

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química de Araraquara
Departamento de Química Analítica

**Uma nova abordagem analítica sobre teores de Zn por HR-CS
AAS em plantas medicinais voltadas ao emagrecimento**

Fabio Genhiro Ishikawa

Araraquara - SP

2011

Fabio Genhiro Ishikawa

**Uma nova abordagem analítica sobre teores de Zn por HR-CS
AAS em plantas medicinais voltadas ao emagrecimento**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Conselho do Curso de Graduação em Química
como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Bacharel em Química

Orientador: Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto

Co-orientador (a): Prof^a. Dr^a. Mercedes de Moraes

Araraquara - SP

2011

Dedico este trabalho a meus pais, irmãos,
familiares e amigos que me ajudaram
diretamente ou indiretamente na
minha vida e formação.

Agradecimentos

Aos meus pais Genshum e Sachiko, pelo apoio moral em decisões importantes e momentos difíceis, e pelo apoio financeiro.

Aos meus irmãos Celso e Karina, pela ajuda e ensinamentos ao longo da vida.

Ao Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto, pela orientação, oportunidade de pesquisa e dedicação ao meu aprendizado.

A Profa. Dr. Mercedes de Moraes, pela orientação, amizade e ensinamentos durante a elaboração deste projeto.

A Jardes Figueiredo, pela supervisão e elaboração deste projeto durante o ano inteiro.

A Ronan, Tiago, Felipe Fiocco e Mariana, pela cooperação no desenvolvimento experimental desde projeto.

Aos demais integrantes do Grupo de Espectroanalítica e Automação (GEA), Alex, Felipe Manfroi, Lucas, Marcos, Bruno e Rodrigo, pelas conversas no laboratório, conselhos e auxílios na elaboração deste projeto.

Aos moradores das Republicas Espanha 1515 e Xurupitas Farm, pelo convívio diário na faculdade, festas e churrascos.

Ao time de futsal Prema A.F., pelo título conquistado no torneio Inter-panels de 2010.

A todos os amigos da faculdade, pelos ótimos momentos durante a toda a graduação.

Aos amigos de São Paulo, Fernando, Kiyoshi, Eduardo, Alex e Luciana, que apesar da distância, a amizade foi mantida desde os tempos de cursinho.

A Naohide Urasaki e aos integrantes do grupo de Taiko de Okinawa Ryukyu Koku Matsuri Daiko, Ana, Evelyn, Takeshi, Tiem"e", Vanessa, Yumeh, pelos momentos de alegria, esforço, dedicação e descontração durante treinos, apresentações em eventos e confraternizações.

Resumo

O presente projeto de pesquisa trata do desenvolvimento de novas metodologias analíticas voltadas a identificação e quantificação do zinco em diferentes frações de drogas vegetais utilizadas para emagrecimento, empregando a espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução. A determinação dos teores de zinco foi feita em espectrômetro de absorção atômica em chama com fonte contínua e alta resolução AnalytikJena ContrAA 300 no comprimento de onda principal do Zn 213,857 nm, com a absorbância integrada no comprimento de onda equivalente a 3 pixels. Foram obtidas curva analítica com faixa linear de calibração entre 0,10 a 1,00 mg L⁻¹, coeficiente de correlação igual a 0,9991 e limite de detecção foi de 0,020 mg L⁻¹. Os teores totais de Zn obtidos após digestão ácida das amostras por micro-ondas foram: 28,06 mg kg⁻¹ (Alcachofra), 31,49 mg kg⁻¹ (Camomila), 77,16 mg kg⁻¹ (Carqueja), 105,38 mg kg⁻¹ (Cavalinha), 32,37 mg kg⁻¹ (Erva-doce) e 5,00 mg kg⁻¹ (Sene). A extração em meio aquoso assistida por radiação micro-ondas produziu extratos contendo: 5,40 mg kg⁻¹ (Alcachofra), 10,65 mg kg⁻¹ (Camomila), 14,83 mg kg⁻¹ (Carqueja), 18,90 mg kg⁻¹ (Cavalinha), 7,80 mg kg⁻¹ (Erva-doce), 3,24 mg kg⁻¹ (Sene), correspondentes a 19%, 34%, 19%, 18%, 24% e 64% dos respectivos teores totais de Zn nessas plantas. Os baixos teores de Zn extraídos de algumas plantas indicam que este metal está fortemente ligado a matriz do vegetal. A extração sequencial utilizando solventes com diferentes polaridades (n-hexano, acetato de etila, isopropanol, metanol, etanol-água 1:1 (v/v), água) objetivou separar diferentes espécies de Zn. Os teores de Zn extraídos foram: 14,82 mg kg⁻¹ (Alcachofra), 16,82 mg kg⁻¹ (Camomila), 34,09 mg kg⁻¹ (Carqueja), 4,75 mg kg⁻¹ (Sene), correspondentes a 53%, 53%, 44%, e 95% dos respectivos teores totais de Zn nessas plantas. Foi observada que o Zn encontra-se sob no mínimo 4 espécies químicas distintas, e o extrator de maior eficiência é a água.

Palavras-chave: Espectrometria de absorção atômica. Extração sequencial. Plantas medicinais. Zinco.

Abstract

The following research project deals with the development of new analytical procedures aimed at the identification and quantification of the element zinc in different fractions of vegetable drugs used for weight loss, using the high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry in flame. The determination of the levels of zinc was made in an AnalytikJena ContrAA 300 spectrometer in the principal line of Zn at 213.857 nm and wavelength integrated absorbance equal to 3 pixels. Calibration curves were obtained with linear dynamic range from 0.10 to 1.00 mg L⁻¹, correlation coefficient equal to 0.9991 and limit of detection equal to 0.020 mg L⁻¹. The total Zn content in the samples obtained after microwave-assisted acid digestion system were: 28.06 mg kg⁻¹ (Artichoke), 31.49 mg kg⁻¹ (Chamomile), 77.16 mg kg⁻¹ (Gorse), 105.38 mg kg⁻¹ (Horsetail), 32.37 mg kg⁻¹ (Fennel) and 5.00 mg kg⁻¹ (Senna). The extraction in aqueous environment assisted by microwave radiation produced extracts containing: 5.40 mg kg⁻¹ (Artichoke), 10.65 mg kg⁻¹ (Chamomile), 14.83 mg kg⁻¹ (Gorse), 18.90 mg kg⁻¹ (Horsetail), 7.80 mg kg⁻¹ (Fennel), 3.24 mg kg⁻¹ (Senna), corresponding to 19%, 34%, 19%, 18%, 24% and 64% of their total content of Zn, respectively. The amounts of Zn in the extracted samples from some plants indicate that this metal was strongly bounded to the plant's matrix. The sequential extraction using solvents and mixtures with different polarities (n-hexane, ethyl acetate, propanol, methanol, ethanol-water 1:1 (v/v), water) aimed the separation of different Zn containing species and water was considered the most efficient extractor. The Zn contents extracted were: 14.82 mg kg⁻¹ (Artichoke), 16.82 mg kg⁻¹ (Chamomile), 34.09 mg kg⁻¹ (Gorse), 4.75 mg kg⁻¹ (Senna), corresponding to 53% in the first two samples, 44% and 95% for the last two, respectively. It was observed that Zn is found complexed under 4 distinct chemical species.

Keywords: Atomic absorption spectrometry. Sequential extraction. Medicinal plants. Zinc

Lista de Figuras

Figura 1 - Espectroscópio criado por Robert W. Bunsen e Gustav R. Kirchhoff.	14
Figura 2 - Lâmpada de arco curto de xenônio utilizado em HR-CS AAS.	17
Figura 3 - Lâmpada de arco curto de xenônio operando sem (esquerda) e com (direita) o modo “hot-spot”.....	17
Figura 4 - Comparação entre a intensidade de emissão da lâmpada de arco curto de xenônio e da lâmpada de catodo oco.....	18
Figura 5 - Espectro tridimensional (absorbância em função do tempo e comprimento de onda).	19
Figura 6 - Esquema de um espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua. No esquema tem-se: (1) lâmpada de arco curto de Xe; (2) espelhos elipsoidais focalizadores; (3) atomizador (chama ou forno de grafite); (4) fenda de entrada; (5) espelhos parabólicos; (6) prisma; (7) fenda intermediária ajustável; (8) rede echelle; (9) detector CCD.	20
Figura 7 - Espectrômetro de absorção atômica ContrAA 300.	24
Figura 8 - Esquema do sistema extrator Soxhlet.....	27
Figura 9 - Espectro de absorção bidimensional referente a branco analítico. .	30
Figura 10 - Espectro de absorção em tridimensional referente a branco analítico.....	31
Figura 11 - Espectro de absorção bidimensional da alcachofra (em azul) juntamente com o espectro referente a banda de NO (em vermelho).....	32
Figura 12 - Espectro de absorção bidimensional da alcachofra (em azul) juntamente com o espectro referente a banda de OH (em vermelho).....	32
Figura 13 - Espectro de absorção bidimensional da alcachofra após a utilização de correção baseada nos mínimos quadrados.....	33
Figura 14 - Espectro de absorção tridimensional da alcachofra utilizando a correção baseada nos mínimos quadrados.....	33
Figura 15 - Curva analítica para Zn no comprimento de onda 213,857 nm.....	34
Figura 16 - Gráfico da porcentagem de extração de Zn em meio aquoso.....	37
Figura 17 - Porcentagem de extração de Zn utilizando diferentes solventes. .	38

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Programa de aquecimento do forno de micro-ondas empregado para digestão das plantas medicinais.....	25
Tabela 2 - Programa de aquecimento do forno de micro-ondas empregado para extração com água das plantas medicinais.....	26
Tabela 3 - Programa de aquecimento para digestão dos extratos resultantes da extração sequencial.	29
Tabela 4 - Condições experimentais ótimas para determinação de Zn em plantas medicinais por HR – CS – AAS.	30
Tabela 5 - Parâmetros da curva analítica para zinco.....	34
Tabela 6 - Figuras de mérito da linha utilizada por HR-CS AAS.....	35
Tabela 7 - Determinação ($n=3$) de Zn nos materiais de referência.....	35
Tabela 8 - Resultados da determinação ($n=3$) de teores totais de Zn em plantas.....	36
Tabela 9 - Determinação ($n=3$) de Zn em extratos aquosos de plantas medicinais.	36
Tabela 10 - Teores de Zn das plantas nos extratos dos solventes em mg kg^{-1}	38
Tabela 11 - Comparação entre os teores de Zn obtidos na extração sequencial e na digestão ácida.	40

Sumário

1	Introdução.....	10
1.1	Plantas Medicinais	10
1.2	O Zinco	11
1.3	A Espectrometria de Absorção Atômica	13
1.4	Espectrometria de absorção atômica com fonte contínua.....	16
2	OBJETIVOS.....	21
3	Materiais e Métodos	22
3.1	Reagentes e Soluções	22
3.2	Amostras.....	22
3.3	Materiais de Referência	23
3.4	Equipamentos.....	23
3.3	Métodos.....	24
3.3.1	Otimização das condições operacionais	24
3.3.2	Correção de interferência de fundo	25
3.3.3	Digestão das amostras	25
3.3.4	Extração de Zn assistida por micro-ondas em meio aquoso	26
3.3.5	Extração Sequencial utilizando diferentes solventes	27
4	Resultados e Discussão	29
4.1	Otimização das condições operacionais do ContrAA 300	29
4.2	Correção de interferência de fundo	30
4.3	Determinação de teor total de Zn em plantas medicinais.....	34
4.4	Extração de Zn assistida por radiação micro-ondas em meio aquoso	36
4.5	Extração Sequencial utilizando diferente solventes	37
5	Conclusão	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1 Introdução

1.1 Plantas Medicinais

A fitoterapia é o estudo das plantas medicinais e suas aplicações na cura de doenças. O uso de plantas medicinais pelo ser humano remonta desde a antiguidade para a prevenção, tratamento e cura de diversas doenças na forma de chás, extratos ou da própria planta seca (CHASSOT, 1994).

Durante as últimas décadas, o uso da medicina tradicional a base de medicamentos fitoterápicos tem sido crescente, não só em países em desenvolvimento, mas também em países onde a medicina convencional é amplamente utilizada no sistema nacional de saúde. O crescente uso fez com que a eficácia, a segurança e o controle de qualidade desses medicamentos se tornassem preocupações importantes para as autoridades de saúde dos países (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2002, de 65-80% da população mundial utilizava medicamentos tradicionais. Entre as práticas tradicionais destaca-se o uso de plantas medicinais.

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 o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional, o governo federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, por meio do Decreto 5.813, de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2011a). Aos três de maio do 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, 2011b). Esta política de âmbito nacional recomenda que as secretarias de saúde dos estados e dos municípios implementem e programem ações para a melhoria do acesso de plantas medicinal e fitoterápico à população, bem como a programação da segurança alimentar e nutricional.

As plantas medicinais são fontes ricas de nutrientes essenciais biodisponíveis para o ser humano. Por isso, no processo de análise da composição química das plantas medicinais, deve ser levada em conta não só a concentração total dos nutrientes, mas também as suas formas extraíveis utilizando diversos solventes (KONIECZYNSKI; WESOLOWSKI, 2007).

Devido ao consumo cada vez mais frequente de plantas medicinais sob forma de chás ou cápsulas, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os teores de zinco em suas formas químicas que possam estar presentes utilizando a técnica de espectroscopia de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS).

1.2 O Zinco

O zinco é um micronutriente essencial para plantas, tendo um papel importante no crescimento e na maturação da mesma. No solo geralmente o Zn encontra-se na forma de complexos orgânicos solúveis, sendo que a disponibilidade pode ser afetada por diversos fatores como o pH do solo e o uso de fertilizantes fosfatados que podem provocar a deficiência deste micronutriente no solo. Em solos com alto teor de matéria orgânica podem “fixar” o Zn, e solos com alta umidade relacionada a baixas temperaturas podem diminuir temporariamente sua disponibilidade, afetando assim a absorção e nutrição a plantas (ALONSO et al., 2006).

O processo de absorção do Zn pelas plantas ocorre pela raiz em um processo de difusão e depende do gradiente de concentração do micronutriente próximo da raiz (OLIVER; BARBER, 1996). O zinco é absorvido pelas raízes na forma de Zn^{2+} , e transportada das raízes para a parte aérea do xilema na forma de complexos como ácido cítrico e málico (MALAVOLTA, 2006).

O zinco tem baixa estabilidade em quelantes orgânicos, tendo assim baixa concentração no floema, limitando a sua redistribuição pela planta devido a sua pouca mobilidade. Porém, em plantas bem supridas com Zn, a mobilidade deste elemento no floema pode ser aumentada. Neste compartimento da planta, o micronutriente está complexado a compostos de peso molecular entre 1.000 e 5.000, denominadas fitoquelatinas (peptídios de cadeia curta contendo unidades repetidas de glutaminas e cisteínas) (MALAVOLTA, 2006).

A deficiência de Zn pode degradar ou reduzir a síntese do ácido indolacético (AIA) existente na planta, resultando na diminuição do volume celular e menor crescimento apical. Outro fator relacionado a deficiência desse micronutriente e que pode inibir o crescimento da planta é a redução no nível

de RNA, que resulta na diminuição da síntese de proteínas, provoca dificuldades na divisão celular e inibe o crescimento da planta (TAKATSUJI, 1999). Em plantas com deficiência em Zn, há o acúmulo de aminoácidos e diminuição da síntese de proteínas associadas a diminuição do AIA, que afetam a produção de matéria seca (RAYLE; CLELAND, 1992). O Zn também atua na atividade enzimática, no acoplamento da ligação enzima-substrato e a ativação da ribulose 1,5-difosfato carboxilase (presente nos cloroplastos) que afeta significativamente a taxa fotossintética das plantas. Neste caso, a taxa de respiração da planta é reduzida, pois a aldolase, é inibida pela falta do Zn e como consequência a síntese de ATP é reduzida (MALAVOLTA, 2006).

A toxicidade de Zn em plantas é observada pela diminuição da área foliar, seguida de clorose (alteração na coloração das folhas), podendo aparecer um pigmento pardo-avermelhado por toda a planta, que pode ser atribuída a menor teor de clorofila (MALAVOLTA, 2006).

O Zn é o segundo elemento traço (mg kg^{-1}) mais abundante no corpo humano. O organismo humano adulto possui de 1,5 - 2,0 g de Zn, com 90% dessa massa distribuídos em ossos, músculos, fígado e pele. Para homens e mulheres de 19 a 70 anos, recomenda-se a ingestão diária de 11 mg e 8 mg de Zn respectivamente, afim de atender às necessidades nutricionais de um indivíduo saudável. O valor de ingestão diária máxima de Zn que não oferece risco de efeito adverso à saúde é de 40 mg tanto para ambos os sexos na faixa de 19 a 70 anos (COZZOLINO, 2004; YUYAMA *et al.*, 2009).

O Zn é essencial ao organismo humano e é encontrado em vários alimentos do nosso dia-a-dia, como carne, arroz, vegetais, chás (provenientes de plantas) e outros. Esse elemento apresenta funções estruturais que são determinantes na forma e disposição espacial de enzimas e proteínas (algumas destas proteínas ligadas ao DNA), funções enzimáticas, com aproximadamente trezentas enzimas necessitando de Zn para realizar sua ação catalítica, e por fim funções reguladoras, necessárias para sínteses protéicas, replicação de ácidos nucleicos, divisão celular e outros (FRANCO, 1999).

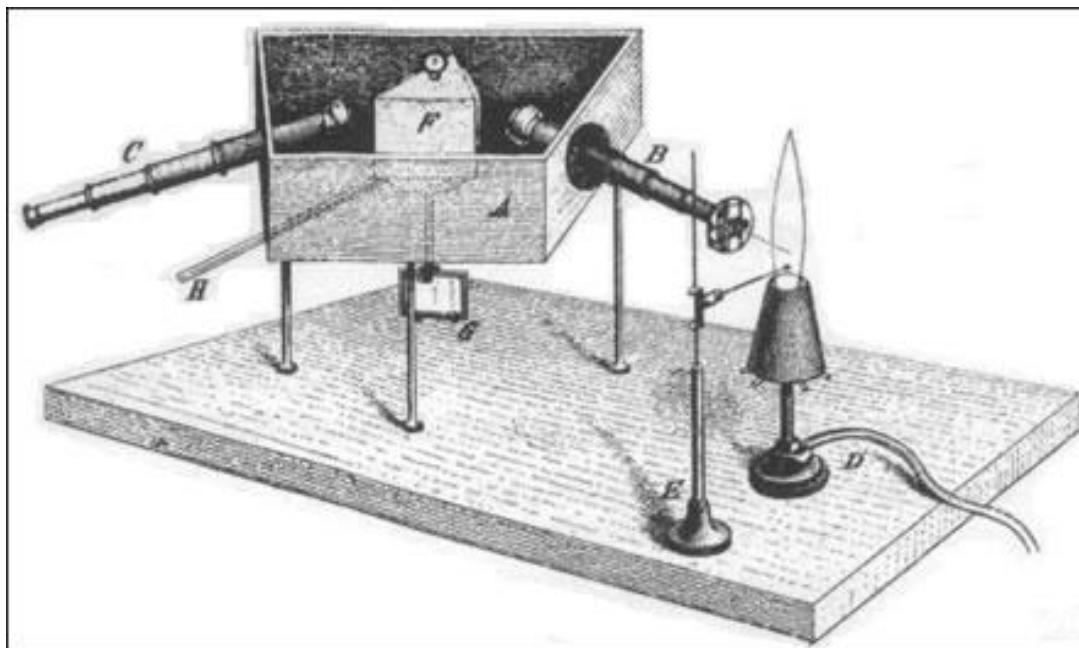
Entre 10 e 40% do teor de Zn ingerido de forma oral é absorvido pelo organismo através do fígado, sendo que esse processo ocorre por difusão no duodeno e jejuno e sua excreção é feita por via urinária. A toxicidade do Zn no organismo provoca vômitos, náusea, cefaléia e deficiência em cobre. A

deficiência deste micronutriente acarreta em retardo no crescimento durante a adolescência, falta de apetite, lesões cutâneas e alterações de comportamento (COZZOLINO, 1997).

1.3 A Espectrometria de Absorção Atômica

A origem da espectrometria teve início em 1648 com Joannes M. Marci, através de alguns experimentos a respeito da origem do arco-íris com base no espalhamento da luz solar nas gotículas d'água (WELZ; SPERLING, 1999). Em 1672, Isaac Newton descreveu a decomposição e recomposição da luz do sol por um prisma. Posteriormente, em 1800, foi descoberta a região do infravermelho pelo inglês Willian Herschel, e em 1801, a região do ultravioleta pelo alemão Johann W. Ritter e o inglês Willian H. Wollaston (FILGUERAS, 1996). Wollaston e Joseph Fraunhofer descobriram a existência de linhas escuras no espectro da luz solar (WELZ; SPERLING, 1999). Pouco tempo depois, em 1859, Robert W. Bunsen e Gustav R. Kirchhoff construíram um espectroscópio (Figura 1), um aparelho no qual poderiam observar as linhas de emissão de elementos químicos excitados em uma chama não luminosa (queimador de Bunsen). Dessa forma, Bunsen e Kirchhoff estabeleceram o princípio de absorção, a partir de estudos de linhas de espectros de metais alcalinos e alcalino-terrosos (FILGUERAS, 1996).

Figura 1 - Espectroscópio criado por Robert W. Bunsen e Gustav R. Kirchhoff.



FONTE: (FILGUERAS, 1996).

Em 1860 Kirchhoff estabeleceu a seguinte lei, que é o princípio fundamental da espectrometria de absorção atômica: “Em condições especiais, todos os corpos podem absorver radiações que eles são capazes de emitir”. Ou seja, quando um átomo é excitado no estado fundamental, ele só absorve radiações de comprimento de onda que são produzidas por eles mesmos (WELZ, et al., 2003). Porém, a técnica de absorção atômica não foi muito desenvolvida durante os anos seguintes. Em 1955, o físico Alan Walsh desenvolveu a técnica de espectrometria de absorção atômica em chama para a determinação de metais. Walsh observou que átomos gerados em uma chama, permaneciam no estado fundamental, pois a chama não fornecia energia suficiente para promover os elétrons para níveis de energia superiores. Dessa forma, os átomos no estado fundamental poderiam absorver radiação de uma fonte primária, e a quantificação da atenuação da radiação poderia ser usada para a determinação de alguns elementos (WALSH, 1995).

Os primeiros equipamentos montados possuíam uma chama para atomização, uma lâmpada de cátodo oco como fonte de radiação específica para cada elemento, um monocromador para seleção do comprimento de onda que é emitida pela fonte de radiação e incide na amostra atomizada e um detector que transforma a energia da radiação não absorvida em sinal elétrico. Amos e Willis propuseram a utilização de chama óxido nitroso-acetileno de

características redutoras, com temperatura máxima igual a 2850 °C, permitindo um crescimento expressivo na produção de espectrômetros de absorção atômica. Esse tipo de chama é utilizado na determinação de metais que possuem tendência a formar óxidos refratários, e de difícil atomização em chama ar-acetileno, com temperatura máxima igual a 2250 °C (AMOS; WILLIS, 1966).

Walsh propôs inicialmente a utilização de uma fonte contínua de radiação que, devido a resultados insatisfatórios como a baixa sensibilidade, a necessidade de um monocromador de alta resolução e um melhor detector na quantificação de metais. Devido a essas limitações as lâmpadas de cátodo oco (HCL) como fonte de radiação (fonte de linhas). Estas lâmpadas foram primeiramente empregadas por Louis Karl Heinrich Friedrich Paschen em 1916, porém nessa ocasião, algumas dificuldades de operação foram apresentadas, como a necessidade de uma atmosfera de argônio de 1 KPa que deveria ser continuamente bombardeada. As HCLs, desenvolvidas por Walsh e colaboradores, eram constituídas de cela de vidro seladas com janela de quartzo (LOWE; SULLIVAN, 1999).

Com a utilização das HCLs como fonte discreta, não era necessário o uso de monocromadores de alta resolução, e os resultados obtidos apresentaram limites de detecção ótimos, alta sensibilidade e seletividade para determinação de elementos traço (LOWE; SULLIVAN, 1999).

Uma desvantagem de se utilizar fonte discreta em AAS é a necessidade da utilização de uma lâmpada para cada elemento. Desde o princípio, não foi esquecida a ideia da utilização da fonte contínua como fonte primária de radiação. A utilização da espectrometria de absorção atômica com fonte contínua possibilita somente uma lâmpada para a determinação de todos os elementos na faixa de 190 – 850 nm. (WELZ; SPERLING, 1999).

A larga banda de emissão da fonte contínua necessita de um monocromador e um detector de alta resolução, para que seja selecionada uma estreita faixa da banda emitida pela lâmpada. Em uma lâmpada de cátodo oco ocorre a emissão de linhas monocromatizadas do espectro luminoso, sendo que essas linhas emitidas são mais estreitas que o perfil de absorção da espécie que está sendo analisada e do passo óptico do monocromador. Assim, a função monocromador é somente isolar a linha espectral desejada, não importando a natureza monocromática da radiação emitida pela lâmpada.

Porém, quando utilizada a fonte contínua, toda a região do passo óptico do monocromador será irradiada, sendo que a medida de absorvância irá compreender uma região muito larga de comprimento de onda. Isto resulta na diminuição de sensibilidade e seletividade, curvas analíticas não lineares e limites de detecção e quantificação mais elevados em comparação ao uso da fonte discreta. Assim, o monocromador de alta resolução é de suma importância para um melhor desempenho analítico do instrumento, quando se utiliza AAS com fonte contínua (HEITMANN et al., 1996, AMORIN et al., 2008).

1.4 Espectrometria de absorção atômica com fonte contínua

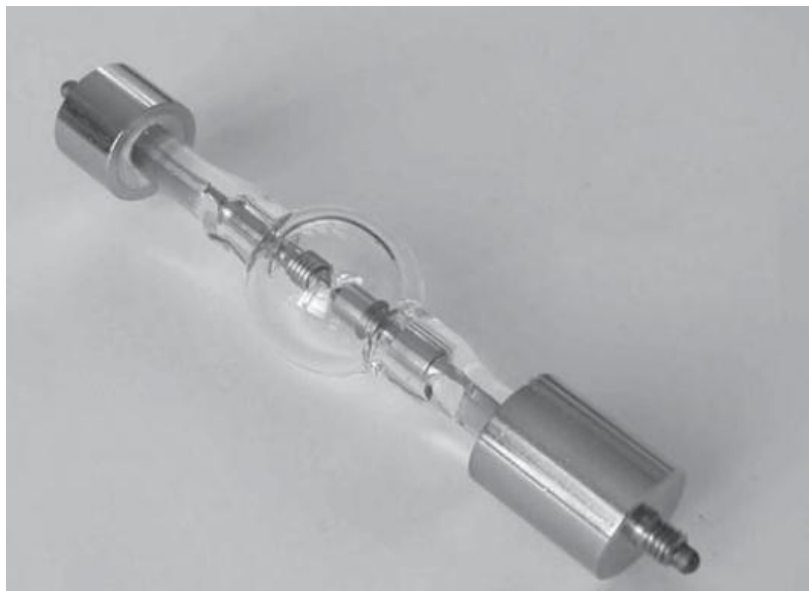
Várias tentativas de construção de um espectrômetro de absorção atômica multi-elementar foram realizadas, utilizando arranjo de lâmpadas de cátodo oco ou descarga sem eletrodo (EDL), mono ou policromadores, atomizadores de chama e detectores convencionais. Mas esses instrumentos apresentaram limitações quanto a determinação de elementos e baixa sensibilidade. A utilização de espectrômetro equipado com duas lâmpadas de cátodo oco multielementares (ALDOUS et al., 1975) apresentou desempenho inferior à equipamentos convencionais (HARNLY, 1998).

A busca de soluções para determinação multi-elementar simultânea e a competição com técnicas espectrométrica envolvendo plasma, fez com que as atenções dos pesquisadores se voltassem novamente para o uso de fontes de radiação contínua. Com a utilização de monocromadores de média resolução e fonte contínua obtinha-se largura da banda de emissão muito maior que as obtidas com fonte de linha. Esta largura da banda resulta na diminuição da sensibilidade e especificidade, curvas de calibração não lineares e susceptibilidade de interferência de radiação de fundo (BOAR, 1989).

Em 1976, O'Haver e colaboradores desenvolveram monocromadores de alta resolução, como o monocromador *Littrow* acoplado a uma rede de difração *echelle* para obter linhas de emissão mais estreitas utilizando fonte contínua. A fonte de radiação utilizada foi uma lâmpada de arco curto de xenônio (Figura 2). Porém, esta lâmpada é significativamente menos intensa do que uma HCL e com a utilização de um monocromador de alta resolução, a intensidade transmitida é reduzida (HARNLY et al., 1984). Para solucionar esse problema foi desenvolvida uma lâmpada de arco curto de Xe que opera no modo “*hot-*

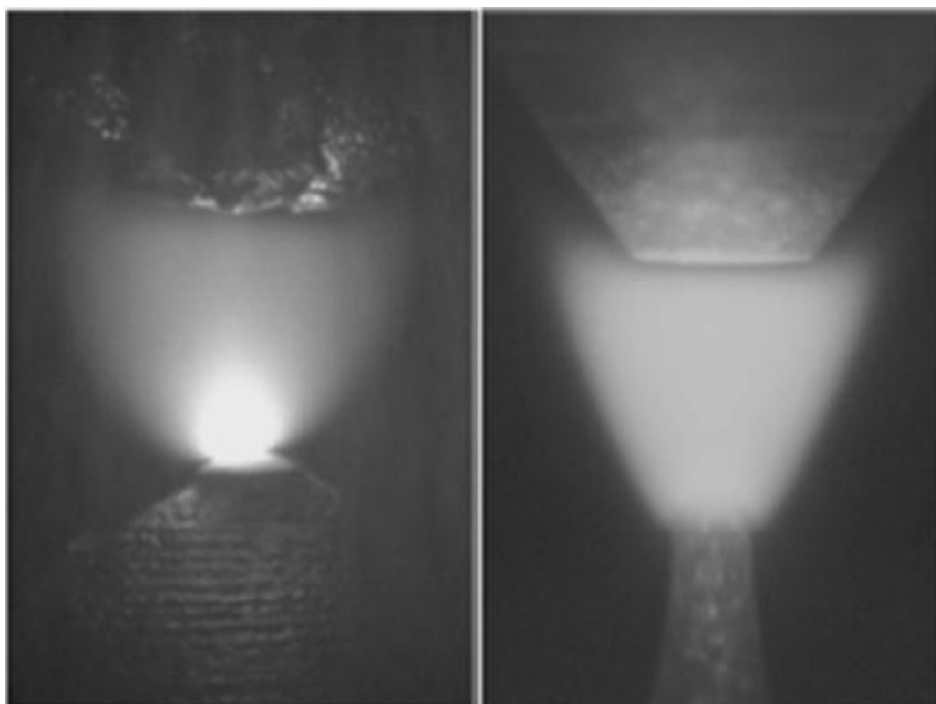
spot (Figura 3), que possui uma maior potência da intensidade e emissão até três ordens de grandeza maior do que as lâmpadas utilizadas tradicionalmente em AAS (WELZ et al., 2003), vide Figura 4.

Figura 2 - Lâmpada de arco curto de xenônio utilizado em HR-CS AAS.



Fonte: (WELZ et al., 2005).

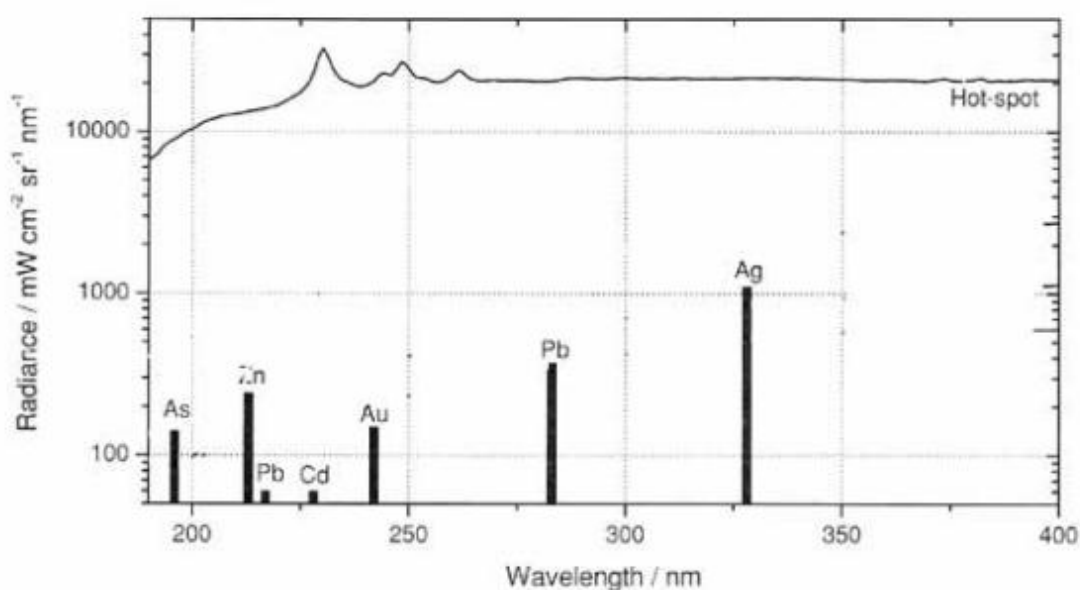
Figura 3 - Lâmpada de arco curto de xenônio operando sem (esquerda) e com (direita) o modo "hot-spot".



Fonte: (WELZ et al., 2005).

A faixa de emissão da lâmpada de arco curto de xenônio operando no modo “*hot-spot*” abrange desde o intervalo de comprimento de onda entre 190 nm e 850 nm. Apesar da instabilidade dos arcos das lâmpadas, um sistema controlado por um computador ajusta o seu posicionamento movendo um espelho, garantindo assim que o feixe de radiação emitida esteja sempre incidindo no centro do atomizador, logo, na fenda de entrada do monocromador (WELZ et al., 2005).

Figura 4 - Comparação entre a intensidade de emissão da lâmpada de arco curto de xenônio e da lâmpada de catodo oco.



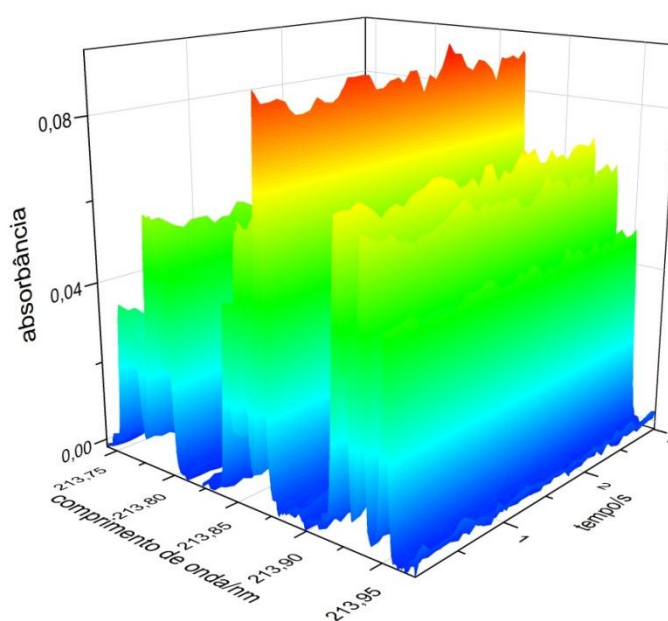
Fonte: (WELZ et al., 2005).

A radiação incidente, após passagem pelo volume de absorção, é dirigida ao monocromador duplo de alta resolução denominado DEMON (*Double-Echelle Monochromator*), que incide em um prisma e uma rede de difração *echelle*, em arranjo *Littrow*. O prisma seleciona parte do espectro de interesse, enquanto que o monocromador *echelle* fornece a alta resolução do intervalo espectral selecionado, que é menor ou igual a 2 pm por *pixel* (unidade fotossensível do detector) a 200 nm. Assim, o comprimento de onda de interesse é selecionado pela rotação para posições pré-ajustadas pela ação motores de passo, sobre os quais do prisma e da rede de difração estão fixados (WELZ et al., 2005; HEITMANN et al., 1996).

Foi desenvolvido um sistema ativo de estabilização de comprimentos de onda, com o uso de uma lâmpada de Ne interna posicionada em frente a fenda intermediária, que emite várias linhas relativamente estreitas. Essas linhas são separadas pela rede de difração *echelle* em várias ordens sobrepostas. Isto implica no fato de que para cada posição da rede de difração há pelo menos uma linha de Ne que irá atingir o detector. Cada linha é atribuída a um pixel correspondente no detector e este sistema é usado para estabilização do comprimento de onda do analito (WELZ et al., 2005; HEITMANN et al., 1996; WELZ et al., 2003).

A radiação resolvida pelo monocromador atinge o detector constituído por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD). Esse detector é similar aos dispositivos utilizados em câmeras fotográficas digitais com 512 pixels. Para cada pixel há um amplificador individual, dos quais 200 são utilizados para propósitos analíticos. Com isso, todo o ambiente espectral próximo à linha analítica se torna visível, fornecendo uma série de informações não disponíveis por instrumentos convencionais. A avaliação da absorbância em relação ao tempo e comprimento de onda é possível utilizando esse detector (Figura 5) (WELZ et al., 2005).

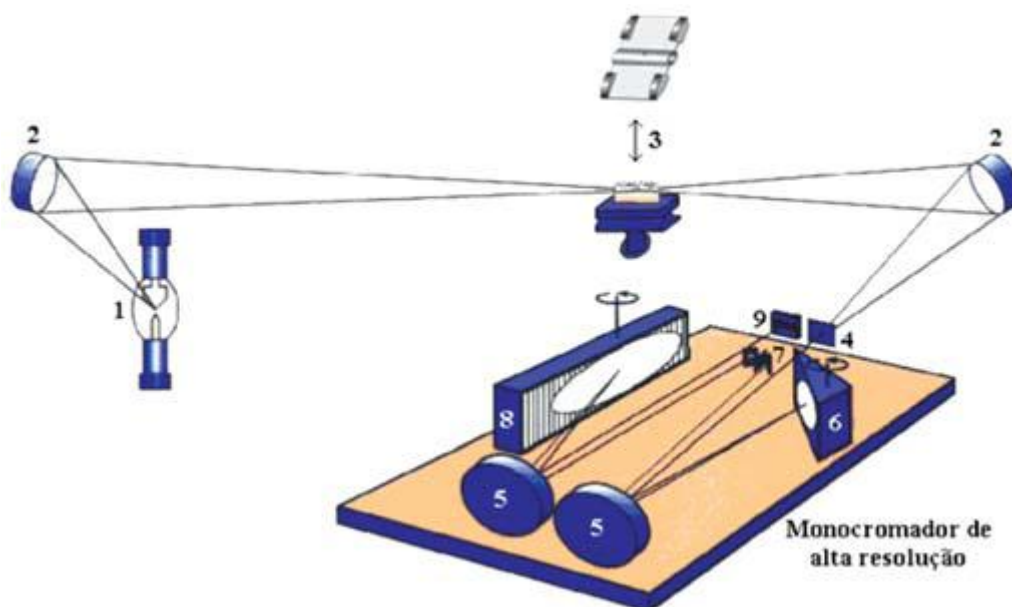
Figura 5 - Espectro tridimensional (absorbância em função do tempo e comprimento de onda).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 6 mostra uma representação esquemática de um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. Uma das principais vantagens desse equipamento é a possibilidade da visualização de fundos espectrais próximos à linha analítica de interesse permitindo a correção empregando o software do equipamento ou através da subtração de um espectro de referência (GALLINDO et al., 2005).

Figura 6 - Esquema de um espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua. No esquema tem-se: (1) lâmpada de arco curto de Xe; (2) espelhos elipsoidais focalizadores; (3) atomizador (chama ou forno de grafite); (4) fenda de entrada; (5) espelhos parabólicos; (6) prisma; (7) fenda intermediária ajustável; (8) rede echelle; (9) detector CCD.



Fonte: (LAZARO, 2009).

2 OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho são:

a) avaliar o desempenho da linha principal no ajuste de sensibilidade para Zn;

b) avaliar diferentes extratores como n-hexano, acetato de etila, 2-propanol, metanol, etanol-H₂O (1:1, v/v), água visando à extração seqüencial de Zn em plantas medicinais com posterior determinação por HR CS AAS;

c) desenvolver método analítico estabelecendo as principais figuras de mérito e aplicar na determinação no teor total Zn nas espécies Cavalinha (*Equisetum arvense*), Alcachofra (*Cynara scolymus*), Carqueja Amarga (*Baccharis trimera*), Camomila (*Chamomilla recutita*), Sene (*Cassia angustifolia*), Erva-doce (*Pimpinella anisum*) e nos seus respectivos extratos.

3 Materiais e Métodos

Todo o material utilizado durante o desenvolvimento da pesquisa foram descontaminados em banho de HNO₃ 10% (v/v) por 48 horas e lavados posteriormente com água deionizada.

3.1 Reagentes e Soluções

As soluções foram preparadas usando água de alta pureza (resistividade 18,2 MΩ cm) obtidas a partir de um sistema de osmose reversa Millipore Rios 5[®] e desionizador Millipore Milli-Q academic[®].

Ácido nítrico (v/v) (Spectrum Chemical[®], NJ, EUA), peróxido de hidrogênio 30% (Merck, Darmstadt, Alemanha) de alta pureza, foram utilizados no preparo das curvas analíticas e na digestão das amostras.

Solução estoque de zinco contendo 100 mg L⁻¹ Zn foi preparada a partir de padrão espectroscópico Chemis[®] por diluição do conteúdo das ampolas em balões volumétricos de 25 mL.

Soluções analíticas de referência contendo 0,1 – 1,0 mg L⁻¹ Zn foram preparadas por diluição apropriada das respectivas soluções estoque em meio de 1% (v/v) HNO₃.

As soluções estoque foram armazenadas em frascos de polipropileno de alta densidade e mantidas sob refrigeração.

3.2 Amostras

Para o desenvolvimento deste projeto, as amostras comerciais plantas Alcachofra (*Cynara scolymus*), Camomila (*Chamomilla recutita*), Carqueja Amarga (*Baccharis trimera*), Cavalinha (*Equisetum arvense*), Erva-doce (*Pimpinella anisum*) e Sene (*Cassia angustifolia*) foram adquiridas na Casa de Ervas São Francisco em Araraquara – SP.

3.3 Materiais de Referência

Materiais de referência certificados para folhas do *National Institute of Standards and Technology* (1515) *Apple Leaves*, (1575a) *Pine Needles* e (1573a) *Tomato Leaves* foram utilizados para avaliar a exatidão do método.

3.4 Equipamentos

Para secagem e moagem das amostras de plantas medicinais utilizou-se uma estufa de circulação e renovação de ar Tecnal TE-394/2 e um moinho de facas Tecnal tipo Wiley TE 340 com peneira de abertura de aproximadamente 0,84 mm (20 mesh).

As digestões das plantas foram feitas com o auxílio de um forno Microondas Anton Paar Multiwave[®] 3000 de 48 posições equipado com frascos de polietileno com capacidade de 25 mL.

As medidas de absorbâncias foram feitas com um espectrômetro de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução AnalytikJena modelo contrAA 300 (Figura 7) equipado com lâmpada GLE (Berlin, Alemanha) de arco curto de xenônio, operante no modo “*hot spot*”, com fonte de radiação contínua e queimador de 100 mm.

Figura 7 - Espectrômetro de absorção atômica ContrAA 300.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Outros equipamentos e materiais utilizados foram balança analítica Bel Mark 210 A (Bel Engineering®) e BL 210S (Sartorius), as micropipetas LabMate® (100 -1000 µL), TediaPet® (1-5mL) e Boeco (10 – 100 µL), além de materiais volumétricos.

3.3 Métodos

3.3.1 Otimização das condições operacionais

Para serem feitas as leituras de absorvância de todas as soluções, foi realizado a otimização das melhores condições operacionais do equipamento, tais como, a altura do queimador e vazão de gás ar/acetileno. A otimização foi feita automaticamente utilizando uma solução padrão de 0,6 mg L⁻¹ Zn.

3.3.2 Correção de interferência de fundo

Para realizar a correção de fundo, foi utilizado um espectro base do branco analítico aplicando o método de correção baseado nos mínimos quadrados.

3.3.3 Digestão das amostras

As plantas foram secas na estufa durante 72 horas, a uma temperatura de 40°C. A moagem dessas plantas foi feita utilizando um moinho de facas. Posteriormente pesou-se em um frasco próprio para digestão em micro-ondas aproximadamente 0,2 g de cada planta numa balança analítica. Em cada frasco foi adicionado 2 mL de H₂O deionizada, 3 mL de HNO₃ e 1 mL de H₂O₂. A digestão das amostras por micro-ondas foi realizada utilizando o programa descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Programa de aquecimento do forno de micro-ondas empregado para digestão das plantas medicinais.

Etapa	Potência Inicial (W)	Potência Final (W)	Rampa de aquecimento (° C min⁻¹)	Tempo de permanência (min)
1	0	500	8	5
2	500	1000	10	10
3	1000	0	-	15

Fonte: Elaborado pelo autor.

As soluções foram transferidas para balões volumétricos e os volumes foram completados até 20 mL. Em seguida foram feitas as determinações de Zn nos digeridos das amostras por HR-CS AAS no comprimento de onda principal (213,857 nm).

3.3.4 Extração de Zn assistida por micro-ondas em meio aquoso

Pesou-se aproximadamente 1,0 g das plantas secas e moídas em um frasco próprio para digestão em micro-ondas, e adicionou-se 10 mL de H₂O deionizada. O programa de aquecimento utilizado está descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Programa de aquecimento do forno de micro-ondas empregado para extração com água das plantas medicinais.

Etapa	Temperatura	Rampa de aquecimento (°C min ⁻¹)	Tempo de permanência (min)
1	100	5	20
2	0	-	8

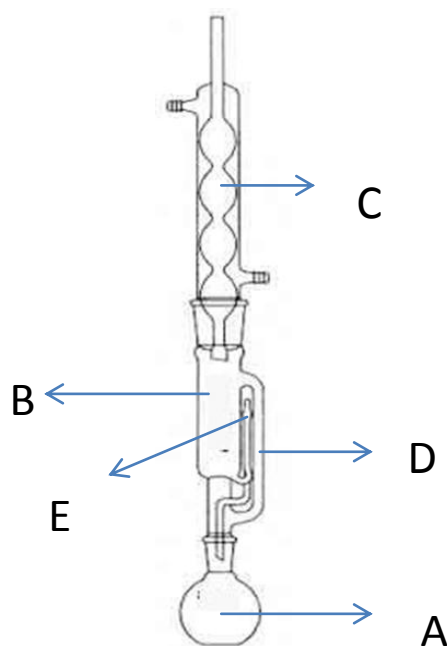
Fonte: Elaborado pelo autor.

As soluções foram transferidas para balões volumétricos e volumes foram completados até 50 mL. Em seguida foram feitas as determinações de Zn nos extratos das amostras por HR-CS AAS no comprimento de onda principal (213,857 nm).

3.3.5 Extração Sequencial utilizando diferentes solventes

A extração foi feita em um sistema extrator Soxhlet. O esquema montado de um sistema extrator Soxhlet é ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema do sistema extrator Soxhlet.



Cerca de 150 mL do solvente a ser utilizado é colocado no balão A. Para evitar uma ebulição tumultuosa, foi colocado neste mesmo balão pedras de ebulição (porcelana).

Pesou-se aproximadamente 1,0 g das plantas secas e moídas, em um cartucho de papel de filtro confeccionado manualmente, de forma que ela fosse devidamente alocada em B. Foram adicionadas algumas “baguetas” de vidro de aproximadamente 1 cm de comprimento e 10 mm de diâmetro no tubo B, para assegurar que o cartucho ficasse retido de forma rígida neste compartimento, e também para aumentar a área de contato do solvente com o cartucho, possibilitando uma extração com um menor volume de solvente.

Uma manta de aquecimento era colocada sob o balão A, e todo o sistema era fixado firmemente usando garras metálicas e um suporte. O condensador C era ligado a uma torneira, por meio de mangueiras de látex, para a circulação de água.

O funcionamento do sistema ocorre como descrito: a manta de aquecimento é ligada, aquecendo o solvente do balão A. Quando o solvente chega à temperatura de ebulição, ocorre a vaporização do solvente. O vapor do solvente sobe pelo tubo lateral D até o condensador C onde a temperatura é menor que a temperatura de ebulição do solvente, o vapor condensa e goteja sobre o cartucho contendo a amostra no tubo B, promovendo a extração das biomoléculas. O solvente condensado vai lentamente enchendo o tubo B e o tubo lateral E, ao passo que, o nível de solvente fica igual nos dois tubos. Quando o tubo E é preenchido até a curvatura, ocorre o refluxo, e o solvente volta ao balão A pelo tubo lateral E, arrastando as espécies extraídas.

Este processo é repetido várias vezes, sendo que o vapor do solvente extrator sobe sempre puro, enquanto que as espécies extraídas ficam no balão A. A operacionalização desse processo foi mantido por aproximadamente 5 horas.

Após o solvente atingir a temperatura ambiente, este era transferido para outro balão de fundo redondo e tampado com filme plástico para evitar possíveis contaminações. As lavagens com pequenas porções do mesmo solvente da extração foram feitas no balão, para remoção de todas as substâncias extraídas que pudessem ficar aderidas nas paredes do balão e nas pedras de ebulição. Uma nova extração era iniciada com outro solvente seguindo o procedimento apresentado anteriormente. Para cada etapa de extração foram utilizadas alíquotas de 150 mL do solvente extrator.

Posteriormente os solventes armazenados no balão eram evaporados, para retirar os resíduos contendo o analito de interesse que ficavam retidos no fundo do balão, foram adicionados 1 mL de H_2O , 1 mL HNO_3 e 1 mL H_2O_2 e colocados em um banho de ultra-som por aproximadamente 10 minutos com constante agitação do balão afim de solubilizar todo o resíduo. Decorrido todo esse tempo a solução foi transferida para um frasco de micro-ondas. Repetiu-se duas vezes o procedimento anterior, mas sem a adição de H_2O_2 .

Foi feito um branco analítico do extrato, para descontar possíveis incrementos de Zn provenientes do solvente, do papel de filtro. O mesmo procedimento anterior foi feito para o branco, utilizando os mesmos materiais, porém sem a presença da amostra.

O resíduo remanescente da extração foi seco em estufa a 40 °C por 24 horas, e em seguida colocadas em dessecador, para que atingisse a temperatura ambiente e evitar contato com a umidade do ar. Pesou-se 0,2 g

desse resíduo em frascos próprios para digestão em micro-ondas e adicionou-se 2 mL de H₂O, 3 mL de HNO₃ 70% e 1 mL de H₂O₂ procedendo-se então a digestão.

As digestões dos extratos feitas em micro-ondas utilizaram o programa de aquecimento descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Programa de aquecimento para digestão dos extratos resultantes da extração sequencial.

Etapa	Potência Inicial (W)	Potência Final (W)	Rampa de aquecimento (°C min⁻¹)	Tempo de permanência (min)
1	0	250	8	5
2	250	500	10	10
3	500	0	-	15

Fonte: Elaborado pelo autor.

As soluções digeridas eram transferidas para balões volumétricos de 20 mL, avolumadas com água deionizada. Posteriormente foram feitas as determinações de Zn dos digeridos.

4 Resultados e Discussão

4.1 Otimização das condições operacionais do ContrAA 300

Inicialmente foram otimizadas as condições do equipamento, como a altura de observação (queimador), fluxo de gases (acetileno – ar). O teste envolveu o monitoramento da absorbância produzida por uma solução 0,6 mg L⁻¹ de Zn medida em 213,857 nm. A variação da altura do queimador foi feita automaticamente pelo programa do equipamento e compreende a distância ótima entre o feixe de radiação (fixo) e a base do queimador (móvel) que produz a máxima absorbância. Posteriormente foram realizados testes para verificar qual o melhor fluxo da mistura de gases ar – acetileno a ser utilizado. Este teste consiste na variação da vazão do fluxo dos gases utilizados para se

obter a melhor absorbância. As melhores condições podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições experimentais ótimas para determinação de Zn em plantas medicinais por HR – CS – AAS.

Elemento	Altura do queimador (mm)	Acetileno L/h	Ar L/h	Tipo de queimador (mm)
Zn	6	40	155	100

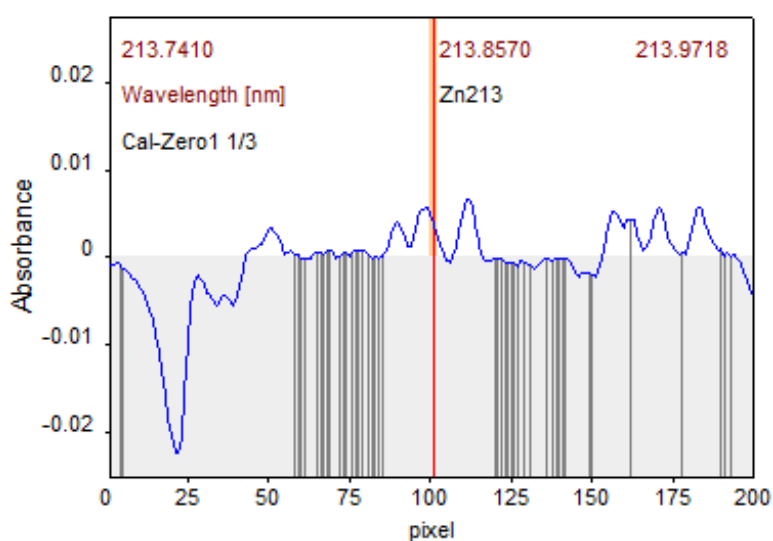
Fonte: Elaborado pelo autor.

A mistura ar-acetileno de alta pureza (acetileno 99,7% - Air Liquide, Sertãozinho-SP, Brasil) foi utilizada para produzir a chama para atomizar o Zn. A taxa de aspiração da amostra foi de 5 mL/min.

4.2 Correção de interferência de fundo

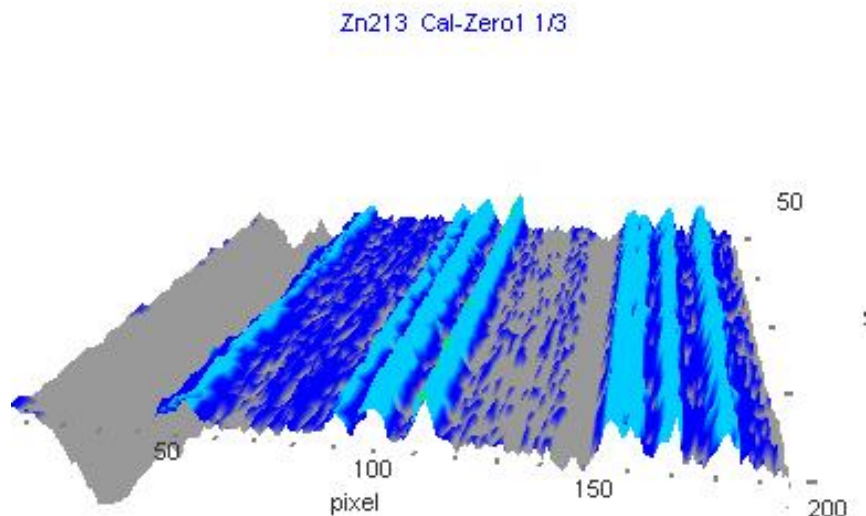
Ao início das medidas de absorbância, observou-se que os brancos analíticos apresentavam um valor de absorbância relativamente alto. Os espectros de absorção em 2D e 3D referentes aos brancos analíticos são apresentados nas Figuras 9 e 10.

Figura 9 - Espectro de absorção bidimensional referente a branco analítico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

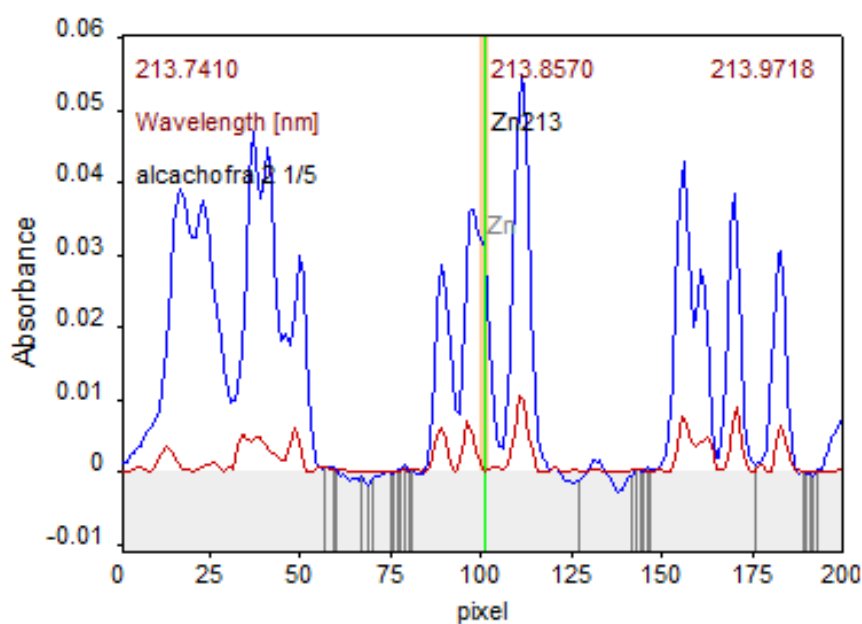
Figura 10 - Espectro de absorção em tridimensional referente a branco analítico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

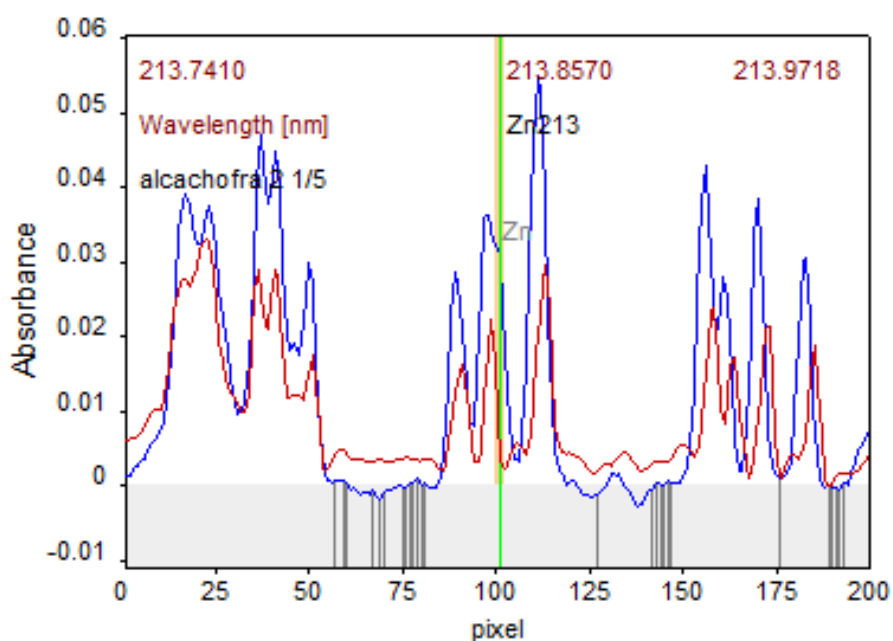
As interferências observadas são provenientes das bandas de NO e OH, provenientes da utilização de ácido nítrico empregado no preparo das soluções padrões e das amostras. Essas interferências podem ocasionar um aumento no sinal analítico do Zn, levando a erros positivos na concentração do analito presente na amostra. Os espectros referentes as bandas de NO e OH estão ilustrados nas Figuras 11 e 12 juntamente com um espectro de absorção referente a amostra de alcachofra.

Figura 11 - Espectro de absorção bidimensional da alcachofra (em azul) juntamente com o espectro referente a banda de NO (em vermelho).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 12 - Espectro de absorção bidimensional da alcachofra (em azul) juntamente com o espectro referente a banda de OH (em vermelho).

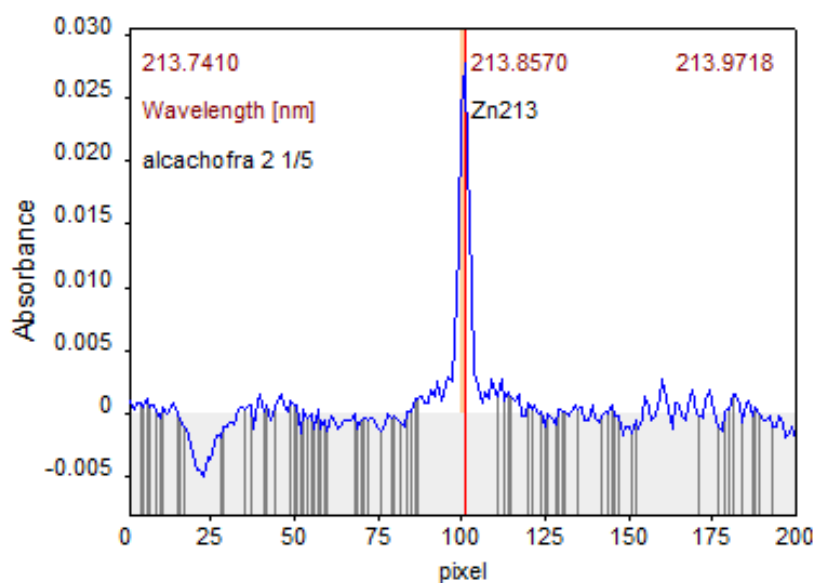


Fonte: Elaborado pelo autor.

Aplicando o método de correção baseado nos mínimos quadrados, utilizou-se uma solução de referência contendo os mesmos volumes usados

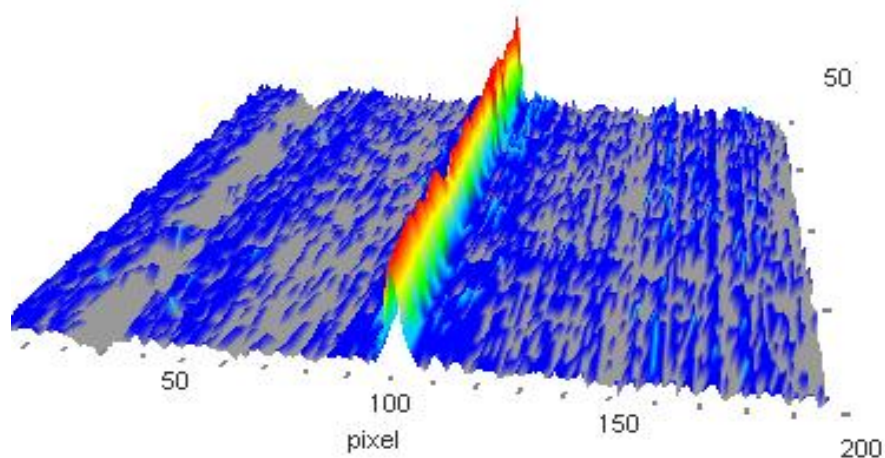
para digestão de uma amostra, porém sem a presença do analito proveniente da amostra, obtendo-se assim um espectro base. A subtração do espectro base do espectro de uma amostra possibilita a remoção dos interferentes, obtendo-se os espectros ilustrados nas Figuras 13 e 14.

Figura 13 - Espectro de absorção bidimensional da alcachofra após a utilização de correção baseada nos mínimos quadrados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 - Espectro de absorção tridimensional da alcachofra utilizando a correção baseada nos mínimos quadrados.

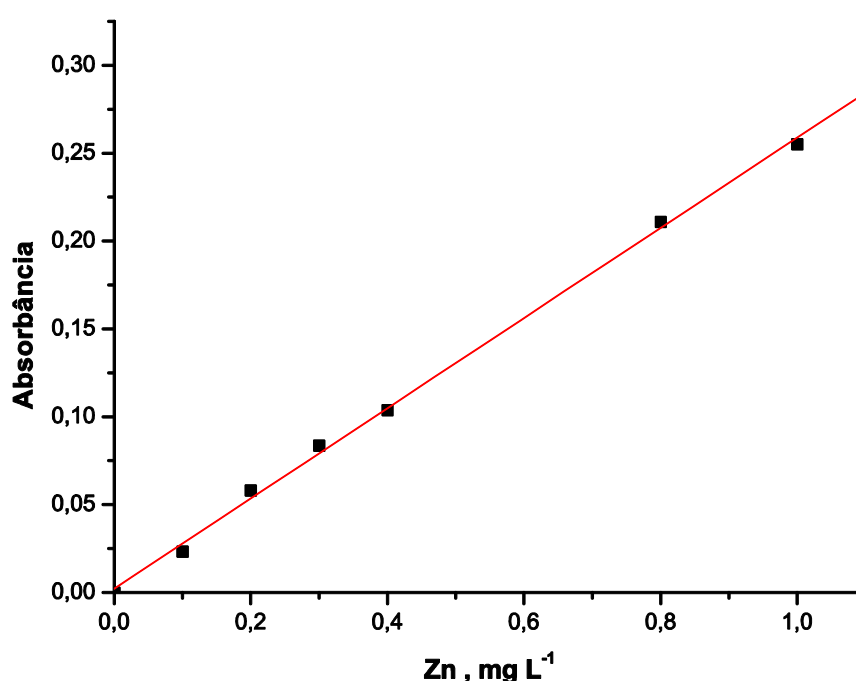


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Determinação de teor total de Zn em plantas medicinais

Com o sistema de correção de fundo e as condições operacionais otimizadas, foi construída a curva analítica de 0,1 – 1,0 mg L⁻¹ (Figura 15) utilizando o sinal analítico obtido pela integração da área referente a 3 pixels do espectro de absorção no comprimento de onda principal do Zn, os parâmetros da curva são apresentados na Tabela 5.

Figura 15 - Curva analítica para Zn no comprimento de onda 213,857 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 - Parâmetros da curva analítica para zinco.

Comprimento de onda (nm)	Equação da reta	%RSD	Coefficiente de correlação
213,857	$A=2,36 \times 10^{-3} + 0,257 \times C$	2,0	0,99914

Fonte: Elaborado pelo autor.

Através da curva analítica foram estabelecidas as principais figuras de mérito como intervalo linear, sensibilidade (b), coeficiente de correlação (R), concentração característica (C_0), limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) que estão compilados na Tabela 6.

Tabela 6 - Figuras de mérito da linha utilizada por HR-CS AAS.

Elemento	Linha Atômica (nm)	Intervalo linear (mg L ⁻¹)	Sensibilidade (mg ⁻¹ L)	C_0 (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Zn	213,857	0,1–1,0	0,257	0,017	0,019	0,062

Fonte: Elaborado pelo autor.

Determinada as figuras de mérito da curva analítica, a exatidão do método foi avaliada utilizando três materiais de referência certificados. Os resultados obtidos (Tabela 7) revelam concordância entre os valores obtidos e certificados ao nível de 95% de confiança (teste t-Student)

Tabela 7 - Determinação ($n=3$) de Zn nos materiais de referência.

Material certificado	[Zn] mg kg ⁻¹ obtidos	[Zn] mg kg ⁻¹ certificado
1575a <i>Pine Needles</i>	37,5 ± 0,8	38,0 ± 2,0
1515 <i>Apple Leaves</i>	11,7 ± 0,5	12,5 ± 0,1
1573a <i>Tomato Leaves</i>	32,6 ± 1,2	30,9 ± 0,7

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os teores de Zn obtidos nas 6 plantas medicinais voltadas para o emagrecimento (Tabela 8) variaram de 7,0 - 105,4 mg kg⁻¹. Devido a altas concentrações de Zn em algumas plantas, como a Cavalinha e Carqueja, foram feitas diluições para que as concentrações dessas plantas se situassem no intervalo linear da curva analítica.

Tabela 8 - Resultados da determinação ($n=3$) de teores totais de Zn em plantas.

Planta medicinal	[Zn] mg kg ⁻¹
Alcachofra	28,0 ± 0,7
Camomila	31,5 ± 1,1
Carqueja Amarga	77,2 ± 1,9
Cavalinha	105,4 ± 4,6
Erva-doce	32,3 ± 0,6
Sene	5,0 ± 0,4

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Extração de Zn assistida por radiação micro-ondas em meio aquoso

Nesse procedimento, foi avaliado a eficiência de extração assistida por radiação micro-ondas de Zn em amostras de 6 plantas voltadas para o emagrecimento. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 9.

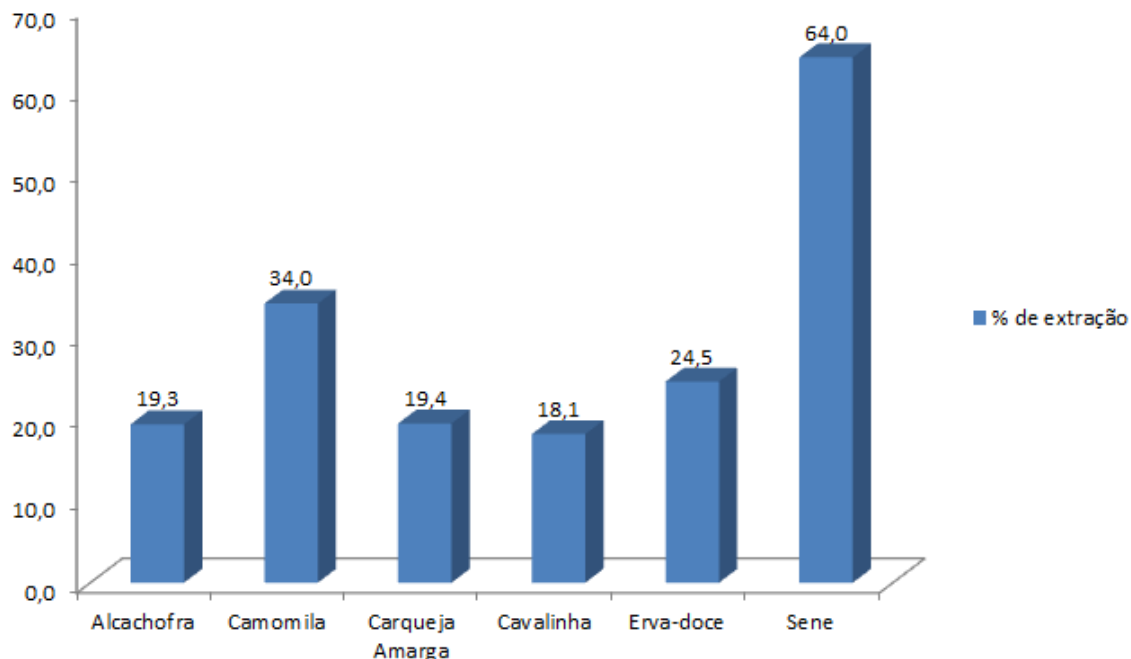
Tabela 9 - Determinação ($n=3$) de Zn em extratos aquosos de plantas medicinais.

Planta Medicinal	[Zn] mg kg ⁻¹
Alcachofra	5,4 ± 0,4
Camomila	10,7 ± 0,3
Carqueja Amarga	15,0 ± 0,2
Cavalinha	19,1 ± 0,2
Erva-doce	7,9 ± 0,2
Sene	3,2 ± 0,1

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os baixos teores solúveis de Zn encontrados nas plantas sugere que este elemento deve estar ligado fortemente a matriz desses vegetais, ou complexados a metalotioninas. Na Figura 16 é ilustrada a porcentagem do teor de Zn extraído em água em relação ao teor total.

Figura 16 - Gráfico da porcentagem de extração de Zn em meio aquoso.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se que apesar dos teores extraídos em meio aquoso são baixos, mas a planta Sene apresentou uma extração de 64,0% utilizando água em comparação ao teor total de zinco encontrada nesta planta. Isto sugere a presença deste metal em sua forma livre, ou complexado a proteínas de alto peso molecular que são facilmente extraídos em meio aquoso.

4.5 Extração Sequencial utilizando diferente solventes

Nesse procedimento de extração sequencial foram analisadas as diferentes espécies de Zn encontradas na planta utilizando solventes de polaridade crescente. A extração era iniciada com o solvente n-hexano, de menor polaridade, sendo posteriormente trocado pelo acetato de etila, isopropanol, metanol, etanol-água (1:1 v/v) e finalmente a água de maior polaridade. Para descontar os aumentos dos teores de Zn nos extratos, proveniente dos solventes ou do papel de filtro foi usado os valores do branco analítico. Na Tabela 11 são apresentados os teores de Zn encontradas nos extratos de cada solvente, e nos resíduos que possuem espécies químicas que não foram extraídos, na Figura 17 está ilustrada a porcentagem extraída para

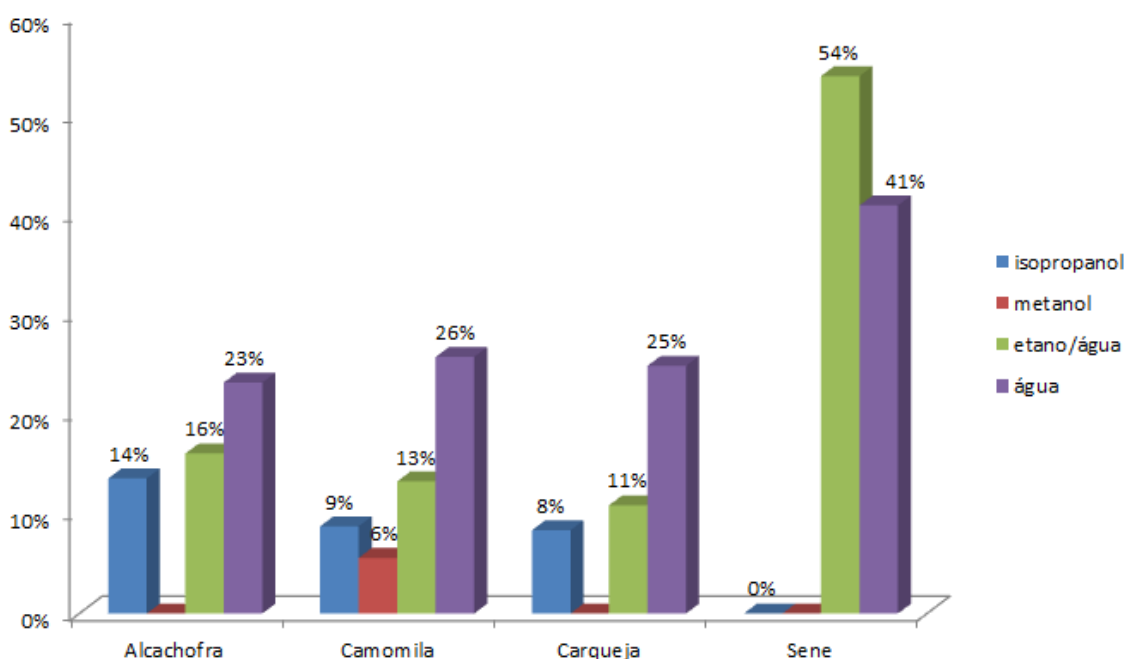
os diferentes tipos de solventes. Devido ao fato dos métodos de extração serem morosos, durante esse trabalho só foi possível realizar a extração em 4 das 6 amostras de plantas.

Tabela 10 - Teores de Zn das plantas nos extratos dos solventes em mg kg^{-1} .

Planta	isopropanol	Metanol	etanol/H ₂ O	Água	Resíduo
Alcachofra	3,8	0	4,5	6,5	19,0
Camomila	2,8	1,8	4,2	8,1	14,2
Carqueja	6,5	0	8,4	19,2	55,8
Sene	0	0	2,7	2,0	0

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 17 - Porcentagem de extração de Zn utilizando diferentes solventes.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Verificou-se que utilizando n-hexano ou acetato de etila na extração de Zn, os teores desse elemento encontravam-se abaixo do limite de quantificação do método para as 4 plantas analisadas, indicando pouca associação do Zn à essas espécies orgânicas.

Cada solvente é responsável de extrair da planta, determinados grupos de biomoléculas onde o Zn pode estar ligado. Um estudo feito por Pavlíková e

colaboradores (PAVLÍKOVÁ et al., 2005). indica os grupos de biomoléculas extraídos da planta por cada solvente.

O solvente n-hexano extrai da planta, espécies orgânicas como hidrocarbonetos, esteróides livres e ésteres de ácidos graxos. Uma explicação para tal fato, é que com esse solvente não são extraídas moléculas com poder complexante.

O solvente acetato de etila extrai da planta espécies orgânicas como ácidos graxos saturados e insaturados, flavonoides, ácidos enilpropanóicos, e diesteróides.

Com o uso do solvente isopropanol que extrai da planta espécies orgânicas como fosfolipídeos polares, flavonóis e ácidos do ciclo do ácido cítrico, 3 plantas apresentaram teores de extração entre 8 e 14%.

Com relação ao extrator metanol, que extrai da planta espécies como fitoquelatinas, agentes quelantes, sais de ácidos fenilpropanóicos e flavonas, a presença do Zn foi observada somente na planta camomila, com um teor de extração de 6%.

A mistura etanol-água (1:1) extrai da planta espécies como polipeptídeos e sais de ácido oxálico. Os teores de extração ficaram entre 11 e 54% quando utilizada essa mistura.

A água atua na planta extraindo íons livres e compostos de alto peso molecular, principalmente metaloproteínas. Os teores de Zn ficaram entre 23 e 41%, sendo esse o melhor extrator dentre os utilizados.

Os resíduos não extraíveis pelos solventes são constituídos de polissacarídeos, proteínas e glicoproteínas. As plantas analisadas possuem altos teores de Zn não extraíveis, com excessão da planta sene.

A Tabela 12 apresenta a soma dos teores de Zn para cada planta nos extratos obtidos e nos resíduos, em comparação aos teores totais obtidos a partir da digestão ácida.

Tabela 11 - Comparação entre os teores de Zn obtidos na extração sequencial e na digestão ácida.

Planta	Extratos + Resíduo (mg kg⁻¹)	Teor total (mg kg⁻¹)
Alcachofra	33,8	28,0
Camomila	31,1	31,5
Carqueja	89,9	77,2
Sene	4,7	5,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

A soma dos teores de Zn nos extratos e resíduos deve ser igual ao teor total obtido na digestão. Porém, os teores encontrados para as plantas alcachofra e carqueja foram maiores que os teores totais das respectivas plantas, sendo essa diferença pode ser relacionado a contaminação proveniente das etapas de extração e secagem do extrato.

5 Conclusão

Para a determinação dos teores de Zn em plantas medicinais, o método proposto mostrou-se sensível, com boa linearidade, baixos limites de detecção e quantificação.

Através da extração sequencial foi possível traçar o perfil da distribuição das diferentes espécies presentes nas plantas. Verificou-se que o Zn encontra-se sob no mínimo 4 espécies químicas diferentes, sendo que em geral a água é o solvente extrator de maior eficiência.

Como propostas futuras, a especiação química do Zn é importante para determinar a quais moléculas orgânica o mesmo pode estar associado.

REFERÊNCIAS

- ALDOUS, K. M.; MITCHELL, D. G.; JACKSON, K. W. Simultaneous determination of seven trace metals in potable water using a vidicon atomic absorption spectrometer. **Analytical Chemistry**, v. 47, p. 1034-1041, 1975.
- ALONSO, F. P. et al. Agronomic implications of the supply of lime and gypsum by products to palexerults from wertern spain. **Soil Science**, v. 171, n. 1, p. 65-81, 2006.
- AMORIM, F. A. C.; LOBO, I. P.; SANTOS, V. L. C. S.; FERREIRA, S. L. C. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares. **Química Nova**, v. 31, n. 7, set. 2008.
- AMOS, M. D.; WILLIS, J. B. Use of high-temperature pre-mixed flames in atomic absorption spectroscopy. **Spectrochimica Acta**, v. 22, p. 1325-1343, 1966.
- BOAR, P. L. The use of atomic absorption spectrometry in the power industry. **Spectrochimica Acta, Part B**, v. 54, p. 1989-1992, 1999.
- BRASIL. **Decreto nº 5.813 de 22 de junho de 2006**: institui a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/Decreto_Fito.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2011a.
- BRASIL. **Portaria 971 de 3 de maio de 2006**: institui a política nacional de práticas integrativas e complementares no Sistema Único de Saúde (SUS). Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2011b.
- CHASSOT, A. **A ciência através dos tempos**. São Paulo, Moderna, 1994, 191 p.
- COZZOLINO, S. M. F., Biodisponibilidade de minerais. **Revista Nutrição**, v. 10, n. 2, p. 87-98, 1997.
- FILGUERAS, C. A. L. A espectroscopia e a química: da descoberta de novos elementos ao limiar da teoria quântica. **Química Nova na Escola**, v. 3, p. 22, 1996.
- FRANCO, G. **Tabela de composição de alimento**. 9. ed. São Paulo, Atheneu, p. 239-241; p. 268-269, 1999.
- GALLINDO, D. L. B. et al. Fundamentos da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua. **Revista Analytica**. v. 18, p. 61-62, 2005.
- HARNLY, J. M.; MILLER-IHLI, N.; O'HAVER, T. C. Simultaneous multielement atomic absorption spectrometry with graphite furnace atomization. **Spectrochimica Acta, Part B**, v. 39, p. 305-320, 1984.

HEITMANN, U. et al. Measurements on the Zeeman-splitting of analytical lines by means of continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear charge coupled device array. **Spectrochimica Acta, Part B**, v. 51, p. 1095-1105, 1996.

KONIECZYNSKI, P.; WESOLOWSKI, M. Determination of zinc, nitrogen and phosphorus in several botanical species of medicinal plants. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 16, n. 5, p. 785-790, June 2007.

LOWE, R. M.; SULLIVAN, J. V. Development in light sources and detectors for atomic absorption spectroscopy. **Spectrochimica Acta, Part B**, v. 54, p. 2031-2039, 1999

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

OLIVER, S.; BARBER, S. A. Mechanisms for the movement of Mn, Fe, B, Cu, Zn, Al and Sr from the soil to the surface of soybean roots. **Soil Science Society of American Proceedings**, v. 30, p. 468-70, 1996.

PAVLIKOVA, D. et al. Development of a procedure for the sequential extraction of substances binding trace elements in plant biomass. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 863-872, 2005.

RAYLE, D. L.; CLELAND, R. E. The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. **Plant Physiology**, v. 99, p. 1271-1274, 1992.

TAKATSUJI, H. Zinc finger proteins: the classic zinc finger emerges in contemporary plant Science. **Plant Molecular Biology**, v. 39, p. 1073-1078, 1999.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapeuta. **Texto & Contexto Enfermagem**, Florianópolis, v. 15, n. 1, jan./mar. 2006.

WALSH, A. The application of atomic absorption spectra to chemical analysis, **Spectrochimica Acta, Part B**, v. 7, p. 108-117, 1995.

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

WELZ, B. et al. High-Resolution Continuum-Source Atomic Absorption Spectrometry – what can we expect? **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 220-229, 2003.

WELZ, B. et al. **High-Resolution Continuum-Source Atomic Absorption Spectrometry: the better way to do atomic absorption spectrometry**. Weinheim: Wiley VCH, 2005.

YUYAMA, L. K. O, et al. Cozzolino, S. M. F. Zinco. In: Cozzolino, S. M. F. **Biodisponibilidade de Nutrientes**, 3. ed., Barueri: Manole, 2009. Cap. 28, p. 616-643.