UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS, QUÍMICAS E FARMACÊUTICAS

RAFAEL FERREIRA FERNANDES

Desenvolvimento de metodologia para identificar cádmio, chumbo e mercúrio em chá de *Passiflora incarnata* via eletroforese capilar com detecção ultravioleta

DIADEMA
2021

RAFAEL FERREIRA FERNANDES

Desenvolvimento de metodologia para identificar cádmio, chumbo e mercúrio em chá de *Passiflora incarnata* via eletroforese capilar com detecção ultravioleta

Trabalho de conclusão da Unidade curricular Projetos Dirigidos em química, sendo requisito parcial para obtenção do grau Bacharel em Química, na Universidade Federal de São Paulo Campus Diadema

Orientadora: Profª Dra. Aline Klassen
Co-orientador: Prof Dr. Leandro Augusto Calixto

DIADEMA
2021

Dados Internacionais da Catalogação na Publicação (CIP)

Fernandes, Rafael Ferreira
Desenvolvimento de metodologia para identificar cádmio, chumbo e mercúrio em chá de Passiflora incarnata via eletroforese capilar com detecção ultravioleta / Rafael Ferreira Fernandes. – – Diadema, 2021.
38 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química) - Universidade Federal de São Paulo - Campus Diadema, 2021.

Orientadora: Aline Klassen
Coorientador: Leandro Augusto Calixto

1. Plantas medicinais. 2. Passiflora incarnata. 3. impurezas elementares. 4. eletroforese capilar. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Campus Diadema da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Agradecimentos

Primeiramente agradecer a Deus por tudo que já passei, tanto aos momentos bons quanto os momentos que foram precisos fortalecer mais minha fé, pela saúde e por conseguir ingressar em uma universidade federal.

À minha mãe Flavia dos Santos Ferreira por ser meu maior exemplo de vida, ter me proporcionado tudo que estava e o que não estava em seu alcance para meu crescimento, por toda instrução de ser um bom exemplo de ser humano dotado de valores e por aconselhar em momentos de necessidade. Ao meu pai Eduardo Castor Fernandes por ter me dado a vida. A meus avós maternos, Nilsa Conceição dos Santos Ferreira e José Nagem Elias Ferreira, por serem grandes exemplos em minha vida e terem contribuído muito para meu crescimento. Aos meus primos Eduardo e Renata pelo apoio.

À minha Orientadora Profª Dra. Aline Klassen, que me aconselhou muito durante minha graduação e teve uma boa contribuição para este momento, me ensinando que perseverança é provida de vitórias. Ao meu Co-orientador Prof Dr. Leandro Augusto Calixto, que desde o início apresentou-se como um amigo e sempre disposto junto com a Profª Dra. Débora Cristina de Oliveira inteirando nossa equipe de pesquisa. O trabalho sempre é mais próximo da perfeição com equipes unidas e pessoas de bom coração e sou muito grato a minha equipe de pesquisa. E aos professores Dr. Celso Molina, Dra. Eliana Valle e Dr. Heron Domiguez que contribuíram com a pesquisa de maneira indireta.

Sou grato a todos meus amigos da graduação em especial os do meu Laboratório, Rafaela, Natacha, Beatriz e Stefanie, que me auxiliaram em alguns momentos e os que me auxiliaram no TCC Ana Carvalho, Laryssa, Ana Carolina, Erika, Vinicius, Victor e Lígia.

A todo corpo docente e aos técnicos da Unifesp, em especial aos que cuidam do NIPE por proporcionar um ambiente seguro e bem cuidado para os equipamentos e a todos os funcionários da Unifesp, que graças a cada um deles tive a oportunidade de receber todo o conhecimento que recebi durante meu período de graduação.

E a minha religião e todos os amigos que cativei e continuo zelando pela a amizade há mais de 20 anos, que estão sempre comigo em momentos que eu preciso e são pessoas que posso contar sempre.

Resumo

O uso de plantas medicinais para tratar enfermidades é considerada uma prática antiga por diversas comunidades. Dentre as plantas do gênero *Passiflora*, a *Passiflora incarnata* é considerada como a espécie oficial para tratamentos fitoterápicos. Entretanto, há uma preocupação no que se refere à contaminação dessas plantas medicinais por impurezas elementares. Assim, o monitoramento dessas impurezas em plantas medicinais, faz-se necessário.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), agência reguladora que orienta o uso da farmacopeia brasileira, descreve os níveis aceitáveis dessas impurezas nesse tipo de amostra.

A técnica convencionalmente empregada para determinar elementos químicos é a espectrometria atômica (AS, do inglês, *atomic spectrometry*). Entretanto, a técnica de eletroforese capilar, devido sua versatilidade, pode ser uma alternativa para a determinação multielementar. Neste sentido, este trabalho objetivou desenvolver uma metodologia analítica por eletroforese capilar, para determinação de chumbo (Pb), cádmio (Cd) e mercúrio (Hg) em chá *Passiflora incarnata*.

A melhor condição de separação foi avaliada com a injeção no *outlet* e inversão de polos. Entretanto, em virtude do alargamento de pico apresentado pelo Hg, somente Cd e Pb foram considerados na otimização do método. Portanto, um planejamento fatorial foi aplicado, onde, foram avaliadas, a temperatura do capilar, tensão aplicada, e, a concentração de éter coroa e metanol. As melhores respostas do planejamento fatorial foram obtidas com: 11,4 kV de tensão aplicada; 20 ºC de temperatura do capilar; 23,3 mmol L^{-1} de éter coroa e 3,7% (v/v) de metanol, com um tempo de análise de 2 minutos. O método foi avaliado frente à algumas figuras de mérito, somente para Cd pois os limites exigidos para Pb não foram atingidos. Dentre elas tem-se: o limite de detecção (LD) (0,20 µg g^{-1}), limite de quantificação (LQ) (0,06 µg g^{-1}), faixa linear (0,2 – 1 µg g^{-1}), repetibilidade (coeficiente de variação (CV) das intra-corridas para o tempo (0 - 1,49%), intra-corridas para área (3,09 - 12,41%), inter-corridas para o tempo (1,77 -

2,37%) e, inter-corridas para área (16,76 - 37,43%), e Recuperação (53,79% para 1 µg g^{-1} e 20,36% para 0,5 µg g^{-1}).
Palavras-chave: Plantas medicinais, *Passiflora incarnata*, impurezas elementares, eletroforese capilar.

Abstract

The use of medicinal plants to treat illnesses is considered an old practice by several communitites. Among the plants of the genus Passiflora, Passiflora Incarnata is considered as the official species for herbal treatments. However, there is a concern regarding the contamination of theses medicinal plants by elemental impurities. Thus, the monitoring of theses impurities in medicinal plants is necessary.

The Brazilian Health Regulatory Agency (Anvisa), regulatory agency that guides the use of the Brazilian Pharmacopeia, describes the acceptable levels of these impurities in this type of sample.

The technique conventionally used to determine chemical elements is atomic spectrometry (AS). However, capillary electrophoresis technique, due to the versatility, can be an alternative for multielementar determination.

Therefore, this work aimed to develop an analytical methodology by capillary electrophoresis, for determination of Lead (Pb), Cadmium (Cd) and Mercury (Hg) in *Passiflora incarnata* tea.

The best separation condition was evaluated with the injection of the outlet injection and pole invertion. However, due to the peak widening presented by Hg, only Cd and Pb were considered. Therefore, a factorial design was apllied, where, the capillary temperature, applied tension, and the concentration of crown ether and methanol, were evaluated.

The best responses of factorial design were obtained with: applied voltage 11.4 kV; capillary temperature 20 ºC; crown ether 23,3 mmol L^{-1} and methanol 3,7% (v/v) with analysis time of 2 minutes.

The method was evaluated against some figures of merit, only for Cd because the limits required for Pb have not been reached. Among them are: the limit of detection (LOD) (0.20 µg g^{-1}), limit of quantification (LOQ) (0,06 µg g^{-1}), linear range (0.2 – 1 µg g^{-1}), repeatability (coefficient of variation (CV) of intra-day for time (0 - 1.49%), intra-day for area (3.09 - 12.41%), inter-day for time (1.77 - 2.37%), inter-day for area (16.76 - 37.43%) and, recovery ((53.79% para 1 µg g^{-1} e 20.36% para 0.5 µg g^{-1}).

Key words: Medicinal plants, *Passiflora incarnata*, elemental impurities, capillary electrophoresis.

Sumário

Resumo i
Abstract iii
1 - Introdução e justificativa 1
1.1 – Plantas medicinais e sua regulamentação no Brasil 1
1.2 – *Passiflora incarnata* 2
1.3 – Metais Pesados e agência reguladora 3
1.4 – Técnicas para a determinação de Metais Pesados 5
1.4.1 – Técnicas mais utilizadas 5
1.4.2 – Eletroforese capilar 6
2 - Objetivos 10
2.1 - Objetivos gerais 10
2.2 - Objetivos específicos 10
3 - Procedimento Experimental 11
3.1 - Preparo de amostras 11
3.1.1 - Chá 11
3.1.2 - Eletrólito 11
3.1.3 - Padrões 11
3.2 - Instrumentação 11
3.2.1 Condicionamento do capilar 12
3.3 - Procedimento para otimização do método analítico 12
3.4 - Critério usado para a escolha da condição otimizada 12
4 - Resultados e Discussão 13
4.1 – Otimização do Método 13
4.2 – Figuras de mérito 20
5 - Conclusões 24
Referências Bibliográficas 25

LITA DE ABREVIATURAS

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AAS - Espectrometria de absorção atômica (AAS, do inglês, *atomic absorption spectrometry*)

LD - Limite de Detecção

LQ - Limite de Quantificação

CV - Coeficiente de variação (CV, do inglês, Coefficient of Variation)

MF - Medicamentos Fitoterápicos

PTF - Produtos Tradicionais Fitoterápicos

MAO - Mono amina oxidase

GABA - Ácido gama-aminobútrico

Cd - Cádmio

Pb - Chumbo

Hg - Mercúrio

As - Arsênio

Ag - Prata

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Sistema nervoso periférico

QI - Quociente de inteligência

ICP-MS - Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*)

ICP-OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)

HR-CS AAS - Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS, do inglês, *High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*)

FSCE - Eletroforese capilar em solução livre (FSCE, do inglês, *Free Solution Capillary Eletroforesis*)

HIBA - Ácido α-hidroxi-isobutírico (HIBA, do inglês, α-*Hydroxyisobutyric acid*)

MES - Ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico

His - Histidina

NIPE - Núcleo de Instrumentação para Pesquisa e Ensino

MeOH - Metanol

CE-UV - Eletroforese capilar com detecção ultravioleta (CE-UV, do inglês, *Capillary Eletroforesis - Ultraviolet)*

D - Desejabilidade

LITA DE FIGURAS

Figura 1: Instrumentação para eletroforese capilar esquematizada. Adaptado de Tavares.[18] 7
Figura 2: Eletroferograma da corrida 2 nas condições estabelecidas na Tabela 1 para água Milli-Q® dopada com os metais Cd, Pb e Hg. 16
Figura 3: Eletroferograma da corrida 5 (Tabela 1) nas condições estabelecidas na Tabela 1 para o chá de Passiflora incarnata dopado com os metais Cd, Pb e Hg, onde (a) é o interferente "a" do chá (b) é o interferente "b" e (c) é o interferente (c). 16
Figura 4: Eletroferograma da corrida 6 (Tabela 1) com temperatura no ponto central (22,5 ºC) e concentração de metanol 10 % (V/V). 18
Figura 5: Eletroferograma da corrida 7 (Tabela 1) com temperatura de 15 ºC e concentração de metanol 0% (V/V), onde as setas indicam os picos dos metais comigrando com os interferentes. 19
Figura 6: Eletroferograma da condição otimizada do método com temperatura de 20 ºC, concentração de metanol 3,7% (V/V), concentração de éter coroa de 23,3 mmol L^{-1} e tensão de 11,4 kV. 20
Figura 7: Eletroferograma correspondente a aplicação do método em amostra de chá que segue as especificações da Anvisa 23
Figura 8: Eletroferograma correspondente a aplicação do método em chá obtido em feira na região metropolitana de São Paulo 23

LITA DE TABELAS

Tabela 1: Primeiro planejamento fatorial. Sendo as variáveis temperatura, concentração de éter coroa, tensão de corrida e concentração de metanol. 14
Tabela 2: Segundo planejamento fatorial. 19
Tabela 3: Limites de Cd, Pb e Hg estabelecidos pela Farmacopeia 20
Tabela 4: Curva de calibração do experimento para o Cd e para o Pb 21
Tabela 5: Precisão intra e inter - corridas expressa em Coeficiente de Variação (CV) para o Cd. 22
Tabela 6: Valores da recuperação do Cd. 22

1 - Introdução e justificativa

1.1 – Plantas medicinais e sua regulamentação no Brasil

A utilização de plantas com propriedades medicinais tem sido feita por humanos há muito tempo.[1] Um dos registros mais antigos um medicamento da cultura Greco-Romana, o Theriak, sendo um de seus constituintes o ópio que é um Produto Natural extraído da papoula.[2]

As Plantas medicinais são uma rica fonte de metabólitos secundários com propriedades bioativas.[1,2] Todas as plantas possuem um metabolismo primário, que é responsável pela produção de substâncias base para o crescimento e desenvolvimento da própria planta, tais como aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleotídeos entre outros. Entretanto existe um metabolismo secundário que é responsável pela produção de moléculas com complexa estrutura molecular, responsáveis pela coloração, sabor e odor, destacando-se terpenóides, alcaloides, cumarinas, flavonoides, entre outros.[2]

Os metabólitos secundários são responsáveis pelas propriedades medicinais das plantas. Eles são produzidos por plantas especificas de acordo com situações de estresse (falta ou excesso de água, minerais, luz solar, entre outras situações), sumarizando é o sistema de defesa da planta.[2,3]

Alguns fatores como, localização e acesso à informação, fazem com que algumas comunidades tenham mais ou menos acesso ao conhecimento. Os indivíduos que utilizam plantas medicinais em diversas formas, como chás, infusão, entre outros, acreditam que esta é uma prática natural e totalmente segura.[1]

Essas plantas, quando são devidamente processadas, seguindo as resoluções exigidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), para serem transformadas em medicamentos, são denominadas de medicamentos fitoterápicos. A principal diferença é que para esses, se têm um tratamento das propriedades da planta, distinto daqueles que utilizam técnicas caseiras de uso, geralmente na forma de chás e infusão.[4]

Na regulamentação dos medicamentos fitoterápicos existem diversas formas de produção e registro tanto para uso humano quanto para uso

veterinário e, também, há uma separação deles em duas classes, Medicamentos Fitoterápicos (MF) e Produtos Tradicionais Fitoterápicos (PTF),[4] onde a principal diferença entra ambos é que os MF comprovam sua segurança e eficácia através de dados clínicos, portanto, são regularizados e recebem a inspeção de órgãos fiscalizadores como a Anvisa. Por outro lado, os PTF comprovam sua segurança e eficácia por tradição de uso ou seguindo um registro implícito.[4] As empresas ligadas a produção industrial das plantas medicinais no Brasil devem ser autorizadas pela Anvisa e certificadas pelas Boas Práticas de Fabricação (BPF) para poder vender os seus medicamentos fitoterápicos.[4] Isso só foi possível após o Ministério da Saúde em 2006 aprovar a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, buscando uma garantia que a população brasileira faria uso das plantas medicinais e fitoterápicos de maneira segura.[5]

1.2 – *Passiflora incarnata*

Dentre as plantas medicinais, destacam-se as plantas do gênero *Passiflora*, pois, apresentam metabólitos secundários como fenóis, flavonoides glicosilados e compostos cianogênicos. As plantas desse gênero são compostas por mais de 500 espécies e têm sido usadas como plantas medicinais no México, América do Sul, Holanda e Itália principalmente visando tratamento no controle de ansiedade. A *Passiflora incarnata* (maracujá) é considerada como a espécie oficial para tratamentos fitoterápicos, pois é citada em diversas farmacopeias.[6] Poucos estudos em humanos com essa planta têm foco somente em controle de ansiedade,[6] os estudos indicam que as propriedades dessa planta agem na inibição da mono amina oxidase (MAO) assim como também ativa os receptores de ácido gama-aminobútrico (GABA), que está diretamente ligada a transtornos neuropsiquiátricos, sendo alguns deles ansiedade e depressão.[6,7] Entretanto existem diversos estudos diferentes como tratamento de abstinência de opiáceos, insônia, transtorno do déficit de atenção e hiperatividade e até mesmo o câncer.[6]

As propriedades medicinais da *Passiflora incarnata* relacionadas à melhora de ansiedade estão principalmente nas folhas e no suco da polpa do fruto, onde há passiflorina, um sedativo natural. O chá de suas folhas tem

efeito diurético depurativo, como também anti-inflamatório. O maracujá é fonte de carboidratos, vitaminas A, C e complexo B como também rico em minerais de cálcio, ferro e zinco.[7]

A presença de flavonoides C-glicosídeos e de alcaloides indólicos é contraditória na literatura, uma vez que para a produção de metabolitos secundários muita coisa tem que ser levada em consideração a respeito da coleta das amostras como, época da colheita, o solo que foi plantada, o estresse que a planta passou (excesso de sol, chuva, escassez de água), entre outros[2,7] mas, há registros da identificação desses componentes na *Passiflora* como também traços de esteroides.[7] Entretanto, essas plantas são passíveis de contaminação por metais pesados, vindos do ar, da irrigação, de um solo contaminado, da própria adubação, entre outras origens.[1]

1.3 – Metais Pesados e agência reguladora

Existe uma preocupação iminente com relação à contaminação dessas plantas com metais pesados. Nos grandes centros onde ocorre o plantio e a colheita, não se sabe a procedência do cultivo (solo, irrigação e adubo), transporte, armazenamento e higiene. Até mesmo como consequência tem-se possíveis fontes de contaminação.[8,9,10] Principalmente as plantas pois necessitam de água, sais minerais e outros nutrientes, logo estão sujeitas à contaminação como todos os seres vivos.[1,8] Portanto, em caso de contaminação ambiental por metais pesados, esses podem ficar acumulados nos tecidos das plantas.[8,9,10]

Os humanos estão sujeitos a contaminação por metais pesados ingerindo plantas ou chás tanto caseiros quanto de procedência industrial. Há relatos de humanos contaminados com metais pesados após fazerem tratamentos caseiros utilizando plantas medicinais chinesas e indianas.[9,10] A intoxicação pode ser aguda, crônica ou subcrônica, também pode ser neurotóxica, carcinogênica, mutagênica ou teratogênica, dependerá da quantidade ingerida e do tipo de impureza metalica.[8] Os sintomas podem se apresentar como distúrbios bioquímicos no corpo, problemas gastrointestinais, tremor, convulsões, paralisia, dentre outras enfermidades.[8]

Metais pesados são elementos metálicos de alta densidade atômica ($4g/cm^3$) que possuem característica venenosa em baixa concentração para

os seres vivos, em concentrações elevadas podem ser letais. Eles incluem alguns metais como cromo (Cr), chumbo (Pb), cádmio (Cd), mercúrio (Hg), arsênio (As), entre outros. Eles podem ser carreados ao meio ambiente por vias naturais ou antropogênicas e podem estar em compostos orgânicos e inorgânicos.[8]

O cádmio é muito perigoso para os humanos, uma vez que, ele é considerado tóxico em quantidades extremamente baixas. Dependendo da exposição ele pode gerar danos ao sistema respiratório uma vez que haja a contaminação pela inalação de pó ou vapores contaminados, podendo causar, dores no peito, falência dos revestimentos dos tecidos pulmonares, enfisema, bronquiolites, alveolites e falta de ar.[8] Nos rins ele pode comprometer a função renal determinado pela proteinúria tubular. Também pode causar aumento da pressão arterial e disfunção do miocárdio, além de todos esses problemas, pode-se associar a contaminação com cádmio a problemas nos ossos como osteoporose, osteomalácia e até fratura instantânea.[8]

A contaminação por chumbo advém da alimentação, da água e inalação. Seus problemas à saúde em sua forma iônica causam problemas ao sistema gastrointestinal, disfunções no sistema nervoso central (SNC) e no sistema nervoso periférico (SNP). Ele também pode causar inibições na síntese de hemoglobinas, disfunções renais, dores nas juntas, problemas ao sistema reprodutor e cardiovascular e até sangue na urina.[7] Em crianças ele pode causar um baixo desenvolvimento da massa cinzenta causando um baixo quociente de inteligência (QI).[8]

O Hg é mais tóxico do que o Pb. A quantidade máxima aceitável de Hg, na água, é a menor entre os três elementos citados, não possui função conhecida na bioquímica e fisiologia humana.[8] Quando sua forma iônica tem contato com um humano ocorre uma absorção instantânea podendo causar distúrbios gastrointestinais e malformação congênita. Porém quando há intoxicação por suas possíveis formas orgânicas pode causar desde eretismo, acrodinia, gengivite e estomatite até malformação congênita, danos severos ao cérebro e SNC.[8]

Portanto, o monitoramento desses metais se faz necessário nesses tipos de amostras, pois já existe estudos comprovando que pode haver

metais pesados nas plantas e também que eles podem ser prejudiciais à saúde humana.[8,9,10]

A Anvisa demostra preocupação com a segurança no uso de medicamentos fitoterápicos. A partir de 2014 ela começou a exigir novos testes para o controle de qualidade destes, sendo um deles uma pesquisa de componentes residuais de agrotóxicos nas plantas medicinais. A mesma, estabeleceu que, 1º de janeiro de 2018 seria o prazo final para a apresentação da avaliação de contaminantes. Para as análises de identificação e quantificação de metais pesados, oriundos de diversas fontes, a Anvisa recomenda os métodos gerais (Ensaio Limite para Metais Pesados) da Farmacopeia Brasileira 6ª edição, o qual sugere dois métodos distintos para a identificação de metais pesados sendo um deles o ensaio limite por formação de partículas sólidas de sulfetos e o outro, determinação por espectrometria atômica.[11,12]

A formação de partículas sólidas de sulfetos é um método semi-quantitativo e só permite constatar se a amostra passa ou não no teste, que consiste na formação de partículas sólidas de sulfetos de metais pesados e posteriormente há uma comparação na intensidade da coloração das amostras e padrão em tubo Nessler. Já a técnica de espectrometria atômica permite quantificar os elementos contaminantes na amostra.[12]

1.4 – Técnicas para a determinação de Metais Pesados

1.4.1 – Técnicas mais utilizadas

Diferentes técnicas foram empregadas para tentar identificar metais pesados, porém nenhuma delas estava de acordo com os limites toxicológicos estabelecidos em guias internacionais. Nesse contexto a Farmacopeia dos Estados Unidos publicou técnicas para a identificação de metais (incluindo metais pesados) utilizando a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* e ICP-OES, do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*).[13] Essas técnicas apresentam sensibilidades adequadas e também a possibilidade de análise multielementar. Por outro lado, são técnicas de elevado custo.[13]

As técnicas de espectrometria de absorção atômica são amplamente empregadas para a determinação de metais pesados, pois apresentam facilidade de operação e outras vantagens como baixo custo operacional, no caso do atomizador por chama e baixo número de linhas espectrais, se comparada com as técnicas de emissão atômica, baixo consumo de amostra, no caso do atomizador forno de grafite. Como limitação, tem-se a análise monoelementar, custo moderadamente elevado, quando se trata de um atomizador forno de grafite ou, elevado consumo de amostra e elevados LD e LQ, no caso do atomizador por chama.[14,15] Além disso, a espectrometria de absorção atômica com fonte contínua e de alta resolução (HR-CS AAS, do inglês, *High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry*) tem ganhado destaque, principalmente pela análise multielementar. Entretanto, as limitações, acabam sendo as mesmas da AAS, pois os atomizadores são os mesmos.[16]

Por outro lado, a técnica de separação por eletroforese capilar apresenta-se como uma técnica alternativa para determinação de íons inorgânicos em diferentes amostras. [17,18,19,20]

1.4.2 – Eletroforese capilar

A eletroforese capilar tem por princípio, a separação dos íons contidos na amostra pela diferença nas suas mobilidades eletroforéticas.[17] Basicamente a separação ocorre pela migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, por meio de um campo elétrico aplicado a uma coluna capilar com uma solução de eletrólito (tampão) em seu interior.[20] A Figura 1 ilustra um esquema da técnica de eletroforese capilar, que é composto basicamente por um dispositivo para controle da temperatura no sistema, uma fonte de alta tensão e eletrodos para ocorrer a migração dos compostos, o capilar que é a coluna de separação da técnica, os reservatórios para solução (também conhecidos como *vials*) e um detector para registrar o sinal dos analitos de interesse da amostra os quais serão registrados na forma de um eletroferograma (sinal por tempo).[18]

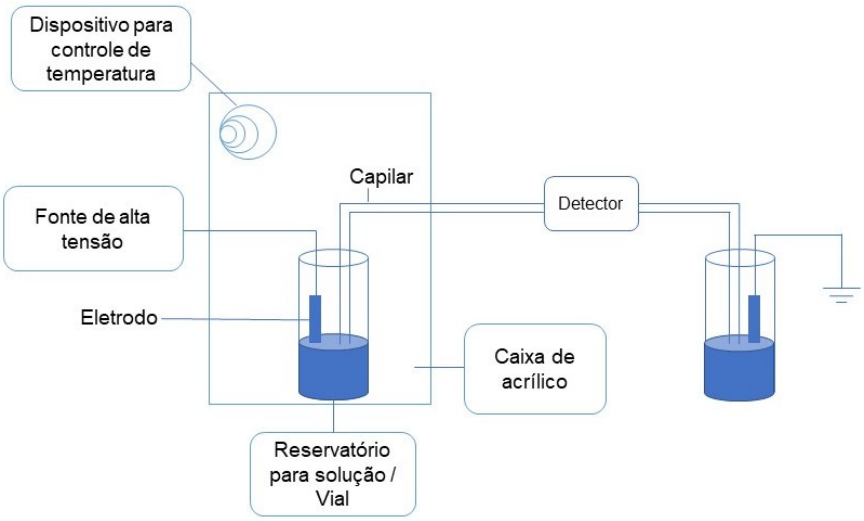

Figura 1: Instrumentação para eletroforese capilar esquematizada. Adaptado de Tavares.[18]

Existem diversos modos de operação do equipamento eletroforese capilar. Um dos mais usados pelos analistas é eletroforese capilar em solução livre (FSCE, do inglês, *Free Solution Capillary Eletroforesis*),[20] também conhecida como eletroforese capilar de Zona. Esse modo tem por princípio em ter o eletrólito circulando dentro do capilar de sílica fundida, então uma amostra é injetada na coluna capilar, na sequência será aplicado o potencial elétrico fazendo com que os solutos migrarem de um uma zona a outra do capilar, realizando a separação pelas diferentes mobilidades efetivas (resultante das mobilidades efetivas e eletrosmóticas).[20]

Uma característica que está presente na sílica fundida do capilar é, uma leve acidez proveniente dos grupos silanóis (Si-OH), pois, uma vez que uma solução aquosa passa pelo capilar alguns desses grupos podem ser ionizados, liberando H^+ na solução e dando origem a uma parede do capilar carregada com carga negativa ($Si\text{-}O^-$). No momento em que um campo elétrico (E) é aplicado de maneira tangencial a superfície do capilar ocorre um movimento unilateral de íons no sentido do eletrodo de carga oposta provocados por forças elétricas, isto gera um fluxo dentro do capilar em direção ao cátodo, denominado fluxo eletrosmótico normal.[20]

Os principais fatores que afetam a separação na prática da eletroforese capilar são: temperatura, pH, força iônica, viscosidade e tensão amplicada.[17,18] Entretanto, para análise de cátions livres, é necessário o uso

de agentes complexantes pois os cátions interagem eletrostaticamente com a parede do capilar que tem carga negativa, causando alargamento de pico e comprometendo as análises.[21,22,23]

Dentre os agentes complexantes destaca-se o éter coroa, que já demostrou ser promissor e necessário na separação de alguns cátions, como por exemplo o K^+ e NH_4^+.[22] Um dos mais utilizados na separação de cátions é o 18-coroa-6, este possuí 18 átomos em sua estrutura "coroa", sendo 6 átomos de oxigênio que são os heteroátomos doadores de elétron para o cátion que deverá complexar no espaço livre no centro da macromolécula e os outros 12 átomos são grupos ($-CH_2-CH_2-$) que ligam os oxigênios.[23,24]

Com relação ao sistema de detecção, diversos critérios devem ser levados em consideração, tais como: sensibilidade, seletividade e ruído, dentre outros critérios, sendo que esses detectores podem ser classificados como universais ou específicos. O detector UV/ Vis é caracterizado como um detector específico, por medir uma propriedade específica do soluto. Portanto, apresentam maior sensibilidade e intervalos de resposta linear mais amplos. Em eletroforese capilar, é possível empregar esse tipo de detector tanto para determinar de forma direta o analito (quando este apresenta absortividade molar), quanto para determinar de forma indireta o analito, ou seja, quando o analito não apresenta absortividade molar, que é o caso dos íons inorgânicos.[20] Neste último caso, adiciona-se ao eletrólito de corrida, um composto com absortividade molar, denominado agente cromóforo. Assim, o detector responde a absorção do cromóforo. Utiliza-se o modo de detecção indireto para determinar cátions e ânions inorgânicos.[20]

Portanto, levando-se em consideração o princípio da técnica e que íons inorgânicos estão na forma iônica, a eletroforese capilar apresenta-se como uma técnica viável para a determinação de metais em diversas amostras, dentre elas o chá, por exemplo. A técnica apresenta como vantagens a possibilidade de uma análise multielementar com consumo reduzido de amostra e reagentes, alta eficiência de separação com elevada frequência analítica, baixo custo de operação, instrumentação simples e limites (LD e LQ) dentro do exigido pela farmacopéia.[12,17,18,19]

A literatura mostra diversos trabalhos com a aplicação da técnica para análise de metais em aerossol atmosférico[25], água de chuva[26], água do

mar[27], caldo de fermentação[28], células[29], chá[30], fertilizante[31], plasma humano[32], entre muitos outros.[23]

2 - Objetivos

2.1 - Objetivos gerais

Esse trabalho tem como objetivo otimizar uma metodologia para a determinação dos elementos: cádmio (Cd), chumbo (Pb) e mercúrio (Hg) em amostras de chá de maracujá (*Passiflora incarnata*), por meio da técnica de eletroforese capilar.

2.2 - Objetivos específicos

Esse trabalho tem como objetivo especifico:

- Otimização do método por meio de um planejamento fatorial;
- Avaliar a confiabilidade do método por meio de algumas figuras de mérito;
- Aplicar o método em amostra real.

3 - Procedimento Experimental

3.1 - Preparo de amostras

3.1.1 - Chá

As folhas de *Passiflora incarnata* foram adquiridas em uma farmácia na região metropolitana da cidade de São Paulo e o chá foi preparado conforme descrito no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira.[11] Um volume de 50 mL de água Milli-Q® (água ultrapura) foi aquecido até chegar a uma temperatura entre 40 e 50 ºC, adicionando-se aproximadamente 1 g de chá, e foi mantido por 10 minutos nessa temperatura. Após isso, esperou-se até o chá esfriar e na sequência foi filtrado com papel de filtro qualitativo, e posteriormente armazenado.

O chá comprado, seguia as especificações da Anvisa e não apresentou sinais de metais pesados no método, então, para o desenvolvimento do método foi necessário adicionar padrões de metais pesados (Cd, Pb e Hg) nas amostras.

3.1.2 - Eletrólito

Os eletrólitos testados neste trabalho foram: uma solução tampão ácido α-hidroxi-isobutírico (HIBA), fosfato, ácido lático, ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico (MES), histidina (His), ácido tartárico, ácido ftálico, agente cromóforo (imidazol, nitrato), agente complexante (Éter coroa, 18-coroa- 6) e metanol.

O eletrólito otimizado foi: HIBA 6 mmol L^{-1}, imidazol 5 mmol L^{-1}, éter coroa 23,3 mmol L^{-1} e metanol 3,7 % (v/v).

3.1.3 - Padrões

Os padrões analíticos usados de Pb, Cd e Hg são de procedência *SCP Science* (Estados Unidos).

3.2 - Instrumentação

Foi empregado um equipamento de eletroforese capilar da Beckman Coulter) com detector UV/vis, operado a um comprimento de onda de 214nm no modo indireto com fonte de alta tensão, sistema de refrigeração com

líquido refrigerante (Beckman Coulter) e injeção do foi do outlet para o inlet de 50 psi por 2 s, alocado no Núcleo de Instrumentação para Pesquisa e Ensino (NIPE). O capilar empregado foi de sílica fundida (Agilent Technologies), revestidos externamente com poliamida com dimensões de 52 cm (comprimento total) x 50 μm diâmetro interno).

3.2.1 Condicionamento do capilar

O capilar novo foi condicionado com NaOH (1 mol L^{-1}) por 30 minutos seguido de água ultra-pura por 30 min. O condicionamento entre corridas foi de 1 min de NaOH seguido de 1 min de água ultra-pura e 1 minuto do eletrólito de corrida.

3.3 - Procedimento para otimização do método analítico

Para a busca das melhores condições de separação dos três metais, um planejamento fatorial foi empregado por meio do uso do software Minitab 18®. As variáveis estudadas foram temperatura, tensão de corrida, concentração de agente cromóforo e concentração de metanol.[15] O comprimento de onda de detecção escolhido considerou o máximo sinal obtido e também em pesquisas da literatura.

3.4 - Critério usado para a escolha da condição otimizada

A otimização da separação entre os picos observados foi feita por meio da avaliação da resolução de pico, simetria e tempo de análise. Os dados obtidos para o cálculo das simetrias de pico e resoluções foram medidos a partir dos picos obtidos no eletroferograma. Os dados foram tratados pelo Minitab® realizando-se um planejamento fatorial por superfície de resposta para encontrar a melhor condição de separação. Para isso, foram usados como resposta a simetrias de pico e resolução de pico.

4 - Resultados e Discussão

4.1 – Otimização do Método

Toda a otimização foi feita na amostra de chá e inicialmente realizou-se testes de eletrólito com lactato, ácido lático e tartarato de acordo com os experimentos de SHI Y. & FRITZ J.S.[17], além disso o comprimento de onda de 214 nm, também foi escolhido baseado nos experimentos desses autores[15] e os experimentos realizados não foram reproduzidos como o esperado. Por meio de teste preliminares e com base na literatura, a composição do eletrólito de corrida foi composta por: 6 mmol L^{-1} de HIBA e 5 mmol/L de Imidazol.

Além do HIBA e do Imidazol, a literatura recomenda o uso de MeOH pois o mesmo afeta a viscosidade e a constante dielétrica do meio,[17] o que está diretamente ligado com a separação eletroforética. Além disso, o éter coroa, que é o responsável por complexar-se com o metal, também é recomendado para a determinação de metais por eletroforese capilar. Portanto, a melhor composição de eletrólito de corrida associada às melhores condições eletroforéticas, tais como temperatura e tensão aplicadas, foram otimizadas por meio de um planejamento fatorial através do software Minitab 18®. O primeiro planejamento fatorial está descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Primeiro planejamento fatorial. Sendo as variáveis temperatura, concentração de éter coroa, tensão de corrida e concentração de metanol.

Ordem de corrida	Ponto Central	Temperatura / °C	Éter Coroa / mmol L^{-1}	Tensão / kV	Metanol / %
1	1	15	50	30	20
2	1	15	20	30	0
3	1	30	50	10	0
4	1	15	20	30	20
5	1	30	20	30	0
6	0	22,5	35	20	10
7	1	15	50	10	0
8	1	15	20	10	0
9	1	15	50	30	0
10	1	30	50	30	20
11	1	30	50	10	20
12	1	15	50	10	20
13	1	30	20	10	20
14	1	15	20	10	20
15	1	30	20	10	0
16	1	30	20	30	20
17	0	22,5	35	20	10
18	0	22,5	35	20	10
19	1	30	50	30	0

Para a execução deste planejamento, um capilar de sílica de 52 cm de comprimento total e 40 cm de comprimento efetivo (até o detector) foi empregado com diâmetro interno de 50 μm e aplicação do potencial elétrico, no modo normal. Assim, a corrida eletroforética ocorreu no sentido do *inlet* para o *outlet.* Sendo assim, obteve-se dezenove eletroferogramas, respectivos a cada uma das ordens de corrida. Por meio destes eletroferogramas, observou-se que os picos correspondentes aos elementos estudados (Cd, Pb e Hg) estavam muito alargados. Isso se deve ao tempo de permanência dos analitos dentro do capilar que apresenta um tamanho elevado, bem como o fato dos metais, que são catiônicos, estarem aderidos à parede do capilar que está carregada negativamente, no pH do eletrólito de corrida (pH = 6), uma vez que o pKa dos sinlanóis presentes na parede do capilar é em torno de 3,6.

Para solucionar o problema apresentado, o sentido da eletroforese capilar foi invertido, ou seja, os polos foram trocados, o ânodo passou a estar no *outlet* e o cátodo no *inlet* e, as injeções das amostras e eletrólito de corrida, foram realizadas no *outlet,* logo, as análises foram realizadas do *outlet* para o *inlet*. Desta forma, os elementos passaram pelo detector de forma mais rápida pois precisaram percorrer apenas 12 cm até a janela de detecção e não mais 40 cm, como na configuração original (*inlet* para *outlet)* e o Planejamento Fatorial apresentado na Tabela 1 foi repetido, ou seja, realizado nesta nova configuração do equipamento (análises realizadas no sentido do *outlet* para o *inlet*).

Esta configuração foi excelente para solucionar o problema de alargamento do Cd e Pb, porém, não para o Hg que continuou alargado. Portanto, foi realizado o mesmo planejamento fatorial (Tabela 1) com esta nova configuração de análise, do *outlet* para o *inlet.*

A Figura 2 mostra a mistura de padrões sem a presença da amostra e a Figura 3 mostra o chá de *Passiflora incarnata* dopado com os padrões de Cd, Pb e Hg. A adição dos padrões referetnes aos elementos avaliados neste trabalho, se fez necessária por dois motivos: primeiro, para avaliar os interferentes da matriz; segundo, pela inexistência desses elementos na amostra. Ambas as figuras se referem aos eletroferogramas do novo método de injeção (injeção no *outlet*).

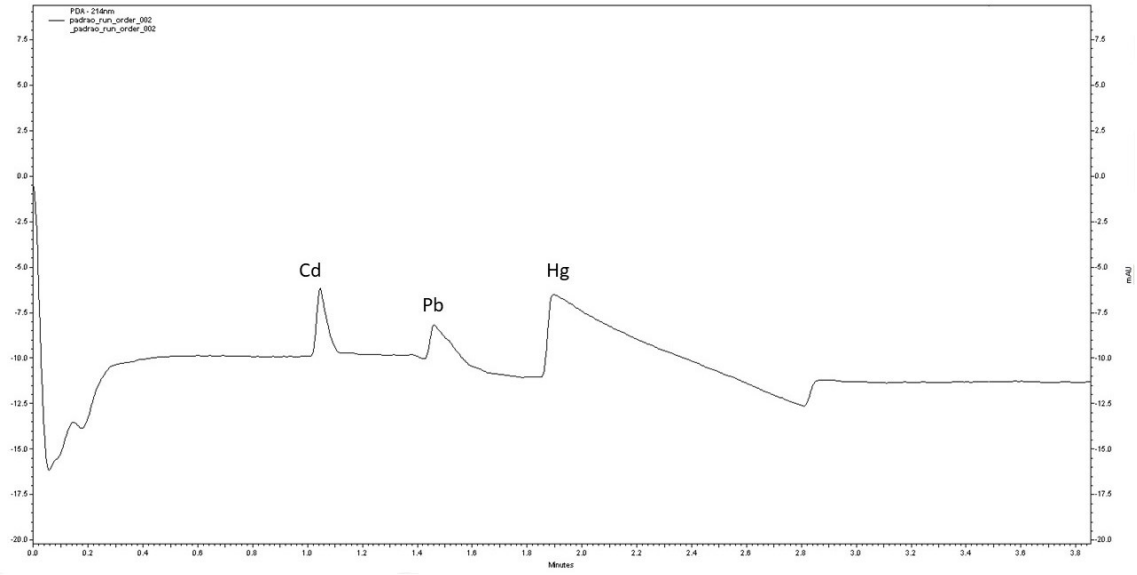

Figura 2: Eletroferograma da corrida 2 nas condições estabelecidas na Tabela 1 para água Milli-Q® dopada com os metais Cd, Pb e Hg.

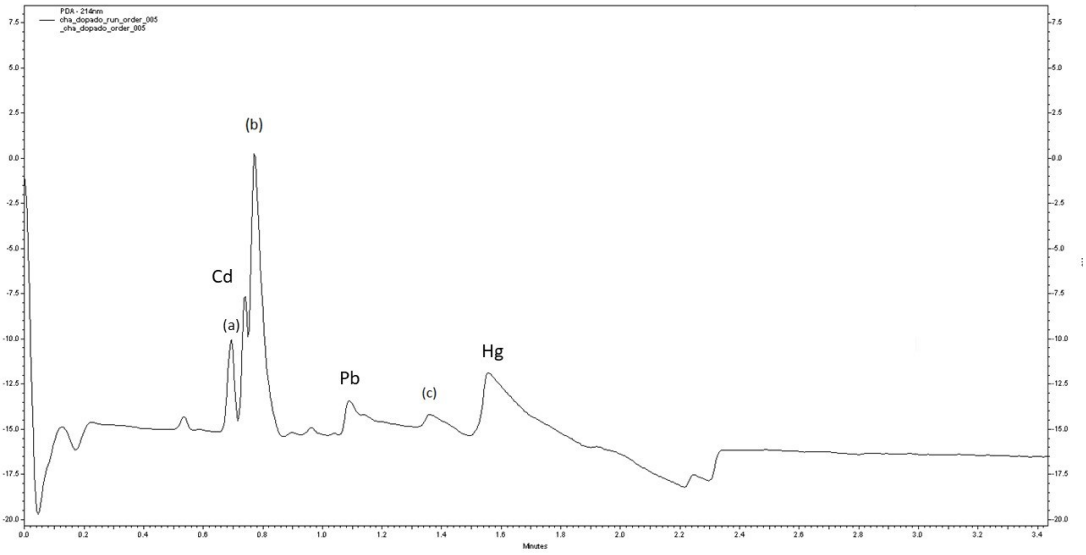

Figura 3: Eletroferograma da corrida 5 (Tabela 1) nas condições estabelecidas na Tabela 1 para o chá de Passiflora incarnata dopado com os metais Cd, Pb e Hg, onde (a) é o interferente "a" do chá (b) é o interferente "b" e (c) é o interferente (c).

A partir dos eletroferogramas foram calculadas as simetrias de pico e resoluções das condições. Através de comparações com pesquisas na literatura[17] e eletroferogramas de água Milli-Q® dopada com os elementos, foi observado que a ordem de migração dos mesmos foi, respectivamente, Cd, Pb e Hg, como mostra a Figura 3.

As respostas consideradas no primeiro planejamento fatorial foram resolução de picos adjacentes e simetrias de pico. A melhor resposta, ou seja, as melhores condições eletroforéticas e de composição de eletrólito, para obter a melhor separação eletroforética, foi obtida por meio da análise de desejabilidade (região do ótimo), quanto maior a desejabilidade melhor a separação, neste caso. As desejabilidades, já foram avaliadas descartando as respostas (resoluções) das corridas relacionadas ao Hg pois, como já foi dito anteriormente, o Hg apresentou uma largura de pico considerável, mesmo nesta melhor configuração experimental.

A resolução de pico nos mostra o quanto a separação entre os picos está boa, sendo que o ideal é que seja acima de 1,6. As resoluções (R) foram calculadas manualmente a partir da Equação 1. Onde t_R é o tempo de retenção dos picos adjacentes a serem analisados, onde t_{R1} se refere ao elemento menos retido e, t_{R2} o elemento mais retido. $W_{0,5h}$ é a largura da base do pico a meia altura, respectivos aos elementos mais e menos retidos.

$$R = 1{,}18 \,.\left(\frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{0,5h1} + W_{0,5h2}}\right)$$

Equação 1: Equação da resolução de pico.

A desejabilidade é uma função que nos diz a solução ótima através de sua maximização, ela pode ser definida como a média geométrica das funções de desejabiliades individuais de cada resposta di (Yi), em que n é o número de respostas, essa função é descrita de acordo com a Equação 2.[33]

$$D = \left(\prod_{i=1}^{n} di\ (Yi)\right)^{\frac{1}{n}}$$

Equação 2: Função da desejabilidade geral.[33]

O resultado obtido do cálculo da região com maior desejabilidade (D = 0,97) correspondia a uma região com simetria de pico igual a 0,5 e uma resolução de 1,6. As variáveis foram temperatura de 28,4 ºC, concentração de éter coroa de 27,9 mmol L^{-1}, tensão de 22 kV e concentração de metanol 17,3 % (v/v). Entretanto essa condição estava duvidosa por causa do valor

das simetrias de pico então, realizou-se um novo estudo de desejabilidades, descartando as simetrias de pico e utilizando somente as resoluções como resposta do planejamento.

Assim, uma nova região de maior desejabilidade (D = 0,9957) que correspondia a uma região com resolução de 1,8 apresentava temperatura de 16,8 ºC, concentração de éter coroa de 23,3 mmol L^{-1}, tensão de 11,4 kV e concentração de MeOH de 10,4% (v/v). Estudando as respostas do planejamento fatorial, observou-se que a temperatura e o MeOH foram as variáveis que mais interagiam entre si influenciando diretamente na separação de Cd e Pb com os interferentes, como mostrado nas Figuras 4 e 5, logo foi visto que precisava de uma concentração mínima de MeOH, ou seja, entre 0 e 10%.

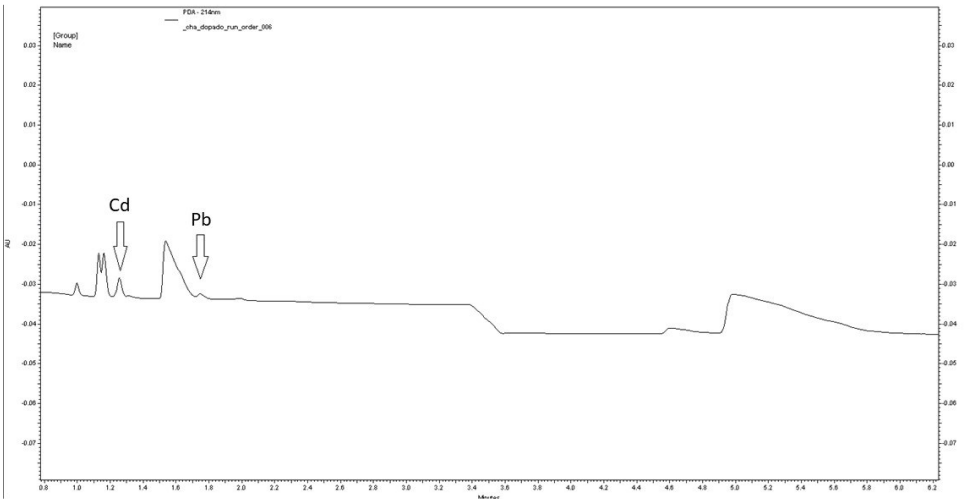

Figura 4: Eletroferograma da corrida 6 (Tabela 1) com temperatura no ponto central (22,5 ºC) e concentração de metanol 10 % (V/V).

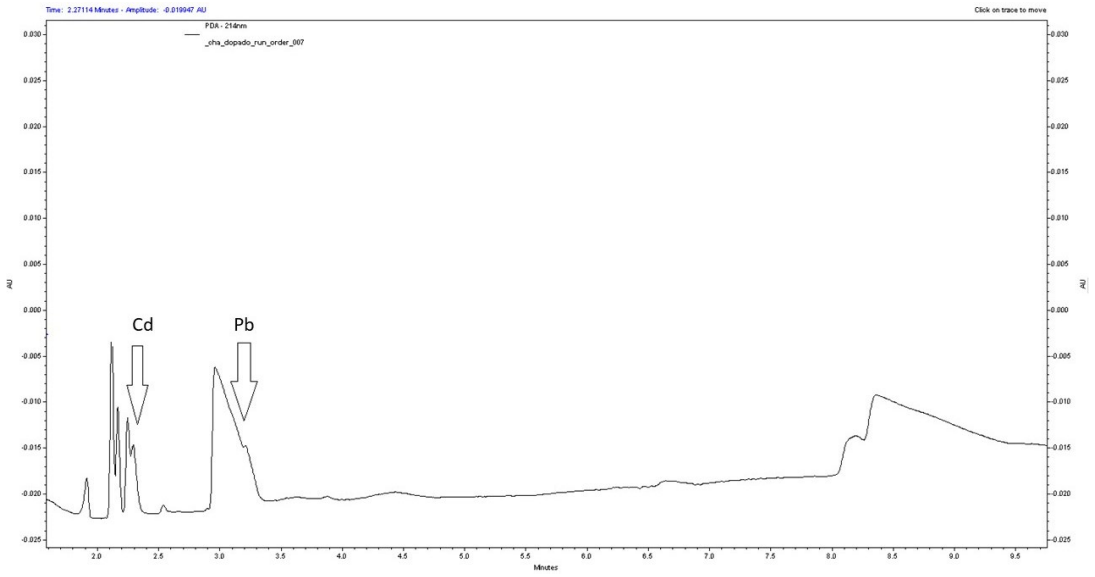

Figura 5: Eletroferograma da corrida 7 (Tabela 1) com temperatura de 15 ºC e concentração de metanol 0% (V/V), onde as setas indicam os picos dos metais comigrando com os interferentes.

Comprovou-se que é necessária uma quantidade mínima de metanol, como foi indicado na Figura 4, onde os picos dos metais foram separados dos interferentes. Por outro lado, a Figura 5 mostra uma co-migração e não houve separação efetiva entre os analitos e os interferentes. Portanto, visando encontrar uma região do ótimo para a temperatura e para o MeOH foi realizado um segundo planejamento fatorial, vide Tabela 2, fixando-se as demais variáveis.

Tabela 2: Segundo planejamento fatorial.

Ordem de corrida	Ponto Central	Metanol / %	Temperatura / ºC
1	1	1	15
2	1	5	20
3	1	5	15
4	1	1	20
5	1	1	15
6	1	5	15
7	1	1	20
8	0	3	17,5
9	1	5	20

O segundo planejamento fatorial apresentou a maior desejabilidade (D = 0,72), com MeOH 3,7% (v/v) e T a 20 ºC. Estas condições, associadas às demais previamente otimizadas, como concentração de éter coroa de 23,3 mmol L^{-1} e tensão de 11,4 kV, foram consideradas as condições otimizadas do método e um eletroferograma da aplicação deste método está indicado na Figura 6. A partir desta otimização deu-se continuidade com a validação do método.

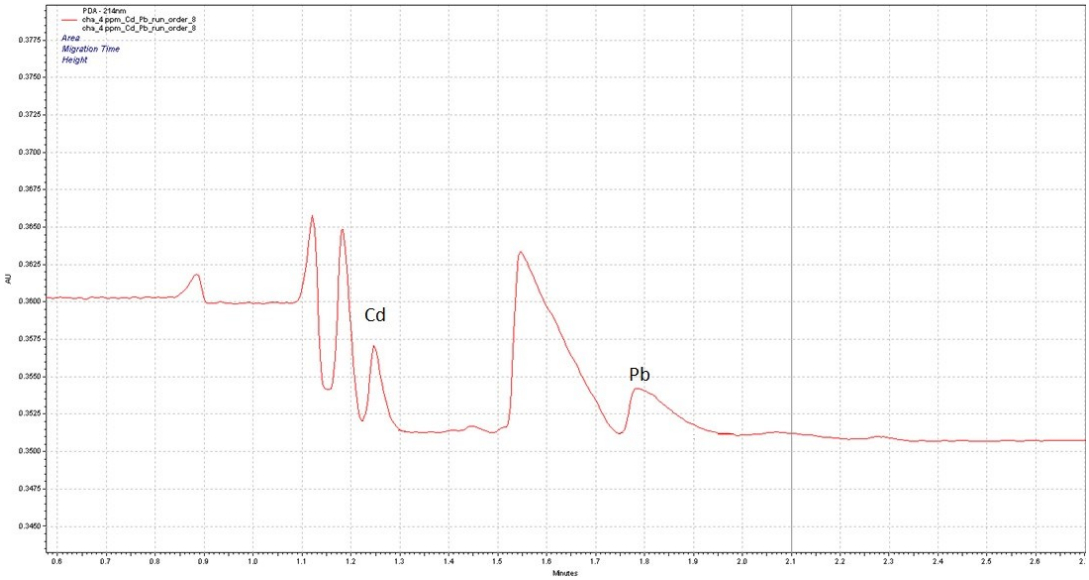

Figura 6: Eletroferograma da condição otimizada do método com temperatura de 20 ºC, concentração de metanol 3,7% (V/V), concentração de éter coroa de 23,3 mmol L^{-1} e tensão de 11,4 kV.

4.2 – Figuras de mérito

Uma vez tendo um método de separação eletroforético otimizado, o mesmo foi então validado. Também foi comparado se a técnica apresenta as imposições, do Ensaio Limite de Metais pesados da Farmacopeia Brasileira 6ª edição, preestabelecidas pela Anvisa. Os Limites estabelecidos pela Farmacopeia para o Cd, Pb e Hg, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Limites de Cd, Pb e Hg estabelecidos pela Farmacopeia

Elemento	Uso Oral Limite máximo / µg g^{-1}	Uso Parenteral Limite máximo / µg g^{-1}
Cd	0,5	0,05
Pb	1	0,1
Hg	1,5	0,15

Primeiramente com a confecção da curva de calibração para o Cd e para o Pb como demostrado na Tabela 4. A faixa linear considerada foi de 0,2 – 0,4 μg g^{-1} para o Cd e 1,5 – 4 μg g^{-1} para o Pb.

Tabela 4: Curva de calibração do experimento para o Cd e para o Pb

Parâmetros	Valores para os metais	
	Cd	Pb
Faixa linear	0,2 - 0,4 μg g^{-1}	1,5 - 4 μg g^{-1}
Coeficiente angular	3209,4	736,34
Coeficiente linear	-469,6	-714,2
Coeficiente de Determinação (R^2)	0,997	0,991

O limite de quantificação do método para Cd e Pb foi obtido de maneira visual, ou seja, soluções de concentrações decrescentes foram analisadas até não se observar nenhum sinal analítico nos eletroferogramas, sendo 0,2 μg g^{-1} para o Cd e 1,5 μg g^{-1} para o Pb. O limite de detecção foi calculado com base no LQ, sendo 0,06 μg g^{-1} para o Cd e 0,45 μg g^{-1} para o Pb. As curvas de calibração apresentaram coeficiente de determinação de 0,997 para o Cd e 0,991 para o Pb, como mostra na Tabela 4.

Os parâmetros de Repetibilidade e Precisão intermediária foram realizados somente para o Cd, uma vez que, em virtude do Pb não apresentar os Limites exigidos pela Anvisa, foram obtidas as figuras de mérito somente para o Cd.

A repetibilidade é o parâmetro que se refere a concordância entre os resultados sem variações de métodos, medições, analista, instrumentos, condições, logo todas as análises devem ser feitas da mesma forma, sem nenhuma alteração e o parâmetro mostra o quanto os resultados podem variar sem nenhuma alteração na metodologia.[34] Também conhecida como precisão intra-corrida[34]. A Repetibilidade do método estudado teve resultados distintos para as áreas dos picos e para os tempos de corrida e foi realizada a análise para concentrações distintas de 0,3 μg g^{-1}, 0,5 μg g^{-1} e 1,0 μg g^{-1} vide Tabela 5.

A Anvisa determina que se a reprodutibilidade for comprovada não é necessário a realização da precisão intermediária (também conhecida por precisão inter-corridas)[34,35]. Uma vez que, não pôde ser realizada a reprodutibilidade, por questão do conjunto de fatores: tempo, a pandemia causada pelo Covid19, foi determinada a precisão intermediária do experimento para três níveis de concentração: 0,3 μg g^{-1}, 0,5 μg g^{-1} e 1,0 μg g^{-1}, vide Tabela 5.

Tabela 5: Precisão intra e inter - corridas expressa em Coeficiente de Variação (CV) para o Cd

	CV / (%) (intra – corrida)		CV / (%) (inter - corrida)	
Concentração / μg g^{-1}	Área	Tempo	Área	Tempo
0.3	12,41	1,49	37,43	2,37
0.5	15,02	0	15,09	2,32
1	3,09	1,43E-14	16,76	1,77

A recuperação é o parâmetro que mostra o quanto um método analítico é eficiente frente a exatidão do método. Ela avalia o efeito da matriz sobre a quantificação dos analitos de interesse.[34,35] Os valores obtidos da recuperação estão expressos a seguir, vide Tabela 6:

Tabela 6: Valores da recuperação do Cd.

Concentração / μg g^{-1}	Recuperação / (%)
1	53,79
0,5	20,36

Quando a recuperação é de aproximadamente, 100%, significa que o efeito da matriz é baixo. Os valores obtidos da recuperação foram baixos, menores que o desejável, ou seja, muito menores que 100%. Portanto, isso mostra que está tendo uma interferência forte da matriz na determinação de Cd. Este resultado sugere a necessidade de um melhor preparo de amostra para se obter um valor melhor da recuperação, uma vez que, no método proposto a amostra foi analisada apenas com o preparo do chá.

Após a avalição das figuras de mérito, uma amostra de chá que segue todas as especificações da Anvisa, bem como uma amostra de chá obtida

de uma feira da cidade de São Paulo foram analisadas no método desenvolvido, vide Figuras 7 e 8, respectivamente. Por meio das Figuras 7 e 8 é possível verificar a ausência dos elementos estudados neste trabalho, tanto no chá da ANVISA, quanto no chá obtido em uma feira local de São Paulo.

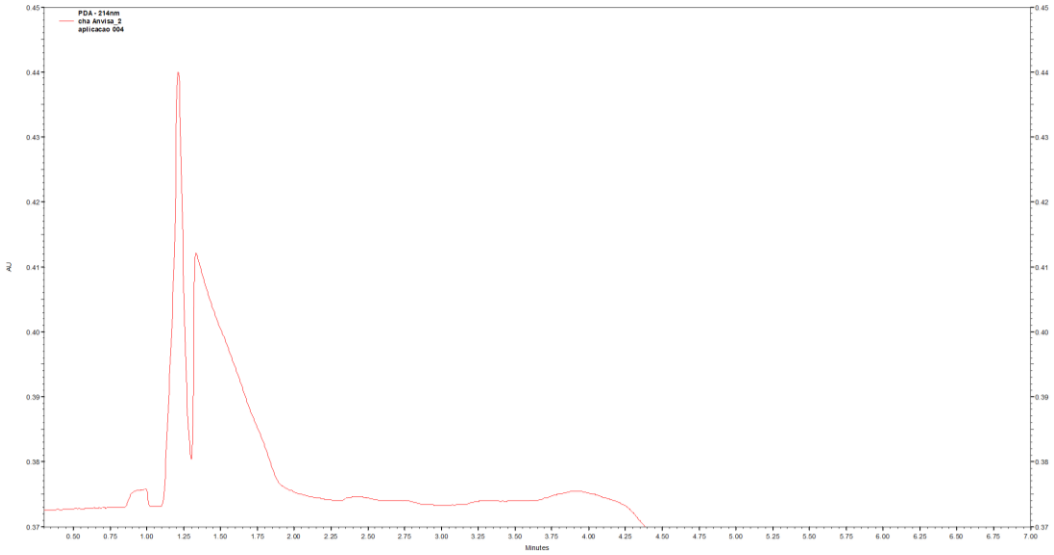

Figura 7: Eletroferograma correspondente a aplicação do método em amostra de chá que segue as especificações da Anvisa

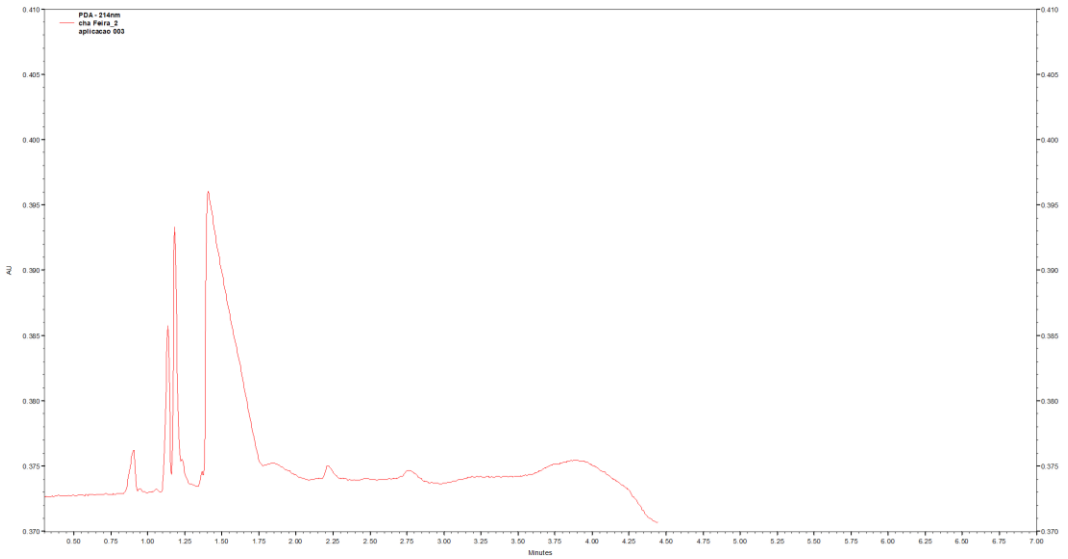

Figura 8: Eletroferograma correspondente a aplicação do método em chá obtido em feira na região metropolitana de São Paulo

5 - Conclusões

Os experimentos realizados nesse trabalho permitiram encontrar as condições ideais para a quantificação de Cd em chá de *Passiflora incarnata* através do estudo das variáveis aplicando-se um planejamento fatorial.

O método desenvolvido apresenta-se apto para análise quantitativa de Cd e para análise qualitativa de Hg e Pb. A partir dos dados obtidos foi possível validar a metodologia via eletroforese capilar para o Cd, porém, o experimento mostra que mais estudos devem ser realizados para encontrar a condição ideal para a quantificação de Cd, Pb e Hg simultaneamente.

A utilização da técnica CE-UV mostrou-se aplicável e promissora, com capacidade de identificação multielementar, também demonstrou ser seletiva e de menor preço quando comparado aos métodos utilizados atualmente.

Tem-se como etapa futura realizar um melhor preparo de amostras para reduzir o efeito de matriz na aplicação do método.

Este trabalho passou pela análise do software Plagius - Detector de Plágio Professional versão 2.6.9, licenciado. A análise foi feita da forma mais profunda que o software permite, com 9 palavras idênticas sendo consideradas suspeitas, sendo que tudo, que foi apontado pelo programa foi avaliado e se necessário modificado

Referências Bibliográficas

1. FREIRE, M.F.I. Metais Pesados e Plantas Medicinais. Revista Científica Eletrônica de Agronomia, ano IV, n. 8, p. 1-14, 2005.

2. CROATEU, R.; KUTCHAM, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secudary Metabolites). Biochemistry & Molecular Biology of Plants, p. 1250 -1318, 2000.

3. BENNETT, R.N.; WALLSGROVE, RM. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New Phytol, 127, p. 617 – 633, 1994.

4. CARVALHO, A.C.B.; RAMALHO, L.S.; MARQUES, R.F.O; PERFEITO, J.P.S. Regulation of herbal medicines in Brazil. Journal of Ethnopharmacology, v. 158, p. 503-506, 2014.

5. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial n. 2960, de 9 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. D.O.U. Poder Executivo, Brasília, 10 de dezembro de 2008.

6. APPEL, K.; ROSE, T.; et al. Modulation of the g-Aminobutyric Acid (GABA) System by Passiflora incarnata L. Phytoterapy Research, res. 25, p. 838 - 843, 2011.

7. LOPES, M.W.; TIYO, R.; ARANTES, V.P. Utilização de *Passiflora Incarnata* no tratamento da ansiedade. Revista Uningá REVIEW, v.9, n.2, p. 81-86, 2017.

8. DURUIBE, J. O.; OGWUEGBU, M. O. C.; EGWURUGWU, J. N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. International Journal of Physical Sciences, v. 2 (5), p. 112-118, 2007.

9. ERNST, E. Toxic heavy metals and undeclared drugs in Asian herbal medicines. Trends in Pharmacological Sciences, v. 23, n. 3, p. 136-139, 2002.

10. ERNST, E. Heavy Metals in traditional Indian remedies. European Journal of Clinical Pharmacology, v. 57, p. 891-896, 2002.

11. ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa n° 04, de 18 de junho de 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Brasília: D.O.U. Poder Executivo, Brasília, 18 de junho de 2014a.

12. ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, volume 1, 6ª Ed. Brasília, 2019.
13. THOMAS, R. Determining Elemental Impurities in Pharmaceutical Materials: How to Choose the Right Technique. Spectroscopy, v. 30, n. 3, p. 30-42, 2015.
14. COSTA, A.C.S.; ALMEIDA, V.C.; et al. Determinação de cobre, alumínio e ferro em solos derivados do basalto através de extrações sequenciais. Química Nova, v. 25, No. 4, 548-552, 2002.
15. AMORIM, F.A.C.; et al. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares. Química Nova, v.31, n.7, p. 1784-1790, 2008.
16. BORGES, D.L.G.; CURTIUS, A.J.; et al. Fundamentos da Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com fonte Contínua. Revista Analytica, n.18, p. 58- 67, 2005.
17. SHI, Y.; FRITZ, J.S. Separation of metal íons by capillary electrophoresis with a complexing electrolyte. Journal of Chromatography, 640, p.473-479, 1993.
18. TAVARES, M.F.M. eletroforese capilar: Conceitos Básicos. Química Nova, v.19(2), p. 173-181, 1996.
19. CARVALHO, L.M., SPENGLER, C.; et al. Determinação simultânea de cátions empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato em equipamento construído em laboratório. Química Nova, v.32(8), p.2203 – 2208, 2009.
20. SPUDEIT, D.A.; DOLZANM, M.D.; MICKE, G.A. Conceitos básicos em eletroforese capilar. Scientia Chromatographica, v.4 (4), p.287-397, 2012.
21. TAVARES, M.F.M. Mecanismo de Separação em eletroforese capilar. Química Nova, v.20, n.5, p. 593-511, 1997.
22. BECK, W.; ENGELHARDT, H. Separation of non UV-absorbing cations by capillary electrophoresis. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 346, p.618-621, 1993.
23. JAGER, A.V.; TAVARES, M.F.M. Determinação Simultânea de Cátions por eletroforese capilar: Fundamentos e aplicações. Química Nova, v. 24, n. 3, p. 363-373, 2001.

24. CARVALHO, F.A. Éteres Coroa: Do reconhecimento às aplicações. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa. Porto, p.48, 2011.

25. DABEK-ZLOTORZYNSKA, E.; DLOUHY, J. F. Application of capillary electrophoresis in atmospheric aerosol analysis: determination of cations. Journal of Chromatography A. v. *706*, p. 527-534, 1995.

26. BÄCHMANN, K.; BADEN, J.; HAUMANN, I.; Indirect fluorimetric detection of alkali and alkaline earth metal ions in capillary zone electrophoresis with cerium (III) as carrier electrolyte. Journal of Chromatography A, v. *626*, p. 259, 1992.

27. WANG, T. L.; LEE, H. K.; LI, S. F. Y. Determination of Sodium, Potassium, Magnesium, and Calcium in Seawater by Capillary Electrophoresis with Indirect Photometric Detection. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. *21*, p. 2485- 2496, 1998.

28. STATHAKIS, C.; CASSIDY, R. M. Capillary Electrophoretic Separation of Metal Ions in the Presence of Polyethylene Glycols. Analyst, v. 121, p. 839-843 ,1996.

29. BAZZANELLA, A.; LOCHMANN, H.; TOMOS, A. D.; BÄCHMANN, K. Determination of inorganic cations and anions in single plant cells by capillary zone electrophoresis. Journal of Chromatography A, v. *809*, p. 231-239, 1998.

30. YANG, Q.; HARTMANN, C.; SMEYEERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. L. Method development and validation for the determination of mineral elements in food and botanical materials by capillary electrophoresis. Journal of Chromatography A, v. 717, p. 415- 425, 1995.

31. AL-SHAVI, A. W.; DAHL, R. Determination of thorium and uranium in nitrophosphate fertilizer solution by ion chromatography. Journal of Chromatography A, v. 706, p. 175- 181,1995.

32. PAZ, E.; RABANAL, B.; NEGRO, A. Determination of Cations in Water and Biological Fluids by Capillary Zone Electrophoresis. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, v. 21, p. 2589- 2605 ,1998.

33. AMDOUN, R.; KHELIFI, L.; et al. The Desirability Optimization Methodology; a Tool to Predict Two Antagonist Responses in Biotechnological Systems: Case of Biomass Growth and Hyoscyamine

Content in Elicited Datura starmonium Hairy Roots. Iranian J. Biotech, v. 16 (1), p. 11- 19, 2018.

34. RIBANI M.; BOTOLLI C. B. G.; et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, v.27, n.5, p. 771 – 780, 2004.

35. ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.