

ANALISE DA COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DOS FITOTERÁPICOS ESPINHEIRA SANTA E BERINJELA PELO MÉTODO DE ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS.

Luan M. Pereira^{1,2}, Mitiko Saiki²

¹ Instituto de Química da Universidade de São Paulo
Av. Professor Lineu Prestes 748
05508-000 São Paulo, SP
luan.pereira@usp.br

² Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN/SP)
Av. Professor Lineu Prestes 2242
05508-000 São Paulo, SP
mitiko@ipen.br

RESUMO

O uso de fitoterápicos tem se tornado bastante popular no Brasil devido a sua vasta flora e a crença de que tudo que é natural não apresenta efeitos danosos a saúde humana. Entretanto estes produtos podem conter elementos tóxicos ou os essenciais em excesso prejudiciais ao organismo humano. O objetivo deste trabalho foi analisar fitoterápicos Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*) e Berinjela (*Solanum melongena*) pelo método de análise por ativação com nêutrons (NAA). As amostras de fitoterápicos foram adquiridas em drogarias na forma de cápsulas, e os seus conteúdos foram removidos das cápsulas para as análises. O procedimento de NAA consistiu em irradiar as alíquotas dos fitoterápicos e os padrões sintéticos de elementos com nêutrons do reator nuclear IEA-R1 seguida de espectrometria de raios gama. Os radioisótopos formados foram identificados pelas meias vidas e energias dos raios gama e as concentrações dos elementos foram calculadas pelo método comparativo. Para controle de qualidade analítica, foram analisados os materiais de referência certificados e cujos resultados apresentaram, em geral, uma boa exatidão e precisão. Nos fitoterápicos, os elementos K e Ca foram encontrados em concentrações mais elevadas, da ordem de mg g^{-1} , Br, Fe, Rb e Zn da ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ e os elementos Co, Cr, Cs, La e Sc da ordem de ng g^{-1} . Resultados obtidos neste trabalho demonstraram a viabilidade de aplicar o procedimento de NAA na determinação da composição elementar de fitoterápicos.

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos tem sido crescente o uso de medicamentos a base de plantas medicinais no Brasil. Segundo dados do governo, entre 2013 e 2015, houve um aumento de 161% na procura por fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) [1]. De acordo com a Legislação Sanitária do Brasil (RDC nº 26/2014), o fitoterápico é definido como qualquer medicamento de eficácia comprovada produzido exclusivamente, de matérias-primas vegetais [2].

O uso de plantas medicinais ou fitoterápicos para a cura de doenças é antigo e é conhecido mundialmente, e o Brasil tem sido um centro das atenções para o desenvolvimento e uso destes produtos por possuir a maior flora do mundo, com 46.096 espécies [3].

Há um contínuo aumento do uso destes medicamentos a base de plantas medicinais devido a possibilidade de serem adquiridos sem receita médica. Além disso, os fitoterápicos são geralmente medicamentos de baixo custo quando comparados aos medicamentos sintéticos. O comércio mundial de fitoterápicos movimenta um montante de recursos de cerca de US\$ 21,7 bilhões por ano [4]. No Brasil, não há esse tipo de dado oficial atualizado, entretanto, tem se estimado que o valor envolvido neste mercado seja de R\$ 160 milhões por ano [4].

Consequentemente torna-se de grande interesse o estudo sobre a composição elementar, eficácia, efeitos colaterais e a toxicidade das plantas medicinais ou fitoterápicos. Isto é, apesar da planta medicinal de ser um produto natural, seu uso não está livre de efeitos indesejáveis devido a presença de elementos tóxicos ou essenciais em excesso.

A crença popular sobre o uso de plantas medicinais é que o tratamento de doenças utilizando fitoterápicos pode não ocasionar de efeitos colaterais. Porém elas podem conter elementos tóxicos dependendo do solo em que foi cultivada [5] ou até ocorrer adulteração proposital do produto durante o processo de preparo [6].

Relativamente às determinações de elementos em plantas medicinais ou fitoterápicos, verifica-se que há inúmeras publicações sobre o assunto que utilizam diversas técnicas analíticas. Dentre os trabalhos mais recentes, destaca-se o trabalho de Başgel e Erdemoğlu [7] que determinaram diversos elementos nas ervas e nas infusões de plantas medicinais consumidas na Turquia aplicando os métodos de espectrometria de absorção com forno de grafite (FAAS) e espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP-AES). Seus resultados mostraram que as quantidades de elementos as infusões são baixas e não excedem os valores recomendados de ingestão diária dos elementos. Fei e colaboradores [8], aplicando o método de análise por ativação com nêutrons determinaram elementos traços em plantas medicinais e verificaram a possibilidade de correlacionar a ação farmacológica das ervas com o conteúdo dos elementos nelas presentes. Azis e colaboradores [9] fizeram uma revisão sobre o conteúdo de elementos em plantas medicinais paquistanesas verificaram que elas podem conter quantidades elevadas de elementos tóxicos como o Pb e Cd e sua ingestão o que pode desencadear acúmulo destes elementos tóxicos no organismo humano.

Face ao exposto, o objetivo deste trabalho foi analisar duas amostras de fitoterápicos, das plantas Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*) e Berinjela (*Solanum melongena*) aplicando o método de análise por ativação neutrônica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

2.1.1. Materiais de referência certificados

Os Materiais de Referência Certificados (MRCs) Mixed Polish Herbs (INCT-MPH-2) e Tea Leaves (INCT-TL-1), ambos procedentes do Institute of Nuclear Chemistry and Technology (INCT), Polônia, foram analisados para avaliar a qualidade dos resultados com relação a precisão e exatidão.

2.1.2. Fitoterápicos

Neste trabalho, foram analisados os fitoterápicos, adquiridos em farmácias da cidade de São Paulo, a base de *Solanum melongena* (Berinjela) e a base de *Maytenus ilicifolia* (Espinheira Santa), ambos apresentados na forma de cápsulas.

A Berinjela é o fruto da planta *Solanum melongena*, utilizado como suplemento para tratamento de diabetes, apresenta a ação de eliminar as toxinas do organismo, ação diurética, ocasiona a redução dos níveis de colesterol no sangue bem como faz parte de dietas de emagrecimento. Estudos realizados in vitro têm indicado que grupos fenólicos da Berinjela são inibidores de enzimas causadoras de diabetes e hipertensão [10].

Já a Espinheira Santa (*Maytenus ilicifolia*) é uma árvore de cerca de três metros de altura e é indicada para o tratamento da dispepsia (sensação de desconforto digestivo) e como coadjuvante no tratamento de gastrite e úlcera gastroduodenal. O nome vem do formato das folhas que indicam ter vários espinhos, e por ser considerada um “santo remédio” na linguagem popular.

2.2. Métodos

2.2.1. Determinação de umidade das amostras

Foram realizadas determinações de umidade dos materiais para o cálculo das concentrações dos elementos na fase seca. Para isso, cerca de 0,300 g de cada um dos materiais foram pesados em pesa-filtros e submetidos a secagem em estufa a uma temperatura de 85 °C por um período de cerca de 24 horas ou até obter massa constante. Tendo a massa do material antes e após a secagem, foi calculada a porcentagem de umidade.

2.2.2. Determinação da massa dos conteúdos dos fitoterápicos nas cápsulas

Esta determinação foi realizada para verificar se não há diferença entre os conteúdos das cápsulas do mesmo fitoterápico. Para isso, o conteúdo de dez cápsulas de fitoterápico foram pesadas individualmente usando uma balança analítica marca Shimadzu, modelo AUW-D com precisão de 0,00001 g.

2.2.3. Preparação dos padrões sintéticos de elementos

Foram utilizadas soluções estoque padrão de elementos adquiridos da Spex Certiprep USA com concentrações de elementos certificados para o preparo de padrões sintéticos de elementos. A partir destas soluções foram preparadas soluções mais diluídas multielementares ou simples

Os padrões sintéticos dos elementos foram preparados pipetando alíquotas de 50 µL de cada soluções diluídas em tiras de papel (1,5 cm x 3,5 cm) de filtro Whatman N°40, utilizando pipetador da marca Eppendorf Research® plus com calibração previamente verificada. As tiras de papel receberam as soluções padrão foram secas em um dessecador. A seguir, estas tiras foram colocadas em envelopes de polietileno e selados com o auxílio de uma seladora elétrica para plásticos e folha de celofane. Os envelopes de polietileno foram confeccionados usando folha de polietileno previamente desmineralizada usando solução de ácido nítrico P.A. diluída em água purificada seguida de secagem a temperatura ambiente. As informações sobre as soluções padrão, seus códigos, concentrações dos elementos utilizados e suas massas para irradiação estão na Tabela 1.

Tabela 1: Códigos dos padrões sintéticos, concentrações e massas dos elementos.

Código do Padrão	Elemento	Concentração na solução padrão ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Massa no papel de filtro
S6	As	29,999	1499,95 ng
	Cu	1999,92	99,996 μg
	Se	160,202	8010,08 ng
	Cr	40,198	2009,92 ng
	Mo	60,177	3008,88 ng
	Sb	12,035	601,75 ng
L6	K	10013,59	500,6795 μg
	La	11,995	599,74 ng
	Cs	12,019	600,94 ng
	Sc	1,5993	79,965 ng
	Co	2,996	149,80 ng
	Cd	200,072	10003,6 ng
Br6	Br	99,92	4,996 μg
F6	Ca	10012,4	500,62 μg
	Rb	200,008	10,0004 μg
	Fe	7226,209	361,3105 μg
	Zn	722,33	36,117 μg

2.2.4. Procedimento da análise por ativação com nêutrons.

Utilizando um balança da marca Shimadzu modelo AUW-D, cerca de 0,180 g de cada uma das amostras e dos materiais de referência foram pesados em envelopes de polietileno. Estas amostras e os padrões sintéticos de elementos foram embrulhados individualmente em folha de alumínio e depois, o conjunto de padrões e amostras com uma nova folha de alumínio. Este conjunto de padrões e amostras foi colocado em dispositivo de alumínio chamado “coelho”, o qual foi enviado para irradiação por 16 horas no reator nuclear IEA-R1, sob um fluxo de nêutrons térmicos de $4,3 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Após cerca de três dias de decaimento, a amostra foi aberta sob a supervisão do pessoal da proteção radiológica e as amostras e os padrões foram montado em suporte de aço inoxidável. As contagens foram realizadas usando um detector de Ge hiperpuro para espectrometria gama modelo GC3020 da Canberra ligado a um analisador digital de espectro DSA 1000. Foram realizadas três séries de contagens para diferentes tempos de decaimento, de 3, 10 e 15 dias, para a determinação de um número maior de elementos bem como evitar o problema de interferência espectral. Os tempos de contagem variaram de 5400 a 6000 segundos para os padrões e de 20000 a 50000 segundos para as amostras. Os espectros gama foram obtidos e analisados utilizando o programa Genie 2000 versão 3.1. A identificação dos radioisótopos foi feita pela meia-vida e a energia dos raios

gama. Os dados das energias e dos tempos de meia-vida dos elementos determinados neste trabalho estão na Tabela 2. As concentrações (C_a) foram calculadas com o método comparativo, utilizando a Equação 1. [11]

$$C_a = \frac{m_p \cdot A_a \cdot e^{\frac{t_{da}-t}{t_{1/2}}}}{M_a \cdot A_p} \quad (1)$$

Em que: m_p é a massa do elemento no padrão, A_a é a taxa de contagem do radioisótopo da amostra, t_{da} e t_{dp} são os tempo de decaimento da amostra e do padrão, respectivamente, M_a é a massa da amostra, A_p é taxa de contagem do radioisótopo no padrão e $t_{1/2}$ é a meia vida do radioisótopo.

Tabela 2: Características dos radionuclídeos utilizados no trabalho

Elemento	Radioisótopo	Tempo de Meia-Vida	Energia de Raios Gama (keV)
K	^{42}K	40,27 h	1524,58
La	^{140}La	12,36 h	1596,21
Cs	^{134}Cs	2,06 a	795,85
Sc	^{49}Sc	83,81 d	889,28
Co	^{60}Co	5,27 a	1173,24
Cd	^{115}Cd	53,47 h	527,91
As	^{76}As	26,32 h	559,10
Cu	^{64}Cu	12,7 h	1345,77
Se	^{75}Se	119,77 d	264,66
Cr	^{51}Cr	27,7 d	320,8
Mo	^{99}Mo	65,95 h	739,58
Sb	^{122}Sb	2,70 d	564,24
	^{124}Sb	60,2 d	1690,98
Br	^{82}Br	35,3 h	776,53
Ca	^{47}Ca	4,54 d	159,00 / 1296,00
Rb	^{86}Rb	16,66 d	1076,60
Fe	^{59}Fe	44,5 d	1099,25
Zn	^{65}Zn	243,9 d	1115,55

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas porcentagens de perdas umidade de 5,00 % e 3,47 %, para os materiais de referência certificados Mixed Polish Herbs e Tea Leaves, respectivamente. As perdas de umidade foram de 5,34 % e 6,89 % para as amostras de fitoterápicos Berinjela e Espinheira Santa, respectivamente.

Aos resultados das determinações das massas dos conteúdos dos fitoterápicos, foram calculadas as suas médias e desvios padrão relativo. Para o fitoterápico Espinheira Santa foi obtida uma massa média e desvio padrão de $(0,4371 \pm 0,0070)$ g com desvio padrão relativo de 1,61 %, indicando homogeneidade das massas dos seus conteúdos das cápsulas. Para o fitoterápico Berinjela, foi obtida uma massa média e desvio padrão de $(0,245 \pm 0,014)$ g com desvio padrão relativo de 5,71 %, indicando que a quantidade deste fitoterápico nas cápsulas é homogênea, porém, menor que da Espinheira Santa.

As médias das concentrações de elementos obtidos na análise dos materiais de referência certificados Mixed Polish Herbs e Tea Leaves são apresentadas, nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Nestas Tabelas também são apresentados os valores dos certificados para comparar com os resultados obtidos nas análises dos MRCs.

Tabela 3: Concentrações de elementos obtidos no material de referência certificado MPH-2 Mixed Polish Herbs

Elementos	M $\pm$ DP (n) ^a	DPR ^b , %	ER ^c , %	Valores do Certificado
As (ng/g)	184,6 $\pm$ 12,3 (3)	6,6	3,5	191 $\pm$ 23
Br (μ g/g)	7,47 $\pm$ 0,63 (4)	8,4	3,2	7,71 $\pm$ 0,61
Ca (%)	1,1 $\pm$ 0,1 (3)	11,3	2,0	1,08 $\pm$ 0,07
Co (ng/g)	215,1 $\pm$ 11,5 (4)	5,4	2,4	210 $\pm$ 25
Cr (ng/g)	1924,5 $\pm$ 88,8 (4)	4,6	12,2	1690 $\pm$ 130
Cs (ng/g)	78,0 $\pm$ 5,0 (4)	6,4	2,6	76,0 $\pm$ 7,0
Fe (μ g/g)	507,6 $\pm$ 12,2 (4)	2,4	-	(460) ^d
K (%)	2,02 $\pm$ 0,06 (4)	2,8	5,5	1,91 $\pm$ 0,12
La (ng/g)	562,8 $\pm$ 22,1 (4)	3,9	1,5	571 $\pm$ 46
Rb (μ g/g)	10,65 $\pm$ 0,24 (4)	2,3	0,4	10,7 $\pm$ 0,7
Sb (ng/g)	69,5 $\pm$ 13,5 (4)	19,4	5,7	65,5 $\pm$ 9,1
Sc (ng/g)	126,7 $\pm$ 2,2 (4)	1,7	2,9	123 $\pm$ 9
Zn (μ g/g)	33,8 $\pm$ 2,6 (4)	7,8	1,0	33,5 $\pm$ 2,1

a. Média e desvio padrão e número de determinações; b. Desvio padrão relativo; c. Erro relativo; d. Valor informativo.

Tabela 4: Concentrações de elementos obtidos no material de referência certificado TL-1 Tea Leaves

Elementos	M ± DP (n) ^a	DPR ^b , %	ER ^c , %	Valores do Certificado
Br (µg/g)	13,1 ± 0,7 (5)	5,4	6,1	12,3 ± 1,0
Ca (%)	0,56 ± 0,07 (4)	13,1	3,4	0,582 ± 0,052
Co (ng/g)	403,92 ± 26,59 (4)	6,6	4,2	387 ± 42
Cr (ng/g)	1925,78 ± 84,96 (4)	4,4	0,8	1910 ± 220
Cs (ng/g)	3802,05 ± 254,89 (4)	6,7	5,0	3610 ± 370
Cu (µg/g)	23,05 ± 3,23 (4)	14,0	11,1	20,4 ± 1,5
Fe (µg/g)	492,28 ± 26,58 (4)	5,4	-	(432) ^d
K (%)	1,8 ± 0,1 (5)	3,9	3,7	1,70 ± 0,12
La (ng/g)	956,0 ± 37,1 (5)	3,9	4,6	1000 ± 70
Rb (µg/g)	79,92 ± 2,37 (4)	3,0	2,0	81,5 ± 6,5
Sc (ng/g)	257,4 ± 15,6 (5)	6,1	3,3	266 ± 24
Se (ng/g)	78,53 ± 15,78 (3)	20,1	-	(76)
Zn (µg/g)	36,4 ± 1,8 (5)	5,1	4,7	34,7 ± 2,7

a. Média e Desvio Padrão e número de determinações; b. Desvio Padrão Relativo; c. Erro Relativo; d. Valor informativo.

Verifica-se nas Tabelas 3 e 4 que, em geral, os resultados obtidos nos materiais de referência certificados apresentam uma boa exatidão com porcentagens de erro relativo inferiores a 12,2%. A precisão dos resultados avaliada com a análise em replicata de quatro determinações mostrou que a maioria dos elementos apresentam desvios padrão relativos variando de 1,7% a 14,1%. As exceções foram para elementos como Sb e Se nos MRCs Miced Polish Herbs e Tea Leaves, respectivamente. A não reprodutibilidade nos resultados obtidos para Sb e Se se deve às suas baixas concentrações nestes materiais.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados das análises dos fitoterápicos Espinheira Santa e Berinjela com seus desvios padrão e desvios padrão relativos.

Uma análise preliminar dos resultados da Tabela 5 indica que, nas condições experimentais, são possíveis a quantificação de elementos dos elementos As, Br, Ca, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, K, La, Rb, Sb e Sc. Os elementos que apresentam teores mais altos foram Ca e K. Os elementos Br, Fe, Rb e Zn estão presentes em concentrações baixas, na ordem de µg/g e os mais baixos teores na ordem de ng/g foram obtidos para As, Co, Cr, Cs, La. Os elementos tóxicos como As e Sb nos fitoterápicos foram detectados, porém em teores muito baixos. O Se não foi detectado nos fitoterápicos nas condições experimentais nas análises.

Tabela 5: Concentrações dos elementos fitoterápicos Berinjela e Espinheira Santa.

Elementos	Espinheira Santa	Berinjela
	M $\pm$ DP (DPR) [n] ^a	M $\pm$ DP (DPR) [n]
As (ng/g)	Não detectado.	18,3 $\pm$ 0,3 (1,6) [2]
Br (μ g/g)	19,5 $\pm$ 1,7 (8,7) [3]	7,7 $\pm$ 0,01 (0,1) [2]
Ca (%)	0,1 $\pm$ 0,01 (4,7) [2]	0,1 $\pm$ 0,01 (9,3) [2]
Co (ng/g)	47,1 $\pm$ 5,3 (11,3) [3]	88,6 $\pm$ 0,8 (0,9) [2]
Cr (ng/g)	173,2 $\pm$ 2,1 (1,2) [3]	ND ^b
Cs (ng/g)	19,5 $\pm$ 2,6 (13,2) [3]	36,4 $\pm$ 0,6 (1,7) [2]
Fe (μ g/g)	10,5 $\pm$ 0,7 (6,7) [3]	87,1 $\pm$ 0,4 (0,5) [2]
K (%)	0,4 $\pm$ 0,04 (9,7) [3]	2,0 $\pm$ 0,1 (3,5) [2]
La (ng/g)	27,9 $\pm$ 0,7 (2,6) [2]	ND
Rb (μ g/g)	6,9 $\pm$ 0,2 (2,6) [3]	17,3 $\pm$ 0,2 (1,2) [2]
Sb (ng/g)	5,6 $\pm$ 0,3 (4,4) [2]	ND
Sc (ng/g)	3,1 $\pm$ 0,3 (10,9) [3]	10,5 $\pm$ 0,8 (7,2) [2]
Zn (μ g/g)	7,2 $\pm$ 0,7 (9,0) [2]	13,6 $\pm$ 1,8 (13,2) [3]

a. Média e desvio padrão, desvio padrão relativo e número de detecções, b. Não determinado.

4. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que o procedimento de análise por ativação com nêutrons utilizado permitiu a determinação de diversos elementos em fitoterápicos. Os resultados obtidos nos materiais de referência demonstraram a viabilidade de obter resultados confiáveis nas análises, com uma boa exatidão e precisão..

Os resultados obtidos nos fitoterápicos indicam a necessidade de obter um número maior de determinações para avaliar a reprodutibilidade dos dados obtidos.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de

Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro. L.M. Pereira agradece ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica PIBIC.

REFERÊNCIAS

1. M.C.M Amorozo. "Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antonio do Leverger, MT, Brasil". *Acta Botânica Brasílica*. vol.16, n.2, pp. 189-203 (2002).
2. "Resolução - RDC No- 26, De 13 De Maio De 2014" <http://portal.crfsp.org.br/index.php/juridico-sp-42924454/legislacao/5496-resolucao-rdc-26-13-maio.html> (2014)
3. "Biodiversidade Brasileira". <http://www.sibbr.gov.br/areas/?area=biodiversidade> (2017).
4. "Fitoterápico atraí investimentos." <http://www.febrafarma.org.br/areas.php?area=pu&secao=38&modulo=materias>. (2007).
5. S.K. Srivastava, V. Rai, M. Srivastava, A.K.S. Rawat, S. Mehrotra. "Estimation of heavy metals in different Berberis species and its market samples." *Environmental monitoring and assessment*, v. **116** n.1-3, pp. 315-320. (2006)
6. E.E. Balbino; M.F. Dias. "Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos". *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. **20** n. 6, pp. 992-1000 (2010).
7. S. Başgel, S. B. Erdemoğlu. "Determination of mineral and trace elements in some medicinal herbs and their infusions consumed in Turkey." *Science of the Total Environment*, v. **359**, n.1 pp. 82-89 (2006)
8. T. Fei, L. Dehong, Z. Fengqun, L. Junhua, T. Hua, K. Xiangzhong. "Determination of trace elements in Chinese medicinal plants by instrumental neutron activation analysis." *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, v.**284** n.3, pp. 507-511 (2010).
9. M.A. Aziz, M. Adnan, S. Begum, A. Azizullah, R. Nazir, S. Iram. "A review on the elemental contents of Pakistani medicinal plants: Implications for folk medicines." *Journal of ethnopharmacology*, v. **188**, pp. 177-192 (2016).
10. Y-I. Kwon, E. Apostolidis, and K. Shetty. "In vitro studies of eggplant (*Solanum melongena*) phenolics as inhibitors of key enzymes relevant for type 2 diabetes and hypertension." *Bioresource Technology*. v.**99** n.8. pp. 2981-2988 (2008).
11. D. De Soete; R. Gilbels; J. Hoste. *Neutron Activation Analysis*, p. 140, New York, Wiley Interscience (1972).