



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTRATÉGIAS PARA CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO
QUÍMICA DA *CASEARIA FASCICULATA* (FRUTA VIDRO)
UTILIZANDO TÉCNICAS ANALÍTICAS**

Ivana Lago da Silva Romão

Salvador - Ba

2020

IVANA LAGO DA SILVA ROMÃO

**ESTRATÉGIAS PARA CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO
QUÍMICA DA *CASEARIA FASCICULATA* (FRUTA VIDRO)
UTILIZANDO TÉCNICAS ANALÍTICAS**

Tese apresentada ao Colegiado de Pós graduação
em Química como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Química Analítica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Pinto dos Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes

Salvador- Ba

2020



TERMO DE APROVAÇÃO

IVANA LAGO DA SILVA ROMÃO

"ESTRATÉGIAS PARA CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA *CASEARIA FASCICULATA* (FRUTA VIDRO) UTILIZANDO TÉCNICAS ANALÍTICAS"

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor(a) em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Pinto dos Santos

Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes

Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof. Dr. Valfredo Azevedo Lemos

Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Prof^ª. Dr^ª. Amália Geiza Gama Pessoa

Doutorado em Química, Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR)

Universidade Federal da Paraíba

Prof^ª. Dr^ª. Débora de Andrade Santana

Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Fábio Alan Carqueija Amorim

Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Universidade Estadual de Santa Cruz

Salvador, 08 de julho de 2020.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI - UFBA.

R761 Romão, Ivana Lago da Silva
Estratégias para caracterização da composição química da
Casearia fasciculata (fruta vidro) utilizando técnicas analíticas/
Ivana Lago da Silva Romão. – Salvador, 2020.
102 f.

Orientadora: Prof^ª. Dr^a Ana Maria Pinto dos Santos

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Química, 2020.

1. Química Analítica. 2. Ácido Nítrico. 3. Óleo essencial. I.
Santos, Ana Maria Pinto. II. Universidade Federal da Bahia. III.
Título.

CDU 543

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os meus familiares em especial minha filha Hanna, minha fonte de inspiração, força e entusiasmo que carrego comigo ao despertar de cada manhã.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado esta oportunidade e por ser tudo em minha vida.

A toda minha família, principalmente meus pais, que sempre estiveram presentes em minha vida, orando, incentivando e torcendo para que meus objetivos fossem alcançados.

A Profa. Dra. Ana Maria Pinto dos Santos, pela orientação, compreensão, paciência e amizade durante esses anos. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes pela co-orientação, amizade, muita paciência, apoio e ensinamentos durante a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar e Prof. Dr. Djalma Menezes pela concessão do Laboratório de Óleos Essenciais e do Laboratório de Cromatografia Prof. Dr. Jailson Bittencourt de Andrade para a realização de parte deste trabalho.

Ao Professor Raildo M. de Jesus pela concessão do Laboratório de Pesquisa em Química Analítica, UESC e aos colegas Herik e Vinicius pelo auxílio nas leituras das amostras.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Marquete do Instituto de Pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro pela identificação da espécie em estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia e aos professores do Colegiado de Pós-Graduação, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório do grupo de pesquisa LQA III da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Jequié: Rosivan, Franciele, Berlane, Jessica, Ícaro. Aos colegas Hion e Daniel do laboratório de química orgânica pelo auxílio durante os processos de análise. A todos os colegas do laboratório de óleos essenciais especialmente Luan pelo auxílio na parte orgânica do trabalho.

Agradeço especialmente a Cheilane, Shirlei e Clissiane pela amizade que construímos, conversas e risadas. Fica aqui o meu muito obrigado por tudo!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 pela bolsa concedida.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!!!

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Identificação da espécie vegetal em estudo.....	33
Figura 2. Região experimental do planejamento de mistura com restrições.....	35
Figura 3. Superfícies de resposta obtidas no planejamento da mistura para (a) Desejabilidade; (b) resposta múltipla; (c) teor de carbono residual e (d) acidez residual.....	40
Figura 4. Resultados individuais das concentrações para macroatomógenos.....	46
Figura 5. Resultados individuais das concentrações para microatomógenos.....	47
Figura 6. Gráfico de pesos do conteúdo mineral nas amostras de <i>Casearia fasciculata</i>	50
Figura 7. Gráfico dos escores do conteúdo mineral nas amostras de <i>Casearia fasciculata</i>	51
Figura 8. Análise multivariada do conteúdo mineral nas amostras de <i>Casearia fasciculata</i> usando ligação completa com distâncias euclidianas: (a) dendrograma das amostras e (b) dendrograma das variáveis.....	52
Figura 9. (a) Planta da espécie <i>Casearia fasciculata</i> . (b) Raiz triturada em laboratório. (c) Sistema de pré-concentração usando mini-coluna contendo a raiz.....	68
Figura 10. Estrutura do agente complexante 5-Br-PADAP.....	73
Figura 11. Linearidade obtida com diferentes concentrações de Mn(II).....	74
Figura 12. Gráfico de Pareto obtido no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	77
Figura 13. Valores preditos versus valores observados para o modelo aplicado.....	78
Figura 14. Distribuição dos pontos de uma matriz Doehlert para otimização do pH e volume do eluente, representada por um hexágono regular.....	79
Figura 15. Superfície de resposta obtida a partir da matriz Doehlert.....	80
Figura 16. Valores preditos versus valores observados para o modelo quadrático..	82
Figura 17. Sistema Clevenger modificado para extração de óleo essencial.....	92
Figura 18. Etapas do teste de imersão em fêmeas de carrapatos adultos.....	94
Figura 19. Extração do óleo essencial das folhas da <i>Caseariae s.p.</i> pela técnica de hidrodestilação.....	95
Figura 20. Cromatograma do óleo essencial de <i>Casearia fasciculata</i> obtido pelo CG-EM.....	96

Figura 21.	Cromatograma do óleo essencial de <i>Casearia fasciculata</i> obtido pelo GC-FID.....	96
Figura 22.	Formula estrutural do isopreno.....	98
Figura 23.	Eficiência do óleo da <i>Casearia fasciculata</i> , sobre as teleóginas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	100

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1. Uso de ácidos diluídos em procedimentos de digestão para determinação de metais por técnicas espectroanalíticas.....	20
Tabela 2. Matriz do planejamento de mistura e planejamento experimental.....	35
Tabela 3. Matriz do planejamento de mistura e resultados do planejamento para as quatro respostas.....	39
Tabela 4. Valores críticos obtidos para o planejamento de mistura usando diferentes respostas.....	41
Tabela 5. Parâmetros analíticos obtidos para o método por ICP OES.....	44
Tabela 6. Limite de quantificação e detecção usando um método estabelecido e pelo método baseado em parâmetros da curva de calibração.....	45
Tabela 7. Resultados obtidos para frutos das amostras de <i>Caseariae Fasciculata</i> pelo ICP OES.....	48
Tabela 8. Matriz de correlação para as variáveis químicas estudadas.....	52
Tabela 9. Estudos envolvendo biosorventes na extração de metais.....	62
Tabela 10. Parâmetros operacionais do FAAS utilizados na determinação de Mn(II)...	65
Tabela 11. Condições iniciais utilizadas para extração de Mn(II).....	70
Tabela 12. Variáveis e domínio experimental estabelecido para o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	70
Tabela 13. Comparação da extração de Mn(II) pela mini-coluna com e sem a presença de complexante.....	72
Tabela 14. Estudo da concentração de Mn(II) na etapa de pré-concentração.....	74
Tabela 15. Matriz experimental e resultados para o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	76
Tabela 16. Matriz e resultados para o planejamento Doehlert.....	80
Tabela 17. Análise de variância para o modelo quadrático usando matriz Doehlert.....	81
Tabela 18. Resultados preliminares para extração de Pb(II) usando o biosorvente.....	82
Tabela 19. Resultados preliminares para extração de Cd(II) e Ni(II) usando o biosorvente.....	83

Tabela 20.	Condições cromatográficas do CG-EM utilizadas na análise do óleo essencial.....	92
Tabela 21.	Características dos compostos voláteis, da <i>Caseáreae fasciculata</i> identificados no CG-EM.....	98
Tabela 22.	Média e desvio padrão dos percentuais de oviposição e eclodibilidade de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas com o óleo da <i>Casearia fasciculata</i>	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NAA	Análise de ativação de neutrons;
AAS	Espectrometria de absorção atômica, do inglês <i>Atomic absorption spectrometry</i> ;
Abs	Absorvância;
CE	Concentração do eluente;
EFS	Extração em fase sólida;
ELL	Extração líquido líquido;
EPN	Extração em ponto de nuvem;;
FAAS	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês <i>Flame atomic absorption spectrometry</i> ;
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Infrared</i> ;
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Indutivamente Inductively Coupled Plasma Optic Emission Spectrometry</i> ;
MSR	Metodologia de superfície de reposta;
pH	Potencial hidrogeniônico;
SEM	Microscópio Eletrônico de Varredura, do inglês <i>Scanning Electron Microscope</i> ;
VA	Vazão da amostra;
VE	Volume de eluente;
XPS	Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X, do inglês <i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i> ;
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i> ;

MIP OES	Espectrometria de emissão óptica induzida por micro-ondas;
LIBS	Espectroscopia de ruptura induzida por laser;
PCA	Análise de componentes principais;
D	Desejabilidade;
MR	Resposta Multipla;
HCA	Análise de agrupamento hierarquicos;
RCC	Conteudo de carbon residual;
LD	Limite de detecção;
LQ	Limite de quantificação;
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia;
CG-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa, do inglês Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry;
GC-FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, do inglês <i>Gas Chromatography Flame Ionization Detector</i> ;
PO	Porcentagem de oviposição;
ER	Eficiência reprodutiva;
EP	Eficiência do produto.

RESUMO

Nesta tese é apresentada a caracterização da *Casearia fasciculata* (Fruta Vidro) através do estudo da composição química do fruto, das partes aéreas e da aplicação da raiz como biossorvente.

Um método de digestão usando ácido nítrico diluído foi otimizado pelo planejamento da mistura para extração simultânea de 10 elementos em polpa, casca e semente de *Casearia fasciculata* cultivada no estado da Bahia, Brasil. Quatro abordagens diferentes foram utilizado para avaliar o desempenho do procedimento de digestão (Resposta múltipla; Desejabilidade; Teor de carbono Residual e Acidez residual). As ferramentas multivariadas, PCA e HCA, foram eficientes na formação de grupos, correspondentes às partes do fruto.

O potencial da raiz da planta *Casearia fasciculata* para extração de Mn(II) em sistemas aquosos foi avaliado em um sistema de pré-concentração utilizando uma mini-coluna preenchida com o biossorvente. O sistema foi otimizado através da aplicação de planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} e matriz Doehlert. O biossorvente também apresentou potencial para remediação dos íons Cd(II), Ni(II) e Pb(II) em meio aquoso.

O óleo essencial das partes aéreas da *Casearia fasciculata* foi extraído por hidrodestilação e os seus componentes químicos majoritários identificados por CG-EM. Os resultados demonstraram que o óleo composto majoritariamente por β -Elemeno, (Trans)- β -Cariofileno, Germacreno- D, Bicclogermacreno e α -Bulneseno foram identificados por CG-EM. O óleo também demonstrou ser um eficiente agente carrapaticida contra *Rhipicephalus microplus*.

A fruta vidro (casca e a semente) apresenta potencialidade para utilização como suplementos minerais na nutrição humana, bem como a raiz e as partes aéreas apresenta excelente perspectiva para emprego como biossorvente e carrapaticida. O sistema em fluxo, associado à técnica FAAS permitiu uma análise rápida, de fácil operação, eficiente e sensível para as espécies. Os resultados comprovaram que esta planta apresenta potencial de aplicação em atividades biológicas promissoras.

Palavras-chave: Composição química, *Casearia fasciculata*, Biossorvente, Óleo essencial.

ABSTRACT

In this thesis the characterization of *Casearia fasciculata* (Fruta Vidro) is presented through the study of the chemical composition of the fruit, the aerial parts and the application of the root as a biosorbent.

A digestion method using diluted nitric acid was optimized by planning the mixture for simultaneous extraction of 10 elements in pulp, bark and seed of *Casearia fasciculata* grown in the state of Bahia, Brazil. Four different approaches were used to assess the performance of the digestion procedure (Multiple Response; Desirability; Residual carbon content and Residual acidity). The multivariate tools, PCA and HCA, were efficient in forming groups, corresponding to the parts of the fruit.

The root potential of the *Casearia fasciculata* plant for extracting Mn (II) in aqueous systems was evaluated in a pre-concentration system using a mini-column filled with the biosorbent. The system was optimized through the application of 2^{4-1} fractional factorial design and Doehlert matrix. The biosorbent also showed potential for the remediation of Cd (II), Ni (II) and Pb (II) ions in aqueous medium.

The essential oil from the aerial parts of *Casearia fasciculata* was extracted by hydrodistillation and its major chemical components identified by CG-EM. The results showed that the oil composed mainly of β -Elemeno, (Trans) β -Karyophyllene, Germacrene-D, Bicyclogermacrene and α -Bulnesene were identified by CG-EM. The oil has also been shown to be an efficient tick-killing agent against *Rhipicephalus microplus*.

The glass fruit (peel and seed) has potential for use as mineral supplements in human nutrition, as well as the root and aerial parts presents an excellent prospect for use as a biosorbent and tick. The flow system, associated with the FAAS technique, allowed a quick analysis, easy operation, efficient and sensitive for the species. The results proved that this plant has potential for application in promising biological activities.

Keywords: Chemical composition, *Casearia fasciculata*, Biosorbent, Essential oil.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
OBJETIVOS.....	17
GENERALIDADES	18
CAPITULO I - Desenvolvimento de metodologias para caracterização da composição química da <i>Casearia fasciculata</i> (fruta vidro) utilizando técnicas analíticas	
1 Introdução.....	30
1.2 A Família Salicaceae e o gênero <i>Caseariae fasciculata</i>	32
1.2.1 Identificação botânica.....	32
1.3 Parte experimental.....	33
1.3.1 Instrumentação do ICP OES.....	33
1.3.2 Reagentes e soluções.....	34
1.3.3 Otimização do sistema de digestão das amostras.....	34
1.4 Coleta das amostras.....	36
1.5 Digestão das amostras.....	37
1.6 Análise estatística.....	37
1.7 Resultados e discussão.....	38
1.7.1 Otimização do método de digestão de amostras.....	38
1.8 Fatores analíticos.....	43
1.9 Aplicação do método.....	45
1.10 Análise exploratória.....	49
1.11 Conclusão.....	54
Referencias.....	55
CAPITULO II – Potencial de um sorvente natural derivado de raiz de <i>Casearia fasciculata</i> para remediação de metais potencialmente tóxicos em meio aquoso.	
2 Introdução.....	60
2.1 Materiais e Métodos.....	65
2.2 Instrumentação.....	65

2.3 Materiais utilizados.....	65
2.4 Reagentes.....	65
2.5 Preparo das soluções.....	66
2.6 Obtenção do biosorvente e preparo da mini coluna.....	67
2.7 Sistema de pré-concentração em batelada.....	68
2.8 Estudos iniciais de pré-concentração.....	69
2.9 Estratégia de otimização.....	70
2.10 Potencial da raiz para extração de outros metais.....	71
2.11 Resultados e discussão.....	72
2.11.1 Preparo da mini-coluna.....	72
2.11.2 Uso de complexante.....	72
2.12 Concentração da solução-teste de Mn(II).....	73
2.13 Modo de eluição.....	75
2.14 Otimização multivariada.....	75
2.15 Potencial da raiz para extração de outros metais.....	82
2.16 Conclusão.....	84
Referências.....	85
CAPITULO III	
3. Introdução.....	89
3.1 Parte Experimental.....	90
3.2 Amostragem.....	91
3.3 Extração do óleo essencial da <i>Casearia fasciculata</i>	91
3.4 Instrumentação.....	92
3.5. Determinação da atividade carrapaticida.....	93
3.5.1 Obtenção das teleóginas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	93
3.5.2 Teste de imersão de adultos.....	93
3.6 Análise e Tratamento dos Dados.....	95
3.7 Avaliação da atividade carrapaticida.....	99
3.8 Conclusão.....	102
Referências.....	103

Apresentação

Esta tese está dividida em três partes distintas, referentes aos estudos realizados ao longo do doutorado: (1) Aplicação de planejamento de mistura usando ácido diluído para extração de componentes inorgânicos em frutos da *Casearia fasciculata* e determinação por ICP OES: avaliação por PCA e HCA. Este trabalho foi publicado no periódico *Journal of the Brazilian Chemical Society* e foi considerado de grande relevância pelos pareceristas avaliadores. (2) Potencial de um sorvente natural derivado da raiz de *Casearia fasciculata* para remediação de metais potencialmente tóxicos em meio aquoso. Este segundo trabalho deu origem a um capítulo de livro intitulado “Remoção de Poluentes em meio aquoso utilizando materiais alternativos”, o qual já foi aprovado e breve teremos a publicação da sua última versão e (3) Análise dos constituintes químicos voláteis do óleo essencial da *Casearia fasciculata* por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (CG-MS). A escrita do artigo científico deste último trabalho está em andamento e parte dos resultados apresenta potencial para o depósito de uma patente. Desta maneira cada capítulo consiste em Introdução, Procedimento experimental, Resultados e discussão, Conclusões e Referências bibliográficas.

OBJETIVOS

GERAL

Desenvolver métodos para caracterizar e determinar a composição química da *Casearia fasciculata* utilizando técnicas espectrais.

ESPECÍFICOS

- a) Utilizar técnicas de planejamento de experimentos para otimizar condições de digestão e extração.
- b) Otimizar um método de digestão utilizando ácido nítrico diluído para extração de macro e micronutrientes presentes nos frutos da *Casearia fasciculata*.
- c) Determinar a concentração de Ca, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, P, S e Zn em casca, semente e polpa dos frutos de *Casearia fasciculata* por ICP OES.
- d) Avaliar a composição de diferentes partes do fruto (polpa, semente e casca) por meio de técnicas multivariadas, PCA e HCA.
- e) Fornecer informações nutricionais sobre os frutos da *Casearia fasciculata*.
- f) Estudar a aplicabilidade da raiz da *Casearia fasciculata* para extração de metais potencialmente tóxico em meio aquoso.
- g) Extrair e identificar constituintes orgânicos presentes no óleo essencial da *Casearia fasciculata* por CG-MS e avaliar a atividade carrapaticida.

GENERALIDADES

O uso de plantas medicinais em pesquisas tem despertado um grande interesse devido a vasta biodiversidade da flora e diversidade biológica. Na medicina tradicional o uso de plantas medicinais torna-se a única forma de tratamento acessível, auxiliando no combate a várias doenças. A grande variabilidade das espécies permite o desenvolvimento de novos medicamentos com suas composições químicas oriundas das plantas [1, 2].

Aproximadamente 80% da população mundial dependem de medicamentos à base de plantas, e a maior parte dos tratamentos envolve o uso de extratos e seus componentes ativos [3]. As terapias tradicionais tem sido reconhecida como uma forma de tratamento eficaz nos seus cuidados com a saúde [4]. Nos últimos anos com os avanços tecnológicos, métodos espectroscópicos e cromatográficos têm aumentado consideravelmente o conhecimento sobre plantas medicinais elevando o número de constituintes químicos isolados, identificados e quantificados.

Estudos com o gênero *Casearia fasciculata* são escassos, no entanto em trabalhos realizados com outras espécies deste gênero foram encontrados substâncias capazes de tratar ferimentos e picadas de cobras. Suas folhas contêm elevados teores de óleos essenciais com ação antitumoral, antifúngica e antibiótica, enquanto seu potencial anti-inflamatório foi considerado similar ao piroxicam e meloxicam [5]. As folhas e as cascas são utilizadas como diurético, cicatrizante e antiofídica [6].

Dessa forma, é de suma importância o desenvolvimento de estratégias para investigar a composição química da *Casearia fasciculata* pertencente à família Salicacea, cujas espécies são bastantes citadas na literatura pelas suas atividades biológicas. Neste contexto, pesquisas precisam ser desenvolvidas afim de atender critérios de qualidade, segurança e também alicerçar o uso de espécies vegetais pela população.

Uso de ácidos diluídos e eficiência dos procedimentos de digestão

Na literatura, são relatados uma variedade de métodos e técnicas a fim de identificar e quantificar elementos essenciais e não essenciais em plantas. Os métodos analíticos instrumentais possibilitam e facilitam a determinação desses

metais e/ou metaloides, sendo cada equipamento com uma sensibilidade específica para tais determinações.

Em procedimentos de preparo de amostra, a seleção dos reagentes que serão utilizados vai depender da natureza da amostra e dos elementos a serem determinados. Quando reagentes concentrados são utilizados em procedimentos de digestão, uma alta concentração de ácido permanece no digerido e uma etapa de diluição para a redução do excesso de acidez pode ser necessária para evitar interferências em algumas técnicas de determinação. A exposição ao risco, a segurança e a saúde também são as maiores desvantagens desse uso. O uso de concentrações de ácido elevadas pode causar interferências na etapa de determinação e também pode elevar dos valores dos brancos analíticos [7]. O manuseio de ácidos concentrados é perigoso para o meio ambiente e exigem investimentos consideráveis para alcançar o tratamento químico adequado dos resíduos [8].

O pré-tratamento da amostra é considerado a etapa mais crítica, pois é nesta etapa que ocorrem mais erros, gasto de tempo e maior custo, por isso os passos de um procedimento de pré-tratamento de amostra devem ser considerados cuidadosamente. No preparo de uma amostra, na maioria dos casos, deve ser realizada a conversão da amostra sólida em uma solução usando condições extremas como, por exemplo, uma temperatura elevada, grandes volumes de ácidos e uso de ácidos concentrados, no entanto, essa metodologia vem sendo cada vez menos utilizada. Procedimentos mais limpos têm sido desenvolvidos para se chegar ao mesmo objetivo que é a oxidação dos compostos e a quebra das ligações químicas. Com o avanço da tecnologia muitos instrumentos têm sido desenvolvidos, porém os equipamentos não suportam o uso de soluções com elevada acidez, logo o desenvolvimento de procedimentos que fazem uso de ácidos diluídos vem também das necessidades propostas pela química verde [9].

Na literatura são relatados procedimentos de digestão utilizando ácidos diluídos, no entanto precisa-se ainda de melhorias procurando sempre por métodos simples, de baixo custo e fáceis de serem aplicados. Na Tabela 1 estão apresentados alguns trabalhos usando diferentes concentrações de ácido nítrico diluído no procedimento de digestão da amostra visando a determinação de íon metálicos usando diferentes técnicas espectroanalíticas.

Tabela 1. Uso de ácido nítrico diluído em procedimentos de digestão para determinação de metais por técnicas espectroanalíticas.

Amostra	Massa da amostra	Conc. HNO₃	Técnica	Elementos	Referências
Leite em pó integral e fígado bovino	500 mg	1,0 mol L ⁻¹	ICP OES e ICP-MS	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Zn, Cd, Co e Pb	[10]
Algas	700 mg	2,0 mol L ⁻¹	ICP-MS	As, Cd e Pb	[11]
Folhas de Boldo, hortelã, erva-cidreira, camomila	200 mg	1,0 mol L ⁻¹	ICP OES	Ca, Mg, K, Na, Cu, Zn, Mn e Al	[12]
Suco de cana-de-açúcar	2,0 mL	1,25 mol L ⁻¹	ICP OES	Ca, Cu, Fe, K e Mg	[13]
Folha de chás garra de gato	250 mg	7,0 mol L ⁻¹	ICP OES e GFAAS	Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, Pb, Zn e Se	[14]
Leite de coco	1.000 mg	1,0 mol L ⁻¹	ICP OES	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn	[15]
Plantas medicinais	500 mg	4,0 mol L ⁻¹	ICP-MS	As, Cd, Hg e Pb	[16]
Arroz	250 mg	4,5 mol L ⁻¹	ICP OES e ICP-MS	Al, As, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Se e Zn	[17]
Patê	250 mg	3.5 mol L ⁻¹	FS FAAS	Fe e Zn	[18]
Linhaça e gergelim	250 mg	3,0 mol L ⁻¹	ICP OES	Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P e Zn	[19]

Os trabalhos citados na Tabela 1 sugerem a aplicação da combinação de ácidos diluídos, oxigênio e peróxido de hidrogênio em diferentes tipos de amostras sem que haja perda de informações da mesma.

O uso de ácido nítrico para a digestão de amostras é o mais comum, pois é um ácido forte e um excelente agente oxidante [20]. A digestão ideal deve levar à decomposição completa do material usando quantidades mínimas de ácido. O ácido deve ser diluído quanto possível para diminuir a concentração final e proteger partes do instrumento de análise [21]. Os procedimentos de digestão com várias concentrações de ácido são realizados a fim de obter um digerido satisfatório. As concentrações estudadas variam de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ a 14 mol L^{-1} os menores valores de acidez são encontrados mediante baixas concentrações de ácido quando comparados com soluções concentradas, no entanto as recuperações dos analitos não tem sido eficiente usando apenas a solução ácida [22].

Estudos tem demonstrado que a digestão pode ser melhorada com a utilização de outros reagentes combinados com o ácido. Uma mistura de ácido, peróxido de hidrogênio e água melhoram as recuperações dos analitos e não danificam componentes dos equipamentos quando em contato com a solução digerida. Isso porque o peróxido de hidrogênio é um forte agente oxidante com alto nível de pureza e a água e o oxigênio são seus produtos de decomposição [20,23]. Levando-se em consideração que a melhor digestão deve conduzir a uma decomposição completa da amostra usando a menor quantidade de reagentes possíveis, essa condição tem gerado menos resíduos do que com o uso de ácidos concentrados, além de tornar o método menos dispendioso, mantendo ainda a eficiência no processo de digestão.

Os resultados obtidos na análise podem ser prejudicados quando o processo de digestão da amostra não é eficiente, isso acarreta em efeitos indesejáveis como a decomposição incompleta, volatilização dos analitos e adsorção levando também a um mal desempenho instrumental. Neste contexto, é indicado a avaliação do teor de carbono residual onde são empregadas soluções de ureia ou ácido cítrico.

Na avaliação da eficiência da digestão a porcentagem de carbono residual é um parâmetro que pode evitar interferências durante a análise feita por técnicas analíticas e que a fonte de ionização seja o plasma. Um valor em torno de 2000 mg L⁻¹ é considerado aceitável sem que haja problemas nos resultados [24].

Outro fator bastante utilizado na avaliação da eficiência em procedimentos de digestão é a acidez residual. A acidez é determinada através de experimentos de titulação ácido-base dos digeridos. Digeridos que apresentam baixa acidez residual são indicados para determinações elementares utilizando técnicas espectrométricas, resultando no ganho de poder na detecção, levando em consideração que não é necessária uma diluição das amostras [25].

Neste contexto, as soluções ácidas diluídas são uma alternativa bastante promissora apresentando muitas vantagens quando comparado aos ácidos concentrados e corroborando com os princípios da química verde gerando uma menor quantidade de resíduos. O descarte inadequado tem gerando sérios problemas ambientais. Estudos tem sido realizados a fim de desenvolver métodos que permitam o tratamento e prevenção adequado destes resíduos minimizando assim a contaminação do meio ambiente. O uso de materiais alternativos naturais como biossorventes vem sendo aplicado na remoção de compostos orgânicos e inorgânicos como alternativa aos materiais sintéticos, se destacado devido ao seu baixo custo e elevada eficiência.

Utilização de biosorvente em sistema de pré-concentração

Muitas pesquisas tem sido realizadas a fim de contornar problemas ambientais ocorridos devido ao elevado crescimento industrial e atividades agrícolas. Testes com produtos naturais como matéria prima tem sido realizado a fim de quantificar, separar e pré-concentrar o analito de interesse de uma determinada matriz [26, 27].

Dentre os vários contaminantes do meio ambiente, os metais pesados necessitam de atenção especial, pois além de serem bioacumuladores, não são degradáveis e, ainda que exerçam papéis essenciais em diversos processos metabólicos dos organismos, quando em excesso, podem se tornar potencialmente citotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos [28]

Tendo em vista essa problemática, métodos de remoção de espécies inorgânicas estão sendo utilizados para descontaminar ambientes. Uma técnica de remediação que vem sendo explorada é o uso de biosorventes, sendo uma alternativa ao uso de adsorventes sintéticos. Os adsorventes sintéticos apresentam um alto custo isso vem impulsionando o desenvolvimento de pesquisas que busquem a utilização de adsorventes oriundos de materiais biológicos, uma vez que estes apresentam vantagens como sendo de baixo custo, materiais de origem biológica, renováveis, de fácil regeneração e apresentam elevada eficácia na remoção de metais [29, 30].

Pesquisas têm evidenciado resultados positivos obtidos por diferentes biosorventes, como algas, fungos, bactérias, resíduos agroindustriais, subprodutos agrícolas, macrófitas aquáticas, entre outros [31].

Estudo da composição química de óleos essenciais

A avaliação da eficácia do uso de produtos naturais (cascas, raízes, folhas e frutos) e seu potencial de aplicação tem tornado objeto de estudo em diversas áreas, uma vez que a identificação e quantificação dos constituintes químicos ativos podem apresentar diversas atividades biológicas. Os óleos essenciais extraídos de folhas de plantas é uma fonte rica em compostos que estão associados a importantes atividades biológicas. A produção de óleos essenciais tem aumentado a cada ano devido, principalmente, ao crescente consumo em atividades tradicionais como na indústria alimentícia e cosmética [32]. Os óleos essenciais tem sido largamente empregados por apresentarem propriedades antifúngicas, bacterianas, inseticida e anti-inflamatória [33,34]. Os componentes majoritários encontrados geralmente determinam as propriedades biológicas do óleo.

A composição química dos óleos essenciais está relacionada tanto a fatores genéticos que podem alterar as produções dos metabólitos secundários, quanto a estímulos decorrentes do ambiente onde a planta se encontra, com isso a rota metabólica é modificada, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos. Muitos óleos essenciais obtidos de plantas são utilizados no controle de insetos e podem ser usados como uma alternativa às substâncias sintéticas, ou adicionados a outros inseticidas nos programas de controle de vetores [35].

Várias espécies do gênero *Casearia* produzem óleos essenciais com atividades biológicas comprovadas. Em vista disso, o estudo de espécies vegetais, visando obter extratos e constituintes químicos bioativos, que possam ser associados ou até mesmo vir a substituir produtos sintéticos, são de grande interesse científico e tecnológico, uma vez que os produtos naturais possuem potencial para serem aplicados como fitoterápicos, cosméticos e inseticidas.

Referências

-
- [1] S. Kordali, A. Cakir, H. Ozer, R. Cakmakci, M. Kesdek, E. Mete, Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and α -cymene. *Bioresource Technology*, DOI: 10.1016/j.biortech.2008.04.048, 2008.
- [2] E. J. F. Araújo, D Y M L. Araújo, R. M. Freitas, P. M. P. Ferreira, Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* swartz: revisão de literatura. *Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.* 35 (2014) 355-361.
- [3] M. F. Mahomoodally, R. Seebaluck, Current Practices towards the Use of Phytotherapy as Alternative Medicine in the Tropical Island of Mauritius. *Journal of Medical Research and Development*. 2 (2013) 35-41.
- [4] BRASIL. Ministerio da saúde. Secretária de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Basica. Brasilia; 2012.
- [5] L. G. A. Marques, E. R. B. Simões, P. M. P. Ferreira, M. R. M. C. Santos, C. Pessoa, Desenvolvimento do potencial tecnológico de *Casearia sylvestris*. *Revista GEINTEC*. São Cristóvão. 3 (2013) 70-85.
- [6] T. O. Gonçalves, J. R. G. M. Vieira, D. H. S. Silva, A. J. Cavalheiro, Hidroquinina: Principio antioxidante e tóxico de *Casearia decandra* (Salicaceae). *Reunião Anual da SBQ*, cd-rom 1, Fortaleza, Brasil, 2009.
- [7] C. A. Bizzi, J. A. Nóbrega, J.S. Barin, E.M.M. Flores, Diluted Acids in Microwave-Assisted Wet Digestion, in: E.M.M. Flores (Ed), *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam. (2014)179-204.

[8] J. A. Nóbrega, G. L. Donati, Microwave-assisted sample preparation for spectrochemistry. In: R. A. Meyers (Ed.). *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Nova Jersey: John Wiley & Sons. (2011).

[9] C.A. Bizzi, E. M.M. Flores, J. S. Barin, E. E. Garcia, J. A. Nóbrega, Understanding the process of microwave-assisted digestion combining diluted nitric acid and oxygen as auxiliary reagent, *Microchemical Journal*. 99 (2011) 193–196.

[10] C.A. Bizzi, E.L.M. Flores, J.A. Nobrega, J.S.S. Oliveira, L. Schmidt, S.R. Mortari, Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques, *J. Anal. At. Spectrom.* 29 (2014) 332–338.

[11] M.F. Mesko, R.S. Picoloto, L.R. Ferreira, V.C. Costa, C.M.P. Pereira, P. Colepicolo, E.I. Muller, E.M.M. Flores, Ultraviolet radiation combined with microwave- assisted wet digestion of Antarctic seaweeds for further determination of toxic elements by ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.* 30 (2015) 260–266.

[12] V. C. Costa, W. N. Guedes, A. S. Santos, M. M. Nascimento, Multivariate Optimization for the Development of a Fast and Simple Ultrasound-Assisted Extraction Procedure for Multielemental Determination in Tea Leaves by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES), *Food Analytical Methods*. 11 (2018) 2004–2012.

[13] S. O. Souza, S. S. L. Costa, B. C. T. Brum, S. H. Santos, C. A. B. Garcia, R. G. O. Araujo, Determination of nutrients in sugarcane juice using slurry sampling and detection by ICP OES, *Food Chemistry*, 273 (2018) 57-63. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.03.060.

[14] J. B. P. Junior, K. G. F. Dantas, Evaluation of inorganic elements in cat's claw teas using ICP OES and GF AAS, *Food Chemistry*. 196 (2016) 331–337.

[15] D C.M.B. Santos, L. S.B. Carvalho, D.C. Lima, D. J. Leão, L. S. G. Teixeira, M. G. A. Korn, Determination of micronutrient minerals in coconut milk by ICP OES after ultrasound-assisted extraction procedure, *Journal of Food Composition and Analysis*. 34 (2014) 75–80. DOI:10.1016/j.jfca.2014.02.008.

[16] A.L.H. Muller, E.I. Muller, J. S. Barin, E.M.M. Flores, Microwave-assisted digestion using diluted acids for toxic element determination in medicinal plants by ICPMS in compliance with United States pharmacopeia requirements, *Anal Methods*. 7 (2015) 5218–25. DOI: 10.1039/C5AY00436E.

[17] T. B. Tarantino, I. S. Barbosa, D. C. Lima, M. G. Pereira, L. S. G. Teixeira, M. G. A. Korn, Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for multi-element determination in rice by ICP OES and ICP-MS, *Food Analytical Methods*, (2017) 1007–1015.

[18] S.N.P. Souza, C.L.M. Nascentes, Validation of a microwave-assisted digestion procedure of pate samples using diluted HNO₃ for Fe and Zn determination by FS FAAS, *Anal Methods*. 5 (2013) 6411–5. DOI: 10.1039/c3ay41343h.

[19] L. A. Souza, T. L. Souza, F. B. Santana, R. G. O. Araujo, L. S. G. Teixeira, D. C. M. B. Santos, M. G. A. Korn, Determination and in vitro bioaccessibility evaluation of Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P and Zn in linseed and sesame, *Microchemical Journal*. 137 (2018) 8–14. DOI:10.1016/j.microc.2017.09.010.

[20] J.F. KRUG. Rocha, F, R, P. Métodos de Preparo de Amostras para análise elemental. 1ª Ed. Abril (2016).

[21] J.T. Castro, E.C. Santos, W.P.C. Santos, L.M. Costa, M. Korn, J.A. Nóbrega, M.G.A. Korn, A critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *Talanta*. 78 (2009) 1378–1382. DOI:10.1016/j.talanta.2009.02.030.

[22] F. C. Bressy, G. B. Brito, I. S. Barbosa, L. S. G. Teixeira, M. G. A. Korn, Determination of trace element concentrations in tomato samples at different stages of maturation by ICP OES and ICP-MS following microwave-assisted digestion, *Microchemical Journal*.109 (2013) 145–149. DOI:10.1016/j.microc.2012.03.010.

[23] J. S.S. Oliveira, R. S. Picoloto, C. A. Bizzi, P. A. Mello, J. S. Barin, E. M. M. Flores, Microwave-assisted ultraviolet digestion of petroleum coke for the simultaneous determination of nickel, vanadium and sulfur by ICP-OES, *Talanta*. 144 (2015) 1052–1058. DOI:10.1016/j.talanta.2015.07.060.

[24] C.A. Bizzi, J.S. Barin, E.E. Garcia, J.A. Nobrega, V.L. Dressler, E.M.M. Flores, Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent, *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*. 66, (2011) 394–398. DOI:10.1016/j.sab.2011.04.013.

[25] J. L. Todolí, J. M. Mermet, Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction, *Spectrochimica Acta B*. 54 (1999) 895-929. DOI:10.1016/S0584-8547(99)00041-5.

[26] Y. Dai, Q. Sun, W. Wensi, L. Lu, L. Mei, L. Jिंगing, Y. Shengshu, S. Yue, K. Zhang, J. Xu, Z. Wenlei, Z. Hu, Y. Yang, Y. Gao, C. Yanju, X. Zhang, F. Gao, Y. Zhang, Utilizations of agricultural waste as adsorbent for the removal of contaminants: A review. *Chemosphere*. 211 (2018) 235-253. DOI:10.1016/j.chemosphere.2018.06.179.

[27] M. L. Chen, C. B. Gu, T. Yang, Y. Sun, A green sorbent of esterified eggshell membrane for highly selective uptake of arsenate and speciation of inorganic arsenic. *Talanta*.116 (2013) 688-694. DOI:10.1016/j.talanta.2013.07.061.

[28] SILVA, K. M. D.; RESENDE, L. C. S. H.; DA SILVA, C. A.; BERGAMASCO, R.; GONÇALVES, S. D.; Caracterização físico-química da fibra de coco verde para a adsorção de metais pesados em efluente de indústria de tintas. *Engevista*. 15 (2013) 43–50. DOI:10.22409/engevista.v15i1.387.

-
- [29] A. Karatepe, M. Soylak, Sea sponge as a low cost biosorbent for solid phase extraction of some heavy metal ions and determination by flame atomic absorption spectrometry. *Journal of AOAC International*. 97(2014) 1689–1695. DOI:10.5740/jaoacint.12-060.
- [30] M. E. Mahmoud, A. A. Yakout, M. M. Osman, Immobilization of *Fusarium verticillioides* fungus on nano-silica (NSi–Fus): A novel and efficient biosorbent for water treatment and solid phase extraction of Mg(II) and Ca(II). *Bioresource Technology*. 134 (2013) 324–330. DOI:10.1016/j.biortech.2013.01.171.
- [31] L. Fleck, M. H. F. Tavares, E. Eyng, Adsorbents natural as controllers of aquatic pollutants: a review. *Revista EIXO*. 2 (2013) 39–52.
- [32] H. R. Bizzo, A. M. C. Hovell, C. M. Rezende, Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, São Paulo. 32 (2009) 588-594. DOI:10.1590/S0100-40422009000300005.
- [33] T. A. Arruda, R. M. P. Antunes, R. M. R. Catão, E. O. Lima, D. P. Sousa, X. P. Nunes, M. S. V. Pereira, J. M. Barbosa-filho, E. V. L. Cunha, Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. *Revista Brasileira Farmacognosia*. 16 (2006) 307-311. DOI:10.1590/S0102-695X2006000300005.
- [34] X. P. Nunes, G. L. A. Maia, JR. G. S. Almeida, F. O. Pereira, E. O. Lima, Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. *Revista Brasileira Farmacognosia*. 16 (2006) 642-644. DOI:10.1590/S0102-695X2006000500010.
- [35] L. A. S. Morais, Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira*, Brasília. 27 (2009) 4050-4063.

Capítulo I

Aplicação de planejamento de mistura usando ácido diluído para extração de componentes inorgânicos em frutos da *Casearia fasciculata* e determinação por ICP OES: avaliação por PCA e HCA

1. Introdução

A caracterização dos alimentos consumidos pela população é uma atividade de extrema importância, pois, através das concentrações dos componentes químicos, é possível obter informações sobre segurança alimentar e nutricional. Alimentos que apresentam rótulos contendo informações sobre a composição acabam tendo maior capacidade de comercialização e aceitação pelos consumidores [1]. A falta de informação sobre alimentos é ainda mais pronunciada em regiões do semi-árido brasileiro, especialmente em frutos da família Salicaceae, que se destaca pela importância econômica e medicinal, além de apresentar várias atividades biológicas atraentes [2]. O gênero *Casearia* está incluído na família Salicaceae, caracterizada por plantas de angiospermas, que compreende um total de 50 gêneros com cerca de 1000 espécies encontradas especialmente em regiões tropicais e subtropicais [3]. Espécies deste gênero destacam-se por ter atividades biológicas tais como: anti-inflamatório, anti-úlceras, antiveneno, citotóxico, entre outros [4,5]. No entanto, existem poucos estudos relacionados à quantificação de componentes inorgânicos presentes em espécies desse gênero.

A determinação de baixas concentrações de metais em matrizes alimentares requer o uso de técnicas suficientemente sensíveis e versáteis, e pode ser realizada usando uma variedade de técnicas analíticas como análise de ativação de nêutrons (NAA), espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), espectrometria de massa com plasma acoplado (ICP-MS), espectroscopia de ruptura induzida por laser (LIBS) e espectrometria de

emissão óptica induzida por micro-ondas (MIP OES) [6]. O ICP OES tem sido amplamente utilizado em diferentes estudos, pois proporciona boa sensibilidade, versatilidade, capacidade de determinação de múltiplos elementos, ampla faixa dinâmica linear, robustez e alta precisão. [7]. Diferentes métodos que usam a ICP OES como uma técnica de detecção de múltiplos elementos usam a resposta múltipla como uma ferramenta para estabelecer uma condição experimental ideal que seja viável para todos os analitos [8].

Em geral, antes que a amostra seja submetida ao processo de análise, uma etapa de dissolução, digestão ou extração é necessária, produzindo o analito em forma de solução. [9]. A escolha do melhor procedimento depende do analito a ser determinado e sua concentração, a natureza da amostra, o método de análise e a precisão desejada [10,11].

Uma alternativa eficiente e amplamente utilizada para digestão de amostras é o uso de ácidos diluídos [12], gerando algumas vantagens para o método, como: i) redução das quantidades de reagentes e, conseqüentemente, menor contaminação dos valores brancos; e ii) geração de soluções com menor acidez, especialmente quando se trata de determinação usando sistemas de nebulização da amostra [11]. Métodos de digestão utilizando ácido nítrico diluído mostraram grande eficiência na decomposição de diversas matrizes alimentícias, como gergelim [13], arroz [14], folhas de chá [15], maracujá [16], suplementos esportivos [17], feijões [18] e leite em pó [19].

A eficiência dos métodos que envolvem a digestão ácida pode ser avaliada pela acidez residual. Soluções muito ácidas podem danificar os acessórios do equipamento, reduzindo a vida útil do equipamento [20]. O carbono residual é outro parâmetro para avaliar a eficiência da digestão em amostras orgânicas. O baixo teor de carbono residual contribui para minimizar interferências, permitindo boa precisão nas análises, bem como evitar variações na tensão superficial e viscosidade da solução a ser analisada [21]. Diferentes procedimentos de digestão de amostras podem ser otimizados com o auxílio de técnicas multivariadas, como o planejamento de misturas. Estas técnicas de otimização são particularmente utilizadas em química analítica para tornar um procedimento mais eficiente e sensível [22].

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um procedimento de digestão através da aplicação de planejamento de mistura para otimizar os

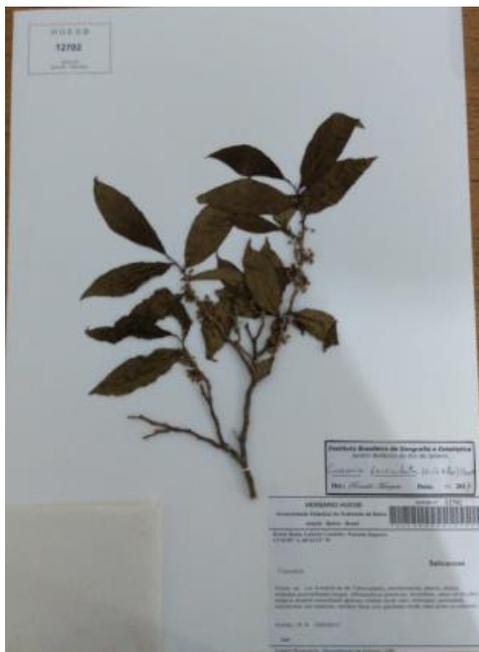
componentes de uma mistura (ácido nítrico diluído, peróxido de hidrogênio e água) para a digestão de diferentes partes da fruta (polpa, casca e semente) *Casearia fasciculata*. O planejamento foi avaliado através de duas respostas gerais (desejabilidade e múltipla resposta) para dez elementos, acidez residual e teor de carbono residual. Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) foram utilizadas como ferramentas estatísticas para avaliar a similaridade das diferentes partes do fruto analisadas pelo ICP OES.

1.2 A Família Salicaceae e o gênero *Casearia fasciculata*

1.2.1 Identificação botânica

A identificação botânica da espécie vegetal em estudo foi realizada empregando exsicatas, onde a amostra da planta é desidratada em estufa e colocada em papel cartonado, possuindo uma etiqueta com todos os dados de identificação da espécie e do ambiente em que foi realizada a coleta. As mesmas foram enviadas ao herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Jequié, e posteriormente encaminhada para o Instituto de Pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro onde efetuou-se a caracterização botânica da espécie com base nas características físicas do material coletado. De acordo com a caracterização botânica, a espécie vegetal em estudo foi dada como pertencente à família Salicaceae, cujo nome científico é *Casearia fasciculata*, conforme características das folhas, flores, galhos e frutos da espécie. A exsicata encontra-se depositada no herbário sob o número 12702 (Figura 1).

Figura 1. Identificação da espécie vegetal em estudo.



Na literatura não foi encontrado nenhum estudo científico com informações relacionadas à espécie descrita. Este trabalho é o primeiro que traz informações quanto ao valor nutricional sobre os frutos da *Casearia fasciculata* popularmente conhecida como Fruta Vidro.

1.3 Parte Experimental

1.3.1 Instrumentação do ICP OES

Um Espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES – Varian, modelo 710 ES, Melbourne, Australia) com configuração axial foi utilizada para determinar componentes inorgânicos em diferentes partes dos frutos. As amostras foram introduzidas no plasma usando um nebulizador concêntrico (OneNeb, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) e câmara de pulverização ciclônica (Varian, Melbourne Australia). As linhas de emissão espectral (nm) escolhidos foram: C(I) 193.027; Ca(I) 373.690; Cr(II) 267,716; Cu(I) 327,395; Fe(II) 259,940; K(I) 766.491; Mg (I) 277.983; Mn(II) 257,610; P(I) 213.618, S(I) 181.972 e Zn(I) 213,857. As análises foram realizadas com uma Potência de radiofrequência (1400 W), vazão de argônio auxiliar (1.5 L min^{-1}) vazão de argônio do plasma (15.0 L min^{-1}) e pressão do

nebulizador (200 kPa) seguindo as condições operacionais estabelecidas pelo fabricante.

1.3.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções foram todas preparadas com água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, EUA; resistividade de 18,2 M Ω cm). Soluções de ácido nítrico foram preparadas por diluição apropriada de 65% (v v⁻¹) de solução estoque (Synth, São Paulo, SP, Brasil) e 30% (m m⁻¹) de peróxido de hidrogênio foram utilizadas na etapa de digestão. Soluções padrão de múltiplos elementos para calibração foram preparadas a partir de soluções estoque de cada elemento C, Ca, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, P, S e Zn (1000 mg mL⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Ácido cítrico P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi usado para preparar soluções padrão de carbono. Hidróxido de sódio P.A. (Vetec) e biftalato de potássio P.A. (Biotec, Paraná, PR, Brasil) foram utilizados para determinar a acidez residual. Vidraria de laboratório foi previamente descontaminada com 10% v / v HNO₃ por 24 h.

1.3.3 Otimização do sistema de digestão das amostras

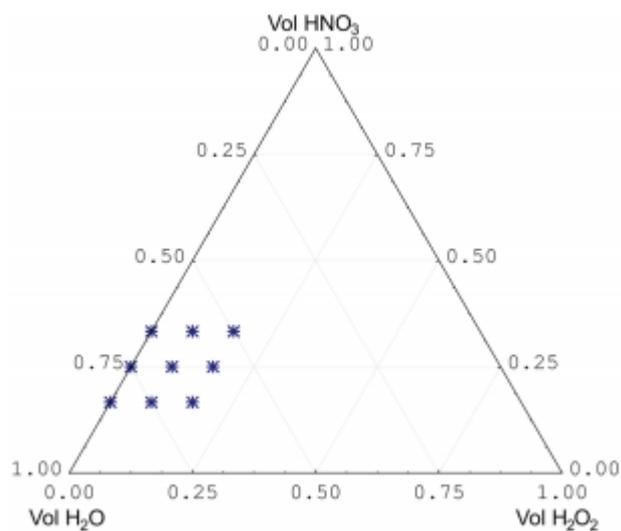
Um planejamento de mistura com restrições foi aplicado para otimizar o volume dos três componentes (água ultrapura, 4,0 mol L⁻¹ de ácido nítrico e 30% de peróxido de hidrogênio) empregados na digestão das amostras. A casca da fruta desidratada foi usada no estudo de otimização. A Tabela 2 apresenta o domínio experimental estabelecido e a matriz experimental, realizada de forma aleatória, e a Figura 2 mostra a região experimental delimitada.

Tabela 2. Matriz do planejamento de mistura e domínio experimental.

(a) Domínio experimental			
Variáveis (mL)	Mínimo	Ponto Central	Máximo
Água ultrapura	3,0	4,5	5,0
HNO ₃ (4.0 mol·L ⁻¹)	1,0	1,5	2,0
H ₂ O ₂ (30%)	0,0	0,5	1,0

(b) Matriz experimental			
Exp.	H ₂ O (mL)	HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)
1	5,0	1,0	0,0
2	4,0	1,0	1,0
3	4,0	2,0	0,0
4	3,0	2,0	1,0
5	4,5	1,5	0,0
6	3,5	1,5	1,0
7	4,5	1,0	0,5
8	3,5	2,0	0,5
9,1 (CP)	4,0	1,5	0,5
9,2 (CP)	4,0	1,5	0,5
9,3 (CP)	4,0	1,5	0,5
9,4 (CP)	4,0	1,5	0,5

Figura 2. Região experimental do planejamento de mistura com restrições.



Para estabelecer uma condição ideal para a extração dos dez analitos simultaneamente, duas abordagens multi-resposta foram utilizadas: a função de desejabilidade (D) e a função resposta múltipla (MR) (Tabela 3). D foi calculada combinando os valores de desejabilidade individuais, de acordo com as equações (1) e (2) [23]. A escala de desejabilidade individual varia entre 0 e 1.

$$d_i = \begin{cases} 0, & \text{if } y < L \\ \left(\frac{y - L}{T - L}\right), & \text{if } L \leq y \leq T \\ 1, & \text{if } y > T \end{cases} \quad \text{Eq. (1)}$$

$$D = \sqrt[n]{d_{i_1} \times d_{i_2} \times d_{i_3} \cdots d_{i_n}} \quad \text{Eq. (2)}$$

onde y é o valor da intensidade para cada elemento, L é o menor valor de intensidade encontrado em uma série de ensaios experimentais para cada analito e T é o maior valor de intensidade para cada analito.

A função MR foi calculada de acordo com a equação (3)

$$MR = \left[\frac{Int_{Ca}}{Int_{max,Ca}} + \frac{Int_{Cr}}{Int_{max,Cr}} + \cdots + \frac{Int_{Zn}}{Int_{max,Zn}} \right] \quad \text{Eq. (3)}$$

onde Int é a intensidade de emissão do analito em um experimento em particular e Int_{max} é o maior sinal obtido em uma série de ensaios experimentais [8].

O teor de carbono residual e a acidez residual do digerido também foram utilizados como respostas para avaliar a eficiência da digestão (Tabela 3). O CCR foi avaliado utilizando soluções padrão de ácido cítrico, monitoradas a C(I) 193,025 nm. Uma solução padronizada de 0,1052 mol L⁻¹ de hidróxido de sódio foi utilizada para medir a acidez residual por titulação de neutralização de 100 µL de digerido final.

1.4 Coleta das amostras

Os frutos da *Casearia fasciculata* foram coletados no verão de 2016, 2018 e 2019 em duas regiões (Bela Vista - latitude 13°37'12 "S e longitude 40°13'27" W e Morro - latitude 13° 36'09 "S e longitude 40°14'13" W), município de Lafaiete Coutinho, região sudoeste do Estado da Bahia, Brasil. Após coleta,

as amostras foram enviadas ao laboratório para executar o procedimento de digestão. As exsicatas foram preparadas para confirmação da espécie e armazenadas no Herbário (código HUESB 11664) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

1.5 Digestão das amostras

Inicialmente, as amostras foram lavadas com água deionizada e separados em polpa, semente e casca. A semente e a casca foram secas em estufa (12 h a 80°C) seguindo um procedimento estabelecido [24]. As amostras secas foram então trituradas para posterior digestão. A digestão da polpa foi realizada sem a necessidade de etapa de secagem. Aproximadamente 0,2000 g de amostra foram pesados em copos de PTFE (23 mL). Solução de ácido nítrico (4,0 mol L⁻¹) e peróxido de hidrogênio a 30% (0,5 mL) foram então adicionados em seqüência a cada vaso de digestão (em triplicata). A mistura foi selada na bomba de digestão de aço inoxidável (Parr Instrument 4749, Moline, Illinois, EUA) e aquecida em estufa a 160 ± 10 °C por 4 h [11]. Após o resfriamento, as soluções digeridas foram transferidas para um balão volumétrico (10 mL) e o volume foi preenchido com água ultrapura. A solução final foi submetida para análise por ICP OES. Soluções de brancos foram preparadas de forma semelhante. O mesmo tratamento foi aplicado para materiais de referência certificados (RM-Agro E1001a *Brachiaria Brizantha* vc Marandu e NIST 1515 Apple Leaves).

1.6 Análise estatística

Duas ferramentas multivariadas para tratamento de dados de multielementos (PCA e HCA) foram utilizadas para avaliar os resultados obtidos a partir da determinação simultânea de 10 elementos em 18 amostras. Os dados experimentais foram processados utilizando os softwares Statistica (The StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA) e Microsoft ExcelTM 2003 (The Microsoft, Co, EUA).

1.7. Resultados e Discussão

1.7.1. Otimização do método de digestão de amostras

Diferentes métodos de digestão de amostras podem ser otimizados usando técnicas de planejamento de mistura [25]. Essas são utilizadas para melhorar o desempenho de um procedimento ou método, a fim de torná-lo mais eficiente e confiável para a extração de analitos em diversas matrizes. A resposta analítica obtida na aplicação de um planejamento de mistura é dependente das proporções de cada componente [26].

Neste estudo, aplicou-se um planejamento de mistura com restrições, envolvendo três variáveis: volume de água ultrapura, volume de ácido nítrico $4,0 \text{ mol L}^{-1}$ e volume de peróxido 30%. Quatro diferentes abordagens foram utilizadas para avaliar o procedimento em um nível de confiança de 95%: 1) Resposta múltipla (MR); 2) Desejabilidade (D); 3) conteúdo de carbono residual (RCC) e 4) acidez residual. Para as respostas globais utilizando as funções D e MR, foram utilizadas as intensidades de emissão normalizadas dos elementos Ca, Cr, Cu, Fe, Mn, K, Mg, P, S e Zn. As variáveis, o domínio experimental aplicado e as quatro respostas estão apresentadas na Tabela 3.

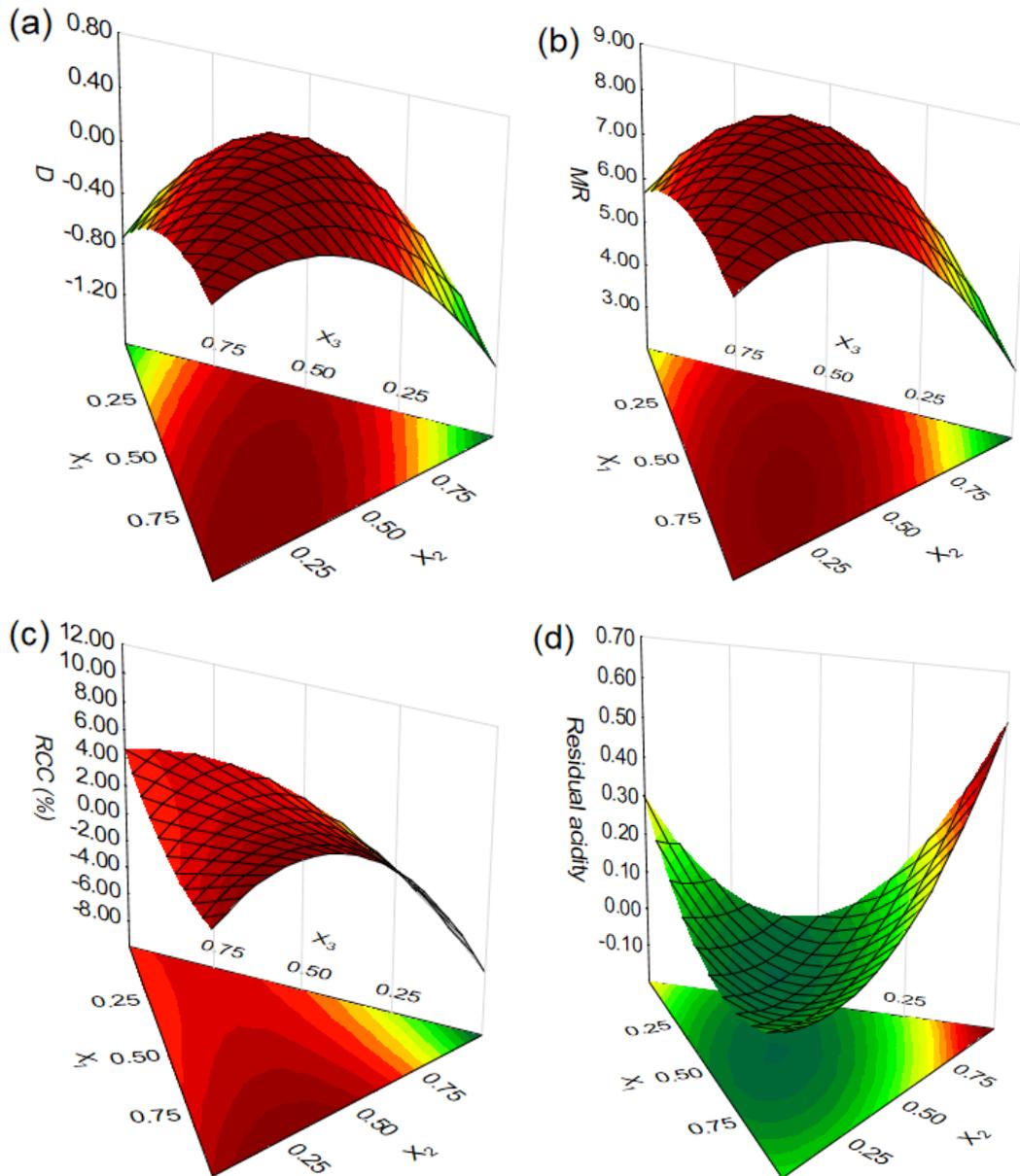
Tabela 3. Matriz do planejamento de mistura e resultados do planejamento para as quatro respostas.

(b) Domínio experimental										
Variáveis (mL)		Mínimo	Ponto Central	Máximo						
Água ultrapura		3,0	4,5	5,0						
HNO ₃ (4.0 mol·L ⁻¹)		1,0	1,5	2,0						
H ₂ O ₂ (30%)		0,0	0,5	1,0						
(b) Matriz experimental										
Exp.	H ₂ O (mL)	HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Respostas						
							Acidez Residual			
				MR	D	RCC (%)	mol L ⁻¹	%		
1	5,0	1,0	0,0	8,34	0,46	7,44	0,19	1,36%		
2	4,0	1,0	1,0	8,2	0,38	7,90	0,24	1,71%		
3	4,0	2,0	0,0	7,38	0,0	4,72	0,03	0,21%		
4	3,0	2,0	1,0	8,05	0,35	4,48	0,03	0,21%		
5	4,5	1,5	0,0	8,18	0,38	4,86	0,03	0,21%		
6	3,5	1,5	1,0	7,79	0,21	4,84	0,03	0,21%		
7	4,5	1,0	0,5	7,98	0,33	8,49	0,03	0,21%		
8	3,5	2,0	0,5	8,61	0,42	5,27	0,03	0,21%		
9,1 (CP)	4,0	1,5	0,5	9,16	0,81	7,92	0,04	0,28%		
9,2 (CP)	4,0	1,5	0,5	8,15	0,35	9,67	0,04	0,28%		
9,3 (CP)	4,0	1,5	0,5	8,46	0,32	6,02	0,03	0,21%		
9,4 (CP)	4,0	1,5	0,5	8,84	0,52	6,13	0,03	0,21%		

CP:Ponto Central; D: Função Desejabilidade; MR: Resposta Múltipla; RCC: Conteúdo de Carbono Residual.

As superfícies de resposta obtidas pela aplicação do planejamento de mistura são mostradas na Figura 3.

Figura 3. Superfícies de resposta obtidas no planejamento da mistura para (a) Desejabilidade; (b) Resposta múltipla; (c) Teor de carbono residual e (d) Acidez residual.



A Figura 3(a) apresenta os resultados usando a função Desejabilidade (D) como resposta. Esta superfície possui um ponto crítico representado pelo ponto máximo e, portanto, as coordenadas desse ponto são as proporções adequadas para obter uma resposta maior. Pontos críticos são obtidos pela

aplicação do critério de Lagrange, que é baseado no determinante Hessiano. [27].

Figura 3(b) mostra os resultados usando a função de resposta múltipla. Como na Figura 3(a), essa superfície também revelou um pico como ponto crítico. O modelo quadrático obtido para ambas as respostas globais (D e MR) apresentou superfícies muito semelhantes em relação ao aspecto visual e às condições ideais, como pode ser observado na Figura 3(a) e (b). Os valores críticos encontrados para as variáveis estudadas também foram próximos e apresentaram valores dentro do domínio experimental estudado, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Valores críticos obtidos para o planejamento de mistura usando diferentes respostas.

Variável	Domínio Experimental	Resposta			
		D	MR	RCC	Acidez residual
Vol. H ₂ O	3,0 – 5,0	4,48	4,13	2,99	3,64
Vol. H ₂ O ₂	0,0 – 1,0	0,39	0,49	0,44	0,50
Vol. HNO ₃	1,0 – 2,0	1,13	1,38	2,56	1,86
	Solução	Máximo	Máximo	Ponto de sela	Mínimo
	Falta de ajuste	0,0792	0,699	2,270	*0,0179

D: Função desejabilidade; MR: Resposta múltipla; RCC: Conteúdo de carbono residual; Vol.: Volume; *Significante.

Em procedimentos envolvendo a digestão de amostras orgânicas, o teor de carbono residual é um parâmetro relevante a ser avaliado. Valores baixos de RCC em digestões orgânicas contribuem para redução de interferências espectrais do carbono residual e permitem uma melhor precisão de análise [28].

Neste estudo, o ponto máximo obtido pela avaliação do RCC é caracterizado como uma condição de sela, ou seja, uma região de interseção entre um mínimo relativo e um máximo relativo [27]. As coordenadas do ponto de sela não apresentam condições ideais para o sistema estudado e os valores críticos para uma ou mais variáveis podem estar compreendidos fora do domínio experimental delimitado. Assim, uma inspeção visual da superfície na Figura 3(c) deve ser realizada a fim de encontrar as condições ideais. Embora

tenha aparecido uma condição de sela, os resultados obtidos em todos os experimentos (Tabela 4) mostraram valores de % RCC menores que 10%, considerados eficientes para procedimentos de digestão. Os resultados são consistentes com outros estudos publicados na literatura [18,29,30].

Outro parâmetro amplamente utilizado para avaliar a eficiência nos procedimentos de digestão é a acidez residual. Em técnicas espectrométricas, como ICP OES, é aconselhável introduzir soluções com acidez inferior a 10% v · v⁻¹ para evitar alterações no transporte de aerossóis durante a introdução da amostra [31]. Os resultados obtidos utilizando condições intermediárias (Ponto Central), dentro do domínio experimental delimitado, permitiram excelentes condições de acidez residual. A eficiência obtida usando ácido diluído pode ser explicada pela habilidade de regeneração ácida na presença de oxigênio do peróxido [32].

A Figura 3(d) mostra os resultados usando a acidez residual como resposta. Esta superfície tem um ponto mínimo como ponto crítico e, portanto, as coordenadas deste ponto são as proporções ideais que geram uma menor acidez residual. Observa-se que as superfícies de resposta [Figura 3(c) e (d)] mostram um comportamento inverso. Assim, é de se esperar que, aumentando a proporção de HNO₃, a acidez residual é aumentada, enquanto o conteúdo de carbono residual é diminuído.

Os pontos críticos de todas as superfícies geradas na Figura 3, considerando as quatro respostas, foram obtidos resolvendo-se um sistema de equações utilizando a primeira derivada da função matemática das seguintes equações [33]. Valores identificados com * são considerados significativos.

$$D = + *0.4337 (V_{H_2O}) - 1.059 (V_{HNO_3}) - 0.7529 (V_{H_2O_2}) + 2.260*(V_{H_2O}) (V_{HNO_3}) + 0.9799 (V_{H_2O}) (V_{H_2O_2}) + 4.960 (V_{HNO_3}) (V_{H_2O_2})$$

$$MR = + *8.191 (V_{H_2O}) + 3.594 (V_{HNO_3}) + 5.661 (V_{H_2O_2}) + 7.760 (V_{H_2O}) (V_{HNO_3}) + 2.799 (V_{H_2O}) (V_{H_2O_2}) + 13.80*(V_{HNO_3}) (V_{H_2O_2})$$

$$RCC = + *7.18 (V_{H_2O}) - 5.306 (V_{HNO_3}) + 4.559 (V_{H_2O_2}) + 26.64 (V_{H_2O}) (V_{HNO_3}) - 5.84 (V_{H_2O}) (V_{H_2O_2}) + 18.0 (V_{HNO_3}) (V_{H_2O_2})$$

$$\text{Acidez residual} = + *0.1471 (\text{VH}_2\text{O}) + 0.5804 (\text{VHNO}_3) + 0.3004 (\text{VH}_2\text{O}_2) - 0.7 (\text{VH}_2\text{O}) (\text{VHNO}_3) - 0.7 (\text{VH}_2\text{O}) (\text{VH}_2\text{O}_2) - 1.6 (\text{VHNO}_3) (\text{VH}_2\text{O}_2)$$

O modelo matemático foi avaliado através da análise de variância (ANOVA). Apenas os resultados para acidez residual mostraram falta de ajuste significativo. No entanto, em todos os experimentos, foram obtidos teores de acidez residual inferiores a 2%, evidenciando a eficiência da digestão utilizando ácido diluído. Em geral, o modelo aplicado foi bem adequado aos valores obtidos.

Uma condição ideal que satisfaz tanto o aumento dos sinais de emissão como a redução da acidez residual e do carbono residual pode ser obtida utilizando volumes intermediários dos reagentes utilizados. Portanto, uma condição eficiente que atenda simultaneamente a ambas as tendências corresponde aos seguintes volumes: 4,0, 1,5 e 0,5 mL para H₂O, HNO₃ e H₂O₂, respectivamente.

1.8 Fatores Analíticos

Para o método proposto, foram considerados os parâmetros de desempenho: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão, avaliados em condições experimentais otimizadas pelo planejamento da mistura.

A linearidade para Cr, Cu, Fe, Mn e Zn foi verificada usando soluções padrão na faixa de 0,1 a 10,0 mg L⁻¹, e para Ca, K, Mg, P e S foi verificada usando soluções padrão na faixa de 0,5 a 80,0 mg L⁻¹. Foram obtidos coeficientes de determinação (R²) superiores ao valor mínimo estabelecido pelo INMETRO (0,998) [34]. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos para o método proposto são semelhantes aos limites obtidos usando digestão ácida diluída assistida por microondas para extração de metais em amostras de arroz [35] e digestão ácida diluída assistida por microondas para extração de vários elementos em amostras de guaraná [36]. A Tabela 5 resume os parâmetros obtidos.

A exatidão do método proposto foi avaliada pela extração e determinação dos elementos estudados em dois materiais de referência

certificados (RM-Agro E1001a *Brachiaria Brizantha* vc Marandu e NIST 1515 *Apple Leave*). Os valores determinados pelo ICP OES e os valores certificados são apresentados na Tabela 5. O teste t não-pareado demonstrou que não houve diferença significativa entre os valores certificados e determinados com nível de confiança de 95% (n = 3) para Cr, Cu, Fe, Zn, K, Mg, P e S e com um nível de confiança de 99% para Ca e Mn.

Tabela 5. Parâmetros analíticos obtidos para o método por ICP OES.

Elementos	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valores Certificados (mg/Kg)	Valores Obtidos (média \pm Desv.Pad) (mg/Kg)	R ²
Cr	0,13	0,42	^a 3,30 \pm 1,66	2,69 \pm 0,01	0,9999
Cu	0,21	0,69	^a 4,0 \pm 0,7	4,2 \pm 1,5	0,9999
Fe	0,45	1,5	^a 91,0 \pm 13	81,0 \pm 3,4	0,9998
Mn	0,04	0,14	^a 76,0 \pm 18,5	61,9 \pm 2,5	0,9991
Zn	0,54	1,8	^a 9,9 \pm 1,6	10,4 \pm 1,5	0,9999
Ca	8,70	29,0	^b 15260 \pm 150	16256 \pm 270	0,9990
K	1,05	3,5	^b 16100 \pm 200	15978 \pm 199	0,9983
Mg	0,57	1,9	^b 2710 \pm 80	2859 \pm 87,0	0,9987
P	1,92	6,4	^a 650 \pm 190	604 \pm 26,0	0,9998
S	5,10	17,0	^b 1800	1821 \pm 102	0,9999

a RM-Agro E1001a *Brachiaria Brizantha* vc Marandu; b NIST 1515 *Apple Leaves*.

LD – Limite de Detecção; LQ – Limite de Quantificação; SD – Desvio Padrão.

Os limite de detecção e limite de quantificação também vem sendo estimados seguindo o método de (OLIVIERI, 2015) [37]. A título de comparação foi construída a Tabela 6, com os LDs e LQs utilizando um método convencional, onde é utilizado dez vezes o desvio padrão do valor do sinal analítico correspondente ao branco dividido pela inclinação da curva analítica e o outro método faz uso das informações da curva de calibração que pode ser feito seguindo a aplicação da planilha eletrônica [38].

Tabela 6. Limites de detecção e Limite de quantificação obtidos pelo método estabelecido e pelo método baseado em parâmetros da curva de calibração.

Elementos	LD (%) (método estabelecido)	LD (%) (método novo)	LQ (%) (método estabelecido)	LQ (%) (método novo)
Cr	0,0013	0,0022	0,0042	0,0051
Cu	0,0021	0,0032	0,0069	0,008
Fe	0,0045	0,0054	0,015	0,0159
Mn	0,0004	0,0009	0,0014	0,0019
Zn	0,0054	0,0062	0,018	0,0188
Ca	0,087	0,169	0,0029	0,372
K	0,0105	0,021	0,035	0,0455
Mg	0,0057	0,011	0,019	0,0243
P	0,0192	0,0383	0,064	0,0831
S	0,051	0,101	0,17	0,22

A estimativa destes parâmetros seguindo este método é baseada em critérios estatísticos mais rígidos quando comparados aos métodos convencionais. Na Tabela 6, observa-se que os valores apresentaram um acréscimo, isto pode ser explicado pelo fato do novo método apresentar maior confiabilidade estatística [38,38]. Uma das limitações no uso desta planilha eletrônica é a quantidade de dados da curva. Os campos permitem inserir até seis níveis de calibração, a planilha também é protegida impossibilitando que alguma alteração seja realizada.

1.9. Aplicação do método

Após otimização e validação o método foi aplicado para a quantificação de Ca, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, P, S e Zn em diferentes partes dos frutos da *Casearia fasciculata* de Lafaiete Coutinho, município da Bahia. A Tabela 7 mostra os resultados, (expressos como média e desvio padrão, n=3).

Nesta análise, foram considerados três partes que compõem o fruto (polpa, semente e casca). Nota-se que as menores concentrações médias foram obtidas para a polpa; isto é principalmente devido à quantidade de água presente no meio. Quando comparados à semente e casca, os elementos Cr, Fe, S e Mg estiveram presentes em maior quantidade na semente, enquanto Cu, Mn, Zn, Ca e K estiveram presentes em maior quantidade na casca. A

presença de Fe, Ca e K em concentrações consideráveis pode ser explicada pelo fato de os solos da região serem ricos em minerais e pelo uso constante de fertilizantes desde o plantio até a colheita. O elemento P apresentou concentrações próximas à semente e à casca. Em ordem crescente de concentração, as amostras apresentaram a seguinte classificação: Cr < Cu < Mn < Zn < Fe (micronutrientes) e S < P < Ca < Mg < K (macronutrientes).

Em relação ao período de coleta, a maioria das amostras coletadas em 2016 apresentou concentrações maiores que as coletadas em 2018 e 2019. A diferença na concentrações entre os anos de coleta podem ser relacionados a fatores como capacidade de troca catiônica do solo, pH do solo, condições climáticas, aplicação de fertilizantes, entre outros.

Em relação à região de coleta, as amostras coletadas no Morro apresentaram concentrações semelhantes às coletadas em Bela Vista. Os resultados individuais das concentrações para macro e micronutrientes podem ser observados nas Figuras 4 e 5, respectivamente

Figura 4. Resultados individuais das concentrações para macromelementos.

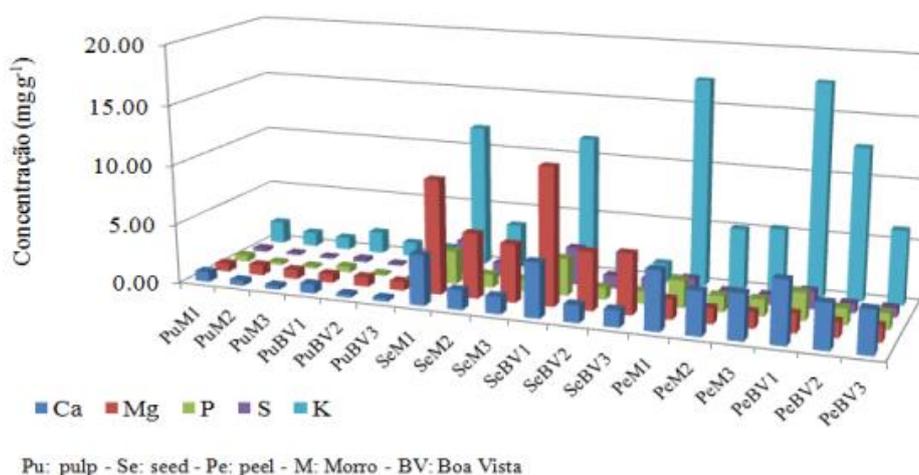
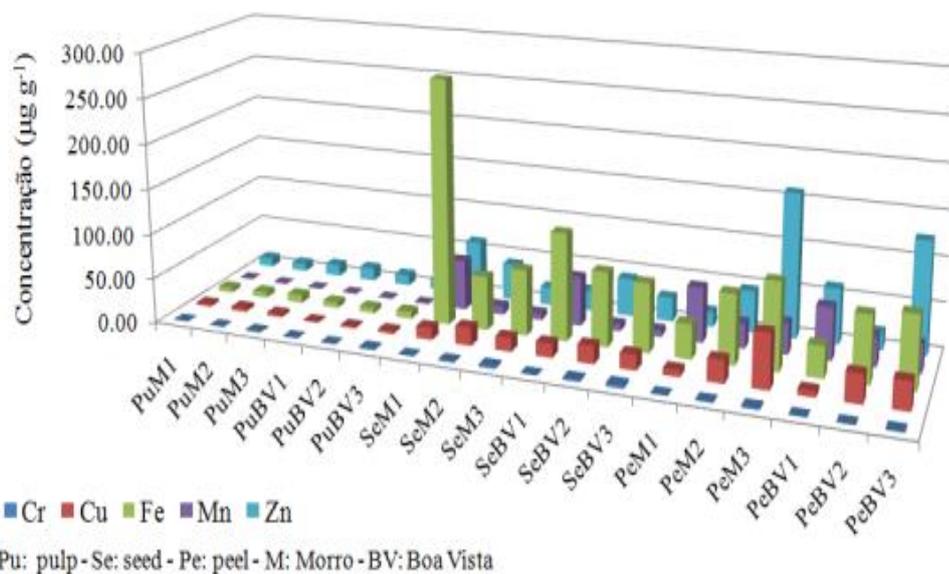


Figura 5. Resultados individuais das concentrações para microelementos.



Os elementos determinados neste estudo apresentam grande importância biológica frente a diversas doenças, uma vez que desempenham um papel essencial na atividade de praticamente todas as enzimas, seja como co-fatores ou no sítio ativo da enzima, sendo a ingestão de cada elemento em quantidades toleráveis recomendado [17,39-40]. Portanto, o conhecimento do conteúdo mineral em matrizes de alimentos, como frutas regionais, é essencial, pois fornece informações sobre aspectos nutricionais e toxicológicos.

Table 7. Resultados obtidos para frutos das amostras de *Casearia fasciculata* pelo ICP OES.

Elem.		Região Morro						Região Bela Vista					
		Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3	
		Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
<i>Concentration</i>													
^a Cr	Polpa	< LQ	---	< LQ	---	0,87	0,25	< LQ	---	< LQ	---	1,52	0,45
	Semente	< LQ	---	1,01	0,29	2,60	0,38	< LQ	---	2,31	0,52	3,79	0,98
	Casca	< LQ	---	0,90	0,23	1,81	0,09	< LQ	---	< LQ	---	1,11	0,24
^a Cu	Polpa	3,0	0,2	4,5	2,5	3,5	2,1	1,1	0,2	1,8	0,5	3,33	2,30
	Semente	13,5	0,3	20,2	2,4	15,3	1,7	15,6	1,0	19,8	4,4	17,2	3,2
	Casca	7,4	0,3	25,1	3,2	59,9	1,4	6,5	0,7	31,3	5,0	31,3	3,1
^a Fe	Polpa	5,4	0,1	6,5	1,3	8,8	2,8	6,4	0,4	6,0	1,1	7,9	2,9
	Semente	272,6	2,0	59,8	8,5	72,9	9,6	119,3	2,1	82,5	17,5	76,2	8,3
	Casca	38,3	1,3	77,2	14,3	96,3	13,6	34,8	3,4	74,1	9,0	80,9	11,4
^a Mn	Polpa	< LQ	---	< LQ	---	< LQ	---	< LQ	---	< LQ	---	< LQ	---
	Semente	56,37	1,32	9,47	1,75	7,24	1,30	54,51	0,99	7,53	0,50	7,42	1,45
	Casca	60,98	0,57	28,10	0,53	34,56	3,31	58,14	0,78	32,63	2,15	31,36	3,57
^a Zn	Polpa	10,25	0,04	9,00	0,08	12,94	1,33	14,63	4,84	12,16	1,37	11,73	2,58
	Semente	62,31	14,70	41,59	5,54	19,93	4,98	22,66	7,65	42,22	1,40	27,09	0,30
	Casca	17,08	1,09	46,58	6,62	160,07	21,74	61,54	1,38	19,26	1,02	125,04	14,72
^b Ca	Polpa	0,85	0,04	0,45	0,05	0,33	0,09	0,78	0,06	0,28	0,10	0,28	0,07
	Semente	4,21	0,19	1,64	0,13	1,46	0,14	4,59	0,22	1,46	0,07	1,41	0,08
	Casca	4,94	0,20	3,64	0,03	3,81	0,07	5,20	0,12	3,76	0,04	3,61	0,06
^b Mg	Polpa	0,69	0,03	0,87	0,05	0,78	0,07	0,73	0,01	0,81	0,01	0,76	0,06
	Semente	9,63	1,52	5,43	0,07	4,87	0,49	11,50	0,10	4,87	0,12	5,06	0,48
	Casca	1,68	0,05	1,31	0,02	1,36	0,03	1,58	0,11	1,31	0,08	1,32	0,02
^b P	Polpa	0,51	0,01	0,23	0,03	0,20	0,02	0,49	0,01	0,18	0,02	0,19	0,01
	Semente	2,76	0,45	1,11	0,02	1,00	0,09	3,13	0,06	1,02	0,01	1,04	0,07
	Casca	2,27	0,12	1,34	0,02	1,39	0,04	2,30	0,06	1,38	0,07	1,35	0,03
^b S	Polpa	0,30	0,01	0,16	0,01	0,13	0,02	0,28	0,01	0,14	0,01	0,14	0,02
	Semente	2,77	0,50	1,16	0,01	1,05	0,10	3,11	0,01	1,07	0,02	1,09	0,10
	Casca	1,49	0,05	0,77	0,01	0,79	0,01	1,49	0,06	0,79	0,04	0,78	0,01
^b K	Polpa	1,88	0,03	1,20	0,02	1,04	0,05	1,84	0,01	1,17	0,05	1,09	0,14
	Semente	11,91	0,06	3,64	0,21	1,13	0,18	11,67	0,56	2,14	1,18	1,55	0,21
	Casca	17,24	0,31	5,12	0,60	5,41	0,16	17,65	0,38	12,67	1,15	6,22	0,26

^aConcentração em $\mu\text{g g}^{-1}$; ^bConcentração em mg g^{-1} ; n = 3; LQ: Limite de Quantificação (Cr = $0,42 \mu\text{g g}^{-1}$) e (Mn = $0,14 \mu\text{g g}^{-1}$); SD: Desvio Padrão.

1.10. Análise Exploratória

A análise multivariada por (PCA) e (HCA) foi realizada em uma matriz auto-escalada (centrada na média e escalada pela variância única) de 54 amostras do fruto (polpa 1-18, semente 19 -36 e casca 37-54) e 10 variáveis (Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn,P, S e Zn). PCA e HCA são técnicas amplamente utilizadas na busca por padrões de comportamento [41,42].

Para avaliar a viabilidade da análise fatorial a partir de uma matriz de correlação do conjunto de dados, no teste de Kaiser-Meyer-Olkin, o valor encontrado de 0,729 foi superior ao valor estabelecido de 0,60. O teste de esfericidade de Bartlett e o valor do Qui-quadrado de 1049,7 mostraram a significância das correlações em $p < 0,001$, o que é considerado aceitável.

Após a adequação da matriz, a análise dos fatores pelo método do componente principal aplicado gerou dez vetores ortogonais (CPs). Os três primeiros componentes tinham autovalores 5,59; 1,95; 1,54 e variâncias totais de 55,9%; 19,5%; 15,4%, respectivamente. A soma das variâncias explicou 90,8% da informação dos dados originais, e a regra de Kaiser (número de autovalores > 1) foi considerada para o estudo.

Na Figura 6 as combinações lineares dos três vetores (PC1, PC2 e PC3) e variáveis serão consideradas na descrição do PCA.:

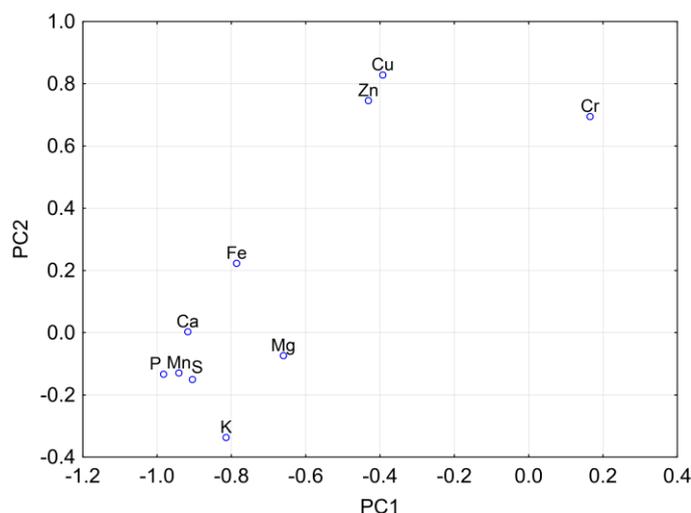
$$PC1 = 0,165 Cr - 0,392 Cu - 0,786 Fe - 0,941 Mn - 0,431 Zn - 0,917 Ca - 0,660 Mg - 0,982 P - 0,904 S - 0,814 K$$

$$PC2 = 0,695 Cr + 0,828 Cu + 0,223 Fe - 0,129 Mn + 0,745 Zn + 0,00323 Ca - 0,0735 Mg - 0,132 P - 0,150 S - 0,336 K$$

$$PC3 = - 0,430 Cr + 0,222 Cu - 0,414 Fe + 0,267 Mn + 0,341 Zn + 0,353 Ca - 0,718 Mg - 0,0562 P$$

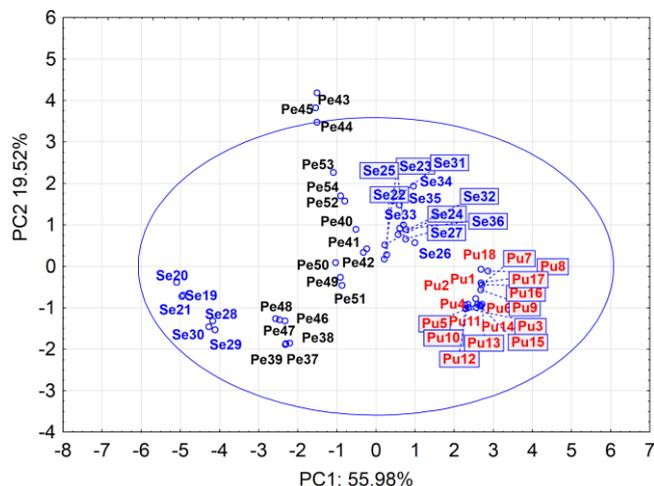
Os resultados calculados sugerem que, no PC1, ferro, manganês, cálcio, fósforo, enxofre e potássio apresentam valores negativos de altas correlações, enquanto no PC2, cromo, cobre e zinco apresentaram valores positivos. Em particular, o magnésio tem uma contribuição expressiva no último PC (PC3). Evidentemente, PC1 é geralmente mais correlacionado com variáveis do que PC2.

Figura 6. Gráfico de pesos do conteúdo mineral nas amostras de *Casearia fasciculata*.



A inspeção da Figura 7, mostra a tendência de formação de 3 grupos de acordo com as partes da fruta: polpa, semente e casca. A elipse do intervalo de confiança de 95% foi aplicada no gráfico do escore do PCA e, apesar de as amostras variarem em diferentes partes do fruto, as amostras estavam dentro do limite de confiança de 95%. As amostras (19, 20, 21, 28, 29 e 30) projetadas no terceiro quadrante pertencem ao mesmo grupo de amostras de sementes localizadas no quadrante oposto, mas apresentam comportamentos diferentes com altos valores de correlação negativa para P, Mn, Ca e S, indicando altas concentrações desses elementos. Isso sugere que essa separação pode estar associada à natureza do solo usado no plantio. Por outro lado, ainda nesta mesma posição do primeiro quadrante, as outras amostras mostram apenas valor expressivo de Cr. A presença de amostras periféricas (43 e 45) também é observada.

Figura 7. Gráfico dos escores do conteúdo mineral nas amostras de *Casearia fasciculata*.



Com relação às amostras de casca projetadas do lado esquerdo, é perceptível a forte associação com Ca, Fe, P, Mn, K e Mg em PC1, bem como elementos de Cu e Zn no PC2. Isso mostra uma absorção significativa desses elementos por cascas de frutas comparadas às polpas distribuídas no quarto quadrante com baixas concentrações de todos os elementos, exceto pela mesma contribuição do cromo observado nas sementes.

Não foi apresentada neste trabalho a projeção das amostras para os vetores ortogonais (PC1 x PC3), mas é verificada pelas equações PC3 e PC1 poucas contribuições diferenciadas nas cargas de Mn, por isso foi considerado já avaliado.

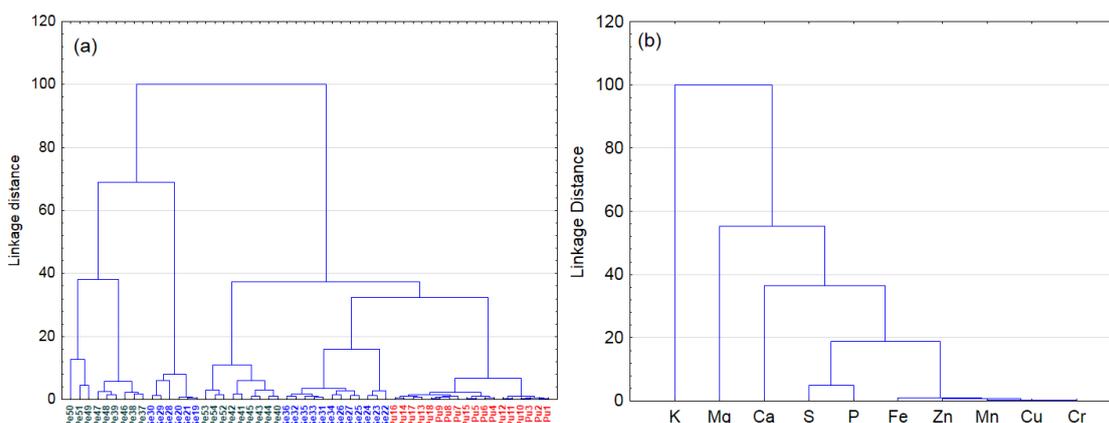
A tabela 8 mostra a matriz de correlação das variáveis ($p < 0,05$). Os autovalores no PCA são iguais aos autovalores da matriz de correlação de Pearson das variáveis e representam a variância contabilizada pelos principais componentes. Podemos destacar correlações fortes e positivas como: fósforo e enxofre ($r = 0,938$), cálcio e potássio ($r = 0,904$), cálcio e manganês ($r = 0,971$), manganês e fósforo ($r = 0,934$) e manganês e potássio ($r = 0,934$). As baixas correlações encontradas para Cr e Cu são provavelmente devidas às pequenas concentrações obtidas nas amostras.

Tabela 8. Matriz de correlação para as variáveis químicas estudadas

	Cr	Cu	Fe	Mn	Zn	Ca	Mg	P	S	K
Cr	1.000									
Cu	0.345	1.000								
Fe	0.084	0.403	1.000							
Mn	-0.294	0.300	0.579	1.000						
Zn	0.193	0.799	0.392	0.383	1.000					
Ca	-0.227	0.437	0.544	0.971	0.475	1.000				
Mg	0.084	0.069	0.770	0.421	0.013	0.334	1.000			
P	-0.195	0.254	0.730	0.934	0.300	0.894	0.699	1.000		
S	-0.089	0.142	0.807	0.768	0.162	0.692	0.898	0.938	1.000	
K	-0.423	0.117	0.369	0.934	0.181	0.904	0.256	0.826	0.631	1.000

As tendências das correlações observadas pelas PCs foram confirmadas a partir do dendrograma obtido pelo HCA (Figura 8). Neste estudo, o conjunto de dados foi tratado pela distância euclidiana e a ligação completa como medida de similaridade.

Figura 8. Análise multivariada do conteúdo mineral nas amostras de *Casearia fasciculata* usando ligação completa com distâncias euclidianas: (a) dendrograma das amostras e (b) dendrograma das variáveis.



Considerando a Figura 8(a), observamos diferentes grupos separados por similaridade com a distância euclidiana normalizada de 60%. O primeiro grupo à direita corresponde à formação de 2 subgrupos (amostras de polpa: Pu1-Pu18) e (amostras de sementes: Se22-Se27; Se31-Se36) devido às pequenas semelhanças na composição mineral. As amostras de casca (Pe37-Pe54) à esquerda fazem parte de um segundo grupo com características semelhantes, mas algumas amostras de sementes (Se19-Se21; Se28-Se30) são misturadas com esse grupo, o que pode estar associado aos diferentes

tipos de solo já mencionado no PCA e pelas altas concentrações de Ca, P, Mn e S que também estão presentes nas cascas.

A Figura 8(b) apresenta o dendrograma hierárquico mostrando a semelhança entre as variáveis químicas. Nesta figura é observada a presença de um grupo constituído pelos elementos Cr, Cu, Mn, Zn e Fe, um segundo grupo constituído pelos elementos P e S e, finalmente, um terceiro grupo correspondendo aos elementos K, Mg e Ca.

1.11 Conclusão

Este estudo é o primeiro a propor a quantificação simultânea de 10 elementos em frutos de *Casearia fasciculata* por ICP OES. A digestão com ácido nítrico diluído e peróxido de hidrogênio mostrou ser uma alternativa eficiente para a preparação de amostras de matrizes de alimentos. Além disso, bons resultados foram obtidos para precisão, linearidade, LOD e LOQ.

O planejamento de mistura proporcionou rapidez e eficiência na otimização do método de digestão. A aplicação das duas funções de múltiplas respostas (Resposta Múltipla e Desejabilidade) foi útil para otimizar as proporções dos reagentes usados na digestão para todos os elementos simultaneamente. O método também forneceu baixo teor de carbono residual e baixa acidez residual.

As ferramentas quimiométricas (PCA e HCA) aplicadas ao processamento de informações obtidas pelo ICP OES contribuíram de maneira eficaz e rápida para a análise e interpretação dos dados. Tais técnicas classificaram as diferentes partes dos frutos em grupos bem definidos, baseados na composição mineral de dez analitos. Adicionalmente, a casca e a semente de *Casearia fasciculata* apresentam potencial para serem utilizadas como suplementos minerais na nutrição humana.

Referências

- [1] Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO), 4ª edição revisada e ampliada, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2011.
- [2] N.B. Anhesine, Documentação química de espécies do gênero *Casearia* (salicaceae) de importância ecológica, econômica e medicinal, Araraquara, 2015.
- [3] H.Lorenzi, V.C. Souza, Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II, Nova Odessa, 2005.
- [4] P.M.P. Ferreira, L.V. Costa-Lotufo, M.O. Moraes, F.W.A. Barros, A.M.A. Martins, A.J. Cavalheiro, V.S. Bolzani, A.G. Santos, C. Pessoa, Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review, An. Acad. Bras. Ciênc. 83 (4)(2011) 1373-1384. DOI: 10.1590/S0001-37652011005000040
- [5] B.M. Ruppelt, E.F.R. Pereira, L.C. Gonçalves, N.A. Pereira, Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as 160 anti-snake venom – I. Analgesic and anti-inflammatory activities, Mem. Ins. Oswaldo Cruz 86 (1991) 203-205. DOI: 10.1590/S0074-02761991000600046
- [6] W.Ż.J. Borkowska-Burnecka, A. Leśniewicz, Extraction Methods in Trace Analysis. In: Baranowska I. (eds) Handbook of Trace Analysis. Springer, Cham, 2016.
- [7] M.A. Bezerra, S.L.C. Ferreira, C.G. Novaes, A.M.P. dos Santos, G.S. Valasques, U.M.F.da M. Cerqueira, J.P. dos S. Alves, A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES), Microchem. J. 128 (2016) 331-346. DOI: 10.1016/j.microc.2016.05.015
- [8] M.A. Bezerra, S.L.C. Ferreira, C.G. Novaes, A.M.P. dos Santos, G.S. Valasques, U.M.F. da M. Cerqueira, J.P. dos S. Alves, Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review, Talanta 194 (2019) 941–959. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.10.088
- [9] M.G.A. Korn, E.S.B. Morte, D.C.M.B. Santos, J.T. Castro, J.T.P. Barbosa, A.P. Teixeira, A.P. Fernandes, B. Welz, W.P.C. Santos, E.B.G.N. Santos, M. Korn, Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods – a review, Appl. Spectrosc. Rev. 42 (2008) 67–92. DOI: 10.1080/05704920701723980
- [10] Flores, E.M.M. Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination. Vol. 1, Elsevier, Waltham, 2014.

-
- [11] Krug, F.J.; Rocha, F.R.P. Métodos de Preparo de Amostras Para Análise Elementar. São Paulo: EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2016.
- [12] C. A. Bizzi, J. A. Nóbrega, J.S. Barin, E.M.M. Flores, Diluted Acids in Microwave-Assisted Wet Digestion, in: E.M.M. Flores (Ed), Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Analysis, Elsevier, Amsterdam, 2014, 179-204.
- [13] L.A. Souza, T.L. Souza, F.B. Santana, R.G.O. Araujo, L.S.G. Teixeira, D.C.M.B. Santos, M.G.A. Korn, Determination and in vitro bioaccessibility evaluation of Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P and Zn in linseed and sesame, *Microchem. J.* 137 (2018) 8–14. DOI: 10.1016/j.microc.2017.09.010
- [14] T.B. Tarantino, I.S. Barbosa, D.C. Lima, M.G. Pereira, L.S.G. Teixeira, M.G.A. Korn, Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for multi-element determination in rice by ICP OES and ICP-MS, *Food Anal. Method.* 10 (2017) 1007–1015. DOI: 10.1007/s12161-016-0658-4
- [15] V.C. Costa, W.N. Guedes, A.S. Santos, M.M. Nascimento, Multivariate Optimization for the Development of a Fast and Simple Ultrasound-Assisted Extraction Procedure for Multielemental Determination in Tea Leaves by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES), *Food Anal. Method.* 11 (2018) 2004–2012. DOI: 10.1007/s12161-018-1171-8
- [16] C.G. Novaes, I.L. da S. Romão, B.G. Santos, J.P. Ribeiro, M.A. Bezerra, E.G.P. da Silva, Screening of *Passiflora* L. mineral content using principal component analysis and Kohonen self-organizing maps, *Food Chem.* 233 (2017) 507–513. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.04.111
- [17] R.M. Pereira, M.G. Crizel, D. La R. Novo, C.M.M. dos Santos, M.F. Mesko, Multi technique determination of metals and non-metals in sports supplements after microwave-assisted digestion using diluted acid, *Microchem. J.* 145 (2019) 235–241. DOI: 10.1016/j.microc.2018.10.043
- [18] J.T.P. Barbosa, C.M.M. Santos, V.N. Peralva, E.M.M. Flores, M. Korn, J.A.Nobrega, M.G.A. Korn, Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products, *Food Chem.* 175 (2015) 212–217. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.092
- [19] C.A. Bizzi, J.S. Barin, E.E. Garcia, J.A. Nóbrega, V.L. Dressler, E.M.M. Flores, Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent, *Spectrochim Acta Part B At. Spectrosc.* 66 (2011) 394–398. DOI: 10.1016/j.sab.2011.04.013

-
- [20] J.L. Todolí, J.M. Mermet, Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction, *Spectrochim Acta Part B At. Spectrosc.* 54 (1999) 895–929. DOI: 10.1016/S0584-8547(99)00041-5
- [21] S.M. Cruz, L. Schmidt, F.M.D. Nora, M.F. Pedrotti, C.A. Bizzi, J.S. Barin, E.M.M. Flores, Microwave-Induced Combustion Method for the Determination of Trace and Ultratrace Element Impurities in Graphite Samples by ICP-OES and ICP-MS, *Microchem. J.* 123 (2015) 28-32. DOI: 10.1016/j.microc.2015.05.008
- [22] C.G. Novaes, R.T. Yamaki, V.F. de Paula, B.B. do Nascimento Junior, J.A. Barreto, G.S. Valasques, M.A. Bezerra, Optimization of Analytical Methods Using Response Surface Methodology – Part II: Mixture Variables, *Rev. Virtual Quim.* 10 (2018) 393–420. DOI: 10.21577/1984-6835.20180030
- [23] G.S. Valasques, A.M.P. dos Santos, D.G. da Silva, J.P. Ribeiro, M.A. Bezerra, Use of Constrained Mixture Design in the Optimization of a Method Based on Extraction Induced by Emulsion Breaking for the Determination of Ca, Mg, Mn, Fe and Zn from Palm Oil by Flame Atomic Absorption Spectrometry, *J. Braz. Chem. Soc.* 29 (2018) 2189–2196. DOI: 10.21577/0103-5053.20180095
- [24] C.G. Novaes, I.L. da S. Romão, B.G. Santos, J.P. Ribeiro, M.A. Bezerra, E.G.P. da Silva, Screening of *Passiflora L.* mineral content using principal component analysis and Kohonen self-organizing maps, *Food Chem.* 233 (2017) 507–513. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.04.111
- [25] B. Barros Neto, I.S. Scarmínio, R.E. Bruns, *Como fazer experimentos: aplicações na ciência e na indústria*, 4a. ed., Bookman: Porto Alegre, 2010.
- [26] C.G. Novaes, R.T. Yamaki, V.F. de Paula, B.B. do Nascimento Junior, J.A. Barreto, G.S. Valasques, M.A. Bezerra, Otimização de Métodos Analíticos Usando Metodologia de Superfícies de Respostas - Parte II: Variáveis de Mistura, *Rev. Virtual Quim.* 10 (2018) 393–420. DOI: 10.21577/1984-6835.20190027
- [27] S.L.C. Ferreira, *Introdução às Técnicas de Planejamento de Experimentos*, Editora Vento Leste, Salvador, 2015.
- [28] S.A. Bhandari, D. Amarasiriwardena, Closed-vessel microwave acid digestion of commercial maple syrup for the determination of lead and seven other trace elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Microchem. J.* 64 (2000) 73–84. DOI: 10.1016/S0026-265X(99)00017-X
- [29] I.S. Barbosa, G.B. Brito, G.L. Santos, L.N. Santos, L.S.G. Teixeira, R.G.O. Araujo, M.G.A. Korn, Multivariate data analysis of trace elements in bivalve molluscs: Characterization and food safety evaluation, *Food Chem.* 273 (2018) 64–70. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.02.063

-
- [30] P.S. Barela, N.A. Silva, J.S.F. Pereira, J.C. Marques, L.F. Rodrigues, D.P. Moraes, Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for further trace elements determination in biodiesel by SF-ICP-MS, *Fuel* 204 (2017) 85–90. DOI: 10.1016/j.fuel.2017.05.028
- [31] J.L. Todolí, J.M. Mermet, Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction, *Spectrochim Acta Part B At. Spectrosc.* 54 (1999) 895–929. DOI: 10.1016/S0584-8547(99)00041-5
- [32] E.M.M. FLORES, Microwave-assisted sample preparation for trace element determination, 1st Edition, Elsevier Science, 2014.
- [33] V.A. Lemos, C.G. Novaes, M.A. Bezerra, An automated preconcentration system for the determination of manganese in food samples, *J. Food Compos. Anal.* 22 (2009) 337–342. DOI: 10.1016/j.jfca.2008.11.019
- [34] INMETRO. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos DOQCGCRE-008. In Revisão 04 – Jul 2011 ed. http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_04.pdf: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – Divisão de Acreditação de Laboratórios, 2011.
- [35] I.J.S. da Silva, A.P.S. Paim, M.J. da Silva, Composition and estimate of daily mineral intake from samples of Brazilian rice, *Microchem. J.* 137 (2018) 131–138. DOI: 10.1016/j.microc.2017.10.006 0026-265X
- [36] H.M. Santos, J.P. Coutinho, F.A.C. Amorim, I.P. Lôbo, L.S. Moreira, M.M. Nascimento, R.M. de Jesus, Microwave-assisted digestion using diluted HNO₃ and H₂O₂ for macro and microelements determination in guarana samples by ICP OES, *Food Chem.* 273 (2019) 159–165. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.12.074
- [37] A. C. Olivieri, Practical guidelines for reporting results in single-and multi-component analytical calibration: A tutorial, *Analytical Chimica Acta.* 868 (2015) 10-22. DOI: 10.1016/j.aca.2015.01.017.
- [38] F. A. L. Ribeiro, M. M. C. Ferreira, S. C. Morano, L. R. Silva, R. P. Schneider, Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados, *Química Nova.* 31 (2008) 164- 171. DOI:10.1590/S0100-40422008000100029.
- [39] P. Smichowski, A. Londonio, The role of analytical techniques in the determination of metals and metalloids in dietary supplements: a review, *Microchem. J.* 136 (2018) 113–120. DOI: 10.1016/j.microc.2016.11.007

-
- [40] J. Hu, P. Yang, X. Hou, Atomic spectrometry and atomic mass spectrometry in bioanalytical chemistry, *Appl. Spectrosc. Rev.* 54 (2019) 180–203. DOI: 10.1080/05704928.2018.1553047
- [41] P.R.M. Correia, M.M.C. Ferreira, Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos, *Quim. Nova* 30 (2007) 481–487. DOI: 10.1590/S0100-40422007000200042
- [42] I.T. Jolliffe, J. Cadima, Principal component analysis: a review and recent developments, *Phil. Trans. R. Soc. A* 374 (2016) 1–15. DOI: 10.1098/rsta.2015.0202.

Capítulo II

Potencial de um sorvente natural derivado de raiz de *Casearia fasciculata* para remediação de metais potencialmente tóxicos em meio aquoso

2. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a atividade industrial vem aumentando de forma acelerada, provocando a criação de empregos e acarretando o desenvolvimento do país. Outra atividade que também apresenta uma crescente no Brasil é a atividade agrícola. Em consequência, a quantidade de resíduos industriais também aponta para uma crescente de forma acelerada, podendo ser citadas as espécies orgânicas e inorgânicas, causando preocupações aos órgãos de proteção ambiental. Algumas espécies inorgânicas caracterizam-se como potencialmente tóxicas, podendo citar os metais cádmio, cromo, chumbo, mercúrio, níquel, manganês, cobre, entre outros, que não se biodegradam facilmente pela ação da natureza, sendo, portanto, bioacumulativos e causam danos ao meio ambiente e a saúde humana (BAIRD, 2011).

Para extração dessas espécies inorgânicas em sistemas aquosos diferentes adsorventes sintéticos podem ser utilizados, dentre eles as resinas poliméricas de troca iônica, sílica gel modificada, tecidos a base de grupamentos orgânicos, sendo capazes de reter seletivamente metais tóxicos por troca iônica, quelação ou precipitação na superfície do adsorvente. Esses materiais apresentam alta estabilidade e estrutura química bem definida (LANÇAS, 2004). No entanto, apresentam alto custo e muitas vezes se tornam inviáveis de serem aplicados.

A utilização de recursos naturais como alternativa aos adsorventes sintéticos é uma proposta interessante e tem ganhado a atenção de estudiosos e pesquisadores da área (AFROZE & SEN, 2018). Entre os materiais que podem ser utilizados como biosorventes em ambientes aquáticos se destacam bactérias, leveduras, algas, fungos, escamas de peixe, folhas, cascas, sementes e raiz (FLECK *et al.*, 2013).

Alguns estudos avaliaram o potencial de biosorventes e a eficiência do processo de extração, dentre os quais pode-se destacar a aplicação da esponja do

mar como um biosorvente para Cu(II), Fe(III), Pb(II) e Ni(II) em águas de torneira (KARATEPE & SOYLAK, 2014) e o uso de sementes de *Moringa oleifera* como biosorvente para a extração de níveis traços de chumbo em amostras de cerveja (ALVES *et al.*, 2011). Os biosorventes também podem ser usados para a remoção de outras espécies potencialmente tóxicas, conforme mostra alguns estudos, destacando-se o uso da casca de coco verde no tratamento de águas residuárias de indústrias de tintas (SILVA *et al.*, 2013) e o uso de raiz do jacinto para o tratamento da águas residuárias contendo o íon Pb(II) (MITRA *et al.*, 2014). A Tabela 8 apresenta resultados de diferentes estudos que demonstram a aplicabilidade desses biosorventes na extração de espécies inorgânicas.

Tabela 9 - Estudos envolvendo biosorventes na extração de metais.

Biosorvente	Espécie ou Tipo	Metal extraído	Técnica	Local de coleta	Informações adicionais	Ref.
Sementes	<i>Moringa oleifera</i>	Pb	FAAS	Árvores cultivadas em Uberlândia Minas Gerais-MG	pH da amostra, vazões de pré-concentração e de eluente, concentração de eluente, tamanho de partícula e massa de sorvente foram estudados	(ALVES <i>et al.</i> , 2011)
Pó de fibra da casca de coco verde	<i>Cocos nucifera</i>	Cd, Cr, Ni, Pb, Zn, Cu, Al, Ba, Co, Fe e Mn	ICP OES	Londrina – PR	40 g de fibra de coco verde em 1800 mL e a amostra foi levada ao Jar Test, na velocidade de 100 rpm durante 2 h	(SILVA <i>et al.</i> , 2013)
Raiz do jacinto	<i>Hyacinthus</i>	Pb	AAS	Bengala Ocidental, Índia	Foi preparada solução de Pb(II) 1000 mg L ⁻¹ e a solução foi retida em coluna de vidro.	(MITRA <i>et al.</i> , 2014)
Casca de noz pecã	<i>Carya illinoensis</i>	Cu	Espectrofotometria	Mercado local Porto Alegre-RS	30,0 – 50,0 mg de casca moída	(BRASIL <i>et al.</i> , 2007)
Casca de arroz	<i>Oryza barthii</i>	Al, Cu, Ni, e Zn	AAS	Não identificado	pH estudado: 4,0 e 5,0 Massa do biosorvente: 0,5000 g para cada 100 mL de solução	(MIMURA <i>et al.</i> , 2010)
Raiz, caule e folhas	<i>Quercus ilex</i> L.	Ni, Cd, Cu, Pb e Cr	AAS	Jardim botânico Universidade de Coimbra – Portugal	1 g da folha, caule e raiz foi adicionado a 100 mL de solução	(PRASAD & FREITAS, 2000)
Raízes de água-pé	<i>Eichhornia crassipes</i>	Cu	XPS/FTIR	Rio em Suzhou, China	20 mg de raiz para 50 mL de solução de Cu (II), em pH 5,50 Foram feitos estudos de cinética de biosorção e de equilíbrio químico	(ZHENG <i>et al.</i> , 2009)

Fungo	<i>Fusarium verticillioides</i>	Ca e Mg	AAS	Mar Mediterrâneo, Alexandria, Egito	10 - 50,0 mg de material, em pH 7,0 Foram feitos estudos de cinética de biosorção e de equilíbrio químico	(MAHMOUD <i>et al.</i> , 2013)
Esponja do mar	Demospongiae	Cu, Fe, Pb e Ni	FAAS	Mercado em Ancara, Turquia	pH da solução, tipo de eluente, volume de amostra e de solução e vazões foram estudados	(KARATEPE & SOYLAK, 2014)
Cacto seco	<i>Opuntia ficus indica</i>	Cd e Pb	FTIR	Próximo a Safi, em Marrocos	Foram feitos estudos de cinética de biosorção e de equilíbrio químico	(BARKA <i>et al.</i> , 2013)
Cascas	<i>Eucalyptus sheathiana</i>	Zn	MEV/FTIR	Universidade Curtin, Perth, Austrália Ocidental	Foram feitos estudos de cinética de biosorção e de equilíbrio químico	(AFROZE <i>et al.</i> , 2016)
Fungo	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Cd, Zn e Pb	Não identificada	Solo da montanha Yuelu (Universidade de Hunan, China)	pH, concentração inicial de íons metálicos, tor de biomassa, tempo de contato e temperatura na biossorção foram estudados	(FAN <i>et al.</i> , 2008)
Biomassa de resíduos de casca	<i>Citrus reticulata</i> (Kino), <i>sinensis</i> (Mitha) e <i>Limetta</i> (Mossambi)	Zr(IV)	FTIR	Universidade de Agricultura, Faisalabad, Paquistão	Foram feitos estudos de cinética de biosorção e de equilíbrio químico	(BHATTI <i>et al.</i> , 2016)

AAS: Espectrometria de absorção atômica; FAAS: Espectrometria de absorção atômica com chama; FTIR: Espectroscopia de infravermelho com transformação de Fourier; ICP OES: Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente; MEV: Microscópio eletrônico de varredura; XPS: Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios X; TG/DTA: Análise termogravimétrica/Análise térmica diferencial.

Embora existam muitos estudos de caracterização e aplicação de diferentes tecidos de plantas para extração de espécies potencialmente tóxicas em meio aquoso, conforme apresentado na Tabela 9, os estudos sobre o potencial das plantas ainda são escassos em boa parte da flora brasileira, em especial na região Nordeste, a qual é coberta, em quase um milhão de km², pelo ecossistema Caatinga, possuindo uma vegetação xerófila característica e afetada pela longa e irregular seca, altas temperaturas e elevada radiação ultravioleta (CARVALHO-NETO *et al.*, 2017). Tal carência se estende quando se trata da família Salicaceae, no entanto esta família tem destacado sua importância econômica e medicinal, sendo relatadas diversas atividades biológicas atrativas na pesquisa de produtos naturais, tais como no combate ao diabetes, reumatismo e doenças venéreas (PRASHITH KEKUDA *et al.*, 2017).

Dentro do ecossistema Caatinga encontram-se plantas do gênero *Casearia*, ao qual já pertenceu à família Flacourtiaceae, porém, com base nos recentes trabalhos de filogenia está incluída na família Salicaceae, caracterizada por plantas angiospérmicas, que compreende um total de 56 gêneros com cerca de 1000 espécies encontradas especialmente nas regiões tropicais e subtropicais (SOUZA & LORENZI, 2005). Sobre o gênero *Casearia*, existem cerca de 180 espécies em todo o mundo tropical e regiões subtropicais do globo, incluindo a América do Norte, América do Sul, Ásia, África, Austrália e as ilhas do Pacífico. Espécies desse gênero destacam-se por sua importância econômica e medicinal, sendo relatadas diversas atividades biológicas para o tratamento de diarreia, úlceras, gripe, lesões, febre, herpes e mordida de cobra. Compostos químicos tais como fenilpropanóides, sesquiterpenóides e diterpenóides de clerodano estão sempre presentes em exames fitoquímicos em plantas desse gênero (XIA *et al.*, 2015).

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a capacidade da raiz da planta *Casearia fasciculata* para extração de manganês em sistemas aquosos. O potencial do biosorvente também foi avaliado para outros metais potencialmente tóxicos (Cd, Cr, Ni e Pb).

2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2. Instrumentação

Um espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS) ar/acetileno foi utilizado para determinação de manganês. A fonte de radiação utilizada foi uma lâmpada de cátodo oco de Mn. Os parâmetros operacionais do FAAS estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros operacionais do FAAS utilizados na determinação de Mn(II).

Parâmetros	Condição
Comprimento de onda (nm)	279,48
Abertura da fenda (nm)	1,8/0,6
Corrente da lâmpada (mA)	40
Comprimento do queimador (mm)	13,5
Vazão do fluxo de acetileno (L min ⁻¹)	2,5
Vazão do fluxo do ar (L min ⁻¹)	10,0
Vazão do fluxo de nebulização (mL min ⁻¹)	7,7

Também foram utilizados um Ultrapurificador de água, Elga – modelo purelab Classic; Medidor de pH, Quimis – modelo Q400AS; Bomba peristáltica multi canal MILAN, modelo 204; Liquidificador comercial Walita; Estufa Eurobrás, Ribeirão preto – SP; Micropipetas, Transferpette e Labmate+; Balanças analíticas, Shimadzu - modelo AY 220.

2.3. Materiais

- Frasco coletor de 2,0 mL, Marca Eppendorf;
- Vidrarias convencionais.

2.4. Reagentes

- Ácido Nítrico P.A. 65% (m m⁻¹) (Vetec);
- Ácido Clorídrico P.A. 37% (m m⁻¹) (Vetec);
- Álcool etílico absoluto (Vetec);
- Borato de sódio (Vetec);
- Acetato de sódio (Vetec);

- Hidróxido de sódio (Vetec);
- 2-(5-Bromo-2-piridilazo)-5-(dietilamino)-fenol (Br-PADAP, Sigma-Aldrich);
- Cloreto de amônio (Vetec);
- Hidróxido de amônio (Vetec).

2.5. Preparo das soluções

Água ultra pura obtida de um sistema de purificação foi utilizada para preparar as soluções em meio aquoso.

Soluções de Mn(II) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$

As soluções de Mn(II) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram preparadas através da diluição de uma solução estoque de manganês a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com água ultra pura.

Soluções de ácido nítrico e clorídrico

As soluções ácidas foram preparadas medindo-se quantidades apropriadas de cada ácido P.A. (Vetec) e diluindo-se com água ultra pura.

Solução de hidróxido de sódio

As soluções de hidróxido de sódio foram preparadas pesando-se quantidades apropriadas da base (Vetec) e diluindo-se com água ultra pura.

Soluções-tampão

- Acetato de sódio (pH 4,5 – 6,0): preparada pela dissolução de 82,00 g de acetato de sódio anidro em 1,0 L de água ultra pura e o pH desejado foi ajustado com ácido acético glacial.
- Borato de sódio (pH 6,5 - 8,0): preparada pela dissolução de 38,13 g de borato de sódio em 1,0 L de água ultra pura e o pH desejado foi ajustado com solução de ácido clorídrico e/ou hidróxido de sódio.
- Amoniacal (pH 8,5 - 10,0): preparada pela dissolução de 53,50 g de cloreto de amônio em 1,0 L de água ultra pura e o pH desejado foi ajustado com hidróxido de amônio.

Solução do complexante 5-Br-PADAP (2-(5-Bromo-2-piridilazo)-5-(dietilamino)-fenol)

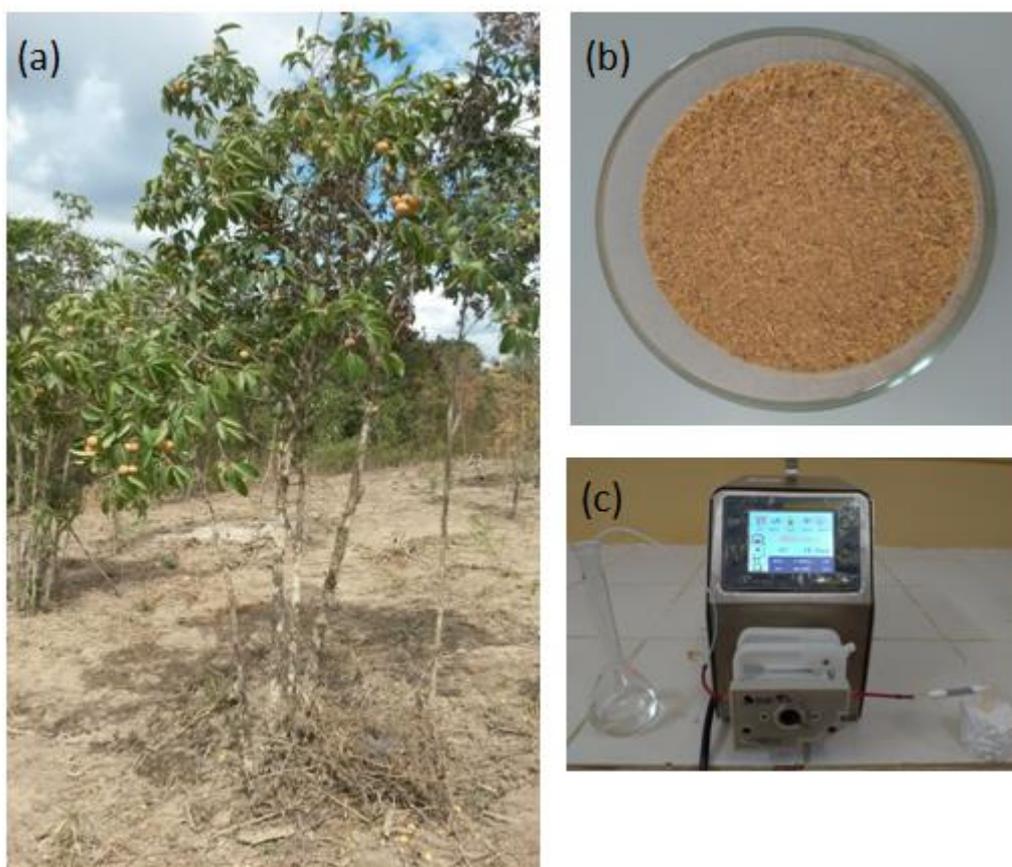
A solução de 5-Br-PADAP (Sigma-Aldrich) foi preparada utilizando quantidades apropriadas do reagente em álcool etílico absoluto para a obtenção de uma solução com concentração de 0,01% (m v⁻¹).

2.6. Obtenção do biosorvente e preparo da mini coluna

O biosorvente foi obtido da raiz de uma planta da espécie *Casearia fasciculata*, coletada no município de Lafaiete Coutinho, região sudoeste da Bahia. Exsiccatas da planta foram preparadas para confirmação da espécie e depositadas no herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (código HUESB 12702). A espécie é conhecida na região como “fruta-vidro”, com usos tradicionais por moradores da cidade. A Figura 9(a) apresenta a ilustração da planta.

Após coleta e transporte até o laboratório, as raízes foram lavadas com água destilada, em seguida foram secas na estufa a 50 °C, durante 4h. Posteriormente, trituradas usando um liquidificador comercial e peneiradas para separação dos grânulos, em tamanhos menores, médios e maiores. A Figura 9(b) apresenta a ilustração da raiz triturada. Para o preenchimento da mini-coluna foram utilizados os grânulos médios, utilizando uma massa de 0,5 g da raiz triturada adicionados em tubo plástico flexível (10 cm de comprimento x 20 mm de diâmetro). A mini-coluna foi lavada com álcool etílico 10% (v v⁻¹), em seguida com solução de ácido nítrico 10% (v v⁻¹) e por fim com água deionizada, todas durante 5 minutos com uma vazão de fluxo de 5 mL min⁻¹.

Figura 9. (a) Planta da espécie *Casearia fasciculata*. (b) Raiz triturada em laboratório. (c) Sistema de pré-concentração usando mini-coluna contendo a raiz.



2.7. Sistema de pré-concentração em fluxo

A pré-concentração de íons Mn(II) na mini-coluna foi realizada utilizando os conceitos da extração em fase sólida, com auxílio de uma bomba peristáltica, responsável por propulsionar o líquido. A Figura 9(c) apresenta o sistema utilizado em bancada. O sistema foi desenvolvido em fluxo, utilizando várias pré-concentrações/eluições sequenciais e posteriormente foram conduzidas para análise no equipamento (FAAS). A etapa de pré-concentração utilizou 50,0 mL de solução-teste contendo o analito Mn(II) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e a eluição foi realizada utilizando 2,0 mL HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Estudos foram realizados para otimização do pH, concentrações, vazões e volumes utilizados nas diferentes etapas. Soluções

usando branco analítico foram analisadas como uma forma de dimensionar o sinal proveniente dos reagentes e água utilizada.

2.8. Estudos iniciais de pré-concentração

Uso de complexante

Testes para avaliar a capacidade de extração do biosorvente foram realizados utilizando duas condições: 1) solução de íon Mn(II) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e 2) solução de íon Mn(II) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ na presença de $500 \mu\text{L}$ do complexante Br-PADAP 0,01% (m v^{-1}), em pH 8,0. Nas duas condições as soluções foram preparadas antes de serem submetidas ao processo de pré-concentração na mini-coluna contendo o biosorvente.

Concentração da solução-teste de Mn(II)

Foram realizados testes a fim de estudar a concentração mínima de solução de Mn(II) que apresentasse sinal de absorvância detectável por FAAS após o processo de pré-concentração/eluição na mini-coluna. As concentrações de Mn(II) utilizadas para a realização do teste foram: 1,0; 10,0; 25,0; 50,0 e $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

Modo de eluição

O modo de coleta do eluato (líquido que sai da mini-coluna contendo o analito) foi realizado em duas formas: 1) por fluxo de eluição no mesmo sentido do fluxo de pré-concentração da solução-teste e 2) fluxo de eluição em sentido contrário ao fluxo de pré-concentração da solução-teste, ou seja, com a mini-coluna invertida.

Condições iniciais

Testes foram realizados para obter condições ótimas de extração dos íons Mn(II) utilizando o sorvente natural obtido da raiz da planta *Casearia fasciculata*. A Tabela 11 resume as condições iniciais utilizadas.

Tabela 11. Condições iniciais utilizadas para extração de Mn(II).

Variável	Valor
Concentração de Mn(II) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	100
pH da solução-teste	8,0
Concentração do tampão borato (mol L^{-1})	0,1
Vazão da solução-teste de Mn(II) (mL min^{-1})	5,0
Volume da solução-teste (mL)	50,0
Vazão do eluente HCl (mL min^{-1})	5,0
Volume do eluente (mL)	2,0
Volume de Br-PADAP (μL)	500
Massa do biosorvente (mg)	500

2.9. Estratégia de otimização

O processo de otimização das variáveis que interferem na eficiência do processo de pré-concentração foi realizado através de análise multivariada, onde as variáveis pH, concentração do eluente HCl, vazão da amostra e volume de eluato coletado foram simultaneamente otimizadas através do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} em dois níveis (FERREIRA, 2015). A Tabela 12 apresenta as variáveis e o domínio experimental estabelecido. Esse planejamento permitiu identificar as variáveis que influenciaram significativamente no processo de extração e, posteriormente, uma matriz Doehlert foi realizada para obter os valores ótimos para cada variável (FERREIRA *et al.*, 2004). Os resultados foram avaliados usando o software STATISTICA versão 12.

Tabela 12. Variáveis e domínio experimental estabelecido para o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

Variáveis	(-1)	(+1)
Ph	5,0	8,0
Vazão da amostra (mL min^{-1})	5,0	10,0
Volume de eluente HCl (mL)	2,0	4,0
Concentração de eluente HCl (mol L^{-1})	0,1	1,0

2.10. Potencial da raiz para extração de outros metais

Algumas variáveis também foram estudadas para avaliar o potencial do biosorvente para extração de outros metais potencialmente tóxicos (Cd, Cr, Ni e Pb) em sistema aquoso. Dentre eles foram avaliados o pH da solução, tipo de tampão, concentração da solução, presença de complexante, bem como a forma de introdução da amostra.

2.11. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.11.1 Preparo da mini-coluna

Para o preenchimento da mini-coluna foi utilizada a raiz triturada com grânulos de tamanho médio, pois os grânulos menores causaram resistência dentro da mini-coluna, o que provoca instabilidade no sistema em fluxo, podendo causar aumento de pressão interna dos tubos e acabar rompendo as conexões. Utilizando grânulos maiores observou-se maior espaçamento entre o material presente na mini-coluna, o que faz com que a passagem da solução-teste pela mini-coluna não seja de forma homogênea, provocando uma rota “viciosa” da solução. Esses caminhos acabam sendo percorridos mais facilmente, e no final a solução não entra em contato com todos os sítios ativos presentes no material biosorvente presente na mini-coluna, ocasionando baixa precisão nas medidas.

2.11.2 Uso de complexante

Os resultados obtidos para avaliar a eficiência da extração de manganês na ausência e na presença do agente complexante 5-Br-PADAP estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Comparação da extração de Mn(II) pela mini-coluna com e sem a presença de complexante.

Absorvância medida no FAAS			
Sem 5-Br-PADAP		Com 5-Br-PADAP*	
Branco	Mn ²⁺ 100 µg L ⁻¹	Branco	Mn ²⁺ 100 µg L ⁻¹
0,003	0,048	0,005	0,099

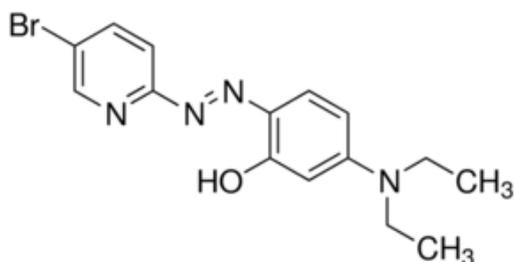
*Volume de complexante = 500 µL

Melhores resultados de extração de Mn(II) na mini-coluna foram obtidos na presença do agente complexante 5-Br-PADAP, em pH 8,0 usando tampão borato 0,1 mol L⁻¹.

O reagente 5-Br-PADAP se comporta como um ligante tridentado para formar Mn(5-Br-PADAP)₂ ou o quelato ML₂. (BARRETO et al., 2019) Muitos corantes tiazolilazo atuam como ligantes tridentados, formando complexos com cátions metálicos, por meio do átomo de nitrogênio heterocíclico, do nitrogênio

azo mais próximo do anel fenólico e do grupo orto-hidroxila (BALIZA et al., 2009). O pH do sistema deve ser mantido abaixo de 9,0 para evitar a formação de hidróxidos metálicos, que precipitam antes de ocorrer a etapa de pré-concentração. A estrutura do Br-PADAP está apresentada na Figura 10.

Figura 10. Estrutura do agente complexante 5-Br-PADAP.



Como a eficiência de extração foi maior na presença do agente complexante 5-Br-PADAP, 500 μL deste foi então adicionado na solução-teste contendo o Mn(II) antes da etapa de pré-concentração.

Outros estudos têm utilizado essa reação de complexação, porém usando outros materiais de suporte, como caulinita (AFZALI *et al.*, 2005) e tetrafenilborato de amônio suportado em naftaleno (TAHER, 2001). Wang & Lu utilizaram a mesma reação para determinar Mn(II) utilizando voltametria de redissolução adsortiva (WANG & LU, 2005). Em outro estudo, o Br-PADAP foi utilizado em um sistema automatizado de pré-concentração de Mn(II) usando reator envelado (BARRETO et al., 2019).

2.12. Concentração da solução-teste de Mn(II)

Os resultados do teste usando diferentes concentrações de Mn(II) para obter uma pré-concentração mensurável, realizados entre 1,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, estão apresentados na Tabela 14.

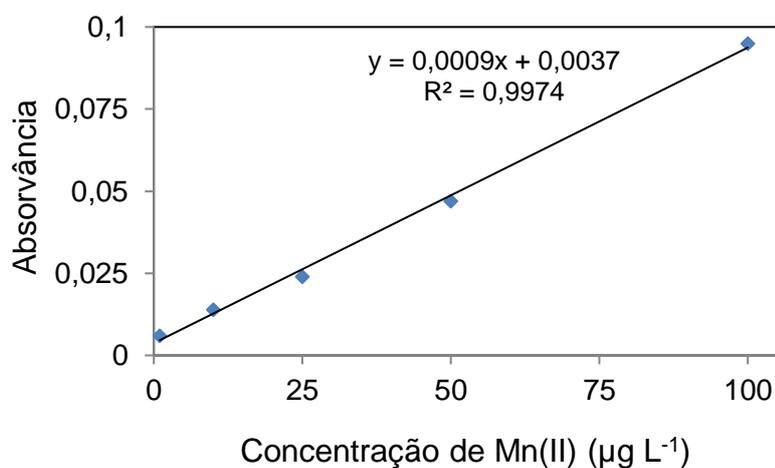
Tabela 14. Estudo da concentração de Mn(II) na etapa de pré-concentração.

Concentração de Mn(II) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Abs
1,0	0,006
10,0	0,014
25,0	0,024
50,0	0,047
100,0	0,095

Avaliando os resultados da Tabela 14 é possível perceber que em concentrações muito baixas de Mn(II), como $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$, não é possível garantir com precisão se houve a adsorção do complexo na mini-coluna. O sinal de absorvância obtido (0,006) é muito próximo do sinal obtido com o branco analítico (0,004). Sendo assim não é possível realizar a adsorção de forma eficiente usando concentrações nesses níveis de concentração. Em concentrações de Mn(II) de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ a sorção do complexo Mn-5-Br-PADAP na raiz ocorreu de forma eficaz e mensurável no FAAS. Em concentrações maiores os sinais aumentam e, portanto, a concentração de Mn(II) de $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$ foi definida para os próximos estudos.

Outra análise que pode ser feita com os dados da Tabela 14 é a avaliação da linearidade obtida usando concentrações crescentes da solução de manganês em função da absorvância obtida pelo FAAS, como pode ser observada na Figura 11.

Figura 11. Linearidade obtida com diferentes concentrações de Mn(II).



Em concentrações maiores a adsorção mantém a eficácia. O maior sinal de absorvância foi obtido em meio de uma solução de Mn(II) $100,0 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo esta concentração definida para estudos posteriores.

A Figura 11 demonstra que o biosorvente utilizado na mini-coluna responde linearmente às diferentes concentrações de Mn(II) na solução com a presença do complexante 5-Br-PADAP, até o limite estudado ($100,0 \mu\text{g L}^{-1}$). O coeficiente de determinação (R^2) encontrado foi de 0,997, valor que se enquadra dentro do mínimo recomendado pelo INMETRO (2007).

2.13. Modo de eluição

Os resultados demonstraram que utilizando a eluição no mesmo sentido da pré-concentração, para uma solução de Mn(II) $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 3$), o sinal de absorvância médio obtido foi de 0,089, enquanto que utilizando a eluição em sentido contrário a absorvância média foi de 0,099. Dessa forma, um ganho de aproximadamente 10% foi observado quando a eluição foi feita no sentido inverso. A redução do sinal usando o mesmo sentido é obtida por que o complexo Mn-5-Br-PADAP adsorvido no material da mini-coluna no momento de pré-concentração acaba se diluindo um pouco pela própria mini-coluna no momento da eluição, diminuindo a sensibilidade do método de extração. Essa dispersão dos íons Mn(II) pela mini-coluna não é observada com a mesma intensidade quando a eluição é feita em sentido contrário. Assim, nos ensaios posteriores os eluatos foram coletados utilizando a inversão da coluna no momento de eluição.

2.14. Otimização multivariada

Planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}

Após definição das condições ótimas das variáveis estudadas anteriormente (presença de complexante, concentração da solução-teste e modo de eluição), foi feita uma otimização multivariada das variáveis consideradas mais significativas através do planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}) para estudar as melhores condições do pH da solução-teste, vazão de introdução da amostra, volume do eluente HCl coletado e concentração do

eluente. Essas variáveis são bastante estudadas quando se quer obter condições experimentais ótimas usando extração em fase sólida. Em cada experimento utilizou-se solução de Mn(II) $100 \mu\text{g L}^{-1}$. A Tabela 15 apresenta a matriz experimental com os valores codificados (+ e -) e os valores reais entre parênteses, bem como os resultados obtidos após a execução do planejamento. Os ensaios foram realizados em duplicata e de forma aleatória para avaliar o modelo por meio da estimativa da variância experimental.

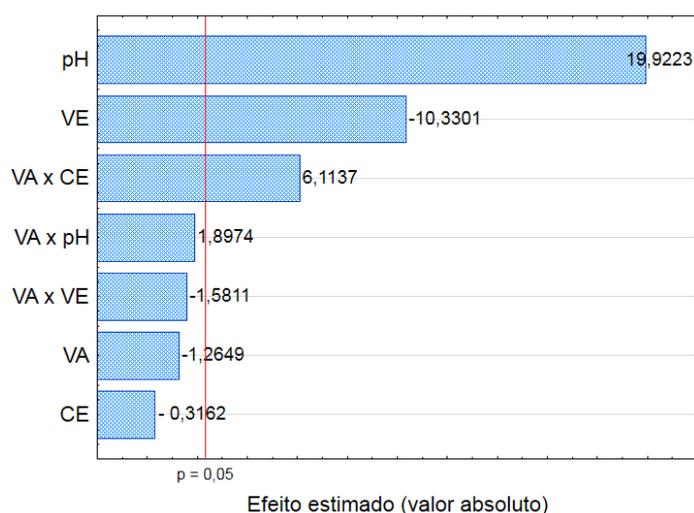
Tabela 15. Matriz experimental e resultados para o planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

Experimento	VA (mL min^{-1})	CE (mol L^{-1})	pH	VE (mL)	Abs*	
1	- (5,0)	- (0,1)	- (5,0)	- (2,0)	0,038	0,042
2	+ (10,0)	- (0,1)	- (5,0)	+ (4,0)	0,025	0,020
3	- (5,0)	+ (1,0)	- (5,0)	+ (4,0)	0,031	0,038
4	+ (10,0)	+ (1,0)	- (5,0)	- (2,0)	0,035	0,039
5	- (5,0)	- (0,1)	+ (8,0)	+ (4,0)	0,063	0,061
6	+ (10,0)	- (0,1)	+ (8,0)	- (2,0)	0,104	0,101
7	- (5,0)	+ (1,0)	+ (8,0)	- (2,0)	0,096	0,100
8	+ (10,0)	+ (1,0)	+ (8,0)	+ (4,0)	0,068	0,053

*Duplicata; VA: Vazão de introdução da amostra; CE: Concentração do eluente HCl; VE: Volume de eluente; Abs: Absorvância

Em uma análise qualitativa dos dados da Tabela 15 observa-se que em pH maiores (8,0) o sinal de absorvância aumenta. Para as demais variáveis não é possível avaliar a significância de forma tão clara, nesse caso há a necessidade de interpretação de forma multivariada (FERREIRA, 2015). A estratégia multivariada apresenta vantagens quando comparada a estratégia univariada, pois considera as interações existentes entre as variáveis, utiliza menos experimentos, é mais econômico e permite que mais de uma variável seja otimizada simultaneamente. O tratamento dos dados da Tabela 15 utilizando o software Statistica gerou o gráfico de Pareto (Figura 12).

Figura 12. Gráfico de Pareto obtido no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .



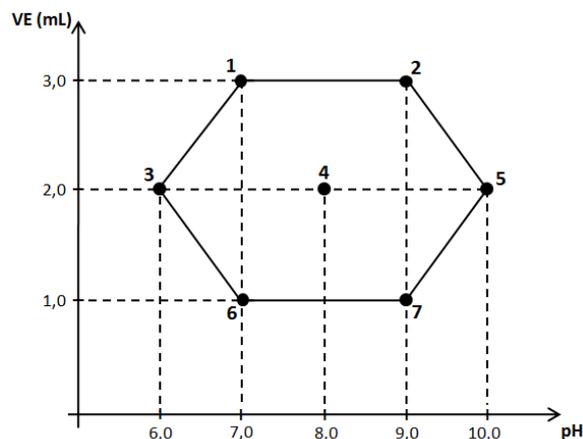
O gráfico de Pareto disponibiliza em ordem decrescente as variáveis estudadas que mais influenciaram na resposta, ou seja, na extração de íons Mn(II) no biosorvente presente na mini-coluna. A linha vertical representa a significância estatística para $p = 0,05$, ou seja, no nível de 95% de confiança.

O gráfico mostra que o pH e o volume de eluente (VE) são as variáveis que mais influenciaram no processo de extração. O valor positivo no gráfico de barras para o pH indica que a extração de Mn(II) em pH mais elevado é mais favorável. Outros estudos também encontraram que em pH básico a formação do complexo Mn-5-Br-PADAP é favorecida (TAHER, 2001; BARRETO *et al.*, 2019). No entanto deve-se tomar cuidado para não utilizar pH muito elevado (> 9,0), pois a concentração de OH^- interfere no equilíbrio favorecendo a formação de hidróxidos metálicos, que precipitam antes da introdução da solução-teste no sistema. A faixa ideal de pH para essa reação de complexação depende ainda do produto de solubilidade do $\text{Mn}(\text{OH})_2$ ($K_{ps} = 2,0 \times 10^{-13}$ a 25 °C) (SKOOG *et al.*, 2015).

Para o volume de eluente coletado, o valor negativo no gráfico de barras indica que sinais maiores de absorvância são obtidos quando é utilizado um volume menor de eluente HCl, em torno de 2,0 mL. Isso demonstra que a dessorção dos íons Mn(II) que ficaram retidos no biosorvente na etapa de pré-concentração acontece de forma rápida. Ao utilizar volumes maiores na eluição proporciona uma maior diluição dos íons Mn(II) no eluato coletado, gerando menores sinais de absorvância.

a matriz Doehlert é representada por um ponto central e outros seis formando um hexágono regular (Figura 14).

Figura 14. Distribuição dos pontos de uma matriz Doehlert para otimização do pH e volume do eluente, representada por um hexágono regular.



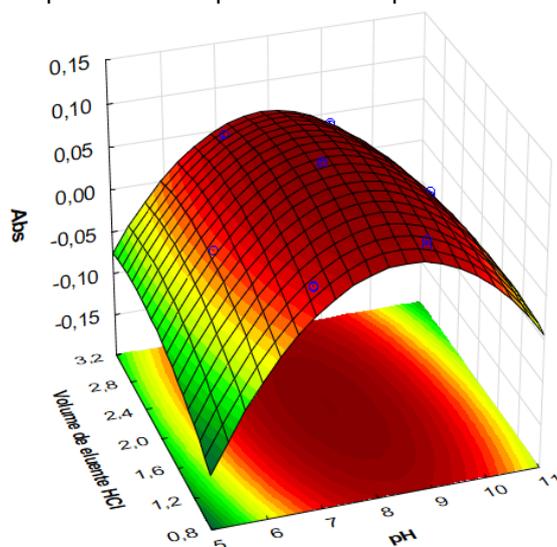
O pH comporta-se como a variável mais crítica do processo de extração. Portanto, esta variável foi estudada em cinco níveis. Quanto ao volume de eluente coletado, esta foi uma variável menos crítica e por isso foi estudada em três níveis. A Tabela 16 apresenta a matriz experimental do planejamento Doehlert e suas respostas como absorvância. Os experimentos também foram realizados de forma aleatória. Outras variáveis foram fixadas em condições previamente utilizadas com base em seus comportamentos no planejamento inicial, como é o caso da vazão de introdução da amostra e concentração do eluente, que apresentou efeito pouco significativo, por isso foram fixados em $5,0 \text{ mL min}^{-1}$ e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. A vazão de eluição foi fixada em $5,0 \text{ mL min}^{-1}$. Os dados foram tratados no programa Statistica e gerou a superfície de resposta, apresentada na Figura 15.

Tabela 16. Matriz e resultados para o planejamento Doehlert.

Experimento	pH	VE (mL)	Abs	
1	6,0 (tampão acetato)	2,0	0,011	0,012
2	7,0 (tampão borato)	1,0	0,039	0,038
3	7,0 (tampão borato)	3,0	0,054	0,061
4	8,0 (tampão borato)	2,0	0,089	0,091
5	9,0 (tampão amoniacal)	1,0	0,069	0,063
6	9,0 (tampão amoniacal)	3,0	0,052	0,055
7	10,0 (tampão amoniacal)	2,0	0,038	0,032

VE: Volume de eluente HCl 0,1 mol L⁻¹.

Figura 15. Superfície de resposta obtida a partir da matriz Doehlert.



Analisando visualmente a superfície da Figura 15 é possível perceber que existe uma região de máximo, representada pela região de cor vermelha intensa na superfície, quando o pH da solução-teste está entre 7,5 - 8,5. Ao mesmo tempo, uma região de máximo aparece quando utilizado volume de eluente no intervalo de 1,6 - 2,4 mL. Essa análise realizada é apenas qualitativa e não permite afirmar um valor exato ideal para cada variável. O valor crítico exato (ótimo) é encontrado através da superfície de resposta descrita pela equação 1 a seguir, obtida a partir do ajuste do modelo quadrático. Todos os coeficientes da equação foram significativos.

$$\text{Equação 1: Abs} = -1,232 + 0,289 (\text{pH}) - 0,017 (\text{pH})^2 + 0,142 (\text{VE}) - 0,019 (\text{VE})^2 - 0,008 (\text{pH}) (\text{VE})$$

As coordenadas do ponto máximo são encontradas pela primeira derivada da função matemática (LEMOS et al., 2009). A derivação da equação geral em termos de pH e volume de eluente resulta em um sistema de equações, apresentados a seguir:

$$\text{Equação 2: } \delta(\text{Abs})/\delta(\text{pH}) = 0,289 - 0,034 (\text{pH}) - 0,008 (\text{VE}) = 0$$

$$\text{Equação 3: } \delta(\text{Abs})/\delta(\text{VE}) = 0,142 - 0,038 (\text{VE}) - 0,008 (\text{pH}) = 0$$

A resolução desse sistema de equações estabelece um ponto crítico (de máximo) para as duas variáveis estudadas. Assim, os valores críticos encontrados, considerados ótimos, para uma maior extração de íons Mn(II) na mini-coluna foram: pH = 8,17 e volume de eluente = 2,0 mL.

A avaliação do modelo foi feita pela análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 17, na qual a falta de ajuste não é significativa, com valor de p (1,00) superior a 0,05. Assim, o modelo quadrático está bem ajustado aos dados obtidos pela aplicação do planejamento Doehlert.

Tabela 17. Análise de variância para o modelo quadrático usando matriz Doehlert.

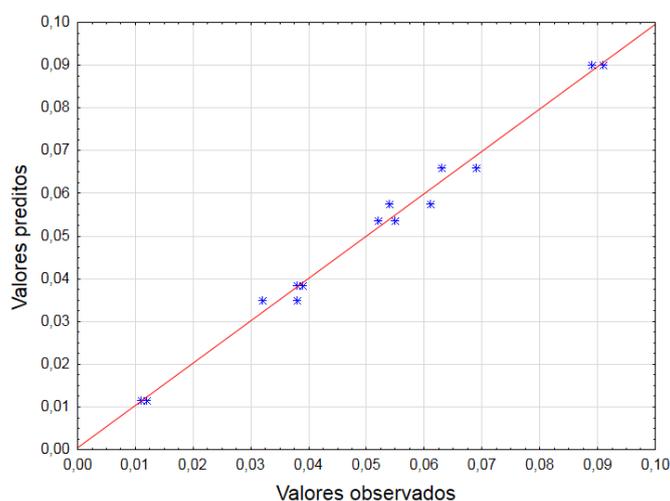
Termo	SQ	gl	MQ	F	Valor p
pH(L)*	0,000828	1	0,000828	85,2739	0,000036
pH(Q)*	0,005941	1	0,005941	611,5478	0,000000
VE(L)	0,000021	1	0,000021	2,1746	0,183803
VE(Q)*	0,000896	1	0,000896	92,1905	0,000028
pH(L) × VE(L)*	0,000496	1	0,000496	51,0717	0,000186
Falta de ajuste	0,000000	1	0,000000	0,0000	1,000000
Erro puro	0,000068	7	0,000010		
SQ total	0,007595	13			

*Termos significativos; SQ = soma quadrática; gl = grau de liberdade; MQ = média quadrática; F = distribuição F de Fisher-Snedecor; Valor p = nível de probabilidade; VE = volume de eluente.

A avaliação do modelo também foi feita pela análise do gráfico de valores preditos versus valores observados, apresentado na Figura 16, na qual a reta é a representação dos valores preditos pelo modelo e os valores experimentais

são representados pelos pontos. A boa correlação entre eles confirma que o modelo quadrático está bem ajustado aos dados experimentais obtidos no planejamento.

Figura 16. Valores preditos versus valores observados para o modelo quadrático.



2.15. Potencial da raiz para extração de outros metais

Neste estudo também foi avaliado de forma preliminar o potencial da raiz da planta *Casearia fasciculata* para extração de outros metais potencialmente tóxicos (Cd, Cr, Ni e Pb) em sistema aquoso. Algumas variáveis foram estudadas para extração de Pb(II) e os resultados estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Resultados preliminares para extração de Pb(II) usando o biosorvente.

Medida	Extração de Pb(II) usando o complexante 5-Br-PADAP		Extração de Pb(II) sem complexante	
	Abs pH 6,0	Abs pH 8,0	Abs pH 6,0	Abs pH 8,0
Branco	0,003	0,005	0,009	0,007
A ₁	0,026	0,023	0,179	0,104
A ₂	0,024	0,021	0,167	0,126
A ₃	0,024	0,020	0,161	0,104

A: Análise; pH 6,0 (tampão acetato); pH 8,0 (tampão borato); massa do biosorvente = 70 mg; Volume de complexante = 100 μ L; Concentração da solução de Pb(II) = 100 μ g L⁻¹; Volume da solução de Pb(II) = 50,0 mL; Concentração de solução tampão = 0,1 mol L⁻¹.

Ao contrário do que ocorreu para o Mn(II), os resultados indicam que o biosorvente apresentou melhor capacidade de extração dos íons Pb(II) quando realizada a pré-concentração sem a presença do complexante 5-Br-PADAP, ou seja, os íons foram retidos diretamente nos sítios ativos da própria raiz. A extração em pH ácido usando tampão acetato foi mais efetiva do que em pH básico usando tampão borato.

Resultados para extração de Cd(II) e Ni(II) também foram obtidos e estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Resultados preliminares para extração de Cd(II) e Ni(II) usando o biosorvente.

Medida	Extração de Cd(II) usando o complexante TAC	Extração de Cd(II) sem complexante	Extração de Ni(II) sem complexante	
	Abs pH 8,0	Abs pH 8,0	Abs pH 6,0	Abs pH 8,0
Branco	0,004	0,004	0,012	0,018
A ₁	0,293	0,294	0,071	0,243
A ₂	0,284	0,284	0,074	0,280
A ₃	0,260	0,240	0,068	0,305

A: Análise; TAC: 2-(2-tiazolilazo)-p-cresol; pH 6,0 (tampão acetato); pH 8,0 (tampão borato); massa do biosorvente = 70 mg; Volume de complexante = 50 µL; Concentração da solução de Cd(II) = 10 µg L⁻¹; Concentração da solução de Ni(II) = 100 µg L⁻¹; Volume da solução de Cd(II) e Ni(II) = 50,0 mL; Concentração de solução tampão = 0,1 mol L⁻¹.

Resultados para a extração de Cd(II) foram bastante promissores em pH básico usando tampão borato. No entanto, não houve diferenças significativas na extração quando comparado os resultados utilizando o complexante 2-(2-tiazolilazo)-p-cresol (TAC) para formação do complexo antes da etapa de pré-concentração e sem a presença de complexante. Neste caso, a raiz do biosorvente apresenta sítios ativos que podem se ligar facilmente tanto aos íons Cd(II) quanto ao complexo Cd-TAC.

Para o níquel, a extração em pH básico usando tampão borato foi mais efetiva do que em pH ácido usando tampão acetato. Neste caso, a raiz do biosorvente também apresentou boa eficiência de extração quando a pré-concentração foi realizada sem a presença de um agente complexante.

O sistema de pré-concentração também foi avaliado para extração de Cr(III) e Cr(VI), com e sem o uso do complexante 5-Br-PADAP e em

diferentes valores de pH (2,0; 5,0; 8,0 e 11,0). No entanto, os sinais de absorvância não foram atrativos nas condições avaliadas.

2.16. Conclusão

No presente estudo foi possível desenvolver um método para extração de íons Mn(II) empregando um biosorvente a partir de raízes da planta *Casearia fasciculata*. Os planejamentos utilizados, fatorial fracionário e matiz Doehlert, foram úteis para otimização das principais variáveis envolvidas no processo: pH da solução-teste, vazão de introdução da amostra, volume de eluente e concentração do eluente.

O reagente 5-Br-PADAP apresentou uma boa aplicação para pré-concentração de Mn(II), no entanto, não foi muito efetivo para Pb(II). Além disso, o sistema em fluxo, associado à técnica FAAS permitiu uma análise rápida, de fácil operação, eficiente e sensível para as espécies estudadas.

O biosorvente estudado também apresentou potencial para remediação de outras espécies inorgânicas potencialmente tóxicas como Pb(II), Cd(II) e Ni(II). Estudos cinéticos, de equilíbrio e de caracterização do material serão feitos em etapas complementares, bem como a validação do método de extração para posterior aplicação em amostras reais em meio aquoso.

Referências

- AFROZE, S.; SEN, T. K.; A review on heavy metal ions and dye adsorption from water by agricultural solid waste adsorbents. **Water, Air, & Soil Pollution**. Vol. 229, p. 225, 2018.
- AFROZE, S.; SEN, T. K.; ANG, H. M.; Adsorption removal of zinc (II) from aqueous phase by raw and base modified *Eucalyptus sheathiana* bark: kinetics mechanism and equilibrium study. **Process Safety and Environment Protection**. Vol. 102, p. 336–352, 2016.
- AFZALI, D.; TAHER, M. A.; MOSTAFAVI, A.; MOBARAKEH, S. Z.; Thermal modified Kaolinite as useful material for separation and preconcentration of trace amounts of manganese ions. **Talanta**. Vol. 65, p. 476–480, 2005.
- ALVES, V. N.; BORGES, S. S. O.; BORGES NETO, W.; COELHO, N. M. M.; Determination of low levels of lead in beer using solid-phase extraction and detection by flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*. **Journal of Automated Methods and Management in Chemistry**. Vol. 2011, p. 1–6, 2011.
- BAIRD, C.; Cann, M.; Química Ambiental. 4ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2011.
- BALIZA, P. X.; FERREIRA, S. L. C.; TEIXEIRA, L. S. G.; Application of pyridylazo and thiazolylazo reagents in flow injection preconcentration systems for determination of metals. **Talanta**. Vol. 79, p. 2–9, 2009.
- BARKA, N.; ABDENNOURI, M.; MAKHFOUK, M. E.; QOURZAL, S.; Biosorption characteristics of cadmium and lead onto eco-friendly dried cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. Vol. 1, p. 144–149, 2013.
- BARRETO, J. A.; LEMOS, V. A.; DE OLIVEIRA, D. M.; CERQUEIRA, U. M. F. M.; MEIRA, L. A.; BEZERRA, M. A.; Use of arduino in the development of a new and fast automated online preconcentration system based on double-knotted reactor for the Mn determination in tea samples by flame atomic absorption spectrometry (F AAS). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, p. 1-10, 2019. DOI 10.21577/0103-5053.20190118.
- BHATTI, H. N.; ZAMAN, Q.; KAUSAR, A.; NOREEN, S.; IQBAL, M.; Efficient remediation of Zr(IV) using citrus peel waste biomass: Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies. **Ecological Engineering**. Vol. 95, p. 216–228, 2016.
- BRASIL, J. L.; VAGHETTI, J. C. P.; DOS SANTOS, A. A.; SIMON, N. M.; PAVAN, F. A.; DIAS, S. L. P.; LIMA, E. C.; Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de biossorção de

- Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como biossorvente. **Revista Química Nova**. Vol. 30, p. 548–553, 2007.
- CARVALHO-NETO, F. G.; DA SILVA, J. R.; SANTOS, N.; ROHDE, C.; GARCIA, A. C. L.; MONTES, A. M.; The heterogeneity of Caatinga biome: an overview of the bat fauna. **Mammalia**. Vol. 81, p. 257–264, 2017.
- FAN, T.; LIU, Y.; FENG, B.; ZENG, G.; YANG, C.; ZHOU, M.; ZHOU, H.; TAN, Z.; WANG, X.; Biosorption of cadmium(II), zinc(II) and lead(II) by *Penicillium simplicissimum*: Isotherms, kinetics and thermodynamics. **Journal of Hazardous Materials**. Vol. 160, p. 655–661, 2008.
- FERREIRA, S. L. C.; DOS SANTOS, W. N.; QUINTELLA, C. M.; BARROS NETO, B.; BOSQUE-SENDRA, J. M.; Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry - review. **Talanta**. Vol. 63, p. 1061–1067, 2004.
- FERREIRA, S. L. C.; Introdução às técnicas de planejamento de experimentos, Editora Vento Leste, Salvador, 2015.
- FLECK, L.; TAVARES, M. H. F.; EYNG E.; Adsorbents natural as controllers of aquatic pollutants: a review. **Revista EIXO**. Vol. 2, p. 39–52, 2013.
- HLIHOR, R. M.; GAVRILESCU, M.; Removal of some environmentally relevant heavy metals using low-cost natural sorbents. **Environmental Engineering and Management Journal**. Vol. 8, p. 353–372, 2009.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - Documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008, Revisão 02 - Junho/2007.
- KARATEPE, A.; SOYLAK, M.; Sea sponge as a low cost biosorbent for solid phase extraction of some heavy metal ions and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Journal of AOAC International**. Vol. 97, p. 1689–1695, 2014.
- KARATEPE, A.; SOYLAK, M.; Sea sponge as a low cost biosorbent for solid phase extraction of some heavy metal ions and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Journal of AOAC International**. Vol. 97, p. 1689–1695, 2014.
- LANÇAS, F. M. Extração em Fase Sólida (SPE) – Vol. 4 Coleção Métodos Cromatográficos de Análise. São Carlos: RiMa, 2004.
- LEMOS, V. A.; NOVAES, C. G.; BEZERRA M. A.; An automated preconcentration system for the determination of manganese in food samples. **Journal of Food Composition and Analysis**. Vol. 22, p. 337–342, 2009.

- MAHMOUD, M. E.; YAKOUT, A. A.; OSMAN, M. M.; Immobilization of *Fusarium verticillioides* fungus on nano-silica (NSi-Fus): A novel and efficient biosorbent for water treatment and solid phase extraction of Mg(II) and Ca(II). **Bioresource Technology**. Vol. 134, p. 324–330, 2013.
- MIMURA, A. M. S.; VIEIRA, T. V. A.; MARTELLI, P. B.; GORGULHO, H. F.; Aplicação da casca de arroz na adsorção dos íons Cu^{2+} , Al^{3+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} . **Revista Química Nova**. Vol. 33, p. 1279–1284, 2010.
- MITRA, T.; SINGHA, B.; BAR, N.; KUMAR, S.; Removal of Pb(II) ions from aqueous solution using water hyacinth root by fixed-bed column and ANN modeling. **Journal of Hazardous Materials**. Vol. 273, p. 94–103, 2014.
- PRASAD, M. N. V.; FREITAS, H.; Removal of toxic metals from solution by leaf, stem and root phytomass of *Quercus ilex* L. (holly oak). **Environmental Pollution**. Vol. 110, Ed. Elsevier, p. 277–283, 2000.
- PRASHITH KEKUDA, T. R.; VINAYAKA, K. S.; RAGHAVENDRA, H. L.; Ethnobotanical uses, phytochemistry and biological activities of *Salix tetrasperma* roxb. (Salicaceae) - A review. **Journal of Medicinal Plants Studies**. Vol. 5, p. 201–206, 2017.
- SILVA, K. M. D.; RESENDE, L. C. S. H.; DA SILVA, C. A.; BERGAMASCO, R.; GONÇALVES, S. D.; Caracterização físico-química da fibra de coco verde para a adsorção de metais pesados em efluente de indústria de tintas. **Engevista**, V. 15, p. 43–50, 2013.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; Fundamentos de Química Analítica. 9ª Ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.
- SOUZA, V. C., LORENZI, H.; Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II, Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.
- TAHER, M. A.; Flame atomic absorption spectrometric determination of trace amounts of manganese in alloys and biological samples after preconcentration with the ion pair of 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol and ammonium tetraphenylborate on microcrystalline naphthalene or by column method. **Analytical Sciences**. Vol. 17, p. 969–973, 2001.
- WANG, J.; LU, J.; Adsorptive stripping voltammetry of trace manganese in the presence of 2-(5'-bromo-2'-pyridylazo)-5-diethylaminophenol (5-Br-PADAP). **Talanta**. Vol. 42, 331–335, 1995.
- XIA, L.; GUO, Q.; TU, P.; CHAI, X.; The genus *Casearia*: a phytochemical and pharmacological overview. **Phytochemistry Reviews**. Vol. 14, p. 99–135, 2015.

ZHENG, J. C.; FENGA, H. M.; LAM, M. H. W.; LAM, P. K. S. Removal of Cu(II) in aqueous media by biosorption using water hyacinth roots as a biosorbent material. **Journal of Hazardous Materials**. Vol. 171, p. 780–785, 2009.

Capítulo III

Análise dos constituintes químicos voláteis do óleo essencial das folhas da *Casearia fasciculata* por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (CGMS)

3. Introdução

O uso de produtos naturais vem despertando o interesse de pesquisadores de diversas áreas, principalmente da área farmacêutica. A busca por substâncias biologicamente ativas tem sido amplamente relatado, dessa forma um estudo e preservação da biodiversidade torna-se fundamental visto que princípios ativos importantes podem ser encontrados em toda a parte da planta [1]. Vários compostos que dão origem a fármacos podem ser de origem natural ou serem sintetizados a partir de produtos naturais [2]. Os óleos essenciais são uma classe importante, estes apresentam várias funções dentre elas destacam-se a função de sinalização para comunicação entre as espécies, proteção contra microrganismos e herbívoros além de serem ricos em metabolitos secundários voláteis associados a importantes atividades biológicas [3].

Entre as plantas produtoras de óleo essencial, encontra-se a família Salicaceae. Espécies deste gênero destacam-se por sua importância econômica e medicinal, sendo relatadas atividades biológicas como: anti-inflamatória, antiúlcera, antiofídica, citotóxica, entre outras. Tais atividades têm sido um tema atrativo na pesquisa de produtos naturais com a sua diversidade estrutural e farmacológica. Devido a isso, representam uma fonte abundante de substâncias desconhecidas com potencial para serem utilizadas como fármacos [4]. Dentre os representantes desta família, destaca-se a *Casearia fasciculata*, conhecida vulgarmente por fruta vidro devido a transparência da polpa do fruto.

Dentre os métodos para a obtenção dos óleos essenciais, a que mais se destaca, por ser extremamente simples, de fácil execução, bom rendimento e baixo

custo é a hidrodestilação por arraste a vapor, que se baseia na imersão do material vegetal em água sob aquecimento até 100 °C, o que resulta na formação de vapores que arrastam os compostos mais voláteis. A mistura de vapor e soluto passa por um condensador e, após a condensação, os compostos separam-se da fase aquosa por decantação [5]. No campo que abrange as investigações fitoquímicas, de separação e identificação dos óleos essenciais, destacam-se as cromatografias de camada delgada, coluna (gasosa e líquida) espectrometrias (massa, ultravioleta, infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono), que associado a outras técnicas de análise vem produzindo novas tecnologias, tornando as técnicas analíticas mais sofisticadas e eficientes [6].

A primeira escolha para análise de compostos químicos voláteis é a CG-MS devido à sua simplicidade, precisão e rapidez. Esta técnica permite a separação dos constituintes pela cromatografia gasosa, que são introduzidos individualmente em ordem de eluição na câmara de ionização do espectrômetro de massas. O espectro de massas obtido para cada um dos constituintes geralmente indica a massa molecular e o seu padrão de fragmentação. O padrão de fragmentação pode ser comparado eletronicamente com aqueles constantes da biblioteca de espectros de massas [5,7].

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo identificar os principais constituintes químicos voláteis do óleo essencial das partes aéreas da *Casearia fasciculata* por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas e avaliar *in vitro* a atividade carrapaticida frente ao componente majoritário presente nas secreções defensivas de *O. fuscipes* em teste de imersão de adultos de *Rhipicephalus microplus*.

3.1. Parte Experimental

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitoterapia e Óleos Essenciais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) campus de Jequié. A metodologia adotada envolveu análise cromatográfica dos constituintes químicos voláteis do óleo essencial das partes aéreas da *Casearia fasciculata* bem como avaliação da atividade carrapaticida.

3.2. Amostragem

As partes aéreas (folhas) da espécie vegetal em estudo foram coletadas em março de 2016, na fazenda Bela Vista, (latitude 13°37'12 "S e longitude 40°13'27" W) localizada no Município de Lafaiete Coutinho (BA) onde há uma predominância vegetal característica de área de transição caatinga e mata, conhecida como mata de cipó. Após a coleta, foi depositado em exsiccata no herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. A espécie vegetal foi submetida às operações de seleção e lavagem, separação das partes da planta (caule e folha) e descarte das partes atacadas por praga ou doenças.

3.3. Extração do óleo essencial da *Casearia fasciculata*

O óleo essencial foi extraído de 501,137 g das folhas frescas da espécie em estudo com 3,0 L de água destilada, por hidrodestilação em um sistema Clevenger (Figura 17) mantendo-se a temperatura constante a 90 °C. Posteriormente, o óleo foi seco por meio da percolação em Na₂SO₄ anidro.

Essa operação foi realizada em triplicata e as amostras foram armazenadas em frasco de vidro sob refrigeração, para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis e em seguida o óleo foi submetido às análises físicas e químicas.

Figura 17. Sistema Clevenger modificado para extração de óleo essencial. Fonte: Própria.



3.4. Instrumentação

A identificação da composição química do óleo essencial extraído das folhas da Fruta Vidro foi realizada por um CG-MS (Shimadzu modelo QP2010), coluna apolar com capilar 3% fenila no Laboratório de Cromatografia. Na Tabela 20 encontram-se as condições de operação do equipamento.

Tabela 20. Condições cromatográficas do CG-EM utilizadas na análise do óleo essencial.

Parâmetros	Condições de operação
Coluna cromatográfica	OV5, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, espessura de 0,25 μ m
Impacto eletrônico	70 e/V
Gás de Arraste/Vazão	Gás Hélio, com fluxo de 1,8 mL min ⁻¹
Programa de temperatura	Inclinado na taxa 3 °C min ⁻¹
Temperatura do Injetor	220 °C
Temperatura da Coluna	Inicial 40 °C - Final 240 °C
Volume Injetado (μ L)	1
Varredura (m/z)	40-500

Para a identificação dos compostos detectados na amostra utilizou-se as bases de dados de espectros de massas NIST 14 e Adams (2007). O espectro de cada constituinte da amostra foi comparado com cada um dos espectros armazenados no banco de dados do computador. Após esta comparação, o programa faz uma lista tríplice de compostos com sua respectiva probabilidade de ser ou não um determinado

composto. O banco de dados é limitado e, em alguns casos, indica quais seriam os prováveis constituintes, por aproximação.

A análise dos constituintes químicos encontrados no óleo essencial, também foi analisado por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID) usando as mesmas condições de operação do CG-MS.

3.5. Determinação da atividade carrapaticida

3.5.1. Obtenção das teleóginas de *Rhipicephalus microplus*

As teleóginas ingurgitadas de *R. microplus* foram coletadas de bovinos leiteiros do Instituto Federal Baiano - Itapetinga (BA). A coleta foi realizada manualmente de animais naturalmente infestados e livres de exposição a acaricidas por um período mínimo de 30 dias. Após a coleta, as teleóginas foram acondicionadas em recipiente plástico e transportadas para o Laboratório de Biologia e Química do Instituto Federal Baiano, *Campus* de Itapetinga, em caixa térmica sob refrigeração, para evitar o início prematuro da oviposição. O tempo entre a coleta e a realização dos ensaios *in vitro* não excedeu 24 horas.

3.5.2. Teste de imersão de adultos

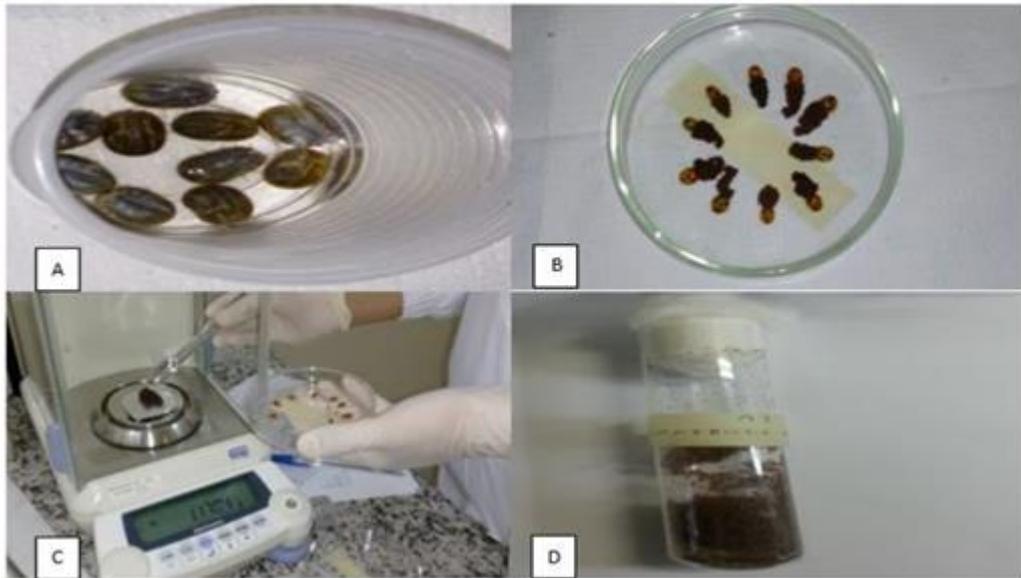
O teste de imersão de teleóginas adultas foi realizado segundo metodologia descrita por Drummond et al. (1973). As teleóginas foram lavadas com água destilada, secas com papel toalha e selecionadas de acordo com a integridade física, motilidade e ingurgitamento. Os carrapatos foram divididos em grupos de 10, com pesos homogêneos por replicata, sendo os testes realizados com quatro repetições.

Para o grupo controle negativo (sem substância a ser testada) e para a diluição do óleo foi utilizada uma solução etanol:água na proporção 70:30). Os controles positivos foram os carrapaticidas comerciais diazinon (organofosforado), e fipronil (fenilpirazol), nas concentrações recomendadas pelo fabricante.

Cada grupo de 10 fêmeas foi submetido à imersão com 5 mL da solução teste (2-metoxi-3-metil-1,4-benzoquinona) e controles durante 5 minutos, retirado o excesso de líquido com papel toalha e fixadas em placas de petri para posterior

ovipostura (Figura 18). As placas foram acondicionadas à temperatura ambiente durante quinze dias. Após este período de incubação, foi realizada a avaliação da ovipostura, e os ovos pesados e armazenados em tubos de ensaio vedados com algodão hidrófobo, mantendo-se nas mesmas condições de incubação anteriormente descritas durante 21 dias para eclosão das larvas. A porcentagem de eclosão dos ovos foi avaliada visualmente com auxílio de lupa.

Figura 18: Etapas do teste de imersão em fêmeas de carrapatos adultos.



A: Imersão das larvas (controle negativo). B: Fêmeas ingurgitadas fixadas em placas de petri, após 15 dias do tratamento. C: Pesagem dos ovos. D: Larvas no tubo de ensaio após 21 dias de incubação.

Foram analisados os parâmetros de porcentagem de oviposição (PO) e porcentagem da eclosão em relação ao controle negativo, eficiência reprodutiva (ER) e eficiência do produto (EP). O cálculo da porcentagem de eclosão foi realizado através da visualização da proporção de ovos que eclodiu, os outros três parâmetros foram determinados através das seguintes equações:

$$PO = \frac{\text{Peso dos ovos}}{\text{Peso das fêmeas}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

$$ER = \frac{\text{Peso da massa de ovos} \times \% \text{ de eclosão} \times 20.000}{\text{Peso das fêmeas}} \quad \text{Equação 2}$$

$$EP = \frac{ER \text{ do grupo controle negativo} - ER \text{ do grupo tratado} \times 100}{ER \text{ do grupo controle negativo}} \quad \text{Equação 3}$$

3.6. Resultados e discussão

Após realização dos procedimentos, conforme descrições anteriores, coletou-se todas as informações e dados obtidos para análise e tratamento.

No primeiro momento, realizou-se a extração do óleo essencial da *Casearia fasciculata* e observou-se que o mesmo apresentou uma coloração amarelo-claro, conforme Figura 19, e uma massa total de 0,286 g, que após cálculo de rendimento, efetuado com base na equação 4, apresentou em sua totalidade 0,057%. Em seguida, a amostra foi armazenada em frasco de vidro sob refrigeração para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis

$$\text{Rendimento \%} = \frac{\text{Massa do Óleo}}{\text{Massa de Folhas Frescas}} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

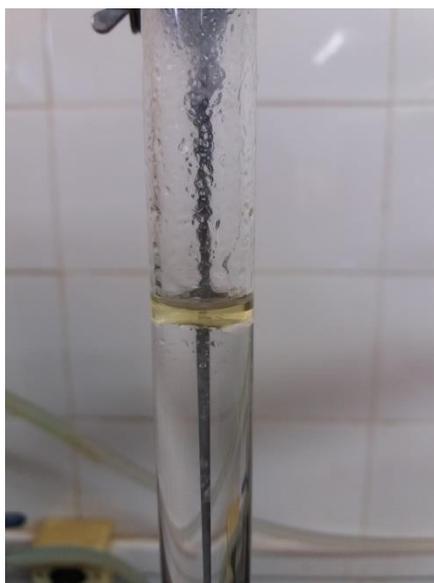


Figura 19: Extração do óleo essencial das folhas da *Casearia fasciculata* pela técnica de hidrodestilação. (Autoria Própria).

Atualmente, a CG-MS é a técnica mais aplicada em laboratórios de pesquisa, uma vez que os espectros obtidos são bem documentados em bibliotecas, que

compensa uma possível baixa recuperação durante o processo de extração e a variação na resposta instrumental [5]. A composição química das amostras do óleo de folhas frescas da *Casearia fasciculata* foi determinada empregando a cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CG-MS) e por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG-FID) com identificação dos constituintes principais que são apresentados nas Figuras 20 e 21 em ordem crescente de tempo de retenção respectivamente.

Figura 20: Cromatograma do óleo essencial de *Casearia fasciculata* obtido pelo CG-MS.

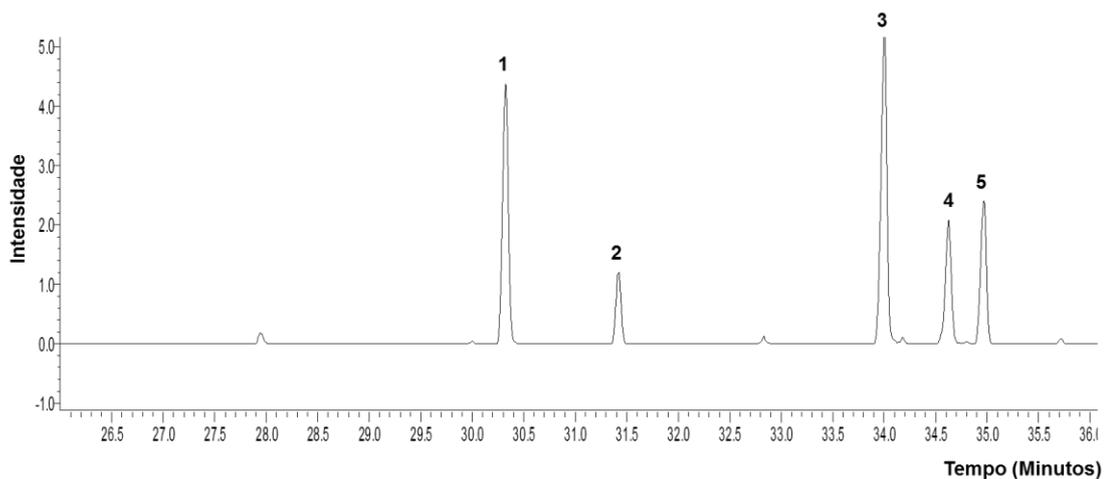
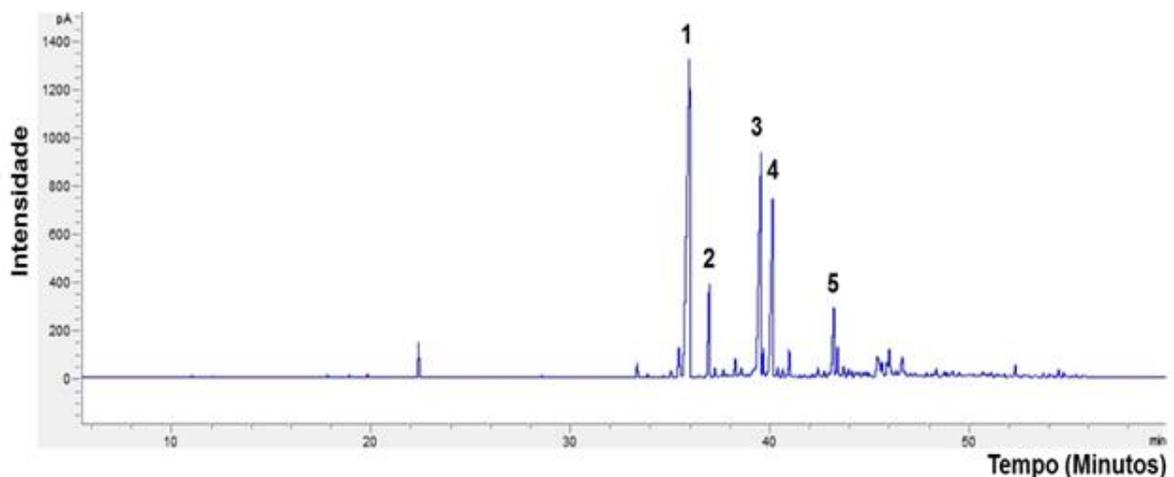


Figura 21: Cromatograma do óleo essencial de *Casearia fasciculata* obtido pelo CG-FID.



Para a identificação dos constituintes químicos do óleo associou-se ao CG-MS a determinação do índice de Kovats, já que este procedimento vem sendo aplicado com sucesso na identificação de substâncias de estruturas conhecidas porque, em

sua maioria, os dados gerados podem ser comparados diretamente com os valores de tempo de retenção obtidos e com os espectros de massas dos constituintes voláteis publicados [5]. De posse do cromatograma e após determinação do índice de Kovats, com resultados apresentados na tabela 21, fez-se uso da biblioteca NIST 14 para ratificação dos resultados.

De acordo com a metodologia utilizada foi possível identificar os constituintes químicos presentes no óleo essencial de *Casearia fasciculata*. A análise do óleo mostrou ser constituído basicamente pela classe de terpenos, grupo de substâncias encontradas em óleos essenciais das plantas e são classificados de acordo com o número de resíduos de isopreno (vasto grupo de biomoléculas que contém unidades estruturais repetidas de cinco carbonos conforme Figura 22) que contém. As substâncias terpênicas podem ser divididas em: monoterpenos (compostos de duas unidades de isopreno); sesquiterpenos (contêm três isoprenóides); diterpenos (compostos de quatro unidades de isoprenos); triterpenos (composto de seis isoprenóides); carotenóides ou tetraterpenos (compostas de oito unidades de isopreno) e politerpenos (moléculas de elevado peso molecular composto de centenas ou milhares de unidades de isopreno) [8].

Os sesquiterpenos estão representados por cinco compostos: β -elemeno, β (trans) – Cariofileno; Germacreno – D; Biciclogermacreno e α – Bulneseno.

Tabela 21: Características dos compostos voláteis, da *Casearia fasciculata* identificados no CG-MS.

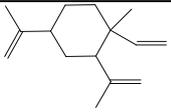
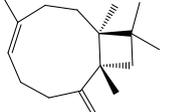
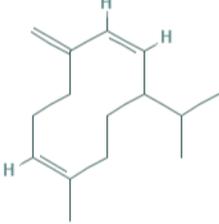
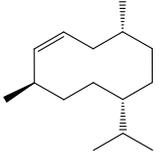
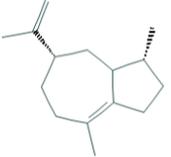
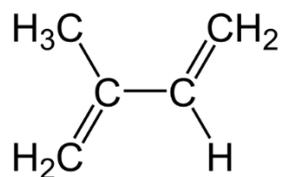
Picos	IK _{cal}	IK _{lit}	Similaridade (%)	Nome do Composto	Estrutura Química
1	1396,94	1389	96	β- Elemeno	
2	1424,58	1417	93	(Trans)-β-Cariofileno	
3	1487,62	1484	96	Germacreno- D	
4	1502,47	1500	91	Biciclogermacreno	
5	1511,58	1509	92	α - Bulneseno	

Figura 22: Formula estrutural do isopreno.



Os terpenos são responsáveis pelas características aromáticas da grande maioria dos produtos naturais, e ainda é detentor de diversas atividades biológicas, como bactericida, fungicida, antiviral, antiparasitária, inseticida e analgésica, que se distribuem dentro de vários grupos. Dentre as atividades biológicas dos terpenos, destaca-se aqui o seu uso na medicina antioxidante, já que um dos terpenos mais importantes nessa área é o beta-caroteno, que no nosso organismo, é convertido em vitamina A [8].

O Elemeno é um grupo constantemente encontrado em uma variedade de plantas inclusive medicinais. Os isômeros α -, β -, γ - e δ -elemeno, são classificados como sesquiterpenos que contribuem para o aroma das plantas e estão sendo relacionados com efeitos anti-proliferativos de alguns tipos de células cancerígenas [9]. O cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico descrito como anti-edêmico, anti-inflamatório, antimoral, antialérgico, bactericida e repelente. Possui, segundo alguns estudos, ação terapêutica nas infecções produzidas por estafilococos, principalmente quando aplicado em feridas infectadas [10]. Os Germacrenos, que também são sesquiterpenos, com cinco isômeros (A, B, C D e E), possuem propriedades antimicrobianas e insecticidas, mas também desempenham um papel de feromonas de insetos [11].

O composto biciclogermacreno segundo a literatura apresenta propriedades comprovadas como: antifúngica e antimicrobiana.

3.7. Avaliação da atividade carrapaticida

O primeiro parâmetro avaliado neste teste foi o efeito do óleo da *Casearia fasciculata* nas respectivas concentrações, 30,5 mg mL⁻¹; 13,93 mg mL⁻¹ e 8,50 mg mL⁻¹ na produção de ovos das teleóginas ingurgitadas. É possível observar na Tabela 19 que o óleo inibiu quase que completamente a oviposição das teleóginas *R. microplus* assim como o controle positivo (Fipronil).

É importante ressaltar que os efeitos dos óleos da *Casearia fasciculata*, e do Fipronil não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (teste de Tukey $p < 0,05$). O controle positivo (Fipronil) e o óleo de *Casearia fasciculata* inibiu completamente a postura dos ovos.

Após a avaliação da oviposição, foi analisada a taxa de eclosão dos ovos (trinta dias depois de incubação dos ovos) e mais uma vez, o óleo testado destacou-se neste parâmetro, pois apresentou o menor percentual de eclodibilidade (3,33%).

É importante ressaltar que as diferentes concentrações testadas apresentaram diferenças não significativas com o controle positivo (fipronil) e também não diferiram entre si (teste de Tukey $p < 0,05$) (Tabela 22). As taxas de eclosão estão diretamente ligadas aos resultados de redução da eclosão e eficiência reprodutiva, indicando o efeito a longo prazo do composto testado nos ovos dos carrapatos, sendo que o óleo de *Casearia fasciculata* apresentou um excelente resultado.

Tabela 22: Média e desvio padrão dos percentuais de oviposição e eclodibilidade de larvas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com o óleo da *Casearia fasciculata*.

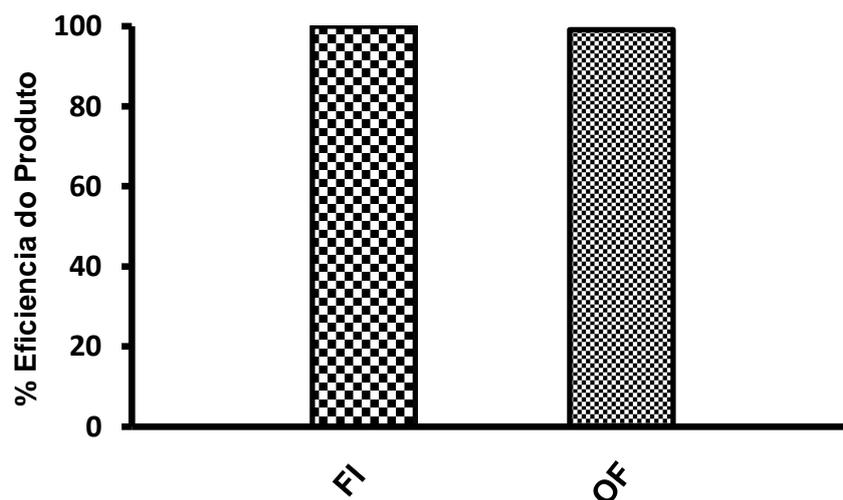
	CONCENTRAÇÃO (mg/mL)	OVIPOSIÇÃO (%)	ECLODIBILIDADE (%)
Óleo fasciculata	30,5	5,69 ± 3,67a	3,33 ± 2,70 ^a
Controle negativo (Etanol 70%)	-	0,00 ± 0,07 b	83,33 ± 7,43 b
Controle Positivo (Fipronil)	10,0	100,00 a	0,00 a

*Letras diferentes representam diferenças significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Os percentuais de eficiência dos diferentes compostos testados estão apresentados na Figura 23. Foi observada uma elevada eficiência no óleo essencial da *Casearia fasciculata* com 99,12%. É importante ressaltar que as diferenças não são significativas (teste de Tukey $p < 0,05$) entre o óleo e o controle positivo (Fipronil).

Figura 23: Eficiência do óleo da *Casearia fasciculata*, sobre as teleóginas de *Rhipicephalus microplus*.

*FI 10, fipronil (controle positivo) na concentração testada (10 mg/mL)



A base de um eficiente controle do *Rhipicephalus microplus* é evitar o desenvolvimento das fêmeas ingurgitadas e limitar a oviposição, sendo os carrapaticidas sintéticos o método mais utilizado por fornecer melhores resultados nestas etapas. O uso indiscriminado e incorreto desses produtos como utilização de subdoses, maneiras de preparo, aplicação e manejo inadequados têm levado a

redução da eficácia e selecionado indivíduos e conseqüentemente populações resistentes a diversos carrapaticidas presentes no mercado. A utilização dos referidos produtos químicos, pelo aumento na frequência da aplicação de acaricidas, pode ser detectada pela presença de resíduos desses produtos no leite e na carne.

Além disso, há uma crescente preocupação social em relação à preservação e saúde humana, que muitas vezes entram em conflito com a necessidade de assegurar a produtividade econômica. Portanto, é necessário e importante a busca de substâncias menos agressivas, ao meio ambiente e à saúde humana, para controlar pragas, como os carrapatos que causam prejuízos aos rebanhos de animais domésticos.

3.8 Conclusão

A análise química do óleo essencial da *Casearia fasciculata* por CG-MS demonstrou que a composição é predominantemente de compostos terpênicos, principalmente pertencentes à classe dos sesquiterpenos.

Os resultados apresentados pelo presente estudo contribuíram significativamente com informações sobre a composição química do óleo essencial da *Casearia fasciculata*, visto que até o momento não foi encontrado nenhum registro com informações a respeito da sua composição química. O óleo essencial da *Casearia fasciculata* apresentou diversos sesquiterpenos de importância biológica em sua composição, além de atividade carrapaticida satisfatória para o óleo. Os princípios ativos presentes no óleo da *Casearia fasciculata* representam uma alternativa às bases químicas utilizadas pela indústria para o controle da população de carrapatos além de ser utilizado como alternativa, com menor impacto ambiental.

Este trabalho fornece subsídios para descobertas relevantes, uma vez que a literatura é carente de informações sobre a *Casearia fasciculata*, evidenciando a necessidade de pesquisas que tenham por objetivo, investigar a composição química, as atividades biológicas, a toxicidade e o potencial para utilização comercial de produtos e extratos obtidos a partir desta espécie.

Referências

- [1] S. KORDALI, A. ÇAKIR, H. ÖZER, R. ÇAKMAKCI, M. KESDEK, E. METE, Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and α -cymene. *Bioresource Technology*, 99(18):8788-95 DOI: 10.1016/j.biortech.2008.04.048, 2008
- [2] E. J. BARREIRO, V. S. BOLZANI, Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos, *Química Nova*, 22(2009) 1678-7064. DOI: 10.1590/S0100-40422009000300012.
- [3] X. P. NUNES, G. L. A. MAIA, J.R. G. S. ALMEIDA, F. O PEREIRA, E. O. LIMA, Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. *Revista Brasileira Farmacognosia* 16(2006).642-644 DOI: 10.1590/S0102-695X2006000500010.
- [4] ANHESINE, N. B. Documentação química de espécies do gênero *Casearia* (salicaceae) de importância ecológica, econômica e medicinal. Araraquara. 2015.
- [5] ORLANDA, J. F. F. Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *ruta graveolens* linneau (rutaceae). Tese (Química Analítica) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2011.
- [6] SILVERSTEIN, R. M.; F.X., W.; D.J., K. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Rio de Janeiro,: Livros Técnicos e Científicos S.A., 2007.
- [7] SOUSA, J. P. B. D. *Copaifera Langsdorffii*: estudo fitoquímico, validação de métodos cromatográficos e análise sazonal. Ribeirão Preto. Tese (Produtos Naturais) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto 2011.
- [8] MOTTA, V. T. BIOQUÍMICA. Rio de Janeiro: MEDBOOK, v. 2º Ed, 2007.
- [9] BETA ELEMENO. Memorial Sloan Kettering Cancer Center, 2015. Disponível em: <<https://www.mskcc.org/cancer-care/integrative-medicine/herbs/beta-elemene>>. Acesso em: Outubro 2015.
- [10] AZAMBUJA, W. *Cariofileno. Óleos Essenciais*, 2009. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/cariofileno/>>. Acesso em: Outubro 2016.
- [11] ECYCLE. Óleo de copaíba: faz bem para pele, cabelo e é anti-inflamatório, analgésico e antisséptico. *Ecycle sua pegada mais leve*, 2013. Disponível em: <<http://www.ecycle.com.br/component/content/article/67-dia-a-dia/2905-oleo-vegetal-copaiba-que-e-para-serve-onde-comprar-puro-natural-uso-aplicacao-hidratacao-pele-cabelo-massagem-saude-beneficios-propriedades-terapeuticas-medicinais-cosmeticos-creme-quimi>>. Acesso em: Outubro 2016.