Autor.

O melhor limite de detecção ($30,5 \text{ mg L}^{-1}$) foi obtido para a soma de linhas e área de integração equivalente a 1 *pixel*, sendo este LOD cerca de 10% menor que o correspondente a linha isolada. Porém, levando em consideração o dispendioso tratamento manual de dados, a pequena diferença em sensibilidade e os melhores RSD obtidos para a linha 257,595 nm, optou-se por esta linha e área de integração de 5 *pixels* para as análises das amostras.

4.4 Resultados obtidos para os diferentes procedimentos de preparo da amostra

Devido a baixa concentração de boro e à baixa sensibilidade obtida para P e S foi necessário o uso de uma massa mais elevada de amostra, de forma que os três elementos se situassem no intervalo de trabalho das respectivas curvas de calibração e pudessem ser determinados sequencialmente. Dessa forma a digestão por microondas foi descartada e dois procedimentos diferentes (incineração e digestão por via úmida em bloco) foram avaliados para determinar qual o melhor método para preparo das amostras de planta medicinal.

O procedimento de preparo via incineração não apresentou bons resultados para os três analitos (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados da determinação de B, P e S no material certificado *Trace Elements in Spinach Leaves* preparado via incineração.

	B (mg kg ⁻¹)	Rec. (%)	P (mg kg ⁻¹)	Rec. (%)	S (mg kg ⁻¹)	Rec. (%)
Valor obtido	19,8 ± 8,3	52,6	460 ± 14,1	8,9	2050 ± 49,5	44,6
Valor certificado	37,6 ± 1,0	-	5180 ± 11,0	-	4600*	-

*Valor de referência.

Fonte: Autor.

As recuperações de B e S foram de aproximadamente 50%, enquanto que a de fósforo foi de 8,9%. A baixa recuperação do enxofre se deve a perdas deste elemento por meio de espécies voláteis como o dióxido de enxofre (SO₂) durante o processo de incineração (WANG *et al.* 1999). O boro apresenta perdas pela volatilização da espécie H₃BO₃ (ZHELJAZKOV; McNEIL, 2008). Além de ineficiente, este procedimento apresentou longos tempos de preparo e consumiu um grande volume de ácidos.

O material certificado *Trace elements in Spinach Leaves* foi preparado então pelo procedimento de digestão por via úmida que forneceu melhores resultados: valores concordantes com os valores certificados para B e S, porém, a concentração de P encontrado foi de 11% em relação ao valor certificado (Tabela 6).

Tabela 6 - Resultados da determinação de B, P e S no material certificado *Trace Elements in Spinach Leaves* preparado por digestão em via úmida.

	B (mg kg ⁻¹)	Rec. (%)	P (mg kg ⁻¹)	Rec. (%)	S (mg kg ⁻¹)	Rec. (%)
Valor obtido	30,9 ± 1,3	82,2	600 ± 30,0	11,6	4300 ± 10,0	93,5
Valor certificado	37,6 ± 1,0	-	5180 ± 11,0	-	4600*	-

*Valor de referência.

Fonte: Autor.

O fósforo se encontra em tecidos vegetais, em sua maioria, na forma de moléculas estáveis e pouco voláteis de fosfato (PO₄³⁻), de modo que a perda deste

elemento durante o processo de digestão é pouco provável. Além disso, o fosfato forma normalmente espécies altamente estáveis com o cálcio, o qual também está presente em concentrações elevadas em tecidos vegetais, pois é um macroelemento necessário ao seu desenvolvimento.

A presença de cálcio na amostra, leva à formação de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) que é extremamente estável e não se dissocia na chama, impedindo a formação das moléculas diatômicas de PO utilizadas para determinação do fósforo a partir do precursor fosfato, gerando dessa maneira uma supressão do sinal e, conseqüentemente, baixas recuperações.

Segundo a literatura, a adição de titânio favorece a formação de titanatos de cálcio (CaTiO_3) mais estáveis que o fosfato de cálcio deixando o fosfato livre em solução para a produção das moléculas diatômicas de PO na chama, permitindo a determinação do fósforo (HUANG *et al.* 2006c).

Com base nesta informação dois materiais certificados foram preparados pelo procedimento 2 com a adição de 5 mL de uma solução 5000 mg L^{-1} Ti. Nesta condição resultados satisfatórios foram obtidos (Tabela 7).

Tabela 7 - Resultados da determinação de B, P e S (mg kg^{-1}) nos materiais certificados *Apple Leaves* (1515) e *Trace elements in Spinach Leaves* (1570a) preparados pelo método proposto.

SRM	Valor obtido			Valor certificado		
	B	P	S	B	P	S
1515	$24,7 \pm 0,6$	$1490,0 \pm$	$2150,0 \pm$	$27,0 \pm 2,0$	$1590,0 \pm$	$1800,0^*$
		70,0	40,0		11,0	
1570a	$45,0 \pm 2,9$	$5700,0 \pm$	$5300,0 \pm$	$37,6 \pm 1,0$	$5180,0 \pm$	$4600,0^*$
		30,0	40,0		11,0	

*Valor de referência.

Fonte: Autor.

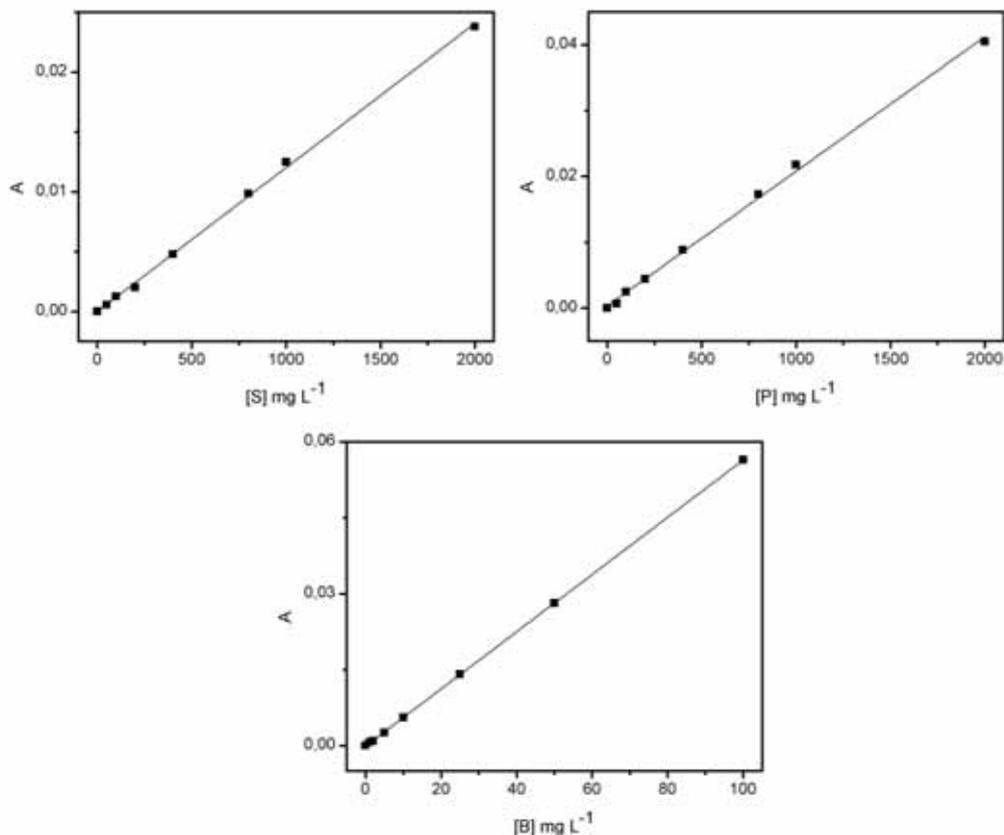
O teste *t*-pareado foi aplicado entre as médias experimentais e os valores certificados para B e P e não certificado para enxofre, e os resultados obtidos foram concordantes a um nível de confiança de 98% para B e 95% para P e S.

4.5 Determinação de B, P e S em amostras de plantas medicinais

Depois de estabelecidas as melhores condições analíticas e o melhor método de preparo das amostras, foram feitas as determinações de B, P e S em 19 amostras de plantas medicinais empregando o método desenvolvido.

Na figura 13 são apresentadas as curvas de calibração obtidas para B, P e S para análise das amostras utilizando as condições previamente otimizadas.

Figura 13 - Curvas de calibração obtidas empregando as linhas 249,773 nm; 247,620 nm e 257,595 nm com áreas de integração de 3; 5 e 5 *pixels*, para B, P e S, respectivamente.



Fonte: Autor.

As concentrações dos analitos presentes nas 19 amostras de plantas medicinais se situaram na faixa de concentrações entre 8,5 – 34,5 mg kg⁻¹ para B, 671,9 – 3910,9 mg kg⁻¹ para P e de 721,0 a 7652,9 mg kg⁻¹ para S (Tabela 8). Os valores encontrados estão de acordo com aqueles encontrados na literatura para esses elementos em matriz vegetal (FARAGO, 1994; MALAVOLTA, 2006; STREET *et al.* 2008).

Tabela 8 - Resultados ($\text{mg kg}^{-1} \pm \text{SD}$) para determinação de B, P e S ($n=3$) em amostras de plantas medicinais empregando o método proposto.

Amostras	B	P	S
Boldo do Chile	$8,5 \pm 1,9$	$818,8 \pm 103,0$	$754,4 \pm 47,4$
Camomila	<LOD	$3910,9 \pm 130,0$	$3143,0 \pm 182,1$
Carqueja	$13,5 \pm 1,2$	$671,9 \pm 10,5$	$798,0 \pm 49,3$
Cáscara Sagrada	$12,9 \pm 3,8$	$681,0 \pm 129,8$	<LOD
Cavalinha	<LOD	<LOD	<LOD
Centelha Asiática	<LOD	$1408,9 \pm 16,0$	$1718,2 \pm 155,3$
Chapéu de Couro	<LOD	$2955,8 \pm 25,0$	$1249,8 \pm 65,8$
Cidreira	<LOD	$817,7 \pm 97,0$	$1149,8 \pm 75,3$
Erva Doce	$19,8 \pm 1,9$	$2420,7 \pm 55,9$	$2860,7 \pm 35,3$
Espinheira Santa	$20,5 \pm 1,8$	$753,9 \pm 10,7$	$1542,7 \pm 36,5$
Ginkobiloba	$34,5 \pm 3,0$	$1346,5 \pm 61,3$	$1469,7 \pm 80,6$
Ginseng	$8,6 \pm 1,2$	$2032,8 \pm 219,1$	$2032,7 \pm 40,0$
Graviola	$16,5 \pm 1,9$	$719,8 \pm 165,7$	$1862,7 \pm 166,0$
Guaco	<LOD	$706,7 \pm 18,8$	$2244,2 \pm 38,2$
Hortelã	$19,4 \pm 3,5$	$1479,1 \pm 223,6$	$7652,9 \pm 132,8$
Melissa	<LOD	$2137,5 \pm 128,2$	$2756,5 \pm 99,2$
Pata de Vaca	<LOD	$1786,9 \pm 35,1$	$721,0 \pm 43,4$
Poejo	$9,7 \pm 0,3$	$2755,1 \pm 143,0$	$2503,0 \pm 83,2$
Sene	$30,1 \pm 2,5$	<LOD	$1486,1 \pm 51,7$

Fonte: Autor.

Utilizando a metodologia desenvolvida foi possível determinar a concentração de boro em 11 amostras e de P e S em 17 amostras. O desvio padrão relativo ($n=12$) para a amostra de Poejo (*Mentha longifolia*) contendo $9,7 \text{ mg kg}^{-1}$ B; $2755,1 \text{ mg kg}^{-1}$ P e $2503,0 \text{ mg kg}^{-1}$ de S foram de 3%, 5% e 4%, respectivamente.

O limite de detecção calculado para a base seca foi de $5,8 \text{ mg kg}^{-1}$ B, 172 mg kg^{-1} P, e 440 mg kg^{-1} S, valores estes inferiores as concentrações normalmente encontrados em tecidos vegetais possibilitando a análise desses elementos em pequenas concentrações em amostras desse gênero.

5 CONCLUSÃO

A espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua se mostrou consistente na produção de curvas de calibração para análise de B, P e S.

A absorbância integrada no comprimento de onda se mostrou mais eficiente na melhoria dos parâmetros de desempenho analítico do que a utilização do somatório das absorbâncias de diferentes linhas, devido principalmente aos erros acumulados quando as absorbâncias são somadas.

Os menores limites de detecção para B e P foram obtidos integrando a absorbância nos comprimentos de onda 249,773 nm e 247,620 nm usando 3 e 5 *pixels*, respectivamente. O somatório de absorbâncias para as linhas de CS em 257,595 nm e 257,958 nm forneceu um limite de detecção somente 10% inferior ao obtido para a linha 257,595 nm, isoladamente, com área de integração de 5 *pixels*.

O procedimento de preparo da amostra por digestão em via úmida com massa de 2,0 gramas de amostra apresentou boas recuperações dos três analitos e permitiu a determinação destes sem necessidade de novas diluições.

A adição de titânio as amostras para a formação de compostos mais estáveis com o cálcio possibilitou a determinação de fósforo por meio da molécula de monóxido de fósforo.

As concentrações determinadas para os analitos variaram entre 8,5 – 34,5 mg kg⁻¹ para B, 671,9 – 3910,9 mg kg⁻¹ para P e de 721,0 a 7652,9 mg kg⁻¹ para S. Estes valores estão acima do limite de detecção calculado para a base seca para estes elementos: 5,8 mg kg⁻¹ B, 172 mg kg⁻¹ P, e 440 mg kg⁻¹ S.

O uso da metodologia analítica desenvolvida neste trabalho permitiu a determinação sequencial de B, P e S em uma única alíquota das amostras de plantas medicinais empregando as potencialidades instrumentais da HR-CS F AAS.

REFERÊNCIAS

- BAKIRDERE, S.; ÖRENAY, S.; KORKMAZ, M. Effect of boron on human health. **The Open Mineral Processing Journal**, v. 3, n. 1, p. 54-59, 2010.
- BAYSAL, A.; AKMAN, S. A practical method for the determination of sulfur in coal samples by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2662-2665, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto n. 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília,DF, p. 2-4, 22 jun. 2006a. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm >. Acesso em: 20 nov. 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a política nacional de práticas integrativas e complementares (PNPIC) no sistema único de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília,DF, p. 20-25, 03 maio 2006b. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf> >. Acesso em: 20 nov. 2012.
- CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.
- CARRERO, P.; MALAVÉ, A.; ROJAS, E.; RONDÓN, C.; PEÑA, Y. P. de; BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M. On-line generation and hydrolysis of methyl borate for the spectrophotometric determination of boron in soil and plants with azomethine-H. **Talanta**, v. 68, n. 2, p. 374-381, 2005.
- CARRILHO, E. N. V. M.; GONZALEZ, M. H.; NOGUEIRA, A. R. A.; CRUZ, G. M.; NÓBREGA, J. A. Microwave-assisted acid decomposition of animal- and plant-derived samples for element analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 15, p. 4164-4168, 2002.
- CARVALHO, A. C. B.; PERFEITO, J. P. S.; COSTA E SILVA, L. V.; RAMALHO, L. S.; MARQUES, R. F. de; SILVEIRA, D. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 467-473, 2011.
- CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). **Analytica Chimica Acta**, v. 391, n. 2, p. 105-126, 1999.
- FARAGO, M. E. **Plants and the chemical elements**: biochemistry, uptake, tolerance and toxicity. New York: VCH, 1994. 292 p.

FERNANDO, R.; CALLOWAY, C. P. Jr.; JONES, B. T. Continuum source atomic absorption spectrometry in an air-acetylene flame with improved detection limits. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 14, p. 1556-1560, 1992.

FERREIRA, H. S.; LEPRI, F. G.; WELZ, B.; CARASEK, E.; HUANG, M. D. Determination of sulfur in biological samples using high-resolution molecular absorption spectrometry in a graphite furnace with direct solid sampling. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 7, p. 1039-1045, 2010.

FERREIRA, R. B.; OLIVEIRA, S. R.; FRANZINI, V. P.; VIRGILIO, A.; RAPOSO JUNIOR, J. L.; GOMES NETO, J. A. Evaluation of lines of phosphorus and potassium by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry for liquid fertilizer analysis. **Atomic Spectroscopy**, v. 32, n. 2, p. 56-61, 2011.

HEITMANN, U.; WELZ, B.; BORGES, D. L. G.; LEPRI, F. G. Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta, Part B**, v. 62, n. 11, p. 1222-1230, 2007.

HEITMANN, U.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HUANG, M. D.; OKRUSS, M. Determination of non-metals via molecular absorption using high-resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, n. 11, p. 1314-1320, 2006.

HOUSECROFT, C. E.; SHARPE, A. G. **Inorganic chemistry**. 2nd ed. Gosport: Pearson Prentice Hall, 2005. p. 293-296; 432-437.

HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. Direct determination of total sulfur in wine using a continuum source atomic absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, n. 8, p. 1877-1881, 2005.

HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. Determination of sulfur by molecular absorption of carbon monosulfide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **Spectrochimica Acta, Part B**, v. 61, n. 2, p. 181-188, 2006a.

HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. Determination of phosphorus by molecular absorption of phosphorus monoxide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, n. 3, p. 338-345, 2006b.

HUANG, M. D.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; OKRUSS, M. The influence of calcium and magnesium on the phosphorus monoxide molecular absorption signal in the determination of phosphorus using a continuum source spectrometer and an air-acetylene flame. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 21, n. 3, p. 346-349, 2006c.

KOMARNISKY, L. A.; BASU, T. K. Biological and toxicological considerations of dietary sulfur. **Reviews in Food and Nutrition Toxicity**, v. 4, n. 1, p. 85-104, 2005.

KOMARNISKY, L. A.; CHRISTOPHERSON, R. J.; BASU, T. K. Sulfur: its clinical and toxicologic aspects. **Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 54-61, 2003.

KOWALEWSKA, Z. Feasibility of high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in flame for sulfur determination in petroleum products. **Spectrochimica Acta, Part B**, v. 66, n. 7, p. 546-556, 2011.

LEE, J. D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1999. p. 236-237.

LEPRI, F. G. **Investigações sobre a determinação de enxofre em materiais biológicos, estabilização, atomização e correção de fundo baseada no efeito Zeeman para o fósforo e determinação de elementos traço em carvão utilizando espectrometria de absorção atômica e molecular de alta resolução com fonte contínua**. 2009. 131 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 527 p.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. de. **Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319 p.

MATO GROSSO. Secretária de Estado de Saúde. **O acesso aos fitoterápicos e plantas medicinais e a inclusão social: diagnóstico situacional da cadeia produtiva farmacêutica do estado de Mato Grosso**. Cuiabá: Secretária de Saúde, 2005. 91 p.

MEACHAM, S.; KARAKAS, S.; WALLACE, A.; ALTUN, F. Boron in human health: evidence for dietary recommendations and public policies. **The Open Mineral Processing Journal**, v. 3, n. 1, p. 36-53, 2010.

O'HAVER, T. C. Continuum-source atomic-absorption spectrometry: past, present and future prospects. **Analyst**, v. 109, n. 3, p. 211-217, 1984.

OLIVEIRA, S. R. **Avaliação da espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução no desenvolvimento de métodos analíticos para diagnóstico foliar de cana-de-açúcar e laranjeira**. 2010. 162 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

OLIVEIRA, S. R.; GOMES NETO, J. A.; NÓBREGA, J. A.; JONES, B. T. Determination of macro- and micronutrients in plant leaves by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry combining instrumental and sample preparation strategies. **Spectrochimica Acta, Part B**, v. 65, n. 4, p. 316-320, 2010.

RESANO, M.; FLÓREZ, M. R. Direct determination of sulfur in solid samples by means of high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using palladium nanoparticles as chemical modifier. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, n. 3, p. 401-412, 2012.

RESANO, M.; BRICEÑO, J.; BELARRA, M. A. Direct determination of phosphorus in biological samples using a solid sampling high-resolution continuum source electrothermal spectrometer: comparison of atomic and molecular absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, n. 10, p. 1343-1354, 2009.

RESANO, M.; BRICEÑO, J.; ARAMENDÍA, M.; BELARRA, M. A. Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of boron in plant tissues. **Analytica Chimica Acta**, v. 582, n. 2, p. 214-222, 2007.

SAH, R. N.; BROWN, P. H. Techniques for boron determination and their application to the analysis of plant and soil samples. **Plant and Soil**, v. 193, n. 1, p. 15-33, 1997.

SHAABAN, M. M. Role of boron in plant nutrition and human health. **American Journal of Plant Physiology**, v. 5, n. 5, p. 224-240, 2010.

SNEDDON, J.; FARAH, B. D.; FARAH, K. S. Multielement atomic absorption spectrometry: a historical perspective. **Microchemical Journal**, v. 48, n. 3, p. 318-325, 1993.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435-440, 2010.

SREBNIK, M.; DEMBITSKY, ABU ALI, H. **Contemporary aspects of boron chemistry**. Boston: Elsevier, 2005. p. 446-572.

STEET, R. A.; KULKARNI, M. G.; STIRK, W. A.; SOUTHWAY, C.; VAN STADEN, J. Variation in heavy metals and microelements in South African medicinal plants obtained from street markets. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 8, p. 953-960, 2008.

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

VIRGILIO, A. **Determinação de enxofre em amostras agroindustriais por espectrometria de absorção molecular com fonte contínua e alta resolução**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

VIRGILIO, A.; RAPOSO JUNIOR, J. L.; CARDOSO, A. A.; NÓBREGA, J. A.; GOMES NETO, J. A. Determination of total sulfur in agricultural samples by high-resolution continuum source flame molecular absorption spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2197-2201, 2011.

WANG, J.; YI, H.; HE, C.; LI, H. Sample preparation method for the determination of total sulfur in plant materials. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 30, n. 5-6, p. 599-603, 1999.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. 3rd ed. Weinheim: VCH, 1999. 941 p.

WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U. **High resolution continuum-source AAS – the better way to do atomic absorption spectrometry**. Weinheim: VCH, 2005. 294 p.

WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; VALE, M. G. R. High-resolution continuum-source atomic absorption spectrometry – what can we expect? **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 220-229, 2003.

WELZ, B.; LEPRI, F. G.; ARAUJO, R. G.; FERREIRA, S. L.; HUANG, M. D.; OKRUSS, M.; BECKER-ROSS, H. Determination of phosphorus, sulfur and the halogens using high-temperature molecular absorption spectrometry in flames and furnaces - a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 647, n. 2, p. 137-148, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneve, 1998. 122 p.

ZHELJAZKOV, V. D.; McNEIL, P. Comparison of five digestion procedures for recovery of nutrients and trace elements in plant tissue. **Journal of Plant Nutrition**, v. 31, n. 11, p. 1937-1946, 2008.