

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS

ANA CLÁUDIA ANDRADE VINHAS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO USANDO DLLME PARA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO EM FOLHAS DE ALFAVACA (Ocimum gratissimum)

ANA CLÁUDIA ANDRADE VINHAS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO USANDO DLLME PARA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO EM FOLHAS DE ALFAVACA (Ocimum gratissimum)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Santos Souza Universidade Federal da Bahia – UFBA

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira - UFBA

Vinhas, Ana Cláudia Andrade

Desenvolvimento de método analítico usando DLLME para determinação de cádmio em folhas de alfavaca (Ocimum gratissimum) / Ana Cláudia Andrade Vinhas.-2017. 65 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Santos Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociência, 2017.

 Plantas medicinais.
 Cádmio. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Vinhas, Ana Cláudia. III. Título.

CDU: 633.88

ANA CLAUDIA ANDRADE VINHAS

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO USANDO DLLME PARA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO EM FOLHAS DE ALFAVACA (Ocimum gratissimum)

ESTA DISSERTAÇÃO FOI JULGADA ADEQUADA À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOCIÊNCIAS E APROVADA EM SUA FORMA FINAL PELO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA.

VITÓRIA DA CONQUISTA – BA, 20/02/2017.

Andrison & source

PROF. DR. ANDERSON SANTOS SOUZA (ORIENTADOR)

Universidade Federal da Bahia

PROF. DR. FABIO ALAN CARQUEIJA AMORIM (EXAMINADOR)

Silion. C. A.

Universidade Estadual de Santa Cruz

PROF^a. DR^a. PATRICIA BAIER KREPSKY (EXAMINADORA)

Patricia Bain Thysky

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua infinita presença em todos os momentos.

Aos meus familiares, amigos e colegas.

A Anderson, além de orientador, um amigo.

A UFBA por esses anos de aprendizado.

Ao grupo QUAMPA por todo o carinho.

Aos servidores da UFBA.

A CAPES.

A todos, minha eterna gratidão.

"É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: Nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível...

A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser"

VINHAS, Ana Cláudia Andrade. Desenvolvimento de método analítico usando DLLME para determinação de cádmio em folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum*). 65 f. il. 2017. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

RESUMO

As plantas medicinais são utilizadas como recursos terapêuticos no cuidado a saúde, conhecimento este que é passado por gerações pela medicina tradicional e popular e que faz parte da evolução humana. O estudo de elementos inorgânicos na composição de plantas recebeu impulso significativo com o incremento das metodologias que possibilitaram a detecção e quantificação de minerais. Desta forma, o trabalho teve por objetivo desenvolver um método analítico por microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) acoplada à espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis para a determinação de cádmio (Cd) em folhas de alfavaca. No processo de extração por DLLME, foi utilizado PAN (1-(2-piridilazo)-2-naftol) como agente complexante e uma mistura de pequenos volumes contendo dois solventes orgânicos, um extrator e um dispersor. Essa mistura foi injetada de forma rápida na amostra aquosa, para extração do analito. A combinação dos solventes promoveu a formação de gotículas, e após centrifugação (15 min a 3200 rpm), a gota flutuante foi coletada (cerca de 500 μL, com etanol) e determinada por um espectrofotômetro a 546 nm. O método foi realizado através do planejamento fatorial de dois níveis e otimizado pela matriz de Doehlert para determinar os pontos críticos das variáveis estudadas. O volume do solvente extrator (1-octanol, 57 μL), volume do solvente dispersor (acetonitrila, 700 μL), pH (9,44) e a concentração do PAN (0,006 %, m/v) foram determinados. O método proposto permitiu a determinação de Cd na faixa de concentração de 10 a 140 μ g L⁻¹ (y = 0,007x - 0,0017, R² = 0,999), com limite de detecção (n = 20) de 0,81 μ g L⁻¹ e limite de quantificação (n = 20) de 2,7 μ g L⁻¹, precisão (n = 12) calculada como desvio-padrão relativo (RSD) de 4,21 e 1,30 % para concentrações de Cd de 10 e 100 µg L⁻¹, respectivamente. O fator de enriquecimento foi de 23 vezes. A exatidão foi avaliada pela técnica de adição e recuperação, e os valores variaram de 92,09 a 108,88 %. Foi avaliada a robustez, variando os níveis das variáveis em ± 10 % dos valores críticos, os resultados indicaram que não houve diferença estatística significativa. A aplicação do método foi realizada em doze amostras de alfavaca e material de referência (NIST- 1515). Não foi determinado Cd nas amostras estudadas, o que tornam seguras quanto aos efeitos tóxicos deste elemento-traço no organismo.

Palavras-chave: DLLME. Cádmio. Planta medicinal.

VINHAS, Ana Cláudia Andrade. Development of analytical method using DLLME for the determination of cadmium in leaves of basil (*Ocimum gratissimum*). 65 pp. ill. 2017. Master Dissertation – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2017.

ABSTRACT

The medicinal plants are used like therapeutic resources in the care the health, this knowledge that is passed over generations for the traditional and popular medicine and that makes part of the human evolution. The study of inorganic elements in the plants composition received significant impulse with the growth of the methodologies that made possible the detection and quantification of minerals. In this way, the work had because of objective developing a analytical method for Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) coupled to the UV-Vis spectrophotometric for the determination of cadmium (Cd) in leaves of basil. In the extraction process for DLLME, there was used PAN (1-(2-piridilazo)-2-naftol) as chelanting agent and a mixture of small volumes containing two organic solvents, an extraction and a disperser. This mixture was rapidly injected into the aqueous sample, for extraction of the analyte. The combination of the solvents promoted the formation of droplets, and after centrifugation (15 min at 3200 rpm), the floating droplet was collected (about 500 µL, with ethanol) and determined by a spectrophotometer at 546 nm. The method was carried out through the projection factorial of two levels and optimized by the of Doehlert matrix to determine the critical points of the studied variables. The volume of the extraction solvent (1-octanol, 57 µL), of the disperser solvent (acetonitrile, 0.700 µL), pH (9.44) and the concentration of the PAN (0.006 %, w/v) were determined. The proposed method allowed the determination of Cd in the concentration ranged from 10 to 140 μ g L⁻¹ (y = 0.007x – 0.0017, R² = 0.999), with detection limit (n = 20) of 0.81 μ g L⁻¹ and limit of quantification (n = 20) of 2.7 μ g L⁻¹, precision (n = 12) calculated like relative standard deviation (RSD) of 4.21 and 1.30 % for concentrations of Cd of 10 and 100 µg L⁻¹, respectively. The enrichment factor was of 23 times. The exactness was valued by the technique of addition and recuperation, and the values varied from 92.09 to 108.88 %. The robustness was valued, when there is varying the levels of the variables in \pm 10 % of the critical values, the results indicated that there was no significant statistical difference. The application of the method was carried out in twelve samples of basil and material of reference (NIST- 1515). Cd was not determined in the studied samples, which they make safe as for the toxic effects of this trace element in the organism.

Keywords: DLLME. Cadmium. Medicinal plant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ocimum gratissimum	4
Figura 2. Ocimum campechianum	5
Figura 3. Ocimum americanum	5
Figura 4. Procedimentos da SDME	9
Figura 5. Procedimentos da DLLME	10
Figura 6. Localização da área de estudo	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aplicação de DLLME combinada com espectrofotometria de absorção molecu	ılaı
UV-Vis	13
Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial de dois níveis	19
Tabela 3. Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial	20
Tabela 4. Valores codificados das coordenadas do desenho Doehlert para três variáveis,	, na
projeção 1, com centro em (0; 0; 0)	20
Tabela 5. Matriz do planejamento fatorial de dois níveis para o teste de robustez	23
Tabela 6. Fatores e níveis utilizados no planejamento para robustez	24

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CG Cromatografia gasosa

Direct-SDME Microextração por gota única direta (do inglês, Direct Single-drop

Microextraction)

DLLME Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, Dispersive Liquid-

Liquid Microextraction)

DLLME-SFO Microextração líquido-líquido dispersiva baseada em solidificação da

gota orgânica flutuante (do inglês, DLLME based on Solidification of

Floating Organic droplet)

FO-LADS Espectrofotômetro com fibra óptica e arranjo linear de detectores (do

inglês, Fiber Optic – Linear Array Detection Spectrophotometry)

HPAs Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

LLE Extração líquido-líquido (do inglês, *Liquid–Liquid Extraction*)

LPME Microextração em fase líquida (do inglês, *Liquid Phase Microextraction*)

MS Ministério da Saúde

NIST National Institute of Standard and Technology

OMS Organização Mundial de Saúde

PAN 1-(2-piridilazo)-2-naftol

PNPIC Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

RENISUS Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de

Saúde

SDME Microextração por gota única (do inglês, Single Drop Microextration)

SDME - HS Microextração por gota única em headspace (do inglês, Headspace

Single-drop Microextraction)

SUS Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA	3
	2.1 Plantas medicinais	3
	2.2 Características do gênero <i>Ocimum</i>	3
	2.2.1 Ocimum gratissimum	۷
	2.2.2 Ocimum campechianum	۷
	2.2.3 Ocimum americanum	5
	2.3 Cádmio	ć
	2.4 Pré-concentração	8
	2.4.1 Extração líquido-líquido na pré-concentração de metais	8
	2.4.1.1 Microextração em gota única (SDME)	8
	2.4.1.2 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	10
	2.5 DLLME acoplada à espectrometria de absorção molecular UV-Vis	11
3.	JUSTIFICATIVA	14
4.	OBJETIVOS	14
	4.1 OBJETIVO GERAL	14
	4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
5.	MATÉRIAS E MÉTODOS	15
	5.1 Instrumentação	15
	5.2 Reagentes	15
	5.3 Preparo de soluções	15
	5.3.1 Soluções de referência	16
	5.3.2 Solução estoque de PAN	16
	5.3.3 Soluções-tampão	16
	5.4 Amostragem	16

5.5 Tratamento das amostras	17
5.5.1 Digestão da amostra	17
5.5.2 Procedimento de pré-concentração	18
5.6 Planejamento experimental	18
5.6.1 Planejamento univariado	18
5.6.2 Planejamento fatorial	19
5.6.3 Matriz de Doehlert	20
5.7 Figuras de mérito	21
5.7.1 Linearidade e fator de enriquecimento	21
5.7.2 Limite de detecção e limite de quantificação	22
5.7.3 Precisão	22
5.7.4 Exatidão	23
5.7.5 Robustez	23
5.7.6 Interferentes	24
5.8 Aplicação	24
6. REFERÊNCIAS	25
7. ARTIGO	34
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	51

1. INTRODUÇÃO

Com base nas quantidades relativas dos elementos essenciais para o crescimento das plantas, os minerais são classificados como macro e micronutrientes: no grupo dos macronutrientes (concentrações superiores a 0,1% de peso de tecido seco) incluem nitrogênio (N), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), fósforo (P) e enxofre (S); como micronutrientes (concentrações menores do que 0,01% de peso de tecido seco) fazem parte o ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn), cobre (Cu), boro (B), cloro (Cl), molibdênio (Mo) e níquel (Ni). Esses nutrientes, juntamente com o carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O) são considerados essenciais para o desenvolvimento de todas as plantas. Minerais adicionais, tais como o cobalto (Co), sódio (Na), silício (Si), selênio (Se), iodo (I) e vanádio (V), são essenciais ou benéficos para certas espécies. Outros elementos, como o cádmio (Cd) ou cromo (Cr), considerados como não essenciais, podem afetar ou restringir o crescimento da planta (GRUSAK, 2001).

Existem plantas que conseguem desenvolver mecanismos específicos para regular a biodisponibilidade dos minerais, restringindo a absorção a partir do solo. No entanto, outras conforme os níveis intracelulares encontrados, conseguem assimilar pelas raízes ou folhas, provenientes das chuvas, poeiras atmosféricas, fertilizantes ou agentes fitofarmacêuticos e acumular elevadas quantidades de um metal específico, que para diversos organismos é tóxico mesmo em quantidades muito inferiores, sendo designadas plantas acumuladoras ou hiperacumuladoras (CLEMENS *et al*, 2002; BAŞGEL & ERDEMOĞLU, 2006; MONTEZ, 2014).

O Cd apresenta semelhanças químicas com o Zn, e são encontrados juntos na natureza. Em minerais e solos, ocorrem em uma proporção que varia, respectivamente, entre 1:100 e 1:1000, principalmente sobre a forma de sulfetos (GUTIERREZ, 2006; NORDBERG *et al*, 2015). Apesar de possuir baixa concentração no ambiente natural, em decorrência da ação antrópica, o Cd tende a acumular de forma exponencial no ar, água e solo, como subproduto do processamento de minérios; resíduos industriais e urbanos despejados como efluentes; e em locais de descarte de pigmentos de tintas, plásticos e baterias de celulares (GUIMARÃES *et al*, 2008; FERREIRA, 2013). Entre 10 e 50 % de Cd inalado e cerca de 5 a 10 % de Cd ingerido pode ser absorvido pelo homem. A acumulação do Cd ocorre em muitos tecidos, com meiavida longa de 10-30 anos, em músculo, osso, rim e fígado (NORDBERG *et al*, 2015).

O emprego de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças é tão antigo quanto à civilização (VEIGA JÚNIOR *et al*, 2005; LEITÃO *et al*, 2014). A acumulação de elementos tóxicos nas plantas, e consequentemente ao longo da cadeia

alimentar, depende diretamente da fração de metais biodisponíveis no meio (GUIMARÃES & SÍGOLO, 2008; LIMA & MERÇON, 2011; MONTEZ, 2014). Desta forma, os elementos químicos contidos nas plantas medicinais podem ser disponibilizados para o corpo humano em concentrações significantes pelo consumo dessas ervas e seus extratos. Nem todos os elementos possuem funções biológicas totalmente descritas, todavia a maioria deles é responsável por importantes atividades no metabolismo humano e, portanto, estão diretamente relacionados com a manutenção da saúde e funcionamento adequado do organismo (FRANCISCONI, 2014).

A utilização de plantas medicinais e de medicamentos fitoterápicos passou a ser oficialmente reconhecido na atenção à saúde, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1978, quando foi recomendado a difusão mundial dos conhecimentos necessários à sua utilização racional e incorporação da fitoterapia nos sistemas públicos de saúde (BRASIL, 2006).

Em 2009, o Ministério da Saúde (MS) divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), que consta de 71 espécies de plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse para uso na atenção básica (BRASIL, 2009). Dentre essas espécies medicinais, o *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) foi selecionado devido sua ampla utilização no estado da Bahia, podendo citar estudos etnobotânicos realizados nos municípios de Nova Viçosa (MOTA & DIAS, 2012), Catu (NETO *et al*, 2014), Ilhéus (MOREIRA *et al*, 2002), Itacaré (PINTO *et al*, 2006), Salvador (CUNHA LIMA *et al*, 2008; COSTA *et al*, 2010), Amargosa e Mutuípe (SILVA *et al*, 2010), Santo Antônio de Jesus (MAGALHÃES *et al*, 2009) e São Francisco do Conde (ALMEIDA *et al*, 2014), além de outras diversidades deste gênero que não constam no RENISUS, como as espécies *O. americanum* em Ilhéus (MOREIRA *et al*, 2002) e Itabuna (PIRES *et al*, 2009) e *O. campechianum* em Cruz das Almas (RODRIGUES & GUEDES, 2006), Ilhéus (FEIJÓ *et al* 2013) e São Francisco do Conde (ALMEIDA *et al*, 2014).

O uso de métodos analíticos que permitam quantificar os minerais pode auxiliar na verificação de possíveis interferências dos metais na sua ação terapêutica, contribuir para a recomendação de planta como fontes minerais na dieta alimentar ou saber se a concentração desses elementos é tóxica ao ser humano, uma vez que o estudo é importante para avaliação de sua qualidade, principalmente em relação à contaminantes metálicos (SINGH & GARG, 1997; FRANCISCONI, 2014).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PLANTAS MEDICINAIS

A OMS considera o uso de plantas medicinais um importante instrumento da assistência farmacêutica no que se refere à Atenção Primária à Saúde. Cerca de 70 a 90 % da população nos países em vias de desenvolvimento fazem uso como forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Nesses países, as plantas medicinais são utilizadas como alternativa popular aos produtos medicinais alopáticos, na forma bruta como chás ou decocções e como fitoterápicos. Em alguns países industrializados, como o Canadá, França, Alemanha e Itália, o uso de produtos da medicina tradicional sobre a denominação de complementar, alternativa ou não convencional é igualmente significante (BRASIL, 2012).

A partir da década de 80, no Brasil, vários documentos foram elaborados destacando a introdução de plantas medicinais e fitoterápicos na atenção básica no sistema público. Em 2003, através das propostas elaboradas no Seminário Nacional sobre Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Assistência Farmacêutica e na Primeira Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica, dentre as recomendações para pesquisa e desenvolvimento na área de plantas medicinais, pode-se mencionar a prioridade de plantas medicinais nativas e exóticas cultivadas, a pesquisa com espécies que estão sendo usadas no setor público e em movimentos sociais (BRASIL, 2005; BRASIL, 2006).

2.2 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO Ocimum

O gênero *Ocimum*, da família Lamiaceae, apresenta grande variedade de espécies, conhecidas popularmente como alfavaca ou manjericão. São encontradas nas regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, Américas Central e do Sul, sendo o principal centro de diversidade o continente africano. Algumas espécies amplamente cultivadas em áreas temperadas, são fonte de óleo volátil utilizado nas indústrias de alimentos e cosméticos, de uso culinário, aromático e medicinal. No Brasil, as espécies de *Ocimum* podem ser divididas em três grupos: 1) espécies cultivadas introduzidas da Europa, como *O. basilicum* e suas variedades morfológicas; 2) espécies naturalizadas incluindo *O. gratissimum* e suas variedades *gratissimum* e *macrophyllum* e 3) espécies silvestres incluindo *O. campechianum*, *O. nudicaule*, *O. selloi* e *O. transamazonicum* (PATON, 1992; VIEIRA & SIMON, 2000; PADALIA *et al*, 2013).

2.2.1 Ocimum gratissimum

O. gratissimum (Figura 1) também conhecido como "alfavaca-cravo", "alfavacão" ou "quioiô", é um subarbusto aromático, originário do Oriente e naturalizado em todo o Brasil (BIASI et al, 2009), comumente utilizado pelas suas propriedades medicinais e de uso na culinária (MADEIRA et al, 2005).



Figura 1. *Ocimum gratissimum* Fonte: Próprio autor

Quanto a composição química, *O. gratissimum* apresenta vários quimiotipos, como ocorre em outras espécies do mesmo gênero, sendo um quimiotipo muito comum o eugenol, que possui essa substância em maior quantidade na composição do óleo volátil (BIASI *et al*, 2009). O óleo volátil pode chegar a 3,5% de rendimento na hidrodestilação de suas folhas (TREVISAN *et al*, 2006).

Na medicina popular, as folhas são comumente empregadas em chá devido suas propriedades carminativa, sudorífica e diurética (CORTEZ *et al*, 1998; PASSOS *et al*, 2009). Estudo com extrato das folhas apresentaram atividade hipoglicemiante (EGESIE *et al*, 2006; OGUANOBI *et al*, 2012; CASANOVA *et al*, 2014), antidiarreico (EZEKWESILI *et al*, 2004) e antibacteriana (STANLEY *et al*, 2014), e o óleo volátil mostrou atividade antifúngica (FARIA *et al.*, 2006), leishmanicida (UEDA-NAKAMURA *et al*, 2006) e antioxidante (FOKOU *et al*, 2014).

2.2.2 Ocimum campechianum

O. campechianum (Figura 2), conhecido no nordeste brasileiro como "alfavacamiúda" e "alfavaca-de-galinha", é uma importante fonte de óleo volátil (SILVA et al, 2004). Um dos constituintes majoritários na hidrodestilação das folhas e flores é o eucaliptol, muito usado em aromas, fragrâncias e cosméticos (CAROVIC´-STANKO et al, 2010). É

tradicionalmente utilizado pelas suas propriedades terapêuticas contra tosse, bronquite e infecções gerais (DI STASI *et al*, 2002), além de analgésico, antipirético, diurético e estimulante (SOUSA, 2004).



Figura 2. *Ocimum campechianum*Fonte: Próprio autor

2.2.3 Ocimum americanum

O. americanum (Figura 3), originário da Ásia e África, é encontrado espontaneamente pela América tropical. É conhecido popularmente pelos nomes de "alfavaca-de-vaqueiro", "manjericão-branco" e "anão" (SOUZA FILHO et al, 2009). Usado na medicina tradicional para tratamento de conjuntivite, malária e dor de cabeça; na culinária e em produtos cosméticos como aromático (CHALCHAT et al, 1999). Em decorrência das diferenças qualitativas e quantitativas na composição química do óleo volátil foram relatados vários quimiotipos. Silva e colaboradores (2003) determinaram os constituintes químicos por hidrodestilação em várias partes da planta, e como majoritários, encontraram o cinamato de metila nas folhas (86,6 %) e na inflorescência (97,5 %); e eugenol nas raízes (88,2 %) (SILVA et al, 2003). Em outro quimiotipo, o óleo volátil das folhas e flores consistiram principalmente em eucaliptol (60,1 %) e piperitol (68,5 %), respectivamente. Sendo que, o óleo volátil das folhas apresentou atividade frente as bactérias gram-positivas e das flores não apresentou nenhuma atividade significativa (BASSOLE et al, 2005).



Figura 3. *Ocimum americanum*Fonte: Próprio autor

2.3 CÁDMIO

O termo elementos-traço tem sido empregado em detrimento da expressão "metais pesados" para classificar os metais catiônicos e oxiânions que normalmente estão presentes em concentrações menores que 100 µg g⁻¹ em solos e plantas (IUPAC, 1997; ESSINGTON, 2004; KABATA-PENDIAS, 2011). Os metais caracterizados como pesados foram assim descritos principalmente em função da sua densidade, que apresentaram variação entre 3,5 e 7 g cm⁻³, ou densidades acima de 7 g cm⁻³. Outras definições também foram descritas baseando-se no peso atômico, no número atômico e até mesmo nas propriedades químicas dos elementos. Também se tem aplicado o conceito de um grupo de metais e semimetais associados com contaminações e potencial toxicidade e ecotoxicidade. O conceito do termo "metal pesado" representa uma incerteza tendo em vista que, ao longo do tempo, novos critérios foram sendo incorporados (DUFFUS, 2002, LIMA & MERÇON, 2011).

Em 1817 na Alemanha, Friedrich Strohmeyer, observou que a calamina impura (ZnCO₃) quando aquecida mudava de cor, enquanto que, a calamina pura se mantinha branca sob aquecimento. O elemento descoberto por Friedrich que tornava a calamina impura amarela foi denominado Cd (AZEVEDO & CHASIN, 2003; PELOZATO, 2008). Membro da família IIb (Grupo 12) dos elementos de transição da Tabela Periódica, possui número atômico 48, massa atômica 112,41 u, ponto de fusão 320,9 °C, ponto de ebulição 767 °C e densidade de 8,65 g cm⁻³ a 25 °C (AZEVEDO & CHASIN, 2003). É um constituinte natural da água do oceano com níveis médios que variam de menos 5 ng L⁻¹ até valores de 110 ng L⁻¹, sendo os níveis mais elevados próximos de áreas costeiras e marinhas com fosfatos e fosforitos. A concentração em água superficial naturais e subterrânea é geralmente menor que 1 μg L⁻¹ (ATSDR, 2012). Em solos não contaminados, altamente regulado pela textura, os teores de Cd podem variar entre 0,01 a 0,30 mg kg⁻¹ em solos arenosos e 0,2 a 0,8 mg kg⁻¹ em solos argilosos (KABATA-PENDIAS, 2011).

O Cd é um elemento tóxico aos vegetais, afeta negativamente seu crescimento e desenvolvimento, mas devido à semelhança com Zn, pertencentes à mesma família da classificação periódica, é facilmente absorvido a partir do solo. O estudo da especiação, definida como ocorrência de um elemento em diferentes formas em um sistema, para o Cd tem mostrado que, na solução do solo, a espécie predominante é Cd⁺², e o mais provável de ser adsorvido na superfície dos sólidos do que as outras espécies. A depender do pH e de outros íons em solução, o metal também pode formar íons complexos tais como: [CdCl]⁺, [CdOH]⁺, [Cd(HCO₃)]⁺, [Cd(Cl₃)]⁻, [Cd(Cl₄)]⁻² [Cd(OH)₃)]⁻ e [Cd(OH)₄)]⁻ (DAVIDSON *et al*, 1994; BAIRD & CANN,

2008; PELOZATO, 2008; BERTOLI, 2011). Sendo as formas solúveis, geralmente, as mais tóxicas (AZEVEDO & CHASIN, 2003), podendo migrar para água (ATSDR, 2012).

Apesar da ampla distribuição natural (atividade vulcânica, intemperismo e erosão), a ação antrópica tem elevado as concentrações de Cd no solo a valores tóxicos, como a prática da incineração inadequada de resíduos urbanos (baterias e plásticos que contém Cd, especialmente), subprodutos de mineração, uso de sulfito de Cd como pigmento, fertilizantes fosfatados, combustíveis fósseis, entre outros (WHO, 2010; D'AVILA, 2014). Esse aumento pode levar a absorção de Cd pelas plantas cultivadas para consumo humano. O processo de absorção pelo solo torna maior com a redução do pH (JÄRUP *et al*, 1998; JÄRUP, 2003; ALLOWAY, 2013), e, inicialmente, requer a disponibilidade posicional do elemento em relação à raiz da planta: ou o elemento se move para a raiz ou a raiz cresce em direção ao elemento (POMBO, 1992). A disponibilidade também pode ser reduzida com o aumento da concentração da matéria orgânica e carbonato de cálcio, capacidade de troca catiônica e a presença de hidróxidos de Mn e Fe (AZEVEDO & CHASIN, 2003).

O Cd é amplamente distribuído através do organismo, após a absorção pelas vias inalatória, oral ou dérmica, principalmente no fígado e rins, que juntos apresentam 50 % de todo o Cd do corpo. A toxicidade aguda pode ocorrer através da ingestão de concentrações relativamente altas contidas em bebidas ou alimentos. Já os principais efeitos observados na exposição em longo prazo são doença pulmonar crônica obstrutiva e enfisema, distúrbios crônicos dos túbulos renais, além de efeitos cardiovasculares e no sistema esquelético, cuja gravidade é proporcional ao tempo e à intensidade da exposição, devido ao caráter de agente tóxico cumulativo do Cd (AZEVEDO & CHASIN, 2003; ATSDR, 2012).

Agências governamentais de saúde têm estabelecido níveis toxicológicos aceitáveis de exposição aos contaminantes inorgânicos visando proteger a saúde pública. No Brasil, o órgão responsável por esse controle é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que através da Resolução RDC nº 42 de 29 de agosto de 2013 regulamenta os limites máximos de contaminantes inorgânicos (arsênio, cádmio, chumbo, estanho e mercúrio) para alimentos no Mercado Comum do Sul. O limite máximo de Cd estabelecido para ervas aromáticas frescas é de 0,20 mg kg⁻¹ (BRASIL, 2013). De acordo com a FAO/WHO (Organização Mundial de Saúde), a quantidade de Cd tolerável, que pode ser ingerida semanalmente pelo organismo humano é de 7 μg kg⁻¹ para adultos e crianças. Este valor foi estabelecido levando em consideração a concentração crítica de Cd que pode causar disfunção renal. Como principais fontes dietéticas de Cd se destacam arroz, trigo, raízes amiláceas e tubérculos, moluscos e legumes, além de vegetais folhosos (WHO, 2004).

2.4 Pré-concentração

2.4.1 Extração líquido-líquido na pré-concentração de metais

Técnicas de extração têm sido empregadas com a finalidade de determinar analito em matrizes complexas, assim, além de separar, pode-se controlar ou eliminar interferentes originalmente presentes, sendo possível quantificar níveis muito baixos do elemento de interesse (PALEOLOGOS, *et al*, 2005). O Cd pode estar presente como contaminante em plantas, sendo necessário, fazer o seu controle (MOHAMED *et al*, 2003).

A OMS enfatiza a necessidade da garantia do controle de qualidade de produtos vegetais com base em técnicas modernas e aplicação de normas adequadas. Assim, determinar elementos traços em plantas medicinais pode estabelecer sua pureza, segurança e eficácia (WHO, 1992; AJASA *et al*, 2004).

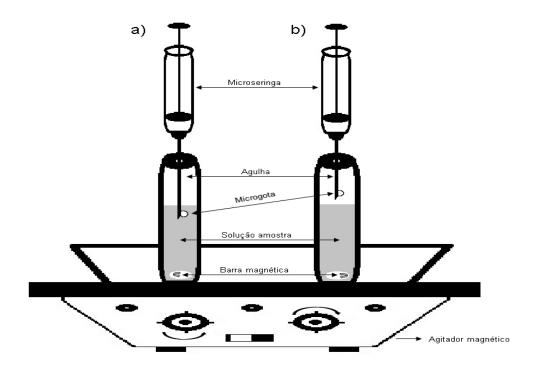
A extração líquido-líquido (LLE) é uma técnica amplamente utilizada no preparo de amostra, etapa de extrema importância para a obtenção de resultados confiáveis. É baseada na transferência do analito de uma amostra aquosa para um solvente imiscível em água. Entretanto, apresenta como desvantagens a tendência à formação de emulsão, a necessidade do uso de grande volume de solventes de alta pureza, o que a torna cara, demorada e tóxica, e com a geração de perigosos resíduos laboratoriais (PENA-PEREIRA *et al*, 2009; MOREIRA *et al*, 2014). Com a finalidade de melhorar o procedimento, com enfoque na Química Verde, têm-se desenvolvido técnicas de microextração em fase líquida, como a LPME – *liquid phase microextraction*) (MOREIRA *et al*, 2014; ZULOAGA *et al*, 2015).

A LPME surgiu em meados dos anos 90 e, como o próprio nome sugere, são usados volumes de solvente na escala do microlitro para extrair analitos de uma solução aquosa. Neste contexto, diferentes metodologias de LPME têm sido exploradas como microextração por gota única (SDME, single drop microextration) e microextração dispersiva líquido-líquido (DLLME, dispersive liquid—liquid microextraction) no preparo de amostras eficientes, rápidas e de baixo custo, além da redução da quantidade de solventes (PENA-PEREIRA et al, 2009; ZULOAGA et al, 2015).

2.4.1.1 Microextração em gota única (SDME)

Desenvolvida em 1996 por Jeannot e Cantwell, a primeira descrição da SDME combina a extração de solvente orgânico com a análise por cromatografia gasosa (CG). Os

autores montaram um sistema onde uma pequena gota de 8 μL da fase orgânica ficava suspensa no final de um tubo Teflon imerso numa solução aquosa. Após um determinado período em que as duas fases permanência em contato a gota era então coletada com auxílio de uma microsseringa e injetada no equipamento para quantificação (JEANNOT & CANTWELL, 1996). Apesar da técnica ter sido muito explorada na área orgânica, a primeira publicação da metodologia na área inorgânica só surgiu em 2003 por Chamsaz (CHAMSAZ *et al*, 2003; PENA-PEREIRA *et al*, 2009). Os dois principais procedimentos da SDME são a microextração direta e a microextração em *headspace*, conforme Figura 4.

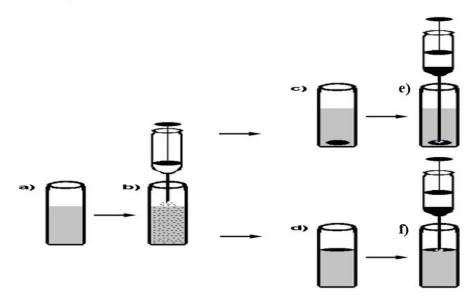


SDME: a) extração direta; b) extração em *headspace*. Fonte: Adaptado (MALTEZ, 2007) Figura 4. Procedimentos da SDME

No procedimento de microextração por gota única direta (Direct-SDME), Figura 4.a, a fase extratora (microgota) é inserida pela ponta da agulha de uma microsseringa, na solução amostra, e o analito é transferido da fase aquosa para a fase orgânica (extratora), com o auxílio da agitação magnética. Já na microextração por gota única em *headspace* (HS-SDME), Figura 4.b, a microgota é suspensa no espaço do frasco sobre a amostra, pela ponta da agulha de uma microseringa, onde através de uma barreira de ar, o analito volátil é transferido para a fase extratora. Após um período de tempo da extração, a gota é retraída pela microseringa e injetada no equipamento para quantificação (MALTEZ, 2007; XU *et* al, 2007; PENA-PEREIRA *et al*, 2009).

2.4.1.2 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A DLLME foi desenvolvida por Rezaee e colaboradores em 2006 para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), é um método simples e rápido de extração e pré-concentração em amostra aquosa. Na técnica, uma mistura de solventes (extrator e dispersor) é injetado de forma rápida, com auxílio de uma seringa, na amostra. Uma solução turva é formada, o estado de equilíbrio é alcançado rapidamente, como resultado do analito presente na amostra ser transferido em um tempo curto para o solvente extrator, devido a uma enorme área interfacial entre eles. Na sequência, a amostra passa por um processo de centrifugação para separação das fases (REZAEE *et al*, 2006). A depender do solvente extrator, de maior ou menor densidade, a gota poderá ser coletada como sedimento ou flutuando na amostra, Figura 5. Várias técnicas têm sido desenvolvidas como melhoria do método apresentado, como ocorre na microextração líquido-líquido dispersiva baseada em solidificação da gota orgânica flutuante (DLLME-SFO), que utiliza solvente extrator de baixa densidade (LEONG *et al*, 2014).



DLLME: a) amostra aquosa; b) adição da mistura de solventes (extrator e dispersor) formando uma solução turva; c) após centrifugação da solução turva e coleta da gota sedimentada (solvente extrator de alta densidade); d) após centrifugação da solução turva e coleta da gota flutuante (solvente extrator de baixa densidade); e); f) coleta da gota. Fonte: Próprio autor

Figura 5. Procedimentos da DLLME

A eficiência da extração por DLLME pode ser influenciada por alguns fatores como a escolha dos solventes extrator e dispersor, tempo da extração, quantidade da amostra, pH, entre outros. A densidade e a solubilidade em água do solvente extrator, assim como a solubilidade no extrator e a miscibilidade em água para o solvente dispersor, deve ser considerado, o que

permitirá a extração e formação da gota na fase aquosa. O clorobenzeno, tetracloreto de carbono, tetracloroetileno e dissulfeto de carbono são frequentemente utilizados como solvente extrator de alta densidade (HERRERA-HERRERA *et al*, 2010), e tolueno, 1-octanol, 1-dodecanol, 1- undecanol entre outros de baixa densidade (JAIN & VERMA, 2011), enquanto que acetona, metanol, acetonitrila e etanol são usados como solvente dispersor (HERRERA-HERRERA *et al*, 2010).

Em geral, a quantidade do solvente extrator utilizado é na faixa de 5-100 μL, para assegurar um volume adequado para a extração e, consequentemente, um alto valor do fator de enriquecimento. Um maior volume da gota, após a centrifugação, diminui a concentração do analito na fase orgânica, o que reduz a sensibilidade do método. O solvente dispersor afeta o grau de dispersão do solvente de extrator na fase aquosa, na formação da solução turva e, subsequentemente, na eficiência de extração, normalmente é usado de 0,5-1,5 mL (ZANG *et al*, 2009).

Na determinação elementar, os metais por não possuírem grupamentos orgânicos, não há uma interação entre o solvente apolar e o analito. Para que ocorra a extração, é requerida uma etapa de complexação previamente à DLLME (PEREIRA, 2013). A concentração do agente complexante e o pH da amostra irão influenciar na eficiência da extração da técnica, uma vez que o pH afeta diretamente a formação do complexo metal-quelante (MACIEL, 2013).

2.5 DLLME ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO MOLECULAR UV-VIS

A espectrometria de absorção molecular na região ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma técnica muito utilizada na química analítica devido sua simplicidade, versatilidade, precisão e custo-eficiência. Empregada na determinação de diferentes analitos, como os metais de transição e compostos orgânicos (ABADI *et al*, 2012). Entretanto, em baixas concentrações, a determinação de muitos analitos, em amostras complexas, são dificilmente quantificados de forma direta por espectrofotometria UV-Vis. Outro fator, é a larga faixa no espectro UV-Vis da espécie que torna a técnica não seletiva. Sendo necessário um preparo da amostra antes da determinação espectrométrica para melhorar a seletividade e sensibilidade (HEYDARI, 2014). Esta técnica segue o princípio da lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação em gases e soluções, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Através da equação, A= log (I₀/I) = εbc, é medido a absorção de radiação em um determinado comprimento de onda, onde A é a absorbância, I₀ é a intensidade

da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. A absortividade molar (ε) é caraterística particular e única de cada espécie absorvente, c é a concentração da espécie absorvente e b a distância percorrida pelo feixe através da amostra (PERKAMPUS, 1992; ROCHA & TEIXEIRA, 2004).

Pérez-Outeiral e colaboradores, 2014, desenvolveram uma técnica simples e barata para determinação de Cd em amostra aquosa, através da DLLME acoplada à espectrofotometria UV-Vis. No método, uma mistura da amostra e metanol (solvente dispersor) foi aquecida a 40 °C, depois acrescentado ditizona (complexante) e clorofórmio (solvente extrator). A solução foi centrifugada, realizou a coleta da fase sedimentada (60 μL) e transferência para uma microcubeta e determinação no espectrofotômetro UV-Vis. Para evitar a perda de sensibilidade, associada à diluição da gota, utilizaram uma cubeta com capacidade de microvolume, o que tornou viável o método, e também evitaram custo com o acoplamento de um outro equipamento. A curva de calibração foi feita na faixa de 10 a100 μg L⁻¹, obtendo boa linearidade (R² = 0,9947), limite de detecção de 8,5 μg L⁻¹ e fator de enriquecimento de 73 (PÉREZ-OUTEIRAL *et al*, 2014).

Heydari, 2014, demonstrou em seu estudo que a DLLME-SFO combinada com espectrofotometria UV-Vis pode ser usada como uma técnica na separação e determinação de íons de Cd em amostras de açafrão. No procedimento, uma mistura de 1-undecanol (solvente extrator) contendo ditizona (agente complexante) e etanol (solvente dispersor) foi rapidamente injetada na amostra dentro de um tubo. Após, esse tubo foi submetido a ultrassom e centrifugação para posterior quantificação. A curva de calibração foi feita na faixa linear de 0,001 a 0,500 μg mL⁻¹ (R² = 0.9948) e o método apresentou limite de detecção de 0,0005 μg mL⁻¹ (HEYDARI, 2014).

Na Tabela 1, são apresentados alguns exemplos da aplicação da técnica de DLLME acoplada à espectrofotometria UV-Vis em metais.

Tabela 1. Aplicação de DLLME combinada com espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis

Técnica de extração	Agente complexante	Solvente Extrator	Solvente dispersor		Amostra	Limite de detecção	Faixa linear	RSD% ¹	F.E. ²	Referência
DLLME	APDC ³	Diclorobenzeno	Etanol	Fe	Água	6,10 μg L ⁻¹	0,02-2,0 mgL ⁻¹	< 12,0	3,3	PEREIRA, 2013
DLLME	APDC ³ DDTC ⁴	Tetracloroetileno	Acetonitrila	Fe Cu	Vinho	0,75 mgL ⁻¹ , Fe 0,37 mgL ⁻¹ , Cu	0,2-2,5 mgL ⁻¹ , Fe 0,05-1,0 mgL ⁻¹ , Cu	< 8,0	-	MACIEL, 2013
DLLME	Ditizona DDTC ⁴	Tetraclorometano	Metanol, Cd Etanol, Cu	Cd Cu	Água e Alimento	0,01 ngL ⁻¹ , Cd 0,50 μgL ⁻¹ , Cu	2,5 ngL ⁻¹ , Cd ⁵ 200 μgL ⁻¹ , Cu ⁵	< 3,0	3458, Cd 10, Cu	WEN et al, 2011
DLMME	DTVTI ⁶	Tolueno	Tributilfosfato	Cd	Água	0,007 mgL ⁻¹	0,11-2,25 mgL ⁻¹	< 4,0	-	KOCÚROVÁ et al, 2013
DLLME	DIDC ⁷	Acetato de isopentila + CCl ₄ ⁸	Metanol	Cu	Água	0,005 mgL ⁻¹	0,020-0,090 mgL ⁻¹	< 5,5	-	ŠKRLÍKOVÁ et al, 2011
DLLME	Ditizona	CCl ₄ ⁸	Acetonitrila	Cu Hg	Água	2,6 ngmL ⁻¹ , Cu 2,8 ngmL ⁻¹ , Hg	10-250 ngmL ⁻¹ , Cu 10-300 ngmL ⁻¹ , Hg	< 2,0	180, Cu 175, Hg	NIAZI et al, 2015
DLLME	PAN ⁹	Clorofórmio	Etanol	Co	Água	$0,50~\mu g~L^{-1}$	2-50 μgL ⁻¹	2,5	125	GHAREHBAGHI et al, 2008
DLLME	PAN ⁹	1-octanol	Acetonitrila	Cd	Alfavaca	$0.81~\mu \mathrm{g~L^{-1}}$	10 a 140 μg L ⁻¹	< 5,0	23	VINHAS et al, 2017

¹Desvio Padrão Relativo; ²Fator de Enriquecimento; ³Pirrolidina ditiocarbamato de amônio; ⁴Dietilditiocarbamato de sódio; ⁵Limite superior; ⁶Brometo de 2-[2-(5-dimetilamino-2-tiofenil)-vinil]-1,3,3-trimetil-3H-indolium; ⁷1,3,3-trimetil-2-[5-(1,3,3-trimetil-1,3-dihidro-indol-2-ilideno)-penta-1,3-dienil]-3Hindolium; ⁸Tetracloreto de carbono; ⁹1-(2-piridilazo)-2-naftol

3. JUSTIFICATIVA

As plantas medicinais são utilizadas como recursos terapêuticos no cuidado à saúde, conhecimento este que é passado por gerações e que faz parte da evolução humana. Desta forma, os elementos químicos contidos nessas plantas, podem ser disponibilizados para o corpo humano em concentrações significantes pelo consumo. Sendo que, níveis altos de metais podem ser extremamente tóxicos e provocar graves doenças.

Esses elementos químicos, decorrente de atividade antrópica, podem ser transferidos para o meio ambiente, e por estes serem capazes de causar impactos negativos sobre a biodiversidade. O desenvolvimento de um método analítico, que consista em quantificar elemento-traço em planta medicinal, permite avaliar sua qualidade no que se refere a contaminação.

A determinação de Cd em planta medicinal é de grande importância devido ao aspecto toxicológico. Em função do metal poder ser disponibilizado para corpo humano através da acumulação nas plantas e, consequentemente, ao longo da cadeia alimentar. Também serve como parâmetro para avaliar a gravidade de contaminação em que o meio se encontra. A presença de elementos-traço em plantas medicinais já foi descrita pela literatura, sendo a sua fonte principal o solo e a água.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método analítico para a determinação de cádmio em folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum*, *O. americanum e O. campechianum*).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método para pré-tratamento da amostra;
- Desenvolver um método analítico baseado na técnica de DLLME;
- Validar o método proposto;
- Aplicar o método às amostras.

5. MATÉRIAS E MÉTODOS

5.1 INSTRUMENTAÇÃO

Todos os procedimentos de pesagem foram feitos em uma balança analítica de precisão (Shimadzu[®], modelo AY220). Para pipetagem das soluções foram utilizados micropipetadores e pipetadores automáticos com capacidade variável de 10 a 1000 µL (Transferpette[®]S) e 1000 a 5000 µL (Eppendorf Research[®]). As amostras vegetais foram pulverizadas através de um moedor de facas (Cuisinart[®], modelo DCG-20BKN) e mantidas em um dessecador.

No processo de digestão foi utilizado bomba de digestão ácida (PARR®) e um forno de microondas (Consul®). Na etapa de separação das fases, durante o procedimento de DLLME, usou uma centrífuga analítica (Hettich®, modelo Rotofix 32 A) com capacidade para 32 tubos de 15 mL e velocidade máxima de rotação de 4000 rpm. Para medida do pH foi utilizado um pHmetro digital (Gehaka®, modelo PG 1800).

As medidas foram feitas empregando um espectrofotômetro UV-Vis de duplo feixe (Shimadzu[®], modelo UV-1800), equipado com duplo monocromador e duas microcubetas de quartzo gêmeas com 1,0 cm de caminho óptico e capacidade de 750 µL.

5.2 REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: peróxido de hidrogênio (Vetec®), ácido nítrico, 1-undecanol, 1-octanol, 1-dodecanol, metanol, etanol e acetonitrila (Sigma-Aldrich®).

5.3 PREPARO DE SOLUÇÕES

Para o preparo de soluções foi utilizado água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação (Milli-Q®). As vidrarias usadas, e outros materiais, foram descontaminados por imersão em uma solução de HNO₃ 10 % (v/v) (Sigma-Aldrich®) durante 24 h e, posteriormente, lavados com água ultrapura.

5.3.1 Soluções de referência

As soluções de referência foram preparadas a partir da diluição de soluções certificadas de 1000 mg L⁻¹ de Cd, Zn, Fe, Ni e Cu (FLUKA-TraceCERT[®]) em água ultrapura.

5.3.2 Solução estoque de PAN

O PAN (Sigma-Aldrich[®]), utilizado como agente quelante para complexação do Cd, foi preparado com etanol absoluto (Sigma-Aldrich[®]), nas concentrações de 0,002 a 0,020 % (m/v) em balão volumétrico.

5.3.3 Soluções-tampão

As soluções-tampão TRIS (tris-(hidroximetil) amino metano), pH 7,0-11,0 e tampão bicarbonato de sódio, pH 10,0-11,0, foram preparados medindo a massa do reagente na concentração de 0,1 mol L⁻¹. Após a dissolução em água ultrapura, o pH foi ajustado para o valor desejado com soluções de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L⁻¹ e hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L⁻¹. Os volumes então foram completados em balões volumétricos com água ultrapura.

5.4 AMOSTRAGEM

Folhas de indivíduo de *O. gratissimum*, *O. americanum e O. campechianum*, Lamiaceae, foram coletadas, no período de janeiro a maio de 2016, nos municípios de Vitória da Conquista, Macaúbas, Barreiras e Livramento de Nossa Senhora, localizadas nas regiões sudoeste, chapada diamantina meridional, oeste, serra geral, respectivamente, no estado da Bahia, Brasil. O material obtido (n = 12) foi seco por processo natural, secagem à sombra (OLIVEIRA *et al*, 1998) por sete dias, pulverizado e mantido em um dessecador até a análise.



Figura 6. Localização da área de estudo Fonte: adaptado do google maps

As amostras foram identificadas e depositadas no Herbário do Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, sob os números: 1231 (*O. americanum*), 1232 (*O. gratissimum*), 1234 (*O. campechianum*).

5.5 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

5.5.1 Digestão da amostra

Aproximadamente 0,05 g de folhas secas e pulverizadas do *O. gratissimum*, *O. americanum* e *O. campechianum* e material de referência (NIST -1515) foram digeridas em bomba de digestão ácida Parr[®] com adição de 900 μL de ácido nítrico 65 % (HNO₃), 300 μL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e 800 μL de água ultrapura. O frasco de digestão foi introduzido no microondas convencional a 90 % da potência total, em três ciclos de dois minutos cada. Com a finalidade de liberar a composição mineral, uma vez que em sua maioria, estes se apresentam ligados a compostos orgânicos. A cada ciclo, o frasco foi deixado em repouso por aproximadamente 10 minutos para alcançar a temperatura ambiente. Após a mineralização, as amostras foram ajustadas para o pH 9,0 com a adição NaOH 25 %, e avolumadas para 5 mL. Sendo então armazenadas até o momento da análise.

5.5.2 Procedimento de pré-concentração

O procedimento foi realizado com 5 mL da solução-tampão 0,1 mol L⁻¹, 500 μL de Cd na concentração de 50 μg L⁻¹, 500 μL de PAN usado como reagente complexante. Foi aguardado um tempo de 15 minutos para a complexação. Em seguida, foi injetado uma mistura de solventes extrator e dispersor, todo o procedimento foi realizado em tubos Falcon de 15 mL. A etapa seguinte foi a centrifugação, que teve duração de 15 minutos a 3200 rpm, para a separação das fases. A fase aquosa foi retirada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro; e, por fim, a fase orgânica foi adicionado 400 μL de etanol. O pH da solução-tampão, a concentração do complexante, o volume dos solventes extrator e dispersor variaram de acordo com o nível utilizado no planejamento experimental, otimização e teste de robustez. A combinação dos solventes extrator e dispersor que apresentaram melhor resposta a DLLME, foram escolhidos para o método. As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis, no comprimento de onda de 546 nm, com base no valor do pico da varredura do complexo Cd-PAN.

5.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento e otimização do método analítico foram utilizadas duas metodologias: método univariado e método multivariado. Na primeira, uma variável é otimizada por vez enquanto que as demais são mantidas constantes. Possui a vantagem de se ter uma interpretação mais simples dos resultados, no entanto requer um maior gasto de reagentes, maiores ensaios analíticos, demanda de tempo, e não considera as interações entre os pontos analisados. Na segunda, todas as variáveis são otimizadas simultaneamente. Os métodos multivariados de otimização são mais rápidos, econômicos e efetivos apesar de possuírem uma interpretação mais complexa (JESUS, 2009).

5.6.1 Planejamento univariado

No planejamento univariado foi avaliado o efeito do pH da solução-tampão no complexo Cd-PAN, variando o pH na faixa de 7,0 a 11,0, o efeito do aumento da concentração do agente complexante sobre a sensibilidade do método, variando a concentração do PAN em 0,002 a 0,020 % (m/v). O efeito da variação do volume da gota foi analisado pelos reagentes

extrator e dispersor. Para o reagente extrator variou o volume de 10 μL a 100 μL e para reagente dispersor de 0,1 mL a 1 mL. A escolha dos reagentes foi baseada na combinação do solvente extrator (1-undecanol, 1-octanol e 1-dodecanol) com solvente dispersor (metanol, etanol e acetonitrila) que apresentaram melhor resposta para a determinação de 50 μg L⁻¹ de Cd. Considerou como parâmetros fixos, no procedimento de pré-concentração, pH 9,0, 500 μL de PAN 0,01 % (m/v), volume do solvente extrator de 60 μL e solvente dispersor de 700 μL.

5.6.2 Planejamento fatorial

O planejamento fatorial completo de dois níveis é uma das ferramentas quimiométricas mais empregadas para otimização de processos e/ou produtos. A quantidade de experimentos necessários para o desenvolvimento é determinada pela expressão, n = 2^k, onde n é o número de experimentos e k o número de fatores. Essa expressão viabiliza todas as possíveis combinações envolvendo todos os fatores em dois níveis, codificados como: inferior (- 1) e superior (+ 1). O erro experimental é determinado pela repetição dos experimentos no ponto central, ou seja, valor codificado (0). Para a avaliação dos resultados encontrados, é gerado o Gráfico de Pareto, que exibe ou não a significância dos fatores principais e de suas interações, mediante apresentação dos valores dos efeitos padronizados de todas as variáveis e suas interações possíveis (FERREIRA, 2015).

A matriz do planejamento foi montada para quatro fatores (pH, agente complexante, solvente extrator e solvente dispersor) totalizando dezesseis experimentos, e mais três pontos centrais, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Matriz do planejamento fatorial de dois níveis

Experimento	pН	Complexante	Extrator	Dispersor
1	1	1	1	1
2	1	1	1	-1
3	1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1
5	1	-1	1	1
6	1	-1	1	-1
7	1	-1	-1	1
8	1	-1	-1	-1
9	-1	1	1	1
10	-1	1	1	-1
11	-1	1	-1	1
12	-1	1	-1	-1

13	-1	-1	1	1
14	-1	-1	1	-1
15	-1	-1	-1	1
16	-1	-1	-1	-1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

Os valores utilizados para o nível inferior, superior e o ponto central de cada fator são representados na Tabela 3. Os níveis foram escolhidos após a análise do planejamento univariado.

Tabela 3. Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial

·		Níveis	
Fatores	- 1	0	+1
pН	7,0	9,0	11,0
Complexante (%, m/v)	4.0×10^{-3}	6.0×10^{-3}	$8,0 \times 10^{-3}$
Volume do extrator (µL)	30,0	50,0	70,0
Volume do dispersor (µL)	700,0	800,0	900,0

5.6.3 Matriz de Doehlert

Após a análise do planejamento fatorial, realizou-se uma etapa de otimização do método, com a finalidade de identificar os pontos críticos dos fatores significativos. A matriz de Doehlert (DOEHLERT, 1970), experimento de segunda ordem, foi aplicada neste estudo. Neste desenho, para três variáveis, Tabela 4, o número de experimentos foi determinado pela expressão n = k² + k + 1, onde (n) é o número de experimentos e (k) é o número de fatores envolvidos. O experimento central foi realizado em triplicata, para cálculo do erro experimental, ao final totalizou 15 experimentos. O planejamento Doehlert possibilita planejamentos envolvendo número de níveis diferenciados para os fatores, sendo que podem ocorrer situações de fatores com até sete níveis; e, não contempla experimentos envolvendo todos os fatores com nível superior e/ou todos com nível inferior (FERREIRA, 2015).

Tabela 4. Valores codificados das coordenadas do desenho Doehlert para três variáveis, na projeção 1, com centro em (0; 0; 0)

Experimentos		Coordena	das	
1	0	0	0	
2	0	0	0	
3	0	0	0	

4	0	-1	0
5	1	0	0
6	0	1	0
7	-1	0	0
8	-0,5	-0,5	0,707
9	0,5	-0,5	0,707
10	0,5	0,5	0,707
11	-0,5	0,5	0,707
12	-0,5	-0,5	-0,707
13	0,5	-0,5	-0,707
14	0,5	0,5	-0,707
15	-0,5	0,5	-0,707

O tratamento dos dados referentes ao planejamento fatorial e otimização da DLLME foi feito com o auxílio do programa *Statistica*[®], versão 10.0 (*Statsoft*), e *Excel Office* 2013, da *Microsoft*[®].

5.7 FIGURAS DE MÉRITO

Os parâmetros de validação de métodos analíticos envolvem linearidade, fator de enriquecimento, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, robustez e interferentes.

5.7.1 Linearidade e fator de enriquecimento

A linearidade é a capacidade de um método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Esse intervalo corresponde à faixa entre os limites de quantificação superior e inferior. É expressa pelo coeficiente de correlação (R^2), obtido por dados estatísticos, no qual o critério mínimo aceitável do R^2 deve ser igual a 0,99; e a equação da reta y = ax + b, onde (y) é a resposta medida em absorbância; (x) a concentração; (x) inclinação da curva de calibração; e (x) a interseção com o eixo x0 (x0) de Cd, com intervalo de 20 x10 (x1) de Cd, com intervalo de 20 x2 (x3).

Com base na curva de linearidade, também foi realizado o cálculo do fator de enriquecimento (FE), Equação 1. Pela razão entre a inclinação da curva do sistema préconcentrado (α_C), na faixa de concentração de 0 a 50 μg L⁻¹ de Cd, e a inclinação da curva do

sistema sem pré-concentrar (α_{SC}), leitura direta do tampão, padrão Cd na faixa de concentração de 0 a 500 μ g L⁻¹ e complexante.

Equação 1:
$$FE = \frac{\alpha c}{\alpha SC}$$

5.7.2 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Na determinação por métodos instrumentais, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de três vezes o ruído da linha de base. Ou determinado pela Equação 2, onde o desvio padrão pode ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco (BRASIL, 2003).

Equação 2:
$$LD = \frac{3 x (desvio padrão)}{inclinação da curva}$$

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Os mesmos critérios de LD podem ser aplicados para o LQ, entretanto, na determinação do ruído da linha de base, considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1. O LD pode ser expresso pela Equação 3 (BRASIL, 2003). O desvio-padrão na determinação do LD e LQ foi calculado com 20 amostras do branco.

Equação 3:
$$LQ = \frac{10 x (desvio padrão)}{inclinação da curva}$$

5.7.3 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Pode ser expresso como desvio

padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV %), conforme a Equação 4. Onde o valor máximo aceitável não ultrapassa 5 % (BRASIL, 2003). Foram realizadas 12 medidas dos pontos de $10~\mu g~L^{-1}$ e de $100~\mu g~L^{-1}$ de Cd.

Equação 4:
$$DPR = \frac{M\acute{e}dia \ x \ 100}{Desvio \ padrão}$$

5.7.4 Exatidão

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança (BRASIL, 2003).

Neste estudo, o teste foi aplicado a cada indivíduo de *O. gratissimum* (n = 4) obtido dos municípios de Vitória da Conquista, Livramento de Nossa Senhora, Macaúbas e Barreiras, onde foram adicionados 10 e 40 μg L⁻¹ de Cd. A recuperação foi calculada através da Equação 5. Onde (C₁) é a concentração determinada na amostra adicionada; (C₂) a concentração determinada na amostra não adicionada; e (C₃) a concentração adicionada.

Equação 5:
$$R(\%) = \left(\frac{C1-C2}{C3}\right) x \ 100$$

5.7.5 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2003). A matriz de planejamento utilizada na robustez pode ser visualizada na Tabela 5.

Tabela 5. Matriz do planejamento fatorial de dois níveis para o teste de robustez

Experimento	pН	Dispersor	Extrator
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1

8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Os valores utilizados para os níveis superiores, inferiores e o ponto central de cada fator, para uma variação de 10 %, são representados na Tabela 6.

Tabela 6. Fatores e níveis utilizados no planejamento para robustez

		Níveis	
Fatores	- 1	0	+1
рН	8,50	9,44	10,38
Volume do dispersor (µL)	630,00	700,00	770,00
Volume do extrator (µL)	51,30	57,00	62,70

5.7.6 Interferentes

Foi avaliado possível interferência de cinco metais (Zn, Cu, Ni e Fe) na determinação do Cd na concentração de 50 μg L⁻¹, pelo método de DLLME, após adição 5, 10 e 15 μg L⁻¹ de cada metal. A interferência (In) foi determinada pela razão entre a leitura do padrão de Cd com a adição do interferente (PA) contra a leitura do padrão (P) sem adição do interferente, expressa em porcentagem, conforme Equação 6.

Equação 6:
$$In = \frac{PA}{P} \times 100$$

5.8 APLICAÇÃO

O método desenvolvido foi aplicado nas amostras de *O. gratissimum, O. americanum, O. campechianum* e material de referência, após a etapa de mineralização. Para o *O. americanum* e *O. campechianum* a determinação de Cd teve por finalidade comparar as espécies com *O. gratissimum.* Para o procedimento foram adicionados 5 mL de solução-tampão pH 9,44, 100 μL da amostra digerida e 500 μL de PAN 0,006 (m/v) % usado como reagente complexante. Foi aguardado um tempo de 15 minutos para a complexação. Em seguida, foi acrescentado uma mistura contendo 57 μL de 1-octanol e 700 μL de acetonitrila. A etapa seguinte foi a centrifugação, que teve duração de 15 minutos a 3200 rpm, para a separação das fases. A fase

aquosa foi retirada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro. E, por fim, a fase orgânica foi adicionado 400 μL de etanol. Também foi realizado pré-concentração para o branco da amostra, após a etapa de mineralização.

As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis, no comprimento de onda de 546 nm, com base no valor do pico da varredura do complexo Cd-PAN. A análise dos dados foi realizada através da ferramenta *Solver*[®] do *Microsoft Excel*[®], conforme foi descrito por Harris (2012) para análise de uma mistura. As digestões e leituras das amostras foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados em forma de média e desvio-padrão.

6. REFERÊNCIAS

ABADI, M.D.M.; ASHRAF, N.; CHAMSAZ, M.; SHEMIRANI, F. An over view of liquid phase microextraction approaches combined with UV–Vis spectrophotometry. **Talanta**, v. 99, p. 1–12, 2012.

AJASA, A. M. O.; BELLO, M. O.; IBRAHIM, A. O.; OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O. Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants of Nigeria. **Food Chem**, v. 85, p. 67–71, 2004.

ALLOWAY, B.J. Heavy metals in soils: trace metals and metalloids in soils and their bioavailability. 3 ed. Environmental Pollution, v. 22, p. 283-311, 2013.

ALMEIDA, M.Z.; LÉDA, P.H.O.; SILVA, M.Q.O.R.; PINTO, A.; LISBOA, M.; GUEDES, M.L.M.L.; PEIXOTO, A.L. Species with medicinal and mystical-religious uses in São Francisco do Conde, Bahia, Brazil: a contribution to the selection of species for introduction into the local Unified Health System. **Rev Bras Farmacogn**, v. 24, p. 171-184, 2014.

ATSDR, AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for cadmium**. Atlanta: ATSDR, 2012.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **Metais: gerenciamento da toxicidade**. São Paulo: Atheneu, 2003.

BAIRD, C.; CANN, M. **Environmental Chemistry**. 4th Edition. New York: W. H., Freeman and Company, 2008.

BAŞGEL, S.; ERDEMOĞLU, S.B. Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey. **Sci Total Environ**, v. 359, p. 82–89, 2006.

BASSOLE, I.H.N.; NEBIE, R.; SAVADOGO, A.; OUATTARA, C.T.; BARRO, N.; TRAORE, S.A. Composition and antimicrobial activities of the leaf and flower essential oils of *Lippia chevalieri* and *Ocimum canum* from Burkina Faso. **African Journal of Biotechnology**,

v. 4, n. 10, p. 1156-1160, 2005.

BERTOLI, A. C. **Efeitos do cádmio e do chumbo no crescimento, translocação e teor de nutrientes tomateiro** (*Lycopersicum esculentum*) cultivado em solução nutritiva. 95f. 2011. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) — Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

BIASI, L.A.; MACHADO, E.M.; KOWALSKI, A.P.J.; SIGNOR, D.; ALVES, M.A.; LIMA, F.I.; DESCHAMPS, C.; CÔCCO, L.C.; SCHEER, A.P. Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo essencial da alfavaca quimiotipo eugenol. **Hortic Bras**, v. 27, n. 1, p. 035-039, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica**: relatório final: efetivando o acesso, a qualidade e a humanização na assistência farmacêutica, com controle social. Brasília, p. 154, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos. Brasília, p. 149, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**, Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Práticas integrativas e complementares plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. Brasília, p. 154, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº42. **Dispõe sobre o regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes Inorgânicos em Alimentos**. Brasília, DF, 2013.

CAROVIC'-STANKO, K.; ORLIC', S.; POLITEO, O.; STRIKIC', F.; KOLAK, I.; MILOS, M.; SATOVIC, Z. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chem**, v. 119, p. 196–201, 2010.

CASANOVA, L.M.; SILVA, D.; SOLA-PENNA, M.; CAMARGO, L.M.M.; CELESTRINI, D.M.; TINOCO, L.W.; COSTA, S.S. Identification of chicoric acid as a hypoglycemic agent from *Ocimum gratissimum* leaf extract in a biomonitoring in vivo study. **Fitoterapia**, v. 93, p. 132–141, 2014.

CHALCHAT, J.C.; GARRY, R.P.; SIDIBÉ, L.; HARAMA, M. Aromatic Plants of Mali (II): Chemical Composition of Essential Oils of *Ocimum canum* Sims. **Essent Oil Res**, v. 11, p. 473–476, 1999.

CHAMSAZ, M.; ARBAB-ZAVAR, M.H.; NAZARI, S. Determination of arsenic by electrothermal atomic absorption spectrometry using headspace liquid phase microextraction after *in situ* hydride generation. **J Anal At Spectrom**, v. 18, p. 1279–1282, 2003.

CLEMENS, S.; PALMGREN, M.G.; KRÄMER, U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. **Trends Plant Sc**, v.7, n.7, 2002.

CORTEZ, D.A.G.; CORTEZ, L.E.R.; PESSINI, G.L.; DORO, D.L., NAKAMURA, C.V. Análise do óleo essencial da alfavaca *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae). **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 2, n. 2, p. 125-127, 1998.

COSTA, R.S.; BRASIL, T.C.; SANTOS, C.J.; SANTOS, D.B.; BARRETO, M.L.; NEVES, N.M.A.; FIGUEIREDO, C.A.V. Produtos naturais utilizados para tratamento de asma em crianças residentes na cidade de Salvador-BA, Brasil. **Rev Bras Farmacogn**, v. 20, n. 4, p. 594-599, 2010.

CUNHA LIMA, S.T.; RODRIGUES, E.D.; MELO, T.; NASCIMENTO, A.F.; GUEDES, M.L.S.; CRUZ, T.; ALVES, C.; MEYER, R.; TORALLES, M.B. Levantamento da flora medicinal usada no tratamento de doenças metabólicas em Salvador, BA- Brasil. **Rev Bras Pl Med**, v. 10, n. 4, p. 83-89, 2008.

D'AVILA, R.C. **Potencial fitorremediador do** *Lupinus* **sp. em solos contaminados com cádmio**. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade do Estado de Santa Catarina, 2014.

DAVIDSON, C.M.; THOMAS, R.P.; MCVEY, S.E.; PERALA, R.; LITTLEJOHN, D.; URE, A.M. Evaluation of a sequential extraction procedure for the speciation of heavy metals in sediments. **Anal Chim ACTA**, v. 291, p. 277-286, 1994.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the brazilian tropical atlantic forest. **Fitoterapia**, v. 73, p. 69-91, 2002.

DOEHLERT, D.H. Uniform Shell Designs. **Journal of the Royal Statistical Society. Series C** (**Applied Statistics**), v. 19, n. 3, p. 231-239, 1970.

DUFFUS, J.H. Heavy metals - A meaningless term? **Pure Appl Chem**, v. 74, n. 5, p. 793-807, 2002.

EGESIE, U.G.; ADELAIYE, A.B.; IBU, J.O.; EGESIE, O. J. Safety and hypoglycaemic properties of aqueous leaf extract of *Ocimum gratissimum* in streptozotocin induced diabetic rats. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, v. 21, n.1-2, p. 31-35, 2006.

ESSINGTON, M.E. **Soil and water chemistry: an integrative approach**. 1 ed. Florida: CRC press, 2004.

EZEKWESILI, C.N.; OBIORA, K.A.; UGWU, O.P. Evaluation of anti-diarrhoeal property of crude aqueous extract of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) in rats. **Biokemistri**, v. 16, n. 2, p. 122-131, 2004.

FARIA, T.J.; FERREIRA, R.S.; YASSUMOTO, L.; SOUZA, J.R.P.; ISHIKAWA, N.K.; BARBOSA, A.M. Antifungal Activity of Essential Oil Isolated from *Ocimum gratissimum* L.

(eugenol chemotype) against Phytopathogenic Fungi. **Braz Arch Biol Techn**, v. 49, n. 6, p. 867-871, 2006.

FEIJÓ, E.V.R.S.; PEREIRA, A.S.; SOUZA, L. R.; SILVA, L. A. M.; COSTA, L.C.B. Levantamento preliminar sobre plantas medicinais utilizadas no bairro Salobrinho no Município de Ilhéus, Bahia. **Rev Bras Pl Med**, v. 15, n. 4, p. 595-604, 2013.

FERREIRA, M.M.A.A.S. **Toxidez de cádmio inibe o crescimento e altera a absorção de nutrientes do girassol**. 48f. 2013. Dissertação (Mestrado em Solos e Qualidade de Ecossistemas) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Bahia, 2013.

FERREIRA, S.L.C. Introdução às técnicas de planejamento de experimentos. Salvador: Vento Leste, 2015.

FOKOU, J.B.H.; DONGMO, P.M.J.; BOYOM, F.F.; MENKEM, E.Z.; BAKARGNA-VIA, I.; TSAGUE, I.F.K.; KAMDEM, M.S.; ZOLLO, P.H.A.; MENUT, C. Antioxidant and antifungal activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* from Yaoundé and Dschang (Cameroon). **J Pharm Pharmacol**, v.2, p. 257-268, 2014.

FRANCISCONI, L.S. **Determinação dos constituintes inorgânicos em plantas medicinais e seus extratos**. 144f. 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

GRUSAK, M.A. **Plant macro- and micronutrient minerals**. USDA/ARS Children's Nutrition Research Center, Texas: Nature Publishing Group, 2001.

GHAREHBAGHI, M.; SHEMIRANI, F.; BAGHDADI, M. Dispersive liquid—liquid microextraction and spectrophotometric determination of cobalt in water samples. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 88, n.7, p. 513-523, 2008.

GUIMARÃES, M.A; SANTANA, T.A; SILVA, E.V; ZENZEN, I.L; LOUREIRO, E. M. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v.1, n. 3, p. 58, 2008.

GUIMARÃES, V.; SÍGOLO, J.B. Detecção de contaminantes em espécie bioindicadora (*Corbicula fluminea*) - Rio Ribeira de Iguape – SP. **Quim Nova**, v. 31, n. 7, p. 1696-1698, 2008.

GUTIERREZ, K. G. Remoção de metais pesados de percolado submetido à recirculação em colunas de resíduo sólido urbano. 87f. 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) — Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

HARRIS, D. C. Análise química quantitativa. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

HERRERA-HERRERA, A.V.; ASENSIO-RAMOS, M.; HERNÁNDEZ-BORGES, J.; RODRÍGUEZ-DELGADO, M.A. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 7, 2010.

HEYDARI, S. Separation/preconcentration and determination of trace levels of cadmium in saffron samples by dispersive liquid—liquid based on solidification of floating organic drop microextraction coupled to UV-VIS spectrophotometry. **Canadian Chemical Transactions**, v. 2, n. 1, p. 12-23, 2014.

IUPAC. International Union of Pure and Applied chemistry. **The "Gold Book". Compendium of Chemical Terminology**, 2 ed. Oxford: Scientific Publications, 1997.

JAIN, A.; VERMA, K.K. Recent advances in applications of single-drop microextraction: A review. **Anal Chim Acta**, v. 706, p. 37-65, 2011.

JÄRUP, L.; BERGLUND, M.; ELINDER, C.G.; NORDBERG, G.; VAHTER, M. Health effects of cadmium exposure - a review of the literature and a risk estimate. **Scand J Work Env Hea**, v. 24, n. 1, p. 1-51, 1998.

JÄRUP, L. Hazards of heavy metal contamination. Brit Med Bull, v. 68, p. 167-182, 2003.

JEANNOT, M.A.; CANTWELL, F.F. Solvent Microextraction into a Single Drop. **Anal Chem**, v. 68, p. 2236-2240, 1996.

JESUS, R.M. Desenvolvimento de método analítico para a determinação de cádmio em vinho e estudo preliminar de especiação de cádmio, ferro, manganês, zinco e cobre em vinho. 104f. 2009. Dissertação (Química) - Universidade Federal da Bahia, 2009.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants**. 4 ed. Boca Raton: CRC Press, 2011.

KOCÚROVÁ, L.; BALOGH, I.S.; ANDRUCH, V. Dispersive liquid-phase microextraction procedure for spectrometric determination of cadmium. **Microchem J**, v. 107, p. 3-9, 2013.

LEITÃO, F.; LEITÃO, S.G.; FONSECA-KRUEL, V.S.; SILVA, I.M.; MARTINS, K. Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: an overview on their botanical diversity and toxicological potential. **Rev Bras Farmacogn**, v. 24, p. 225-247, 2014.

LEONG, M.; FUH, M.; HUANG, S. Beyond dispersive liquid–liquid microextraction. **J Chromatogr A**, v. 1335, p. 2–14, 2014.

LIMA, V.F.; MERÇON, F. Metais pesados no ensino de química. **Química Nova na Escola**, v. 33, n. 4, 2011.

MACIEL, J.V. **Desenvolvimento de método para determinação de ferro e cobre em vinho por espectrofotometria empregando DLLME**. 88f. 2013. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) — Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2013.

MADEIRA, S.V.F.; RABELO, M.; SOARES, P.M.G.; SOUZA, E.P.; MEIRELES, A.V.P.; MONTENEGRO, C.; LIMA, R.F.; ASSREUYA, A.M.S.; CRIDDLE, D.N. Temporal variation of chemical composition and relaxant action of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) on guinea-pig ileum. **Phytomedicine**, v.12, p. 506–509, 2005.

- MAGALHÃES, V.C.; SILVA, D.M.; MACEDO, T.P.; SILVA, F.; MARTINS, M.L.L.; ALMASSY JR., A.A.; NASCIMENTO, W.A. Levantamento etnobotânico na comunidade rural Sapucaia em Santo Antônio de Jesus, Recôncavo da Bahia BA. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 2071- 2074, 2009.
- MALTEZ, H. F. Desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas em sistemas de préconcentração empregando extração em fase sólida e microextração com gota única para determinação de metais-traço em amostras aquosas ambientais. 137f. 2007. Dissertação (Doutorado em Química) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.
- MOHAMED, A.E.; RASHED, M.N.; MOFTY, A. Assessment of essential and toxic elements in some kinds of vegetables. **Ecotox Environ Safe**, v. 55, p. 251–260, 2003.
- MONTEZ, A.C.M. Exposição e acumulação de elementos potencialmente tóxicos em manjericão (*Ocimum basilicum*). 63f. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar Qualidade e Segurança Alimentar) Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2014.
- MOREIRA, R.C.T.; COSTA, L.C.B.; COSTA, R.C.S.; ROCHA, E.A. Abordagem Etnobotânica acerca do Uso de Plantas Medicinais na Vila Cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farm Bonaerense**, v. 21, n. 3, p. 205-11, 2002.
- MOREIRA, B.J.; YOKOYA, J.M.C.; GAITANI, C.M. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME): fundamentos, inovações e aplicações biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 6, n. 3, p. 186-204, 2014.
- MOTA, R.S.; DIAS, H.M. Quilombolas e recursos florestais medicinais no sul da Bahia, Brasil. **Interações**, v. 13, n. 2, p. 151-159, 2012.
- NETO, F.R.G; ALMEIDA, G.S.S.A.; JESUS, N.G.; FONSECA, M.R. Estudo Etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela Comunidade do Sisal no município de Catu, Bahia, Brasil. **Rev Bras Pl Med**, v. 16, n. 4, p. 856-865, 2014.
- NIAZI, A.; HABIBI, S.; RAMEZANI, M. Preconcentration and simultaneous spectrophotometric determination of copper and mercury by dispersive liquid—liquid microextraction and orthogonal signal correction—partial least squares. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 8, p. 706-714, 2015.
- NORDBERG, G. F.; NOGAWA, K.; NORDBERG, M. Handbook on the toxicology of metals: Cadmium. 4 ed. Elsevier, 2015.
- OGUANOBI, N.I; CHIJIOKE, C.P.; GHASI, S.I. Effects of aqueous leaf extract of *Ocimum gratissimum* on oral glucose tolerance test in type-2 model diabetic rats. **Afr J Pharm Pharmaco**, v. 6, n. 9, p. 630-635, 2012.
- OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Farmacognosia. São Paulo: Atheneu, 1998.

PADALIA, R.C.; VERMA, R.S.; CHAUHAN, A.; CHANOTIYA, C.S. Changes in aroma profiles of 11 Indian *Ocimum* taxa during plant ontogeny. **Acta Physiol Plant**, v. 35, p. 2567, 2013.

PALEOLOGOS, E. K.; GIOKAS, D. L.; KARAYANNIS, M. I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 5, 2005.

PASSOS, M.G.; CARVALHO, H.; WIEST, J.M. Inibição e inativação in vitro de diferentes métodos de extração de *Ocimum gratissimum* L. ("alfavacão", "alfavaca", "alfavaca-cravo") - Labiatae (Lamiaceae), frente a bactérias de interesse em alimentos. **Rev Bras Pl Med**, v. 11, n. 1, p. 71-78, 2009.

PATON, A. A synopsis of *Ocimum* L. (Labiatae) in Africa. **Kew Bulletin**, v. 47, n. 3, p. 403-435, 1992.

PELOZATO, M. Valores de referência de cádmio, cobre, manganês e zinco para solos de Santa Catarina. 70f. 2008. Dissertação (Mestrado em Manejo do Solo) - Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, SC, 2008.

PENA-PEREIRA, F.; LAVILLA, I.; BENDICHO, C. Miniaturized preconcentration methods based on liquid–liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. **Spectrochim Acta B**, v. 64, p. 1-15, 2009.

PEREIRA, E.R. Desenvolvimento de método empregando DLLME para extração e préconcentração de ferro em amostras de água com diferentes salinidades. 71f. 2013. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) — Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2013.

PÉREZ-OUTEIRAL, J.; MILLÁN, E.; GARCIA-ARRONA, R. Use of dispersive liquid-liquid microextraction and UV-Vis spectrophotometry for the determination of cadmium in water samples. **Journal of Spectroscopy**, v. 2, p. 1-4, 2014.

PERKAMPUS, H. H. **UV-VIS spectroscopy and its applications**. 1 ed. Berlin: Springer Verlag, 1992.

PINTO, E.P.P.; AMOROZO, M.C.M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica — Itacaré, BA, Brasil. **Acta Bot Bras**, v. 20, n. 4, p 751-762, 2006.

PIRES, M.V; ABREU, P.P; SOARES, C.S; SOUZA, B.; MARIANO, D.; SILVA, D.C.; ROCHA, E.A. Etnobotânica de terreiros de candomblé nos municípios de Ilhéus e Itabuna, Bahia, Brasil. **R Bras Bioci**, v. 7, n. 1, p. 3-8, 2009.

POMBO, L.C.A. Absorção de metais pesados por plantas e métodos e avaliação da disponibilidade de cádmio no solo. 84f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Programa de Pós-graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1992.

- REZAEE, M.; ASSADI, Y.; MILANI HOSSEINI, M.R.; AGHAEE, E.; AHMADI, F.; BERIJANI, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **J Chromatogr A**, v. 1116, p. 1-9, 2006.
- ROCHA, F.R.P.; TEIXEIRA, L.S.G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Quim Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.
- RODRIGUES, A.C.C.; GUEDES, M.L.S. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas Bahia. **Rev Bras Pl Med**, v. 8, n. 2, p. 1-7, 2006.
- SILVA, M.G.V.; SANTOS, R.N.; MATOS, F.G.A.; MACHADO, M.I.L. Volatile constituents from leaf, inflorescence and root oils of *Ocimum americanum* L. grown in north-eastern Brazil. **Flavour Fragr J**, v. 18, p. 303–304, 2003.
- SILVA, M.G.V.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; SILVA, F.O. Essential oil composition of the leaves of *Ocimum micranthum* Willd. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 3, p. 189-190, 2004.
- SILVA, M.P.L; GUIMARÃES, O.S.; ALMASSY JR, A.A.; SILVA, F; MARTINS, G.N. Levantamento etnobotânico e etnofarmacológico de plantas Medicinais em comunidades rurais de Amargosa e Mutuípe Ba. **Magistra**, v. 22, n. 1, p. 08 -13, 2010.
- SINGH, V.; GARG, A.N. Availability of essential trace elements in Ayurvedic indian medicinal herbs using instrumental neutron activation analysis. **Appl Radiat Isotopes**, v. 48, n. 1, p. 97-101, 1997.
- ŠKRLÍKOVÁ, J.; ANDRUCH, V.; BALOGH, I.S.; KOCÚROVÁ, L.; NAGY, L.; BAZEĽ, Y. A novel, environmentally friendly dispersive liquid—liquid microextraction procedure for the determination of copper. **Microchem J**, v. 99, p. 40-45, 2011.
- SOUSA, T.S. Estudo da atividade biológica de *Ocimum campechianum* Mill. e determinação de seu perfil fitoquímico. 76f. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.
- SOUZA FILHO, A.P.S.; BAYMA, J.C.; GUILHON, G.M.S.P.; ZOGHBI, M.G.B. Atividade potencialmente alelopática do óleo essencial de *Ocimum americanum*. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 499-505, 2009.
- STANLEY, M.C.; IFEANYI, O.E.; CHINEDUM, O.K.; CHINENYE, N.D. The Antibacterial activity of leaf extracts of *Ocimum gratissimum* and Sida acuta. **International Journal of Microbiological Research**, v. 5, n. 2, p. 24-129, 2014.
- STATISTICA for Windows, *StatSoft*, Inc. 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 741014, USA, 1999.
- TREVISAN, M.T.S.; SILVA, M.G.V.; PFUNDSTEIN, B.; SPIEGELHALDER, B.; OWEN, R.W. Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *ocimum*. **J Agr Food Chem**, v. 54, p. 4378-4382, 2006.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R.R.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; MAZA, P.K.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; ALVIANO, D.S.; ROSA, M.S.S.; LOPES, A.H.C.S.; ALVIANO, C.S.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitol Int**, v. 55, p. 99-105, 2006.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas Medicinais: Cura segura? **Quim Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEIRA, R.F.; SIMON, J. E. Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil. **Economic Botany**, v. 54, n. 2, p. 207-216, 2000.

WEN, X.; YANG, Q.; YAN, Z.; DENG, Q. Determination of cadmium and copper in water and food samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with UV–vis spectrophotometry. **Microchem J**, v. 97, p. 249-254, 2011.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. . Expert committee on specification for pharmaceuticals preparation, 1992.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Exposure to cadmium: A major public health concern, 2010.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Joint FAO/WHO food standards** programme codex alimentarius commission, twenty-seventh session, 2004.

XU, L.; BASHEER, C.; LEE, H.K. Developments in single-drop microextraction. J Chromatogr A, v. 1152, p. 184-192, 2007.

ZANG, X.; WU, Q.; ZHANG, M.; XI, G.; WANG, Z. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. **Chin J Anal Chem**, v. 37, n. 2, p. 161–168, 2009.

ZULOAGA, O; OLIVARES, M.; NAVARRO, P.; VALLEJO, A.; PRIETO, A. Dispersive liquid—liquid microextraction: trends in the analysis of biological samples. **Bioanalysis**, v. 7, n. 17, p. 2211-25, 2015.

7. ARTIGO

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO USANDO DLLME PARA DETERMINAÇÃO DE CÁDMIO EM FOLHAS DE ALFAVACA (Ocimum gratissimum)

Ana Cláudia Andrade Vinhasa, Anderson Santos Souza*a.

^aUniversidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, 45.029-094, Vitória da Conquista, Bahia, Brazil

RESUMO

As plantas medicinais são utilizadas como recursos terapêuticos no cuidado a saúde, conhecimento este que é passado por gerações pela medicina tradicional e popular e que faz parte da evolução humana. O estudo de elementos inorgânicos na composição de plantas recebeu impulso significativo com o incremento das metodologias que possibilitaram a detecção e quantificação de minerais. Desta forma, o trabalho teve por objetivo desenvolver um método analítico por microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) acoplada à espectrofotometria de absorção molecular UV-Vis para a determinação de cádmio (Cd) em folhas de alfavaca. No processo de extração por DLLME, foi utilizado PAN (1-(2-piridilazo)-2-naftol) como agente complexante e uma mistura de pequenos volumes contendo dois solventes orgânicos, um extrator e um dispersor. Essa mistura foi injetada de forma rápida na amostra aquosa, para extração do analito. A combinação dos solventes promoveu a formação de gotículas, e após centrifugação (15 min a 3200 rpm), a gota flutuante foi coletada (cerca de 500 μL, com etanol) e determinada por um espectrofotômetro a 546 nm. O método foi realizado através do planejamento fatorial de dois níveis e otimizado pela matriz de Doehlert para determinar os pontos críticos das variáveis estudadas. O volume do solvente extrator (1-octanol, 57 μL), volume do solvente dispersor (acetonitrila, 700 μL), pH (9,44) e a concentração do PAN (0,006 %, m/v) foram determinados. O método proposto permitiu a determinação de Cd na faixa de concentração de 10 a 140 μ g L⁻¹ (y = 0.007x - 0.0017, R² = 0.999), com limite de detecção (n = 20) de 0,81 μ g L⁻¹ e limite de quantificação (n = 20) de 2,7 μ g L⁻¹, precisão (n = 12) calculada como desvio-padrão relativo (RSD) de 4,21 e 1,30 % para concentrações de Cd de 10 e 100 µg L⁻¹, respectivamente. O fator de enriquecimento foi de 23 vezes. A exatidão foi avaliada pela técnica de adição e recuperação, e os valores variaram de 92,09 a 108,88 %. Foi avaliada a robustez, variando os níveis das variáveis em ± 10 % dos valores críticos, os resultados indicaram que não houve diferença estatística significativa. A aplicação do método

foi realizada em doze amostras de alfavaca e material de referência (NIST- 1515). Não foi

determinado Cd nas amostras estudadas, o que tornam seguras quanto aos efeitos tóxicos deste

elemento-traço no organismo.

Palavras-chave: DLLME. Cádmio. Planta medicinal.

1. INTRODUÇÃO

O emprego de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças é

tão antigo quanto à civilização [1,2]. O gênero Ocimum, da família Lamiaceae, apresenta grande

variedade de espécies, conhecidas popularmente como alfavaca ou manjerição [3-5]. O.

gratissimum também conhecido como "alfavaca-cravo", "alfavacão" ou "quioiô", é um

subarbusto aromático, originário do Oriente e naturalizado em todo o Brasil [6]. Na medicina

popular, as folhas são comumente empregadas em chá devido suas propriedades carminativa,

sudorífica e diurética [7,8]. Estudo com o extrato das folhas apresentou atividade

hipoglicemiante [9-11], antidiarreico [12] e antibacteriana [13] e o óleo volátil atividade

antifúngica [14], leishmanicida [15] e antioxidante [16].

A acumulação de elementos tóxicos nas plantas, e consequentemente ao longo da cadeia

alimentar, depende diretamente da fração de metais biodisponíveis no meio [17, 18]. Desta

forma, os elementos químicos contidos nas plantas medicinais podem ser disponibilizados para

o corpo humano em concentrações significantes pelo consumo dessas ervas e seus extratos [19].

De acordo com a FAO/WHO (Organização Mundial de Saúde), a quantidade de cádmio (Cd)

tolerável, que pode ser ingerida semanalmente pelo organismo humano é de 7 µg kg⁻¹ para

adultos e crianças. Este valor foi estabelecido levando em consideração a concentração crítica

de Cd que pode causar disfunção renal. Como principais fontes dietéticas de Cd se destacam

arroz, trigo, raízes amiláceas e tubérculos, moluscos e legumes, além de vegetais folhosos [20].

Neste trabalho um método de extração e pré-concentração de Cd em folhas de alfavaca

líquido-líquido dispersiva (DLLME) e determinação usando microextração

espectrofotometria UV-Vis foi proposto. Os principais parâmetros que influenciam o

procedimento da DLLME foram estudados através de análise fatorial completa de dois níveis e

otimização pela matriz de Doehlert.

35

2. EXPERIMENTAL

2.1 Instrumentação

Todos os procedimentos de pesagem foram feitos em uma balança analítica de precisão (Shimadzu[®], modelo AY220). Foram utilizados micropipetadores e pipetadores automáticos com capacidade variável de 10 a 1000 μL (Transferpette[®]S) e 1000 a 5000 μL (Eppendorf Research[®]). As amostras vegetais foram pulverizadas através de um moedor de facas (Cuisinart[®], modelo DCG-20BKN) e mantidas em um dessecador. No processo de digestão foi utilizado bomba de digestão ácida (PARR[®]) e um forno de microondas (Consul[®]). Na etapa de separação das fases, durante o procedimento de DLLME, usou uma centrífuga analítica (Hettich[®], modelo Rotofix 32 A) com capacidade para 32 tubos de 15 mL e velocidade máxima de rotação de 4000 rpm. Para medida do pH foi utilizado um pHmetro digital (Gehaka[®], modelo PG 1800). As medidas foram feitas empregando um espectrofotômetro UV-Vis de duplo feixe (Shimadzu[®], modelo UV-1800), equipado com duplo monocromador e duas microcubetas de quartzo gêmeas com 1,0 cm de caminho óptico e capacidade de 750 μL.

2.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico: peróxido de hidrogênio (Vetec[®]), ácido nítrico, 1-undecanol, 1-octanol, 1-dodecanol, metanol, etanol e acetonitrila (Sigma-Aldrich[®]). Para o preparo de soluções foi utilizado água ultrapura obtida a partir de um sistema de purificação (Milli-Q[®]). As vidrarias usadas, e outros materiais, foram descontaminados por imersão em uma solução de HNO₃ 10 % (v/v) (Sigma-Aldrich[®]) durante 24 h e, posteriormente, lavados com água ultrapura.

As soluções de referência foram preparadas a partir da diluição de soluções certificadas de 1000 mg L⁻¹ de Cd, Zn, Fe, Ni e Cu (FLUKA-TraceCERT[®]) em água ultrapura. O PAN (Sigma-Aldrich[®]), utilizado como agente quelante para complexação do Cd, foi preparado com etanol absoluto (Sigma-Aldrich[®]), nas concentrações de 0,002 a 0,020 % (m/v) em balão volumétrico. As soluções-tampão TRIS (tris-(hidroximetil) amino metano) com pH 7,0-11,0 e tampão bicarbonato de sódio com pH 10,0-11,0 foram preparados medindo a massa do reagente na concentração de 0,1 mol L⁻¹. Após a dissolução em água ultrapura, o pH foi ajustado para o

valor desejado com soluções de ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L⁻¹ e hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 mol L⁻¹. Os volumes então foram completados em balões volumétricos com água ultrapura.

2.3 Amostra

Folhas de indivíduo de *O. gratissimum*, *O. americanum* e *O. campechianum* Lamiaceae, foram coletadas, no período de janeiro a maio de 2016, nos municípios de Vitória da Conquista, Macaúbas, Barreiras e Livramento de Nossa Senhora, localizadas nas regiões sudoeste, chapada diamantina meridional, oeste, serra geral, respectivamente, no estado da Bahia, Brasil. O material obtido (n = 12) foi seco por processo natural, secagem à sombra [21] por sete dias, pulverizado e mantido em um dessecador até a análise.

As amostras foram identificadas e depositadas no Herbário do Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, sob os números: 1231 (*O. americanum*), 1232 (*O. gratissimum*), 1234 (*O. campechianum*).

2.4 Tratamento da amostra

Aproximadamente 0,05 g de folhas secas e pulverizadas das espécies de alfavaca e material de referência (NIST -1515) foram digeridas em bomba de digestão ácida Parr® com adição de 900 μL de ácido nítrico 65 % (HNO₃), 300 μL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e 800 μL de água ultrapura. O frasco de digestão foi introduzido no microondas convencional a 90 % da potência total, em três ciclos de dois minutos cada. Com a finalidade de liberar a composição mineral, uma vez que em sua maioria, estes se apresentam ligados a compostos orgânicos. A cada ciclo, o frasco foi deixado em repouso por aproximadamente 10 minutos para alcançar a temperatura ambiente. Após a mineralização, as amostras foram ajustadas para o pH 9,0 com a adição NaOH 25 %, e avolumadas para 5 mL. Sendo então armazenadas até o momento da análise.

2.5 Planejamento univariado

No planejamento univariado foi avaliado o efeito do pH da solução-tampão no complexo Cd-PAN, variando o pH na faixa de 7,0 a 11,0, o efeito do aumento da concentração do agente complexante sobre a sensibilidade do método, variando a concentração do PAN em 0,002 a

0,020 % (m/v). O efeito da variação do volume da gota foi analisado pelos reagentes extrator e dispersor. Para o reagente extrator variou o volume de 10 μL a 100 μL e para reagente dispersor de 0,1 mL a 1 mL. A escolha dos reagentes foi baseada na combinação do solvente extrator (1-undecanol, 1-octanol e 1-dodecanol) com solvente dispersor (metanol, etanol e acetonitrila) que apresentaram melhor resposta para a determinação de 50 μg L⁻¹ de Cd. Considerou como parâmetros fixos, no procedimento de pré-concentração, pH 9,0, 500 μL de PAN 0,01 % (m/v), volume do solvente extrator de 60 μL e solvente dispersor de 700 μL.

2.6 Planejamento fatorial

O estudo foi realizado em duas etapas. Primeiro foi realizado planejamento fatorial completo de dois níveis para quatro fatores. As variáveis escolhidas foram pH, concentração do agente complexante, volume do solvente extrator e volume do solvente dispersor. Os valores utilizados para os níveis superiores, inferiores e o ponto central de cada fator foram escolhidos tomandose como base os resultados obtidos no planejamento univariado. A segunda etapa foi a determinação dos valores críticos pela matriz de Doehlert [22]. As variáveis otimizadas foram pH, volume dos solventes extrator e dispersor. Replicatas dos pontos centrais em ambos estudos foram obtidos para cálculo do erro experimental. O tratamento dos dados foi realizado através do programa *Statistica*[®], versão 10.0 (*Statsoft*) [23], e *Excel Office* 2013, da *Microsoft*[®].

2.7 Procedimento de pré-concentração

Nas condições de otimização para DLLME, foram adicionados 5 mL de solução-tampão pH 9,44, 100 μL da amostra digerida e 500 μL de PAN 0,006 (m/v %) usado como reagente complexante. Foi aguardado um tempo de 15 minutos para a complexação. Em seguida, foi acrescentado uma mistura contendo 57 μL de 1-octanol e 700 μL de acetonitrila. A etapa seguinte foi a centrifugação, que teve duração de 15 minutos a 3200 rpm, para a separação das fases, fase orgânica menos densa que a água. A fase aquosa foi retirada com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro; e, por fim, a fase orgânica foi adicionado 400 μL de etanol. Foi realizado pré-concentração para o branco da amostra, após a etapa de mineralização.

As leituras foram realizadas em um espectrofotômetro de absorção molecular UV-Vis, no comprimento de onda de 546 nm, com base no valor do pico da varredura do complexo Cd-PAN. Os dados foram analisados em triplicata, através da ferramenta *Solver*[®] do *Microsoft*

Excel®, conforme descrito para análise de uma mistura [24], e apresentados em forma de média e desvio-padrão.

2.8 Figuras de mérito

Os parâmetros de validação do método foram linearidade, fator de enriquecimento, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, robustez e interferentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Seleção dos reagentes

O solvente extrator é usado na DLLME como um importante parâmetro na eficiência da extração, combinado com o solvente dispersor, o reagente orgânico é disperso na fase aquosa da amostra em gotas muito finas extraindo os analitos [25]. O 1-undecanol, 1-octanol e 1-dodecanol foram usados como solventes extratores em virtude de apresentarem imiscibilidade na amostra e possuírem alta capacidade de extração do composto de interesse. O metanol, etanol e acetonitrila foram usados como solventes dispersores. O 1-octanol e a acetonitrila, solvente extrator e dispersor, respectivamente, foram os reagentes que em associação apresentaram a melhor eficiência de extração e consequentemente a melhor resposta analítica, Figura 1.

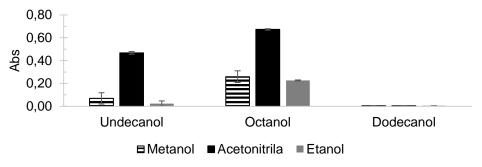


Figura 1. Seleção do tipo do solvente extrator e dispersor

As leituras foram realizadas no espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 546 nm, determinado através do pico da varredura do complexo Cd-PAN, Figura 2.

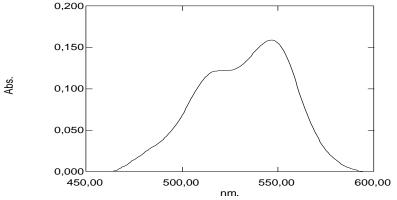


Figura 2. Espectro de absorção Cd-PAN

3.2 Planejamento experimental

No planejamento univariado foi avaliado o efeito do pH no complexo Cd-PAN, concentração do agente complexante sobre a sensibilidade do método e variação do volume da gota pelos reagentes extrator e dispersor, Figura 3.

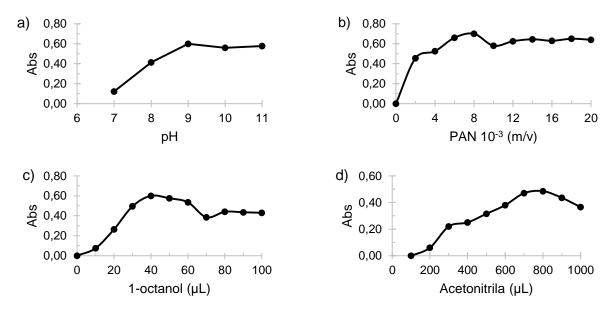


Figura 3. Planejamento univariado: a) pH; b) complexante (PAN); c) solvente extrator (1-octanol); d) solvente extrator (acetonitrila)

Os valores de cada fator foram otimizados através do planejamento fatorial de dois níveis, pela resposta dos maiores valores em absorvância do planejamento univariado, Tabela 1. A significância dos efeitos foi avaliada através da Análise de Variância (ANOVA) e o gráfico de Pareto, com 95 % de confiabilidade.

Tabela 1. Matriz do planejamento fatorial de dois níveis com valores codificados

Experimento	ьП	Complexante	Extrator	Dispersor	Resposta
Experimento	pН	(m/v %)	(µL)	(µL)	(absorvância)
1	- (7,0)	$-(4 \times 10^{-3})$	- (30,0)	- (700,0)	0,181
2	+(11,0)	$-(4 \times 10^{-3})$	- (30,0)	- (700,0)	1,141
3	- (7,0)	$+ (8 \times 10^{-3})$	- (30,0)	- (700,0)	0,209
4	+ (11,0)	$+ (8 \times 10^{-3})$	- (30,0)	- (700,0)	1,198
5	- (7,0)	$-(4 \times 10^{-3})$	+(70,0)	- (700,0)	0,187
6	+ (11,0)	$-(4 \times 10^{-3})$	+(70,0)	- (700,0)	1,866
7	- (7,0)	$+ (8 \times 10^{-3})$	+(70,0)	- (700,0)	0,205
8	+ (11,0)	$+ (8 \times 10^{-3})$	+(70,0)	- (700,0)	1,364
9	- (7,0)	$-(4 \times 10^{-3})$	- (30,0)	+(900,0)	0,184
10	+ (11,0)	$-(4 \times 10^{-3})$	- (30,0)	+(900,0)	1,026
11	- (7,0)	$+ (8 \times 10^{-3})$	- (30,0)	+(900,0)	0,213
12	+(11,0)	$+ (8 \times 10^{-3})$	- (30,0)	+(900,0)	0,998
13	- (7,0)	$-(4 \times 10^{-3})$	+(70,0)	+(900,0)	0,178
14	+ (11,0)	$-(4 \times 10^{-3})$	+(70,0)	+(900,0)	1,078
15	- (7,0)	$+ (8 \times 10^{-3})$	+(70,0)	+(900,0)	0,204
16	+(11,0)	$+ (8 \times 10^{-3})$	+(70,0)	+(900,0)	1,201
17	0 (9,0)	$0 (6 \times 10^{-3})$	0 (50,0)	0 (800,0)	0,981
18	0 (9,0)	$0 (6 \times 10^{-3})$	0 (50,0)	0 (800,0)	1,098
19	0 (9,0)	$0 (6 \times 10^{-3})$	0 (50,0)	0 (800,0)	1,057

O resultado da ANOVA, apresentado na Tabela 2, mostra que pH, solvente extrator (SE) e solvente dispersor (SD) são variáveis significativas e, portanto, suas influências devem ser estudadas, assim como as interações (pH x SE) e (pH x SD). O complexante (CR) não foi significativo e seu valor fixado em 6 x 10⁻³ (m/v %).

Tabela 2. Análise de variância do planejamento fatorial de dois níveis

Fatores e variáveis	SS	df	MS	F	P
(1) pH	4,317045	1	4,317045	1224,925	0,000815
(2) CR	0,003875	1	0,003875	1,100	0,404401
(3) SE	0,080231	1	0,080231	22,765	0,041230
(4) SD	0,100648	1	0,100648	28,558	0,033278
1 by 2	0,012713	1	0,012713	3,607	0,197935
1 by 3	0,083955	1	0,083955	23,822	0,039508
1 by 4	0,099698	1	0,099698	28,288	0,033580
2 by 3	0,011078	1	0,011078	3,143	0,218249
2 by 4	0,018838	1	0,018838	5,345	0,146943
3 by 4	0,026651	1	0,026651	7,562	0,110710
Lack of Fit	0,390743	6	0,065124	18,478	0,052222
Pure Error	0,007049	2	0,003524		
Total SS	5,152521	18			

Lack of fit = falta de ajuste; Pure error = erro puro; SS = soma quadrática; df = grau de liberdade, MS = média quadrática; valor P = nível de probabilidade.

A partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial, o gráfico de Pareto foi gerado para visualização dos efeitos estimados dos fatores principais. Neste gráfico, Figura 4, os fatores representados em barras, indicam o efeito significativo sobre o resultado (p > 0,05).

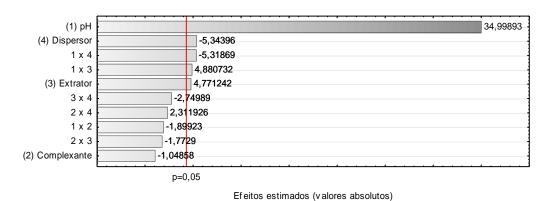


Figura 4. Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial

A função polinomial de primeira ordem do planejamento fatorial está apresentada na Equação 1, coeficiente de correlação (R²) de 0,92. Esta equação descreve as superfícies de resposta apresentada na Figura 5.

Equação 1. y = 0.767 + 0.519(pH) - 0.015(CR) + 0.071(SE) - 0.079(SD) - 0.028 (pH x CR) + 0.072(pH x SE) - 0.079(pH x SD) - 0.026(CR x SE) + 0.034(CR x SD) - 0.041(SE x SD)

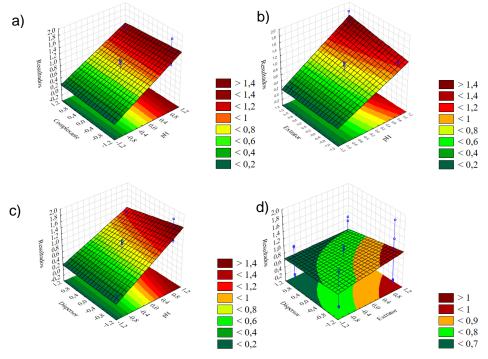


Figura 5. Gráfico da superfície de resposta das interações entre as variáveis: a) complexante x pH; b) extrator X pH; c) dispersor x pH; d) dispersor x extrator.

Após a análise das variáveis significativas no planejamento fatorial, pH e solventes dispersor e extrator, a segunda etapa foi a determinação dos valores críticos pela matriz de Doehlert, totalizando 15 experimentos e a resposta dada em absorvância, Tabela 3.

Tabela 3. Matriz de Doehlert para três variáveis

Experimento	рН	Extrator (µL)	Dispersor (μL)	Resposta (absorvância)
1	0 (9,0)	0 (50,0)	0 (800,0)	0,676
2	0 (9,0)	0 (50,0)	0 (800,0)	0,615
3	0 (9,0)	0 (50,0)	0 (800,0)	0,644
4	0 (9,0)	-1 (30,0)	0 (800,0)	0,452
5	1 (11,0)	0 (50,0)	0 (800,0)	0,342
6	0 (9,0)	1 (70,0)	0 (800,0)	0,542
7	-1 (7,0)	0 (50,0)	0 (800,0)	0,275
8	-0,5 (8,0)	-0,5 (40,0)	0,707 (1000,0)	0,461
9	0,5 (10,0)	-0,5 (40,0)	0,707 (1000,0)	0,275
10	0,5 (10,0)	0,5 (60,0)	0,707 (1000,0)	0,325
11	-0,5 (8,0)	0,5 (60,0)	0,707 (1000,0)	0,224
12	-0,5 (8,0)	-0,5 (40,0)	-0,707 (600,0)	0,369
13	0,5 (10,0)	-0,5 (40,0)	-0,707 (600,0)	0,446
14	0,5 (10,0)	0,5 (60,0)	-0,707 (600,0)	0,599
15	-0,5 (8,0)	0,5 (60,0)	-0,707 (600,0)	0,433

O resultado da ANOVA da matriz de Doehlert, com intervalo de confiança de 95 %, é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Análise de variância da matriz de Doehlert

Fatores e variáveis	SS	df	MS	F	P
(1) pH (L)	0,005329	1	0,005329	5,7240	0,139149
pH (Q)	0,135879	1	0,135879	145,9492	0,006782
(2) SE (L)	0,002756	1	0,002756	2,9605	0,227461
SE (Q)	0,026285	1	0,026285	28,2329	0,033642
(3) SD (L)	0,039481	1	0,039481	42,4066	0,022779
SD (Q)	0,064701	1	0,064701	69,4961	0,014086
1L by 2L	0,017672	1	0,017672	18,9817	0,048854
1L by 3L	0,013448	1	0,013448	14,4447	0,062781
2L by 3L	0,020402	1	0,020402	21,9141	0,042729
Lack of Fit	0,006343	3	0,002114	2,2709	0,320298
Pure Error	0,001862	2	0,000931		
Total SS	0,292862	14			

Lack of fit = falta de ajuste; Pure error = erro puro; SS = soma quadrática; df = grau de liberdade, df = média quadrática; valor df = nível de probabilidade; df = linear; df = quadrática

A partir dos dados foram geradas superfícies de resposta, Figura 6. Estes gráficos podem ser descritos pela Equação 2, R² de 0,97, que mostra a relação entre pH, SE, SD e sinal analítico (SA). Durante a avaliação de modelos em técnicas multivariadas o valor R² maior ou igual a 0,90 é considerado satisfatório [26].

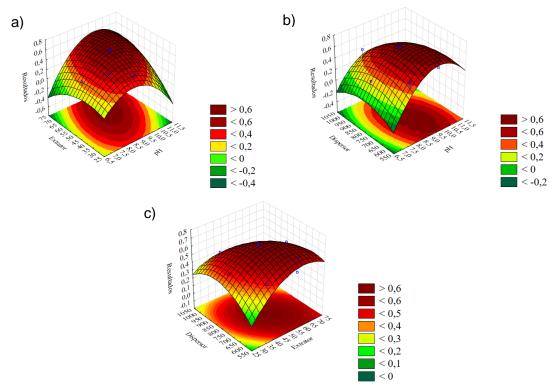


Figura 6. Gráfico da superfície de resposta das interações entre as variáveis: a) extrator x pH; b) dispersor X pH; c) dispersor x extrator

Equação 2.
$$(SA) = -9,532 + 1,461(pH) + 0,016(SE) + 0,008 (SD) - 0,08413 (pH)^2 - 0,0003 (SE)^2 - 0,000003 (SD)^2 + 0,004 (pH)(SE) - 0,0002 (pH)(SD) - 0,00003 (SE)(SD)$$

A derivação da equação acima em função das três variáveis resulta no sistema de equações abaixo:

$$\delta(SA)/\delta(pH) = 1,461 - 0,168 (pH) + 0,004 (SE) - 0,0002 (SD) = 0$$

$$\delta(SA)/\delta(SE) = 0,016 - 0,0006 (SE) + 0,004 (pH) - 0,00003 (SD) = 0$$

$$\delta(SA)/\delta(SD) = 0,008 - 0,000006 (SD) - 0,0002 (pH) - 0,00003 (SE) = 0$$

Desta forma, os valores otimizados para cada uma das variáveis são: pH 9,44, volume extrator de 57 μ L e volume dispersor de 700 μ L.

3.3 Figura de mérito

A linearidade é a capacidade de um método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais a concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Esse intervalo corresponde à faixa entre os limites de quantificação superior e inferior. Expressa pelo coeficiente de correlação (R^2), obtido por dados estatísticos, no qual o critério mínimo aceitável do R^2 deve ser igual a 0,99; e a equação da reta y = ax + b, onde (y) é a resposta medida em absorbância; (x) a concentração; (x) inclinação da curva de calibração; e (x) a interseção com o eixo x0 germanas de calibração para o método proposto foi realizada nas concentrações de 0 a 160 x1 germanas de Cd, com intervalo de 20 x2 germanas de Cd, com resultado a faixa linear foi de 0 a 140 x3 germanas concentrações de 0 a 160 x5 de Cd, com intervalo de 20 x6 germanas de Cd, com resultado a faixa linear foi de 0 a 140 x5 germanas concentrações de 0 a 160 x6 germanas concentrações de 0 a 160 x7 germanas concentrações de 0 a 160 x8 germanas concentrações de 0 a 160 x9 germanas concentrações

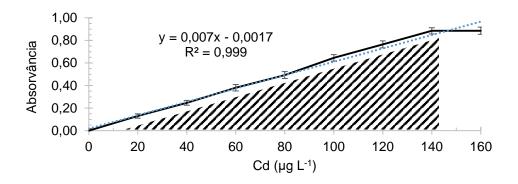


Figura 7. Curva de calibração pré-concentrada

Com base na curva de linearidade, foi realizado o cálculo do fator de enriquecimento (FE). Pela razão entre a inclinação da curva do sistema pré-concentrado, na faixa de concentração de 0 a 50 μ g L⁻¹ de Cd (y = 0,007x + 0,0022, R² = 0,998), e a inclinação da curva do sistema sem pré-concentrar, leitura direta do tampão pH 9,44, complexante PAN 6 x 10⁻³ (m/v %) e Cd, na faixa de concentração de 0 a 500 μ g L⁻¹ (y = 0,0003x + 0,0007, R² = 0,999), o fator de enriquecimento foi de 23 vezes. Para n = 20, obteve-se como resultado limite de detecção (LD) de 0,81 μ g L⁻¹ e limite de quantificação (LQ) de 2,70 μ g L⁻¹. A precisão (n = 12) calculada como desvio-padrão relativo (RSD) foi de 4,21 e 1,30 % para concentrações de Cd de 10 e 100 μ g L⁻¹, respectivamente, o valor máximo aceitável não ultrapassa 5 % [27].

A robustez foi avaliada pelo planejamento fatorial de dois níveis, totalizando onze experimentos. Os níveis escolhidos foram aplicados com base no resultado da otimização

variando os valores de pH, solventes extrator e dispersor em \pm 10 %, os resultados são demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5.	Planejamento	fatorial para	avaliação	da robustez

Experimento	рН	Dispersor (µL)	Extrator (µL)	Resposta (absorvância)
1	-1 (8,50)	-1(630,00)	-1 (51,30)	0,366
2	1 (10,38)	-1(630,00)	-1 (51,30)	0,396
3	-1 (8,50)	1 (770,00)	-1 (51,30)	0,405
4	1 (10,38)	1 (770,00)	-1 (51,30)	0,446
5	-1 (8,50)	-1(630,00)	1 (62,70)	0,353
6	1 (10,38)	-1(630,00)	1 (62,70)	0,449
7	-1 (8,50)	1 (770,00)	1 (62,70)	0,362
8	1 (10,38)	1 (770,00)	1 (62,70)	0,574
9	0 (9,44)	0 (700,00)	0 (57,00)	0,415
10	0 (9,44)	0 (700,00)	0 (57,00)	0,468
11	0 (9,44)	0 (700,00)	0 (57,00)	0,408

A análise do gráfico de Pareto, Figura 8, demonstrou que o sistema é robusto para uma variação de pH 9,44 \pm 0,94, solvente dispersor de 700,00 \pm 70,00 (μ L) e de solvente extrator 57,00 \pm 5,70 (μ L).

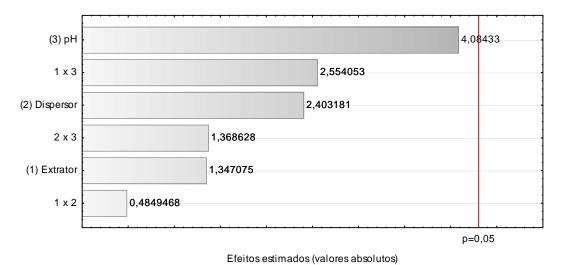


Figura 8. Análise da robustez pelo gráfico de Pareto

Os metais Zn, Cu, Ni e Fe foram estudados na determinação do Cd na concentração de 50 µg L⁻¹. A interferência foi determinada pela razão entre as leituras com adição de metal e sem adição expressa em porcentagem. Os resultados são apresentados na Tabela 6. O Zn (36,39 %) e Cu (28,30 %) interferiram no método a partir da adição de 5 µg L⁻¹ de cada metal, o Ni com

a adição de 15 μ g L⁻¹ (40,30 %), sendo que na adição de 5 e 10 μ g L⁻¹ a interferência foi menor que 3 %. O Fe até a adição de 15 μ g L⁻¹ apresentou interferência menor que 5 %.

Tabela 6. Resultado da análise de interferentes na determinação de cádmio

	Concentração do cádmio 50 μg L ⁻¹				
Metal	Adição (μg L ⁻¹)	$(\mu g L^{-1})$	Interferência (%)		
	5	68,20 (± 1,57)	36,39		
Zn	10	78,05 (± 3,11)	56,10		
	15	74,62 (± 1,09)	49,25		
	5	64,15 (± 4,72)	28,30		
Cu	10	63,40 (± 4,21)	26,77		
	15	75,05 (± 4,54)	50,10		
	5	51,10 (± 0,87)	2,20		
Ni	10	51,20 (± 2,78)	2,39		
	15	70,15 (± 7,57)	40,30		
	5	52,43 (± 6,62)	4,87		
Fe	10	51,67 (± 4,35)	3,34		
	15	51,91(± 4,99)	3,82		

3.4 Exatidão e aplicação

Após as etapas otimização e estabelecimento das características analíticas, a exatidão foi avaliada usando ensaios de adição e recuperação, que consiste na determinação do analito em amostras com e sem adição de quantidades conhecidas do analito. A recuperação do Cd através do método aplicado a cada indivíduo de *O. gratissimum*, onde foram adicionados 10 e 40 μg L⁻¹ de Cd, é demonstrado na Tabela 7. Como resultado, a recuperação do Cd nas amostras variou de 92,1 a 108,9 %.

Tabela 7. Valores de recuperação e desvios-padrão na análise de Cd em amostras de Ocimum gratissimum

Amostras	Cd adicionado (µg L ⁻¹)	Cd encontrado (µg L ⁻¹)	Recuperação (%)
	0,00	< LQ	
VCA	10,00	$10,21 \ (\pm \ 2,75)$	102,13
	40,00	$38,04 (\pm 2,24)$	95,10
	0,00	< LQ	
BAR	10,00	$10,88 \ (\pm \ 1,85)$	108,84
	40,00	43,55 (± 1,22)	108,88
	0,00	< LQ	
LIV	10,00	10,12 (± 2,89)	101,20
	40,00	41,49 (± 1,24)	103,71

	0,00	< LQ	
MAC	10,00	$10,58 \ (\pm \ 0,97)$	105,76
	40,00	36,84 (± 4,07)	92,09

Vitória da Conquista (VCA), Livramento de Nossa Senhora (LIV), Macaúbas (MAC) e Barreiras (BAR)

O método foi aplicado em amostras de folhas de maçã (NIST 1515), *O. americanum* e *O. campechianum*, a concentração de Cd foi menor que o LQ do método, Tabela 8. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o limite máximo de Cd estabelecido para ervas aromáticas frescas é de 0,20 mg kg⁻¹ [28].

Tabela 8. Valores de recuperação e desvios-padrão na análise de Cd em amostras de Ocimum gratissimum

	Amostras	Cd (µg L ⁻¹)
VCA	O. americanum	< LQ
	O. campechianum	< LQ
BAR	O. americanum	< LQ
	O. campechianum	< LQ
LIV	O. americanum	< LQ
	O. campechianum	< LQ
MAC	O. americanum	< LQ
	O. campechianum	< LQ
Folhas de maçã		< LQ

Vitória da Conquista (VCA), Livramento de Nossa Senhora (LIV), Macaúbas (MAC) e Barreiras (BAR)

4. CONCLUSÃO

Neste estudo foi desenvolvido e validado um método analítico para determinação de cádmio por espectrofotometria empregando DLLME em amostras de alfavaca de diferentes espécies. O método demonstrou ser simples, específico, linear, exato, preciso e robusto para ser executado na rotina de um laboratório, sendo uma alternativa aos procedimentos utilizados. Quanto aos resultados, não foi determinado cádmio nas amostras estudadas, o que as tornam seguras quanto aos efeitos tóxicos deste elemento-traço no organismo.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de subsídios e bolsas e apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- [1] V.F. Veiga Júnior, A.C. Pinto, M.A.M Maciel, Plantas Medicinais: Cura segura?, Quim Nova 28 (2005) 519-528.
- [2] F. Leitão, S.G. Leitão, V.S. Fonseca-Kruel, I.M. Silva, K. Martins, Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: an overview on their botanical diversity and toxicological potential, Brazilian Journal of Pharmacognosy 24 (2014) 225-247.
- [3] A. Paton, A synopsis of Ocimum L. (Labiatae) in Africa, Kew Bulletin 47 (1992) 403-435.
- [4] R.F. Vieira, J.E. Simon, Chemical characterization of basil (*Ocimum* spp.) found in the markets and used in traditional medicine in Brazil, Economic Botany 54 (2000) 207-216.
- [5] R.C. Padalia, R.S. Verma, A. Chauhan, C.S. Chanotiya, Changes in aroma profiles of 11 Indian *Ocimum* taxa during plant ontogeny, Acta Physiol Plant, 35 (2013) 2567-2587.
- [6] L.A. Biasi, E.M. Machado, A.P.J. Kowalski, D. Signor, M.A. Alves, F.I. Lima, C. Deschamps, L.C. Côcco, A.P. Scheer, Adubação orgânica na produção, rendimento e composição do óleo essencial da alfavaca quimiotipo eugenol, Hortic Bras 27 (2009) 035-039.
- [7] D.A.G. Cortez, L.E.R. Cortez, G.L. Pessini, D.L. Doro, C.V Nakamura, Análise do óleo essencial da alfavaca *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae), Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar 2 (1998) 125-127.
- [8] M.G. Passos, H. Carvalho, J.M. Wiest, Inibição e inativação in vitro de diferentes métodos de extração de *Ocimum gratissimum* L. ("alfavacão", "alfavaca", "alfavaca-cravo") Labiatae (Lamiaceae), frente a bactérias de interesse em alimentos, Revista Brasileira de Plantas Medicinais 11 (2009) 71-78.
- [9] U.G. Egesie, A.B. Adelaiye, J.O. Ibu, O.J. Egesie, Safety and hypoglycaemic properties of aqueous leaf extract of *Ocimum gratissimum* in streptozotocin induced diabetic rats, Nigerian Journal of Physiological Sciences 21 (2006) 31-35.
- [10] N.I. Oguanobi, C.P. Chijioke, S.I. Ghasi, Effects of aqueous leaf extract of *Ocimum gratissimum* on oral glucose tolerance test in type-2 model diabetic rats, Afr J Pharm Pharmaco 6 (2012) 630-635.
- [11] L.M. Casanova, D. Silva, M. Sola-Penna, L.M.M. Camargo, D.M. Celestrini, L.W. Tinoco, S.S. Costa, Identification of chicoric acid as a hypoglycemic agent from *Ocimum gratissimum* leaf extract in a biomonitoring in vivo study, Fitoterapia 93 (2014) 132-141.
- [12] C.N. Ezekwesili, K.A. Obiora, O.P. Ugwu, Evaluation of anti-diarrhoeal property of crude aqueous extract of *Ocimum gratissimum* L. (Labiatae) in rats, Biokemistri 16 (2004) 122-131.

- [13] M.C. Stanley, O.E. Ifeanyi, O.K. Chinedum, N.D. Chinenye, The Antibacterial activity of leaf extracts of *Ocimum gratissimum* and Sida acuta, International Journal of Microbiological Research 5 (2014) 24-129.
- [14] T.J. Faria, R.S. Ferreira, L. Yassumoto, J.R.P. Souza, N.K. Ishikawa, A.M. Barbosa, Antifungal Activity of Essential Oil Isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against Phytopathogenic Fungi, Braz Arch Biol Techn 49 (2006) 867-871.
- [15] T. Ueda-Nakamura, R.R. Mendonça-Filho, J.A. Morgado-Díaz, P.K. Maza, B.P. Dias Filho, D.A.G. Cortez, D.S. Alviano, M.S.S. Rosa, A.H.C.S. Lopes, C.S. Alviano, C.V. Nakamura, Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*, Parasitol Int 55 (2006) 99-105.
- [16] J.B.H. Fokou, P.M.J. Dongmo, F.F. Boyom, E.Z. Menkem, I. Bakargna-Via, I.F.K. Tsague, M.S. Kamdem, P.H.A. Zollo, C. Menut, Antioxidant and antifungal activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* from Yaoundé and Dschang (Cameroon), J Pharm Pharmacol 2 (2014) 257-268.
- [17] V. Guimarães, J.B. Sígolo, Detecção de contaminantes em espécie bioindicadora (*Corbicula fluminea*) Rio Ribeira de Iguape SP, Quim Nova 31 (2008) 1696-1698.
- [18] A.C.M. Montez, Exposição e acumulação de elementos potencialmente tóxicos em manjericão (*Ocimum basilicum*), Dissertação de Mestrado, Universidade de Lisboa, 2014.
- [19] L.S. Francisconi, Determinação dos constituintes inorgânicos em plantas medicinais e seus extratos, Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2014.
- [20] World Health Organization, Joint FAO/WHO food standards programme codex alimentarius commission, twenty-seventh session, 2004.
- [21] F. Oliveira, G. Akisue, M.K. Akisue, Farmacognosia. São Paulo: Atheneu, 1998.
- [22] D.H. Doehlert, Uniform shell designs, Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics) 19 (1970) 231-239.
- [23] Statistica for Windows, StatSoft, Inc (1999) 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 741014, USA.
- [24] D. C. Harris, Análise química quantitativa. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
- [25] M.L. Martins, E.G. Primel, S.S. Caldas, O.D. Prestes, M.B. Adaime, R. Zanella, Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações, Scientia Chromatographica 4 (2012) 35-51.

[26] M. Nechar, M.F. Molina, J.M. Bosque-Sendra, Application of Doehlert optimization and factorial designs in developing and validating a solid-phase spectrophotometric determination of trace levels of cadmium, Analytica Chimica Acta, 382 (1999) 117-130.

[27] BRASIL, Resolução nº 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2003). [28] BRASIL, Resolução nº 42 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2013).

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi desenvolvido e validado um método analítico para determinação de cádmio por espectrofotometria empregando DLLME em amostras de alfavaca de diferentes espécies. O método demonstrou ser simples, específico, linear, exato, preciso e robusto para ser executado na rotina de um laboratório, sendo uma alternativa aos procedimentos utilizados. Quanto aos resultados, não foi determinado cádmio nas amostras estudadas, o que as tornam seguras quanto aos efeitos tóxicos deste elemento-traço no organismo.