IPEN

AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO INORGÂNICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Peperomia pellucida* NO CRESCIMENTO DE *Aspergillus flavus*

FÁBIO VITÓRIO SUSSA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientador:
Prof. Dr. Paulo Sergio Cardoso da Silva

SÃO PAULO

2011

Aos meus Mestres.

AGRADECIMENTO

À minha mãe, por ser meu alicerce durante meus primeiros passos rumo ao saber e pelo amor incondicional, ao meu pai a minha admiração e exemplo de homem forte e trabalhador. Meus irmãos Fernando e Thiago por todo amor. Aos meus sobrinhos, Larissa, Isabela, Gabriel, Vitor, Lukas, Mariana que são um grande presente na minha vida e a Sofia, minha sobrinha e afilhada, por sua presença doce e inspiradora. Às minhas cunhadas pelo carinho. À minha prima Daniella Garibaldi pela motivação inicial rumo à minha vida acadêmica. À toda família.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Sergio Cardoso da Silva, pelo voto de confiança, orientação, paciência em todos os momentos. Sinto me privilegiado pela oportunidade de poder trabalhar com você, por admirar seu profissionalismo e dedicação. Muito agradecido.

À Dra. Barbara Pacci Mazzilli que também possibilitou a realização deste trabalho, pois foi de quem recebi apoio desde a Iniciação Científica.

À Profa. Dra. Elsie Franklin Guimarães pela colaboração na coleta e identificação da planta estudada e pela agradável hospitalidade.

À Dra. Joana D'arc Felicio de Souza do Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico pela orientação e contribuição que possibilitou a concretização deste trabalho.

Aos meus colegas do LRA e aos novos colegas do LAN, cujos nomes, preferi não mencionar, pois são muitos e muito queridos. A cada um, dedico esse trabalho como forma de expressar minha gratidão por toda contribuição e amizade que recebi na forma de incentivos.

Aos colegas do Instituto Biológico de São Paulo por toda a ajuda, durante a realização dos experimentos e pela companhia.

Aos meus amigos de graduação, à Leila, por sua presença constante e palavras certas, ao Luiz Henrique Yamashita, Maria das Graças Dantas e Vanessa Pascarelli que sempre me incentivaram e estiveram comigo nesta jornada.

Ao Rodrigo Mar, parceiro de todas as horas.

Ao IPEN pela condução de programas de pós-graduação em nível de mestrado e doutorado, sem os quais não seria possível este trabalho de pesquisa.

Aos integrantes da Banca Examinadora, Dr. Marcelo José Pena Ferreira e Dra. Déborah Inês Teixeira Fávaro, pelos comentários e sugestões apresentadas com o objetivo de valorizar o trabalho.

À Capes pela bolsa concedida.

O conhecimento leva à União.
A ignorância leva à dispersão.
(Rámakrishna)

Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção.
(Paulo Freire)

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO INORGÂNICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Peperomia pellucida* **NO CRESCIMENTO DE** *Aspergillus flavus*

Fábio Vitório Sussa

RESUMO

Nas últimas décadas houve um grande avanço em pesquisas no desenvolvimento de medicamentos à base de plantas medicinais. Entretanto, constata-se que há pouca preocupação sobre as concentrações de elementos estáveis, bem como as concentrações de atividade de radionuclídeos naturais das séries do ^{238}U e ^{232}Th em plantas com esta finalidade no Brasil. A presença de minerais e radionuclídeos em plantas constitui um meio de migração destes elementos para o organismo humano, através da ingestão de chás ou medicamentos feitos com ervas medicinais. *Peperomia pellucida* é conhecida popularmente por erva de jabuti e por suas propriedades medicinais, como cicatrizante, analgésica, bactericida e fungicida. As amostras de *Peperomia pellucida* e de solo analisadas neste trabalho foram coletadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro e em suas proximidades. A concentração elementar de As, Ba, Br, Ce, Cl, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, Hf, K, La, Lu, Mg, Mn, Na, Nd, Rb, Sb, Sc, Sm, Ta, Tb, Th, U, Yb e Zn foi determinada nas folhas, partes aéreas, compreendendo folhas e caule, e raiz de *Peperomia pellucida*, nos extratos obtidos por maceração e infusão e no solo pela técnica da Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (AANI). O método analítico utilizado para determinar os elementos Cd, Hg e Pb foi a Espectrometria por Absorção Atômica e as atividades de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb foram determinadas pela contagem alfa e beta total após separação radioquímica. A qualidade dos resultados obtidos foi verificada pela análise dos materiais de referência certificados IAEA-336 “Lichen”, IAEA-Soil-7, IAEA-326 “Radionuclides in soil”, NIST 1515 “Apples Leaves” e NIST 1542 “Peach Leaves”. Os resultados obtidos nas análises apresentaram boa precisão e exatidão. O óleo essencial e os extratos etanólico e hexânico obtidos das partes aéreas de *P. pellucida* foram testados “in vitro”, em placas de Petri, para verificar a atividade antifúngica diante ao fungo *Aspergillus flavus.* A atividade antifúngica baseou-se na zona de inibição

e nos valores de CI_{50} frente ao patógeno. Também foi determinada a composição química do óleo essencial pela Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massa (GC-EM).

INORGANIC COMPOSITION DETERMINATION AND EVALUATION OF THE BIOLOGIC ACTIVITY OF *Peperomia pellucida* **IN THE** *Aspergillus flavus* **GROWTH**

Fábio Vitório Sussa

ABSTRACT

In recent decades, there has been a great advancement in research in developing drugs from plants. Nevertheless, little significant care exists in the literature about the stable concentration of elements, as well as the activity concentration of ^{238}U and ^{232}Th decay products in plants used for this purpose in Brazil. The presence of stable elements and radionuclides in plants constitutes the pathway for their migration to humans, via uptake of tea or remedies made with medicinal herbs. *Peperomia pellucida*, whose popular name is “erva de jabuti”, is a plant known by its medicinal usages, such as healing and analgesic properties plus antibacterial and antifungal activities against food fungi. In this study, the elemental composition of *Peperomia pellucida* and surrounding soil samples collected in the Botanical Garden in Rio de Janeiro was determined; the elemental concentration in the alcoholic extract and infusion processes of dry plants was also determined. The elemental concentration of As, Ba, Br, Ce, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, Hf, K, La, Lu, Na, Nd, Rb, Sb, Sc, Sm, Ta, Tb, Th, U, Yb and Zn was determined in the leaves, aerial parts, including leaves, stems and roots of *Peperomia pellucida*, in their extracts obtained by maceration and infusions and in the surrounding soil by the Instrumental Neutron Activation Analysis (INAA). The analytical methodology used to determine the elements Cd, Hg and Pb was the Atomic Absorption Spectrometry (AAS); the activities of ^{226}Ra, ^{228}Ra and ^{210}Pb were carried out by gross alpha and beta counting, after radiochemical separation. The quality of the obtained results was assured by the analyses of the certified reference materials IAEA-336 Lichen, IAEA-Soil-7, IAEA-326 Radionuclides in soil, NIST 1515 Apple Leaves and NIST 1542 Peach Leaves. The relative standard deviations and the relative errors obtained in these analyses indicated good precision and accuracy of the results. The essential oil, ethanolic and hexane

extracts of *Peperomia pellucida* were tested for antifungal activity against *Aspergillus flavus* in vitro on Petri plates. The antifungal activity was based on the inhibition zone and IC_{50} values against the pathogen on Petri plates assays. Also, the essential oil chemical composition was determined by GC-MS.

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO..... 21
1.1 Aspectos históricos e importância das plantas medicinais..... 21
1.2 Características das Piperaceae..... 26
1.2.1 A família Piperaceae..... 26
1.2.2 O gênero *Peperomia*..... 27
1.2.3 *Peperomia pellucida*..... 32
1.3 Considerações sobre o fungo *Aspergillus flavus*..... 36
1.3.1 Aspergilose e Aflatoxicose..... 37
1.4 Óleo volátil..... 38
1.5 Composição elementar nas plantas..... 39
1.6 Radioatividade natural..... 42
1.6.1 Considerações sobre o ^{226}Ra e ^{228}Ra..... 47
1.6.2 Considerações sobre ^{210}Pb..... 48
2 OBJETIVOS..... 49
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS..... 51
3.1 Descrição dos pontos de coleta..... 51
3.2 Coletas e preparação das amostras para a determinação multielementar..... 53
3.2.1 Extração dos elementos em meio alcoólico – maceração..... 56
3.2.2 Extração dos elementos em meio aquoso – infusão..... 60
3.3 Coleta e preparação das amostras para avaliação da atividade antifúngica..... 63
3.3.1 Preparo dos extratos hexânico e etanólico..... 64
3.3.2 Extração do óleo essencial de *Peperomia pellucida*..... 67
4. METODOLOGIAS ANALITICAS..... 69
4.1 Análise Por Ativação Neutrônica Instrumental (AANI)..... 69
4.1.1 Princípios do método..... 69
4.1.2 Preparação e irradiação das amostras..... 71

4.1.3 Verificação da metodologia..... 74
4.2 Determinação Radioquimica de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb nas amostras de *Peperomia pellucida* e Solo..... 89
4.2.1 Princípios do método..... 89
4.2.2 Procedimento experimental para as análises dos radionuclídeos ^{226}Ra e ^{228}Ra..... 89
4.2.3 Determinação da concentração de atividade do ^{226}Ra e ^{228}Ra..... 91
4.2.3.1 Cálculo da concentração de atividade do ^{226}Ra..... 91
4.2.3.2 Cálculo da concentração de atividade do ^{228}Ra..... 92
4.2.4 Procedimento experimental para análise do ^{210}Pb..... 93
4.2.4.1 Cálculo da concentração de atividade do ^{210}Pb..... 94
4.2.5 Determinação da radiação de fundo, do limite inferior de detecção e verificação da metodologia..... 94
4.3 Espectrometria de Absorção Atômica..... 97
4.3.1 Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite (GFAAS).. 98
4.3.1.1 Procedimento experimental para as análises de Cd e Pb por Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite..... 98
4.3.1.2 Calibração do equipamento de GFAAS e medida das amostras..... 99
4.3.1.3 Verificação da metodologia..... 101
4.3.2 Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (CVAAS)..... 102
4.3.2.1 Princípio do método..... 102
4.3.2.2 Procedimento experimental para as análises de Hg por Espectrometria de Absorção Atômica com Geração por Vapor Frio (CVAAS)..... 102
4.3.2.3 Calibração do equipamento de CVAAS e verificação da metodologia..... 103
4.4 Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Peperomia pellucida*..... 106
4.4.1 Princípio do método..... 106
4.4.2 Determinação dos componentes químicos do óleo essencial de *Peperomia pellucida*..... 106

4.4.3 Microrganismo teste..... 107
4.4.4 Reagente e padrão antifúngico..... 107
4.4.5 Preparo do inóculo..... 107
4.4.6 Ensaios microbiológicos..... 107
4.4.7 Análise estatística..... 108
5 RESULTADOS..... 109
5.1 Resultados de concentração para os elementos determinados por Análise por Ativação com Nêutrons Instrumental (INAA)..... 109
5.2 Resultados de concentração de atividade dos elementos ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb determinados por contagem alfa e beta total após separação radioquímica..... 115
5.3 Resultados de concentração para Cd, Hg e Pb nas amostras por Espectrometria por Absorção Atômica (AAS)..... 116
5.4 Resultados da avaliação da atividade antifúngica frente ao fungo *Aspergillus flavus* e da constituição química do óleo essencial de *Peperomia pellucida*..... 118
5.4.1 Teste do Disco de Difusão..... 118
5.4.2 Constituição química do óleo essencial de *Peperomia pellucida*..... 120
6 DISCUSSÃO..... 123
6.1 Elementos estáveis e radionuclídeos..... 123
6.1.1 Discussão das análises dos extratos da planta medicinal..... 134
6.1.2 Tratamento estatístico dos dados de AAN e Separação Radioquímica. 136
6.1.2.1 Análise de Agrupamento..... 137
6.1.2.2 Coeficiente de Correlação..... 139
6.2 Avaliação dos testes com Disco de Difusão e da constituição do óleo essencial de *Peperomia pellucida*..... 141
7 CONCLUSÕES..... 144
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 147

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1.1 – Atividades biológicas de extratos ou substâncias isoladas de espécies do gênero *Peperomia*..... 31

Tabela 4.1 - Elementos e suas concentrações (média ± desvio), em µg g^{-1}, nos materiais de referência utilizados para AAN..... 71

Tabela 4.2 - Elementos analisados por ativação neutrônica, radioisótopo formado na ativação, energia dos raios gama utilizados na espectrometria gama e suas respectivas meia-vida..... 73

Tabela 4.3 - Concentração dos elementos (µg g^{-1}) certificados no material de referência IAEA-336 (Lichen), determinada pela técnica de AAN utilizando-se como padrões os materiais de referência BE-N1, Padrão Pipetado, BRS e Soil – 7; DPR% e ER%..... 75

Tabela 4.4 - Concentração dos elementos (µg g^{-1}) certificados no material de referência IAEA-Soil-7, determinada pela técnica de AAN utilizando-se como padrões os materiais de referência BE-N1, Lichen, BRS, ES e Padrão Pipetado; DPR% e ER%..... 76

Tabela 4.5 - Concentração dos elementos (µg g^{-1}) certificados no material de referência IWG-GIT-basalt (BE-N1), determinada pela técnica de AAN utilizando-se como padrões os materiais de referência Lichen e Soil-7; DPR% e ER%..... 77

Tabela 4.6 - Concentração dos elementos (µg g^{-1}) certificados no material de referência NIST 8704 (Buffalo River Sediment - BRS), determinada pela técnica de AAN utilizando-se como padrões os materiais de referência Lichen, IAEA-326 e Soil-7; DPR% e ER%.. 78

Tabela 4.7 - Concentração dos elementos (µg g^{-1}) certificados no material de referência NIST 1696a (ES), determinada pela técnica de AAN utilizando-se como padrão o material de referência Soil-7; DPR% e ER%..... 79

Tabela 4.8 - Concentração dos elementos (µg g^{-1}) certificados no material de referência IAEA-326, determinada pela técnica de AAN utilizando-se como padrões os materiais de referência BRS e Lichen; DPR% e ER%..... 79
Tabela 4.9 - Valores de Limite Inferior de Detecção (LID) e Limite de Quantificação (LQ) da técnica de AAN (mg kg^{-1}), exceto onde indicado por %, obtidos para os elementos nos materiais de referência IAEA-336 e IAEA-Soil-7..... 88
Tabela 4.10 - Valor médio do Limite Inferior de Detecção (LID) para os radionuclídeos ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb em mBq kg^{-1}..... 96
Tabela 4.11 - Média das concentrações obtidas de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb em Bq kg^{-1}, para o material de referência IAEA-326..... 96
Tabela 4.12 - Soluções utilizadas na construção da curva de calibração para determinação de Cd e Pb pela técnica de GFAAS..... 99
Tabela 4.13 - Parâmetros de determinação de Cd e Pb ajustados para análise..... 100
Tabela 4.14 - Etapas de aquecimento do forno de grafite para determinação de Cd e Pb..... 101
Tabela 4.15 - Média das concentrações obtidas de Cd e Pb em mg kg^{-1}, para os materiais de referência NIST 1515 (Apple Leaves) e NIST 1542 (Peach Leaves)..... 101
Tabela 4.16 - Concentração das soluções utilizadas na curva analítica para determinação de Hg por CVAAS..... 104
Tabela 4.17 – Limite Inferior de Detecção (LID) e Limite de Quantificação (LQ) para Cd, Pb e Hg..... 105
Tabela 5.1 - Concentrações e desvios, em µg g^{-1}, determinados por ativação neutrônica para as amostras PPEP, RPEP e SPEP coletadas no ponto P1..... 110
Tabela 5.2 - Concentrações e desvios, em µg g^{-1}, determinados por ativação neutrônica para as amostras PPEP, RPEP e SPEP coletadas no ponto P2..... 111

Tabela 5.3 - Concentrações e desvios, em µg g^{-1}, determinados por ativação neutrônica para as amostras MPEP e IPEP de *Peperomia pellucida* coletada no ponto P2..... 112
Tabela 5.4 - Concentrações e desvios, em µg g^{-1}, determinados por ativação neutrônica para as amostras FPEP, PPEP, RPEP e SPEP coletadas no ponto P3..... 113
Tabela 5.5 - Concentrações e desvios, em µg g^{-1}, determinados por ativação neutrônica para as amostras MPEP e IPEP de *Peperomia pellucida* coletada no ponto P3..... 114
Tabela 5.6 - Concentração de atividade de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb, em Bq kg^{-1}, nas amostras PPEP e SPEP coletadas no P1..... 115
Tabela 5.7 - Concentração de atividade de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb, em Bq kg^{-1}, nas amostras PPEP, do SPEP, do MPEP e da IPEP coletadas no P2..... 115
Tabela 5.8 - Concentração de atividade de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb, em Bq kg^{-1}, nas amostras FPEP, PPEP, RPEP,SPEP, MPEP e IPEP coletadas no P3..... 116
Tabela 5.9 - Resultados de concentração de Hg total (CVAAS), em µg g^{-1}; Cd e Pb (GFAAS), em µg g^{-1}, determinados nas amostras coletas no ponto P2..... 117
Tabela 5.10 - Resultados de concentração de Hg total (CVAAS), em µg g^{-1}; Cd e Pb (GFAAS), em µg g^{-1}, determinados nas amostras coletas no ponto P3..... 117
Tabela 5.11 - Rendimento do óleo essencial obtidos das partes aéreas frescas de *Peperomia pellucida*..... 118
Tabela 5.12 - Halos de inibição do crescimento (mm e %) obtidos para diferentes alíquotas do óleo essencial de *Peperomia pellucida* e para Derosal® (Controle Positivo) contra o fungo *Aspergillus flavus*..... 118
Tabela 5.13 - Componentes determinados no óleo essencial de *P. pellucida*..... 120
Tabela 6.1 - Coeficientes de correlação calculados para os elementos determinados por AAN e Separação Radioquímica ($p < 0,05$)..... 140

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1.1 - Metabólitos secundários isolados de espécies de *Peperomia*... 29
Figura 1.2 - *Peperomia pellucida* (L.) Kunth..... 32
Figura 1.3 - Metabólitos secundários isolados de *Peperomia pellucida*..... 34
Figura 1.4 - Contaminação de culturas de milho por *Aspergillus flavus*..... 36
Figura 1.5 - Série de decaimento radioativo do ^{238}U..... 43
Figura 1.6 - Série de decaimento radioativo do ^{232}Th..... 44
Figura 1.7 - Principais vias de transferência dos radionuclídeos primordiais nos vários compartimentos do ecossistema..... 46
Figura 3.1 - Jardim Botânico do Rio de Janeiro..... 51
Figura 3.2 - Ponto de coleta: Casa dos Pilões (I), planta coletada (II) e Rio dos Macacos (III). Imagens: Lídio Parente, Fábio Sussa e Maria Teresa de Jesus Gouveia..... 52
Figura 3.3 - Pontos de coleta P1, P2 e P3..... 53
Figura 3.4 - Tratamentos das amostras. Limpeza (I), secagem das amostras após a lavagem (II) e separação das estruturas da planta em parte aérea e raiz (III)..... 54
Figura 3.5 - Tratamento das amostras: Pesagem das amostras (I), secagem em estufa (II), amostras secas (III) e pulverização (IV).... 55
FIGURA 3.6 – Procedimentos realizados nas amostras de Solo para as análises..... 55
FIGURA 3.7 - Processo de extração e tratamento das amostras: Maceração em álcool (I), filtração da solução (II) e dissolução dos metais (III)..... 56
Figura 3.8 - Procedimentos realizados para obtenção do extrato alcoólico para AAN..... 57
Figura 3.9 - Procedimentos realizados para obtenção do extrato alcoólico para separação radioquímica..... 58
Figura 3.10 - Preparação das amostras para determinação por GFAAS. Tubos de Teflon (I) e bloco digestor (II)..... 59

Figura 3.11 - Procedimentos realizados para obtenção do extrato alcoólico para EAA..... 59
Figura 3.12 - Processo de infusão e tratamento das amostras. Tubos de centrífuga (I), filtração da solução (II) e dissolução dos metais (III) 60
Figura 3.13 - Procedimentos realizados para obtenção da infusão para AAN..... 61
Figura 3.14 - Procedimentos realizados para obtenção da infusão para separação radioquímica..... 62
Figura 3.15 - Procedimentos realizados para obtenção da infusão para EAA..... 63
Figura 3.16 - Evaporador rotatório..... 64
Figura 3.17 - Procedimentos realizados para obtenção do extrato hexânico das partes aéreas de *Peperomia pellucida*..... 65
Figura 3.18 - Procedimento realizado para obtenção do extrato etanólico das partes aéreas de *Peperomia pellucida*..... 66
Figura 3.19 - Equipamentos utilizados no processo de extração do óleo essencial de *Peperomia pellucida*: Aparelho de Clevenger (I), balão fundo redondo (II), erlenmeyer (III) e funil de separação (IV). 67
Figura 3.20 - Procedimentos realizados para obtenção do óleo essencial das partes aéreas de *P. pellucida*..... 68
Figura 4.1 - Detector HPGe com janela de berílio e eletrônica associada..... 72
Figura 4.2 - Valores normalizados para os elementos determinados por AANI..... 74
Figura 4.3 - Valores de Z-*score* obtidos na análise do material de referência IAEA-336 (Lichen), utilizando-se como padrão os materiais de referência BE-N1, BRS, PADRÃO PIPETADO e Soil-7..... 81
Figura 4.4 - Valores de Z-*score* obtidos na análise do material de referência IAEA-Soil-7, utilizando-se como padrão os materiais de referência BE-N1, IAEA-336, BRS, PADRÃO PIPETADO e ES..... 83
Figura 4.5 - Valores de Z-*score* obtidos na análise do material de referência IWG-GIT-basalt (BE-N1) utilizando-se como padrão os materiais de referência IAEA-336 e Soil-7..... 84

Figura 4.6 - Valores de Z-*score* obtidos na análise do material de referência NIST 8704 (BRS) utilizando-se como padrão os materiais de referência IAEA-336, Soil-7 e IAEA-326..... 85
Figura 4.7 - Valores de Z-*score* obtidos na análise do material de referência NIST 1696a (ES) utilizando-se como padrão o material de referência Soil-7..... 86
Figura 4.8 - Valores de Z-*score* obtidos na análise do material de referência IAEA-326 utilizando-se como padrão os materiais de referência BRS e IAEA-336..... 86
Figura 4.9 - Contador proporcional de baixa radiação de fundo..... 95
Figura 4.10 - Equipamento de GFAAS modelo *AAnalyst* 800 da Perkin Elmer para determinação de Cd e Pb..... 98
Figura 4.11 - Curva de calibração para Cd obtida por GFAAS..... 99
Figura 4.12 - Curva de calibração para Pb obtida por GFAAS..... 100
Figura 4.13 - Equipamento de CVAAS marca Perkin Elmer, modelo FIMS 100 (*Flow Injection Mercury System*) para determinação de Hg..... 103
Figura 4.14 - Curva de calibração para Hg obtida por CVAAS..... 104
Figura 4.15 - *Aspergillus flavus* em meio de cultura BDA..... 107
Figura 4.16 - Etapas dos ensaios microbiológicos: Identificação das placas (I), solução de esporos (II), inoculação do fungo no meio de cultura pela técnica de *Swab* (III), adição dos discos de papéis no centro das placas (IV), pipetagem de diferentes aliquotas do óleo essencial e dos extratos (V) e impregnação (VI)..... 108
Figura 5.1 - Efeito inibidor por diferentes alíquotas do óleo essencial e a projeção CI_{50}..... 119
Figura 5.2 - Cromatograma do óleo essencial de *Peperomia pellucida*: (1) n-dodecano, (2) ni, (3) n-tetradecano, (4) *trans*-cariofileno, (5) aromadendreno, (6) γ-muuroleno, (7) biciclogermacreno, (8) n-pentadecano, (9) (*E,E*)-α-farneseno, (10) germacreno B, (11) *trans*-nerolidol, (12) ni, (13) espatulenol, (14) óxido de cariofileno, (15) dilapiol, (16) apiol..... 121
Figura 5.3 - Estruturas químicas identificadas no óleo essencial obtido das partes aéreas de *Peperomia pellucida*..... 122

Figura 6.1 - Concentração (mg kg^{-1}) de As, Ba, Br, Co, Cr e Cs nas amostras de FPEP, PPEP, RPEP e SPEP nos pontos coletados P1, P2 e P3..... 124
Figura 6.2 - Concentração (mg kg^{-1}), exceto onde indicado (%), de Fe, Hf, K, Na, Rb e Sb nas amostras de FPEP, PPEP, RPEP e SPEP nos pontos coletados P1, P2 e P3..... 125
Figura 6.3 - Concentração (mg kg^{-1}) de Cl, Mg, Mn, Ta, Th, U e Zn nas amostras de FPEP, PPEP, RPEP e SPEP nos pontos coletados P1, P2 e P3..... 128
Figura 6.4 - Concentração (mg kg^{-1}) dos Elementos Terras Raras (Ce, Eu, La, Lu, Nd, Sc, Sm, Tb e Yb) nas amostras de FPEP, PPEP, RPEP e SPEP nos pontos coletados P1, P2 e P3..... 130
Figura 6.5 - Concentração (mg kg^{-1}) dos elementos Cd e Pb nas amostras de FPEP, PPEP, RPEP e SPEP nos pontos coletados P2 e P3..... 131
Figura 6.6 - Concentração de atividade (Bq kg^{-1}) de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb nas amostras coletadas nos pontos P1, P2 e P3..... 133
Figura 6.7 - Porcentagem dos elementos extraídos por Maceração (MPEP) e Infusão (IPEP) das amostras coletadas nos pontos P2 e P3..... 135
Figura 6.8 - Porcentagem dos radionuclídeos ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb extraídos por Maceração (MPEP) e Infusão (IPEP) das amostras coletadas nos pontos P2 e P3..... 136
FIGURA 6.9 - Dendrograma da análise de agrupamento entre as observações das amostras de PPEP, RPEP e SPEP nos 3 pontos de coleta..... 137
FIGURA 6.10 - Dendrograma resultante da análise de agrupamento para 25 variáveis..... 138
FIGURA 6.11 – Coeficiente de variação dos elementos determinados no Solo, Raiz e Partes Aéreas..... 141
Figura 6.12 - Halos de inibição do crescimento do *A. flavus* em discos de papel pelo controle positivo (fungicida) (I), pelo controle negativo (H_2O) (II) e pelas alíquotas de 2,5 µL (III), 5,0 µL (IV), 7,5 µL (V) e 10,0 µL (VI) do óleo essencial de *P. pellucida*..... 142

LISTA DE ABREVIATURAS

AANI – Análise por Ativação Neutrônica Instrumental

AAS - *Atomic Absorption Spectrometry*

ANVISA – Agência de Vigilância Sanitária

BDA - Batata-Dextrose-Ágar

CG-EM - Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas

CPS – Contagem Por Segundos

CVAAS - *Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry*

DP – Desvio Padrão

DPR – Desvio Padrão Relativo

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetra-acético

ER – Erro Relativo

ETR – Elementos Terras Raras

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FIMS – *Flow Injection Mercury System*

FGAAS – *Fournace Graphite Atomic Absorption Spectrometry*

HPGe – *High Purity Germanium*

IAEA – *International Atomic Energy Agency*

CI_{50} – Concentração Inibitória

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

LAN – Laboratório de Ativação Neutrônica

LID – Limite Inferior de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

LRA – Laboratório de Radiometria Ambiental

NIST - *National Institute of Standards and Technology*

NTA - Ácido nitrilo tri-acético

OMS – Organização Mundial da Saúde

SE - Solução estoque

SP - Solução padrão

SRM – Standard Reference Materials

WHO – World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos históricos e importância das plantas medicinais

O uso terapêutico das plantas medicinais na saúde humana constitui-se como prática milenar (Alvim, 2006). O emprego de plantas para fins curativos data, de acordo com vários antropólogos, do Paleolítico ou idade da pedra lascada, o primeiro dos três grandes períodos em que se subdivide a idade da pedra (Dias, 2005).

O ser humano ao observar os animais se alimentarem de plantas também as experimentava e assim começou a perceber que determinados tipos de plantas aliviavam certos distúrbios como as dores de estômago, dores de cabeça, cólicas intestinais e outros tipos de males como as dores musculares (Vaz, 1995).

Desde cedo as primeiras civilizações perceberam que algumas plantas continham em suas essências substâncias as quais ao serem aplicadas no combate às doenças revelaram empiricamente seu poder curativo. Toda essa informação foi sendo, de início, transmitida oralmente às gerações posteriores, para depois, com o aparecimento da escrita, passar a ser compilada e guardada com desvelo zeloso (Badke, 2008).

As mais antigas fontes escritas médico-farmacêuticas são provenientes da região do crescente Fértil[1], cujas civilizações são as que têm maior importância para a história da farmácia ocidental (Dias, 2005).

De acordo com Biazzi (2005) os primeiros registros históricos datam de 5.000 anos e mencionam a utilização de plantas medicinais como o louro e o tomilho pelos Sumérios.

---

[1] O crescente Fértil é constituído pelo Egito, pela Mesopotâmia e pelo corredor sírio-palestiniano, espaços dominados, respectivamente, pelo vale do Nilo, pela planície do Tigre e do Eufrates e pela faixa mediterrânica que os liga entre si (Dias, 2005).

O conhecimento do uso de plantas medicinais nos chega por meio dos chamados papiros médicos egípcios, sendo o mais importante para a história da farmácia é o *Papiro de Ebers*. Acredita-se que o referido papiro, contendo cerca de 800 receitas e referências a mais de 70 drogas, incluindo absinto, hortelã, mirra e mandrágora, tenha sido escrito no século XVI a.C. Esse papiro, em escrita hierática[2], conserva-se atualmente na Biblioteca da Universidade de Leipzig (Tubino et al., 2009; Menezes, 2005).

Já na antiguidade, na Grécia e em Roma, de Hipocrates a Galeno, a medicina sempre esteve estreitamente dependente da Botânica, persistindo nessa situação até o século XVII (Lameira e Pinto, 2008).

Quem se destacou no campo das plantas medicinais foi Dioscórides que, ao acompanhar os exércitos romanos na Península Ibérica, no Norte da África e na Síria, recolheu abundante informação sobre plantas dessas regiões. Escreveu o tratado “De Matéria Medica”, dividido em cinco livros, no qual são descritos cerca de 600 plantas e indicações sobre o seu uso médico (Menezes, 2005). Sua obra, tendo sido escrita no ano 78 da nossa era, passa a ser usada, como guia de ensino, no mundo romano e no árabe, continuando em vigor até finais da Idade Média e ainda no século XV são feitas cópias em latim dessa obra (Cunha, 2008)

No decorrer da Idade Média, adventos históricos que ocorreram na Europa, tais como a ascensão e queda do Império Romano e o fortalecimento da Igreja Católica, provocaram uma enorme influência sobre o saber científico da época. Em virtude disso a medicina e também o estudo e as informações sobre o uso das plantas medicinais mantiveram-se estagnados por um longo período, pois todo o legado greco-romano tornou-se restrito aos mosteiros. Dessa forma, o cultivo e o emprego das plantas medicinais tornaram-se exclusividades da Igreja Católica, uma vez que, qualquer prática realizada fora dessas instituições religiosas era considerada por seus sacerdotes como práticas de bruxarias ou alquimia (Martins et al., 2000).

---

[2] Escrita Hierática: Diz-se da escrita cursiva que os antigos egípcios desenvolveram a partir da escrita hieroglífica. (Escrita hieroglífica: escrita analítica, de ordinário monumental, constituídas de sinais figurativos (Menezes, 2005).

Ainda segundo Cunha (2008), embora tivesse ocorrido um retrocesso na evolução da Arte de Curar, preparavam-se misteriosamente ungüentos maravilhosos por meio de fórmulas mágicas, adquiridos através do conhecimento greco-latino sobre o emprego de plantas medicinais, que cultivavam junto aos mosteiros. Eram considerados como produtos vegetais mágicos o visco que vegetava sobre o castanheiro, a mandrágora, a arruda e até o alho.

Segundo Osmar (2008), muitos medicamentos originaram-se desse uso empírico, fruto de um longo processo de descobertas por tentativas, como por exemplo, os digitálicos, drogas derivadas da dedaleira (*Digitalis purpúrea* L. e *Digitalis lanata* L.), com poderosa ação específica sobre o músculo cardíaco. Seus princípios ativos, os glicosídeos cardiotônicos, são hoje fármacos obrigatórios no tratamento de certas doenças do coração.

Após a idade média, conforme Silveira (2005), no período do Renascimento, ocorre uma retomada dos estudos, dentre eles os que abordam o emprego de plantas medicinais como forma paliativa ou curativa de tratar as doenças. E ao mesmo tempo vão sendo introduzidos na terapêutica novos fármacos provenientes de diversas culturas.

Na modernidade, o uso de plantas medicinais, apesar de ser um tratamento secular para as doenças e de estar presente em diversas culturas, sofreu muitas alterações, sobretudo, a partir da segunda metade do século XX com o avanço dos medicamentos sintéticos. Quando o uso de medicamentos sintéticos ou industrializados começou a intensificar-se, o uso de plantas passou a ser negligenciado em virtude da supremacia dos medicamentos alopáticos que passaram, a partir de então, a predominar nas terapias modernas. Entretanto, a partir da década de 80, as plantas medicinais passaram novamente a ser valorizadas como fonte de propriedades curativas (Badke, 2008).

A retomada do interesse no estudo das plantas medicinais se deve às constantes críticas que as drogas sintéticas passaram a sofrer, devido às reações adversas provocadas pelos medicamentos alopáticos, como reações alérgicas e distúrbios gastrointestinais e seu elevado custo (Adeodado et al., 1996).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades está arraigada às culturas do europeu, do negro e do índio, resultando em uma produção multicultural, que de acordo com Coelho (1989), foi durante muito tempo, a principal forma de cura utilizada pela população.

O primeiro estudo realizado sobre as plantas medicinais brasileiras data de 1797, quando um médico português que visitava o Brasil, Dr. Bernadino Antônio Gomes, catalogou e estudou 15 variedades de plantas conhecidas com nomes populares de auda-açú, pipi, guapibeira, erva de cobra, batata de purga, barbatimão, contra-erva, mangabeira, tabebuia, coqueiro de guriri, mil-homens, jarrinha, jaqueira, craveiro da terra e maririçú.

Atualmente o estudo das plantas medicinais, de uma maneira geral, é feito em todos os continentes, havendo um número maior de pesquisas onde elas são utilizadas popularmente para fins medicinais, tais como Índia, Brasil, alguns países da Europa e da África, Japão, China e Estados Unidos.

No Brasil 20 % da população consome 63 % dos medicamentos alopáticos, o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas, uma fonte alternativa de medicação (Foglio et al., 2006).

Assim, para o desenvolvimento e uso de plantas medicinais tornam-se primordiais os estudos sobre a obtenção e identificação de novos princípios ativos bem como as investigações sobre a correlação com os fatores que afetam a formação, o crescimento e as características medicinais das plantas. Consequentemente, os estudos envolvendo plantas medicinais têm merecido especial atenção e constituem hoje temas de pesquisas multidisciplinares como da química, bioquímica, farmácia, medicina e outros.

Convém ressaltar ainda que o estudo de plantas medicinais é de tal importância que a Organização Mundial da Saúde (OMS) em julho de 1991 reuniu em Munique diversos cientistas internacionais para uma revisão dos princípios ativos medicinais e para a elaboração de regulamentos para o uso de fitoterápicos.

Nos últimos anos, houve um crescimento significativo do mercado de fitoterápicos e plantas medicinais no Brasil. Em 1994, o mercado de fitoterápicos correspondia a um valor estimado em US$ 355 milhões, o que representava 5,5% do valor total das vendas de medicamentos (Alvarenga et al., 2009). Estima-se que as vendas de produtos farmacêuticos derivados de plantas alcançaram a cifra de US$ 550 milhões em medicamentos e cosméticos, a partir de plantas medicinais e aromáticas (Lameira e Pinto, 2008).

Segundo a Febrafarma (2007), o crescimento do mercado de fitoterápicos, no Brasil, é da ordem de 15% ao ano, enquanto o mercado de

medicamentos sintéticos cresce em torno de 3% a 4%. O mercado brasileiro encontra-se em crescimento estando entre os dez maiores mercados de substâncias de origem vegetal do mundo (Campesato, 2005).

O estudo sobre plantas medicinais tem se tornado, nas últimas décadas, assunto de pesquisas cada vez mais amplo. Diversos aspectos são abordados sobre o uso de plantas medicinais, tais como a diversidade e a potencialidade que as plantas apresentam como fontes de produtos medicinais, a extração dos princípios ativos, modo de ação e uso potencial de óleos essenciais e também sobre os meios de preservação das plantas medicinais.

A caracterização elementar das plantas medicinais ou de seus extratos também constitui tema de pesquisa de grande interesse. Em pesquisas com fitoterápicos o foco principal é geralmente a caracterização do principio ativo da planta para comprovação científica de suas propriedades farmacológicas (Ferreira et al., 2003; Calixto, 2000). Entretanto, a análise da composição elementar bem como das concentrações de atividade de radionuclídeos naturais da série do U e Th faz se necessária, pois a fonte principal de absorção destes elementos é a dieta humana.

A análise elementar das plantas e dos seus extratos contribui no estabelecimento da dosagem dos fitoterápicos visto que pode haver possíveis interferências dos componentes inorgânicos em sua terapêutica e dependendo dos teores de certos elementos, estes podem ser tóxicos ao ser humano (Olujohungbe et al., 1994; Kakosy et al., 1996). Os vegetais incorporam os elementos estáveis e os radionuclídeos naturais do solo onde são cultivados e dos fertilizantes empregados com a finalidade de aumentar a produção vegetal. Uma planta medicinal contendo concentrações destes elementos superiores aos valores máximos permitidos pode causar intoxicações e problemas bastante graves, uma vez que tais plantas são geralmente usadas por longos períodos de tratamento por via oral.

Entre as inúmeras atividades biológicas e farmacológicas exibidas por substâncias presentes nas plantas medicinais, há também um crescente estímulo pela busca de novos agentes antifúngicos, tendo em vista o aumento do número de infecções causadas ao organismo humano por estes microrganismos. Além disso, é imprescindível a busca por novos agentes antifúngicos para a agricultura devido à crescente resistência exibida por microrganismos aos agrotóxicos

convencionais como, por exemplo, os fungos toxigênicos. Os grãos e cereais são expostos, no campo, a uma ampla variedade de microrganismos, proveniente do ar, água, plantas doentes, insetos, solo, fertilizantes e material orgânico. Dentre esses, os fungos podem causar uma série de danos aos grãos durante o plantio, colheita e armazenamento (Dubuisson, 1977). O impacto econômico da invasão fúngica inclui a diminuição do poder de germinação, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, mudanças químicas e nutricionais com conseqüente produção de micotoxinas e perda da qualidade, tornando-os impróprios para o consumo (Paster, 1988).

No âmbito do governo brasileiro, o Ministério da Agricultura e Abastecimento, (2006) através da Portaria Ministerial nº 230, de 10-06-1997, publicada no Diário Oficial da União, de 11-06-1997, instituiu o Programa Nacional de Controle de Micotoxinas em Produtos, Subprodutos e Derivados de Origem Vegetal, já que, os dados em nível mundial são alarmantes. Segundo estimativas da FAO (Food and Agriculture Organization), 25% de todas as plantações agrícolas são afetadas anualmente pela contaminação por micotoxinas gerando um problema mundial de saúde pública. Para impedir a comercialização de produtos contaminados, barreiras sanitárias e sérios padrões restritivos aos produtos contaminados por micotoxinas e agrotóxicos são impostos internacionalmente, implicando em prejuízos expressivos para países exportadores de alimentos como o Brasil (Ministério da agricultura, 1997).

Desta forma o controle de fungos é uma questão de saúde pública e de grande importância para o agronegócio, visto que é constante o surgimento de novos microrganismos resistentes a antimicrobianos.

1.2. Características das Piperaceae

1.2.1 – A Família Piperaceae

As Piperaceae são estudadas desde o início do conhecimento da taxonomia botânica, que se dá desde o século XVIII, quando Linnaeus (1753) descreve 17 espécies de *Piper* L. (Medeiros, 2006). Poucos anos depois, outros estudiosos também contribuíram para o conhecimento da família, descrevendo novos gêneros e espécies.

A família Piperaceae, pertencente à ordem Piperales, que é considerada como uma das mais primitivas plantas dentre as angiospermas basais, somando aproximadamente 3.000 espécies de distribuição tropical e subtropical com centro de diversidade na Malásia e nas Américas Central e do Sul (Ferreira, 2007; Dignani, 2009).

A família Piperaceae é extremamente estudada dos pontos de vista botânico, químico e farmacológico (Jaramillo, 2001). Possui cerca de 10 gêneros, sendo *Piper* e *Peperomia* os mais representativos, com mais de 1000 espécies cada (Greig, 2004).

O Brasil possui 3 gêneros nativos: *Piper*, *Peperomia* e *Sarcorhachis,* sendo encontradas principalmente nas florestas Amazônica e Atlântica (Greig, 2004; Ferreira, 2007).

Pela ampla ocorrência e abundância no Brasil, várias espécies dessa família são referidas como medicinais, tais como erva de jabuti (*Peperomia pellucida*), falso jaborandi (*Piper aduncum*) e pariparoba (*Piper umbellatum*) e utilizadas na culinária (Mendes, 2011; Monteiro, 2008; Navarro, 2009).

Sob o ponto de vista econômico e comercial, o gênero *Piper* é o mais importante, tendo com principal exemplo a espécie *Piper nigrum* (pimenta do reino). É a mais importante especiaria comercializada mundialmente sendo usada em larga escala como condimento, em indústrias de carnes e conservas (Singh, 1992).

Quimicamente a família é conhecida pela produção de mais de 700 substâncias. Os principais metabólitos secundários que caracterizam as espécies de Piperaceae são amidas, cromenos e fenilpropanóides, lignóides, flavonóides, terpenóides e piperolídeos (Parmar et al.,1997; Parmar et al., 1998).

1.2.2 – Gênero *Peperomia*

O gênero *Peperomia* foi descrito por Ruiz e Pavon (1794) e assim denominado por sua semelhança com as pimentas. Destaca-se como o segundo maior gênero da família das Piperaceae, somando cerca de 1600 especies diversamente distribuídas na América Central e América do Sul, algumas espécies são encontradas na Ásia, África e Oceania (Wanke et al., 2006; Ferreira, 2007; Li, N et al., 2008).

As especies de *Peperomia* são ervas de habito epifítico ou terrestre, crescendo preferencialmente em locais úmidos e sombreados. As plantas deste gênero apresentam elevada diversidade. Os ramos são geralmente carnosos e suculentos, mas também podem ser densos e translúcidos. As inflorescências são do tipo espiga, opostas as folhas ou auxiliares (Ferreira, 2007).

A maioria das espécies de *Peperomia* apresenta folhas providas de tecido especializado em reservar água, e essa capacidade possibilita a sobrevida em períodos de seca, as quais espécies de hábitos epifíticos são submetidas com freqüência (Dignani, 2009).

Por apresentar uma folhagem vistosa, muitas espécies da *Peperomia* são utilizadas como plantas ornamentais (Mendes, 2010). As folhas são também amplamente utilizadas na medicina para tratamento de inflamações, asma, úlceras gástrica, por suas atividades analgésica, antibacteriana e fungicida (Mutee et al., 2010; Khan et al., 2002; Dignani, 2009).

O gênero *Peperomia* também se destaca pela produção de óleos essenciais (Silva, 1999).

Os relatos da composição química desse gênero são raros e recentes na literatura, principalmente quando se considera o número estimado de espécies. Recentemente, uma revisão foi publicada na literatura sobre os constituintes químicos isolados de *Peperomia* (Li et al., 2008).

Ainda segundo Li et al. (2008), cerca de 200 compostos têm sido relatados a partir deste gênero. Eles são divididos principalmente em lignanas, policetídeos, benzopiranonas, benzopiranos, quinonas, flavonóides, fenilpropanóides, terpenóides, amidas, fenóis e ácidos (FIG. 1.1).

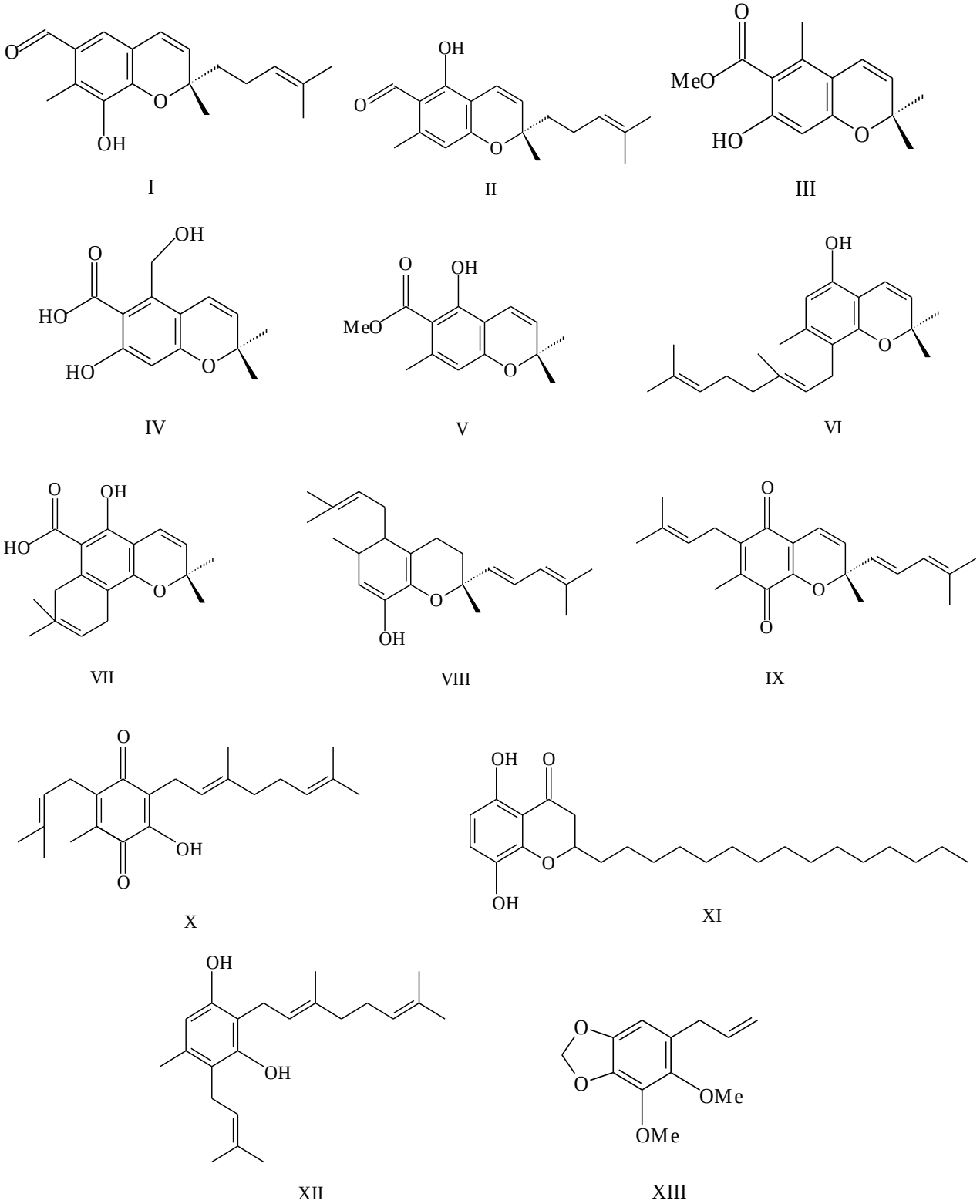


FIGURA 1.1 - Metabólitos secundários isolados de espécies de *Peperomia*.

Estruturas: I e II – *P. blanda* (Veloso et al., 2006); III, IV e V – *P. villipetiola* (Salazar et al., 2005); VI e VII – *P. serpens* (Kitamura et al., 2006); VIII – *P. obtusifolia* (Tanaka et al., 1998); IX, X e XII –*P. galioides* (Mahiou et al., 2006; Mahiou et al., 2005); XI – *P. proctorii* (Seeran et al., 2000); XIII – *P. pellucida* (Ragasa et al., 1998).

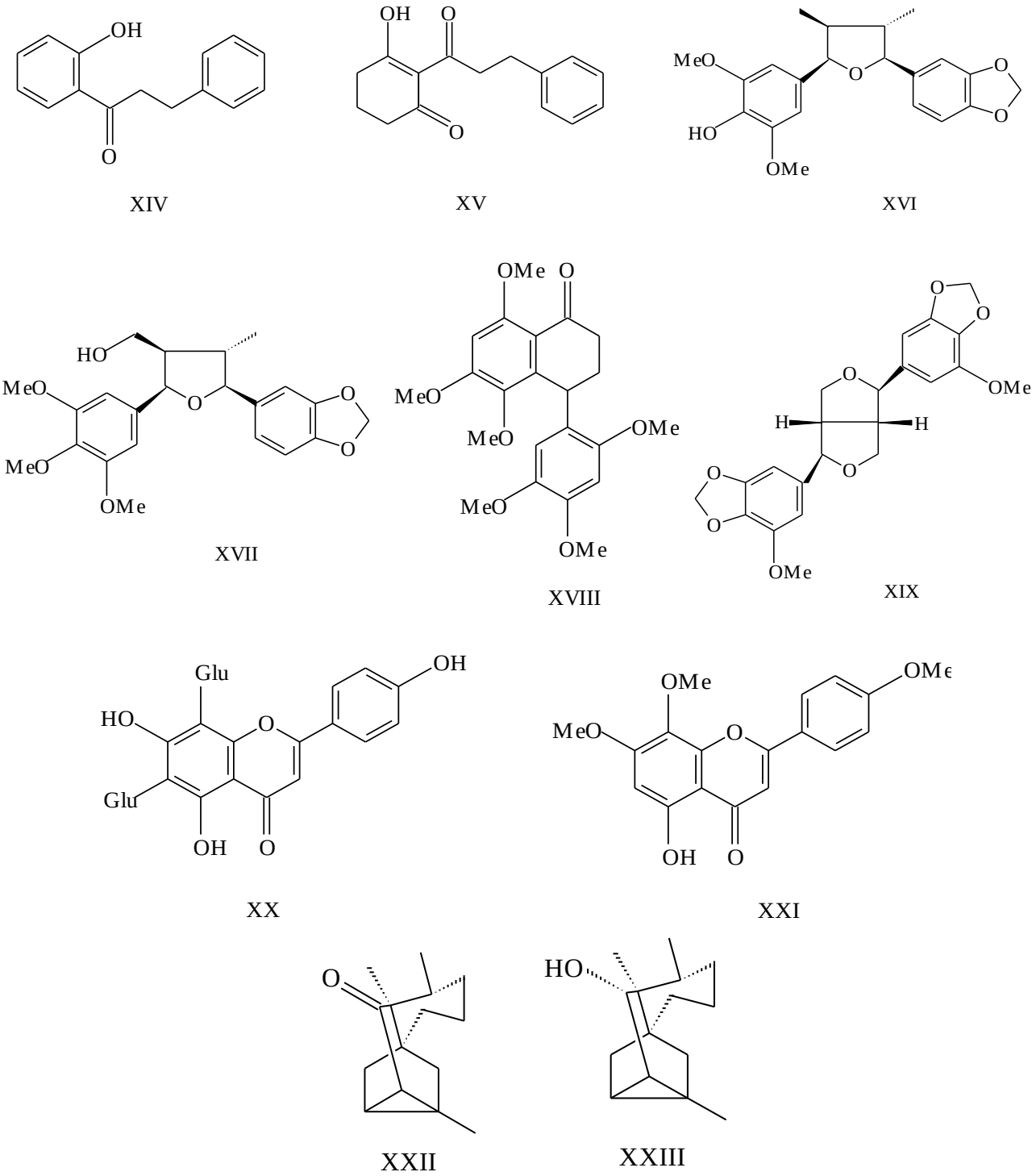


FIGURA 1.1 – Continuação.

Estruturas: XIV - *P. obtusifolia* (Tanaka et al., 1998); XV – *P. dindygulensis* (Wu et al., 2005; Wu et al., 2006); XVI e XVII – *P. blanda* (Felippe et al., 2008); XVIII – *P. pellucida* (Xu et al., 2006); XIX – *P. duclouxii* (Li et al., 2007); XX – *P. blanda* (Velozo et al., 2006); XXI – *P. blanda* (Felippe et al., 2008); XXII e XXIII – *P. oreophila* (Lago et al., 2007).

Além de estudos fitoquímicos, alguns ensaios biológicos já foram realizados com o intuito de se verificar efeitos antimicrobianos, citotóxicos, antiinflamatórios, antiparasitários e inseticidas de extratos e substâncias extraídas de *Peperomia* (TAB. 1.1).

TABELA 1.1 – Atividades biológicas de extratos ou substâncias isoladas de espécies do gênero *Peperomia*.

Espécie	Substâncias / Extrato	Bioatividade	Referência
P. blanda	Flavonóides e Cromenos	Antiradicalar	Velozo et al., 2006.
	Lignanas	Tripanossomicida	Felippe et al., 2008.
P. dindygulensis	Lignóides	Citotóxica	Wu et al., 2006; Wu et al., 2005.
P. galioides	Quinonas preniladas	Anti-Leishmania	Mahiou et al., 1996.
	Difenóis prenilados	Antiparasitária	Mahiou et al., 1995.
	Óleo essencial	Antibacteriana	De Feo et al., 2008.
P. heyneana	Lignóides	Antiviral (HIV)	Zhang et al., 2007.
P. pellucida	Lignóides	Citotóxica	Xu et al., 2006.
	fenilpropanóides	Antifúngica	Ragasa et al., 1998.
	Extrato	Anti-inflamatória Analgésica	Arrigoni-Blank et al., 2004.
		Antibacteriana	Mendes et al., 2011.
P. alata	Acilrescorcinóis	Antifúngica	Reigada et al, 2005

1.2.3 *Peperomia pellucida*

A espécie *Peperomia pellucida* (L.) Kunt (FIG. 1.2) conhecida como erva de jabuti é identificada como erva terrestre e epifítica, suculenta, com pontuações translúcidas, caule ereto e ramificado. Folhas alternas, longo-pecioladas; lâmina ovada, 1,5 - 2,5 x 1 - 2 cm, base cordada, ápice agudo e membranácea. Espigas terminais, axilares ou opositifólias com até 5 cm de comprimento; pedúnculo com cerca de 5 mm de comprimento, bractéolas arredondado-peltadas, flores esparsamente dispostas, drupa elipsóide, não estipitada, longitudinalmente estriada (Guimarães, 2004).

FIGURA 1.2 - *Peperomia pellucida* (L.) Kunth.

A *Peperomia pellucida* é amplamente distribuída na Ásia (Egwuche, 2011), África (Aziba, 2001), nas Américas do Norte, Central e do Sul (Khan, 2010). No Brasil ocorre desde o Amazonas até o Paraná, crescem em locais úmidos, principalmente em paredões e muito freqüentemente em jardins, em clima tropical e subtropical.

Esta espécie é muito utilizada na medicina popular por atuar em diversos distúrbios. Na pesquisa de Egwuche e al. (2011), os autores descrevem a sua utilização para tratamentos de dores abdominais, cólicas, acnes, furúnculos, dores de cabeça, distúrbios renais e dores nas articulações.

Baseado em indicações populares, a espécie é indicada para problemas relacionados às doenças do sistema geniturinário, como rins, inflamação de útero e ovário e pedra nos rins (Silva, 2008).

Segundo Guimarães et al. (2004), a planta é usada para combater a tosse ou a dor de garganta, sendo ainda antipruriginosa e diurética, utilizada sob a forma de chá ou infusão preparados com toda a planta, incluindo as raízes. Não raro, é consumida como excelente salada.

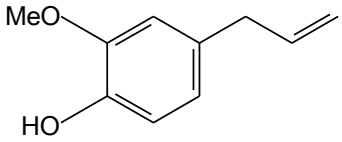
Segundo Munhoz et al. (2000), na Bolívia a planta inteira é utilizada para estancar hemorragias, conhecimento passado pelos povos indígenas. As raízes são utilizadas para tratamento da febre a as partes aéreas são utilizadas para cobrir as feridas, como cicatrizante.

Khan et al. (2007) investigaram os efeitos antipiréticos de extratos obtidos de folhas de *Peperomia pellucida* (L.) Kunt mostrando que houve uma redução significativa na temperatura dos animais estudados.

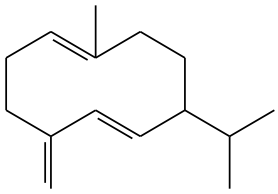
Aziba et al. (2001) determinou a atividade analgésica em extratos das partes aéreas de *Peperomia pellucida* em camundongos.

Segundo Mutte et al. (2010), o extrato obtido de *P. pellucida* reduziu significativamente edema induzido em camundongos. Os resultados obtidos no estudo sugerem que a planta é uma boa fonte natural para terapia anti-inflamatória.

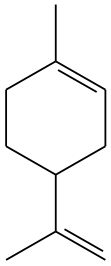
Do ponto de vista químico já foram isolados metabolitos secundários, os quais são substâncias sintetizadas pelas plantas com funções de defesa ou atração, principalmente. Entre os metabólitos secundários isolados destacam-se os terpenos e os fenilpropanóides (FIG 1.3)



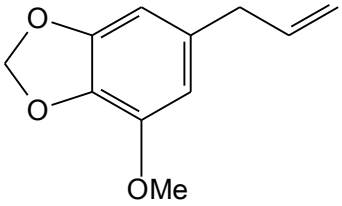
eugenol



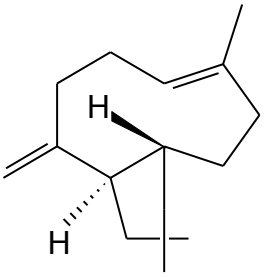
germacreno D



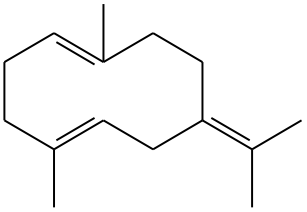
limoneno



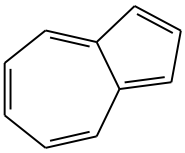
miristicina



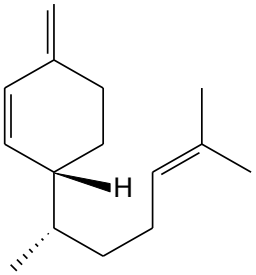
trans-cariofileno



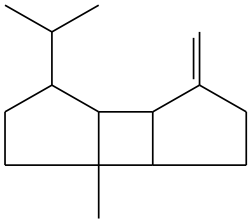
germacreno B



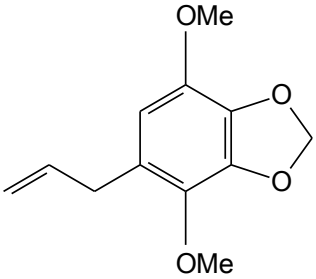
azuleno



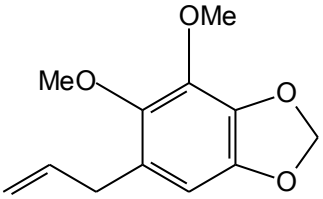
beta-sesquifelandreno



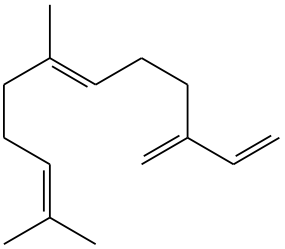
beta-bourboneno



apiol

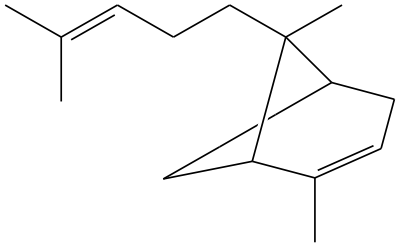


dilapiol

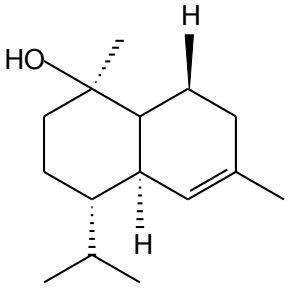


beta-farneseno

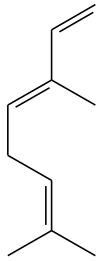
FIGURA 1.3 - Metabólitos secundários isolados de *Peperomia pellucida*.



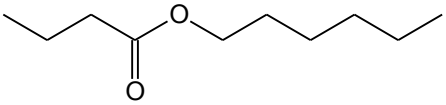
trans-alfa-bergamoteno



alfa-cadinol



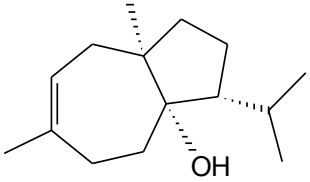
(E) - beta-ocimeno



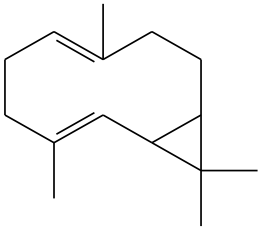
butanoato de hexila

$CH_3(CH_2)_9CH_3$

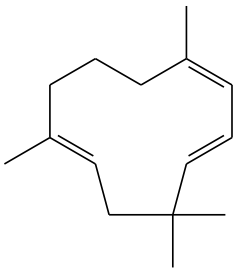
undecano



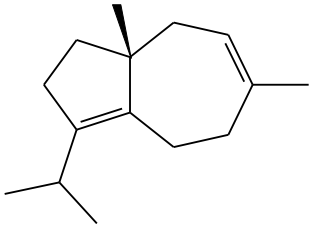
carotol



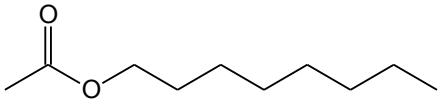
biciclogermacreno



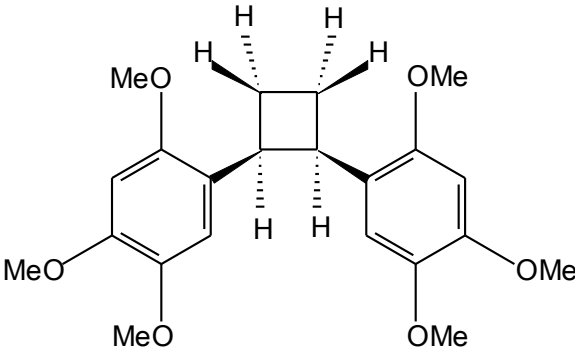
alfa-humuleno



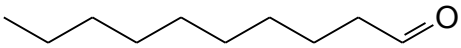
dauceno



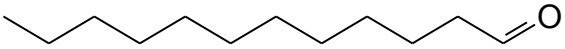
acetato de octila



pellucidina A



decanal



dodecanal

FIGURA 1.3 - Continuação.

1.3. Considerações sobre o fungo *Aspergillus flavus*

Os fungos constituem um grupo de microrganismos amplamente encontrado nos vários ambientes terrestres: ar, água e solo. Esses microrganismos toleram uma ampla faixa de condições para seu crescimento, relacionadas com a umidade, pH, temperatura e nutrientes disponíveis no substrato. Por esse motivo, podem adaptar-se facilmente em alimentos (Esper, 2011).

Os fungos mais comuns encontrados em alimentos e produtos estocados pertencem ao gênero *Aspergillus*. Esses fungos são capazes de produzir uma grande quantidade de enzimas que provocam a deterioração dos alimentos e algumas especies podem produzir toxinas (micotoxinas) causando significativas perdas econômicas e sérios problemas à saúde humana e animal (Ritter, 2007).

O fungo *Aspergillus flavus* (FIG. 1.4) ocorre em solos de todo o mundo se alimentando de substâncias orgânicas normalmente provenientes de matéria em decomposição. É caracterizado pelo desenvolvimento de colônias de coloração esverdeada e é a espécie mais comumente implicada na contaminação de alimentos por micotoxinas (Taniwaki e Silva, 2001).

FIG. 1.4 - Contaminação de culturas de milho por *Aspergillus flavus.*

O *Aspergillus flavus* provoca doenças em varias culturas agrícolas importantes, como o milho, amendoim e algodão, antes e depois da colheita, não necessariamente reduzindo o rendimento, mas causando perdas econômicas por

meio da contaminação de sementes por aflatoxinas. Este fungo também causa doenças em animais e humanos, quer através de consumo de alimentos contaminados, causando aflatoxicose ou câncer de fígado; ou através de crescimento invasivo, causando a aspergilose, que é, muitas vezes, fatal em seres humanos que estão imunocomprometidos (Amaike e Keller, 2011).

1.3.1 Aspergilose e Aflatoxicose

Aspergilose é um termo usado para infecção causada por *Aspergillus* aos seres humanos e animais e a espécie *Aspergillus flavus* é um dos agentes causadores de aspergilose, junto com pelo menos 20 outras especies de *Aspergillus* (Krishnan, 2009).

A maioria das infecções humanas surge através da inalação de esporos dos fungos. As manifestações clínicas de aspergilose são classificadas em alérgicas; como asma, alveolite alérgica e aspergilose broncopulmonar alérgica e em invasiva, pulmonar e extrapulmonar. Animais também podem ser infectados por *A. flavus*, em particular, coelhos, galinhas domésticas, gansos e perus (Amaike e Keller, 2011).

As aflatoxinas, descobertas há mais de 30 anos, são produzidas por algumas cepas de fungos do gênero *Aspergillus*, principalmente das espécies *A. flavus* e *A. parasiticus*, os quais se desenvolvem naturalmente em amendoim, milho, feijão, arroz, soja, trigo, entre outros (Esper, 2011). As aflatoxinas causam doenças aos seres humanos e aos animais conhecidas como aflatoxicoses. As aflatoxicoses se distinguem das aspergiloses por serem adquiridas através da ingestão de baixas doses de aflatoxinas (aflatoxicose crônica) e pela ingestão de altas concentrações de aflatoxinas (aflatoxicose aguda) (Amaike e Keller, 2011).

As aflatoxinas de um modo geral afetam praticamente todos os sistemas orgânicos dos animais, de forma que são observadas icterícia (hepatopatia), hemorragias generalizadas na musculatura (devido à fragilidade vascular), aumento no tamanho e necrose nas glândulas adrenais e enterite hemorrágica, que pode ser confundida com outras síndromes entéricas. As aflatoxinas ainda podem diminuir o desempenho reprodutivo, reduzir a produção de leite, causar teratogênese, ser cancerígena e diminuir as funções imunológicas (imunossupressora) (Esper, 2011).

1.4 Óleo volátil

As atividades anti-sépticas de plantas aromáticas e medicinais e de seus extratos vêm sendo reconhecidas desde a antiguidade e os óleos essenciais têm merecido destaque especial com relação a estas atividades.

Nos últimos anos várias pesquisas vêm buscando o uso de substâncias naturais para o emprego na agricultura como fungicida, pois o uso intensivo e indiscriminado de substâncias químicas sintéticas, como os agrotóxicos, tem causado diversos problemas ao meio ambiente. Além disso, estima-se que milhares de pessoas tenham desenvolvido doenças devido à ingestão de produtos alimentícios contaminados com essas substâncias químicas sintéticas. Atualmente, os consumidores buscam o emprego de aditivos naturais, que minimizam os riscos causados por substâncias sintéticas, as quais, muitas vezes, possuem efeitos carcinogênicos (Esper, 2011).

Os óleos essenciais são complexos orgânicos constituídos por numerosos componentes. São essencialmente misturas variadas de terpenóides, especificamente monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), alguns diterpenos (C20), fenilpropanóides e uma grande variedade de hidrocarbonetos alifáticos de baixa massa molecular (lineares, ramificados, saturados e insaturados). Os terpenos e os fenilpropanóides são os principais responsáveis químicos pela fragrância e pelos usos medicinais e culinários de plantas (Navarro, 2009).

Os óleos essenciais ficam retidos em vacúolos citoplasmáticos podendo ser rompidos por danos mecânicos ou físico-químicos. Os óleos são geralmente extraídos de plantas por métodos de destilação por vapor ou hidrodestilação. Apresentam baixo ponto de ebulição e um forte aroma.

Os óleos essenciais encontram sua maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos. Esta propriedade, presente na grande maioria destes compostos, de certa maneira, representa uma extensão da própria função que exercem nas plantas, defendendo-as de bactérias e fungos fitopatogênicos (Aguiar, 2003).

As propriedades antimicrobianas de óleos essenciais e de seus constituintes são estudadas por vários autores (Naghetini, 2006). Entre as espécies de Piperaceae, alguns estudos na literatura relatam potencial atividade antifúngica dos óleos essenciais.

Silva et al. (2007) avaliaram *in vitro* a atividade antifúngica do óleo essencial em diferentes concentrações extraído de 10 espécies de *Piper* coletadas na região Amazônica sobre o crescimento dos fungos *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *P. capsici*. Os óleos essenciais de *P. callosum*, *P. marginatum var. anisatum* e *P. enckea* apresentaram ação fungitóxica significativa contra os três fitopatógenos testados.

Morandim-Gianetti et al. (2010) investigaram a composição e atividade antifúngica de óleo essencial de folhas de espécies de Piperaceae e verificaram que os óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper gaudichaudianum* e *Piper solmsianum* apresentaram alta atividade antifúngica frente ao fungo *Cryptococcus neoformans* e o óleo de *Piper gaudichaudianum* mostrou atividade frente ao fungo *C. krusei*.

1.5 – Composição elementar nas plantas

A análise da composição multielementar é importante e necessária, pois determina os elementos químicos que estão presentes na composição de uma determinada planta. Estes elementos têm um papel fundamental em todos os sistemas biológicos, pois participam de todos os processos metabólicos, como componentes de diferentes enzimas, catalisando interações químicas em células vivas (Ivyengar et al., 1970; Carvalho et al., 2007)

Os elementos químicos são classificados, quanto aos níveis de concentrações, como elementos ultra-traço, quando sua concentração é menor que 0,01 μg g^{-1}; elementos traço, quando a concentração está entre 0,01 μg g^{-1} e 100 μg g^{-1}; e elementos majoritários, quando a concentração é maior que 100 μg g^{-1} (Lindhu, 1991).

Para as plantas os elementos traço essenciais são aqueles que não podem ser substituídos por outros em suas funções bioquímicas específicas e que têm uma influência direta no organismo (Kabata-Pendias, 2000).

A matéria seca das plantas, em geral, é constituída por, aproximadamente, 44,5 % de C, 42,5 % de O, 6,5 % de H, 2,5 % de N, 1,9 % de K, 1,0 % de Ca, 0,3 % de S, 0,2 % de P e 0,2 % de Mg. Estes elementos são encontrados nas plantas em altas concentrações e, por isso, são comumente chamados de macro-elementos. Existem ainda, os micro-elementos, geralmente representados por B, Cl, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Na, Si e Zn que, embora

encontrados em pequenas quantidades, são essenciais ao desenvolvimento adequado das plantas (Vieira, 2010).

A composição mineral das plantas está relacionada com a absorção de elementos presentes no solo e nas águas, muitas vezes, contaminados pelo uso de fertilizantes, pesticidas, combustão de carvão e óleo, emissões veiculares, mineração, fundição, refinamento e incineração de resíduos urbanos e industriais.

Segundo Vaz (1995), diversos íons podem estar presentes inicialmente no solo na fase sólida ou adsorvido à fase sólida, na fase líquida, em condição imediatamente disponível para as plantas e dessa forma podem ser deslocados através do córtex e cilindro central das plantas até a parte aérea. O deslocamento depende das constantes de equilíbrio, que variam com os fatores tais como: tipo de nutriente, forma do composto, temperatura e pH.

As partes aéreas das plantas apesar de adaptadas para realização de fotossíntese, também possuem a capacidade de absorver água e nutrientes do meio externo. A mobilidade dos elementos das folhas para outras partes da planta exige um gasto de energia e ocorre inicialmente pelo tecido condutor da seiva elaborada.

Vários são os fatores que afetam a absorção dos elementos pelas folhas e os mais representativos são:

- Contato entre as folhas e as substâncias líquidas: a absorção dos elementos exige que a superfície da folha esteja molhada.

- Condições climáticas: a temperatura do ar e a umidade relativa influenciam na absorção dos elementos pelas folhas.

- Composição: cada elemento apresenta uma velocidade diferente de absorção que para um dado elemento pode ser afetada pela presença de outro elemento na solução.

- pH: afeta de maneira diversificada a absorção dos elementos; em alguns casos o pH 7 facilita a absorção do potássio e pH 3 é mais favorável à absorção do fósforo.

- Luz: aumenta a absorção foliar na medida em que esta depende do fornecimento de energia fotossintética.

- Condições das folhas: normalmente as folhas novas absorvem mais nutrientes que as velhas. Nas folhas velhas a cutícula e as paredes são mais finas

e o teor do elemento é menor nas células. As folhas secas ou murchas absorvem quantidades também menores de nutrientes.

Diante ao exposto verifica-se que vários fatores influenciam nos teores dos elementos presentes em uma determinada parte da planta. Este fato pode explicar porque as plantas provenientes de regiões distintas podem apresentar diferenças com relação à composição elementar.

As plantas medicinais contêm os elementos químicos que podem ser disponibilizados para o corpo humano em qualquer tipo de consumo das ervas e seus extratos. Nem todos os elementos possuem funções biológicas totalmente descritas, todavia a maioria deles é responsável por importantes atividades no metabolismo humano e, portanto, estão diretamente relacionados com a manutenção da saúde e o funcionamento adequado do organismo.

Vaz et al. (1995) determinaram os elementos Al, Br, Ca, Ce, Cl, Cr, Cs, Fe, K, La, Mg, Mn, Na, Rb, Sb, Sc e Zn em extratos de plantas *Achyrolcline satureoides* DC, *Casearia sylvestris*, *Centella asiática*, *Citrus aurantium* L., *Solano lycocarpum*, *Solidago microglossa*, *Stryphnondedron barbatiman* e *Zingiber officinale* R. popularmente utilizadas como medicinais.

Lésniewicz et al. (2006) determinaram a biodisponibilidade e os teores totais de macro e micro-nutrientes em ervas medicinais polonesas. Os autores apresentaram as faixas de ingestão diária recomendada e tolerável para uma série de elementos investigados, baseados em recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) para homens e mulheres adultos.

Fei et al. (2010) determinaram a concentração dos elementos traço, Ca, Fe, Na, Zn, Ba, Rb, Ce, Cr, La, Co, Th, Cs, Sb, Sc, Sm, Hf, Eu e Tb em ervas utilizadas na medicina tradicional chinesa e discutiram as possíveis interações entre as ações farmacológicas das ervas e alguns elementos.

Yamashita et al. (2006) determinaram a composição inorgânica de folhas e extratos em diferentes espécies de *Casearia genus* (C*. sylvestris, C. decandra* e *C. obliqua*). Os resultados obtidos permitiram concluir que as concentrações de elementos nessas plantas dependem da região onde foram cultivadas. Este estudo também mostrou que as amostras de folhas das diferentes espécies coletadas numa mesma região não apresentaram diferenças significativas na maioria de seus constituintes inorgânicos. Entretanto, a acumulação de elementos foram diferentes entre as espécies estudadas. Quanto

a comparação entre as composições elementares das folhas e dos extratos, os resultados indicaram que para a maioria dos elementos as concentrações obtidas para as folhas foram da mesma ordem de grandeza daquelas obtidas nos extratos.

Almeida et al. (2002) analisaram a ocorrência de minerais com comprovadas funções no metabolismo humano em dez ervas de uso terapêutico popular. Os autores compararam os resultados com os valores de ingestão diária recomendada pela ANVISA e OMS. Sugeriram estudos para a utilização dessas ervas como uma fonte alternativa complementar de Na, K, Mg, Zn, Ca, Fe e certa prudência quanto ao uso de alguns vegetais estudados, devido aos significativos teores encontrados de Al.

Sussa et al. (2009) determinaram a concentração de elementos estáveis e atividade dos radionuclideos naturais em diferentes partes de plantas medicinais de uso comum no Brasil (alho, babosa, berdroega, boldo do Chile, camomila, cáscara sagrada, chá verde, ginko biloba, ginseng e urucum) e nos seus extratos obtidos por maceração. Com relação aos elementos estáveis, os resultados indicaram que a concentração elementar apresentou uma grande variação nas diferentes espécies analisadas. Sendo que a concentração desses elementos nos extratos foram menores que as obtidas nas plantas. A comparação entre a concentração de atividade dos radionuclídeos nas plantas e nos extratos mostrou que os extratos apresentaram quase todo o conteúdo de Ra e Pb presentes nas plantas.

1.6. Radioatividade natural

A vida no planeta desenvolveu-se num ambiente sujeito às radiações de fundo, originarias de rochas que compõem a crosta terrestre e das radiações emitidas pelos radionuclídeos produzidos pela interação da radiação cósmica com a atmosfera e a crosta terrestre (Oliveira, 1988).

Os radionuclídeos de ocorrência natural estão presentes no meio ambiente como elementos traço e nestes níveis não apresentam riscos à saúde humana ou ambiental. Quando presentes em altas concentrações podem ser tóxicos ou danosos para os seres vivos, incluindo o homem. Entre estes elementos encontram-se o ^{40}K e os radioisótopos das séries naturais do urânio e tório (Ribeiro, 2004).

Nas FIG.1.5 e 1.6 são apresentadas as séries de decaimento do ^{238}U e ^{232}Th onde se observam os valores das meias vidas dos radionuclídeos produtos de decaimento e os tipos de emissão. Dentre esses radionuclídeos, os de maior interesse sob o ponto de vista de proteção radiológica são os de meia vida relativamente longa, ^{238}U, ^{226}Ra, ^{210}Pb, ^{232}Th e ^{228}Ra, os quais podem se transferir para diferentes compartimentos do ecossistema.

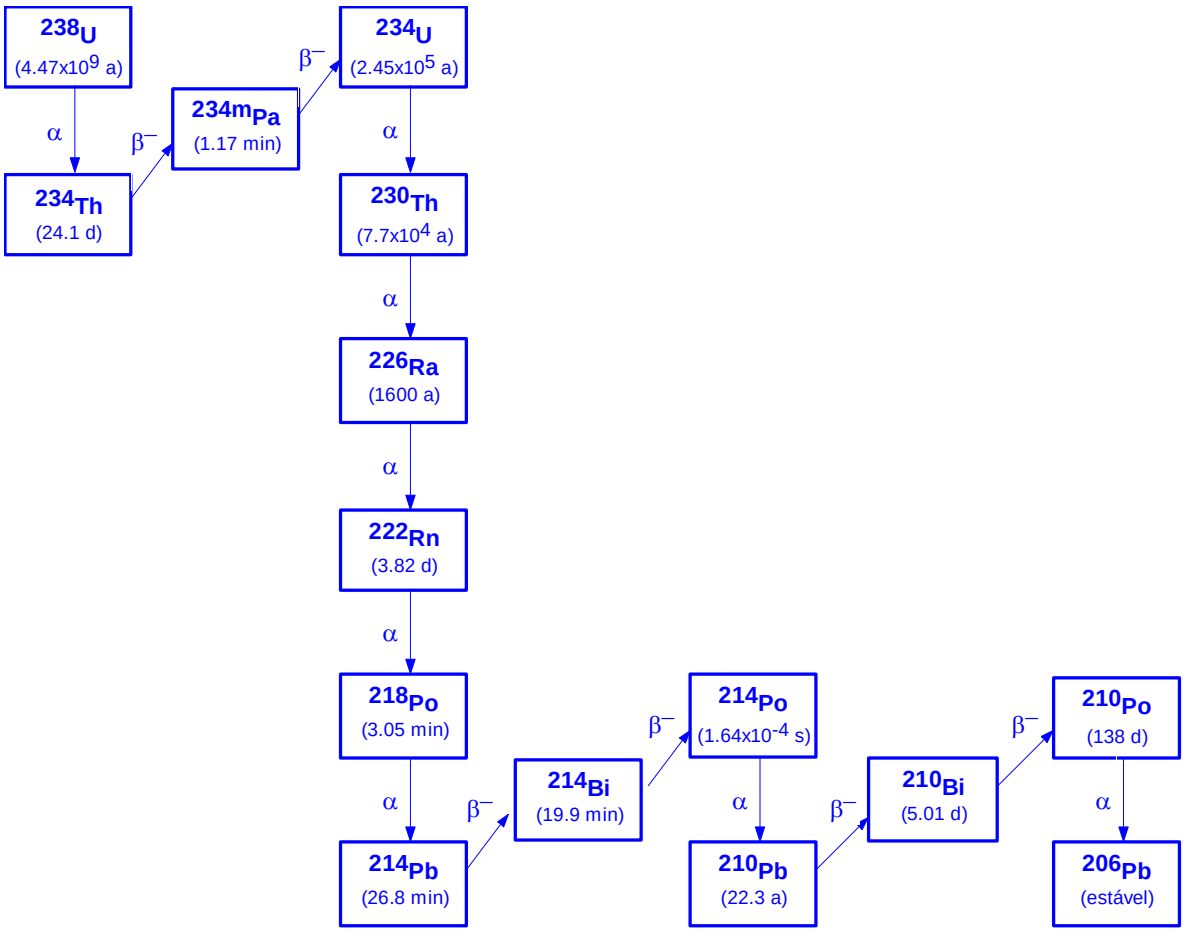


FIGURA 1.5 - Série de decaimento radioativo do ^{238}U.

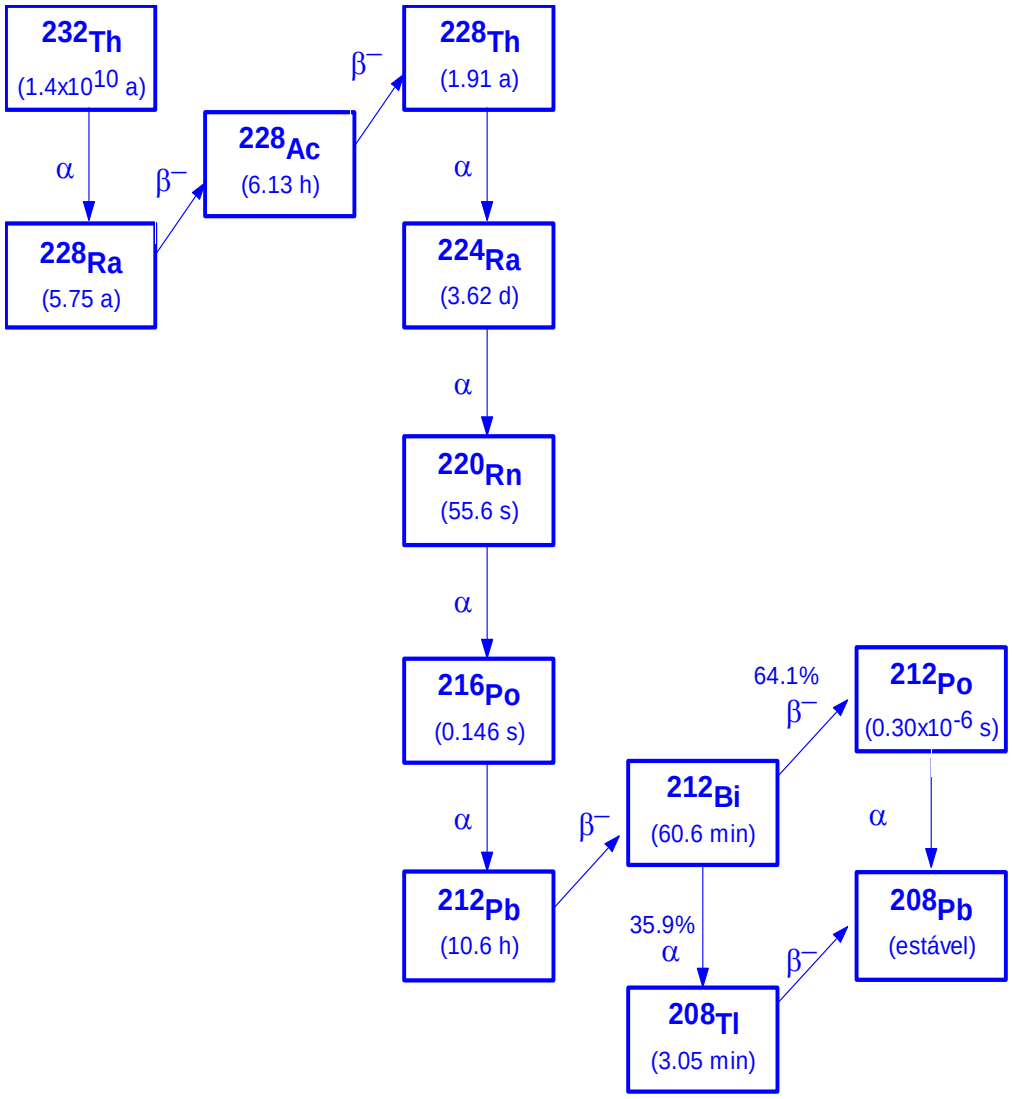


FIGURA 1.6 - Série de decaimento radioativo do ^{232}Th.

Os radionuclideos são classificados em duas classes: os cosmogênicos e os primordiais. Os primeiros são produzidos através de reações entre raios cósmicos e núcleos na atmosfera, solo e água. São emissores de raios gama, raios-X e partículas beta e o intervalo de meia vida varia de milhões de anos a uma fração de segundos.

Em termos de exposição dos seres humanos, os radionuclideos cosmogênicos que mais contribuem são o ^{3}H, ^{7}Be, ^{14}C, ^{22}Na e ^{85}Kr. Como quase todos os organismos vivos têm grande quantidade de carbono e hidrogênio, um pequeno percentual é radioativo.

Os radionuclideos primordiais são aqueles que são associados com a formação da Terra e são na sua maioria isótopos de elementos pesados que pertencem as séries radioativas naturais de decaimento do ^{238}U (abundância natural de 99,27%), ^{235}U (abundância natural de 0,73%) e ^{232}Th (abundância natural de 100%) (Klement, 1982).

Destas séries, freqüentemente a do ^{235}U é a de menor interesse devido à pequena porcentagem do isótopo na natureza.

Muitos outros nuclídeos que não pertencem às séries de decaimento radioativo também contribuem para a radioatividade natural da crosta terrestre, como o potássio, que tem além de dois isótopos estáveis, um isótopo radioativo, o ^{40}K com meia vida de $1,28 \times 10^{9}$ anos e uma abundância relativa de 0,012%.

Os radionuclideos naturais são encontrados na crosta da terra em todo o meio ambiente, como solo, água e atmosfera. Sua concentração varia com a localização geográfica, origem geológica do solo, hidrografia e agricultura. O uso de fertilizantes, em varias situações na agricultura, afeta a concentração dos radionuclideos, como no caso do ^{40}K quando são usados fertilizantes que possuem este elemento (Moreira, 1993).

Outras fontes de radiação natural são as edificações construídas com materiais como cerâmica, tijolos, revestimentos de pedra, granito, argamassa, concreto e gesso onde ocorre a emanação de gases radioativos, como o radônio. Por ser um gás inerte, difunde facilmente desses materiais para a atmosfera. Como este possui massa atômica elevada, sua concentração é maior em níveis próximos do solo, devido à decantação gravitacional. Dos filhos do radônio, os radionuclídeos que merecem maior atenção são os ^{218}Po, ^{214}Pb, ^{210}Pb e ^{214}Bi, que se depositam no pulmão. Os filhos do radônio são isótopos de metais pesados

que se fixam facilmente aos aerossóis presentes na atmosfera e seu decaimento radioativo se dá por emissão de partículas alfa e beta e raios gama (Scheibel, 2006).

As substâncias radioativas percorrem no meio-ambiente vários compartimentos, conhecidos como vias de transferência, até atingirem o homem (Leonardo, 2010). Um exemplo simplificado das principais vias de transferência dos radionuclideos no meio ambiente é apresentado esquematicamente na FIG. 1.7.

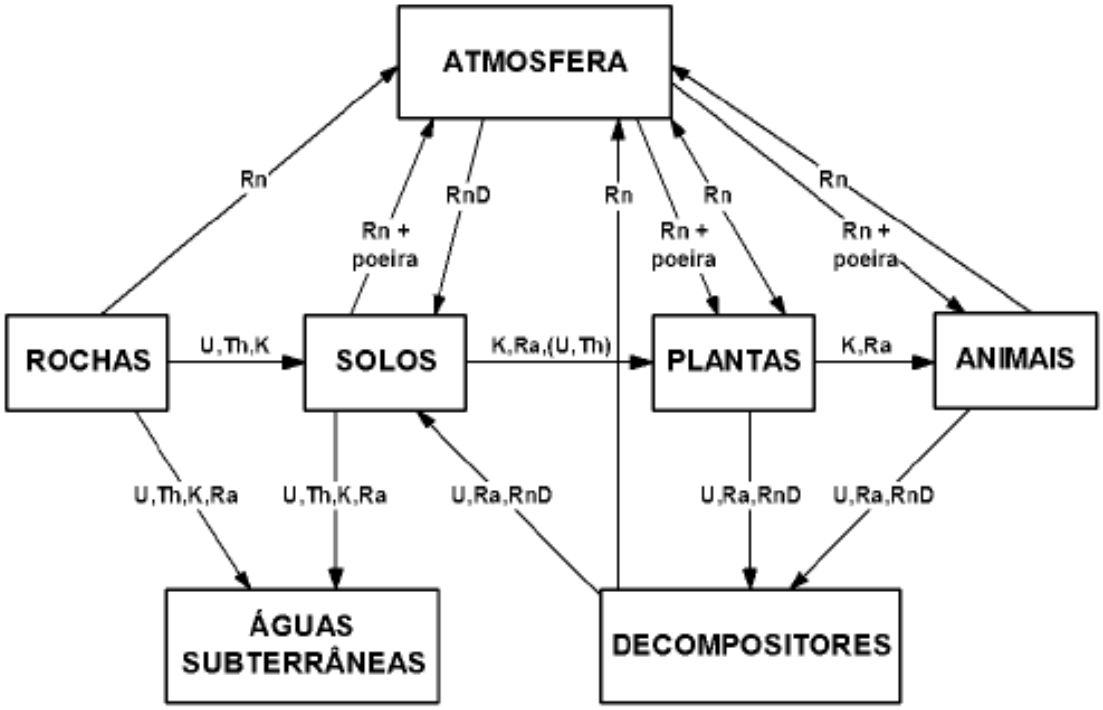


FIGURA 1.7 - Principais vias de transferência dos radionuclídeos primordiais nos vários compartimentos do ecossistema.

1.6.1 – Considerações sobre os radionuclídeos naturais ^{226}Ra e ^{228}Ra

Descoberto em 1898 pelo casal de cientistas Pierre e Marie Curie, o rádio é o elemento químico de número atômico 88, pertencente ao grupo dos metais alcalinos terrosos (Grupo 2) da tabela periódica. São conhecidos 25 isótopos de rádio com número de massa variando de 206 a 230; sendo 4 deles naturalmente radioativos: ^{223}Ra, ^{224}Ra, ^{226}Ra e ^{228}Ra (Oliveira, 1993). Dentre eles, os mais abundantes são o ^{226}Ra, emissor de partículas alfa da série de decaimento do ^{238}U, com meia-vida de 1622 anos, e o ^{228}Ra, um emissor de radiação beta da série de decaimento do ^{232}Th, com meia-vida de 5,7 anos.

Estes radioisótopos são considerados críticos em virtude de suas meias-vidas e de seus produtos de decaimento (radionuclídeos emissores de partículas alfa como o ^{222}Rn e o ^{226}Ra). Entre os radionuclídeos provenientes da cadeia de decaimento do ^{238}U, o rádio é de particular interesse por sua abundância natural, pela grande mobilidade no ambiente, meia-vida longa e, também, por sua ligação com a mineração de urânio e de outros minérios que possuem o urânio associado, como as rochas fosfáticas.

Os solos em geral apresentam teores de tório superiores aos de urânio. Portanto, há uma tendência destes apresentarem teores de ^{228}Ra maiores que os de ^{226}Ra e, conseqüentemente, a maioria dos alimentos de origem vegetal apresentam maiores teores de ^{228}Ra em relação aos de ^{226}Ra.

A ingestão de alimentos e água e a inalação são as principais vias de entrada do rádio no corpo humano. Após a sua entrada, seu comportamento metabólico é similar ao do cálcio, um elemento essencial, ficando cerca de 70 a 90% retido nos ossos, e o restante sendo distribuído uniformemente nos tecidos moles ou excretado.

O tempo de residência (meia-vida biológica) do elemento no corpo humano é significativo: a fração incorporada geralmente diminui para menos de 10% em poucos meses, mas alguma quantidade pode permanecer por toda a vida. O dano biológico mais severo é o câncer nos tecidos. O valor de referência para a ingestão anual de ^{226}Ra na dieta (comida e água) foi estimado em 22 Bq, correspondendo a uma dose efetiva anual de 6,3 μSv para adultos (Ghiassi Nejad, 2003). Adicionalmente, alguns filhos de ^{226}Ra e ^{228}Ra decaem por emissão de partículas alfa, o que aumenta o risco devido à ingestão destes isótopos.

1.6.2 – Considerações sobre o ^{210}Pb

Considerado um elemento não essencial ao metabolismo humano, o chumbo (Pb) é um metal pesado, altamente prejudicial à saúde que pode ser encontrado em muitas matrizes ambientais. Os efeitos tóxicos de chumbo envolvem vários órgãos e consequentemente desencadeia uma variedade de defeitos bioquímicos. Os efeitos mais críticos em geral são o desenvolvimento de neuropatologias, problemas hematológicos, renais, desenvolvimento da hipertensão e carcinogenicidade. Toxicidade grave de chumbo causa esterilidade, aborto e mortalidade neonatal (WHO, 1996 e Kabata-Pendias, 2007).

O ^{210}Pb junto com seu progenitor o ^{226}Ra, ambos da família do urânio, é um dos radionuclídeos naturais que contribui com a mais alta dose de radiação ao seres humanos. Após ser absorvido é distribuído pelo sangue para os tecidos moles e para o sistema ósseo de onde é lentamente eliminado (sua meia vida biológica nos ossos humanos é de aproximadamente 10 anos). O ^{210}Pb é um emissor beta com meia-vida de 22,3 anos e o seu potencial tóxico é acrescido pelas suas propriedades radiológicas. Como um produto do decaimento do ^{222}Rn (meia vida de 3,82 dias), o ^{210}Pb pode ser produzido no ar e se depositar na vegetação e no solo, e posteriormente, ser incorporado ao tecido vegetal através da absorção foliar ou radicular. Sendo a absorção pelas folhas maior do que pelas raízes, pois a absorção de ^{210}Pb pelas raízes é passiva e, assim, a taxa de sua absorção do solo é bastante baixa. A sua transferência atraves das plantas é muito limitada e uma grande proporção deste elemento é acumulado nas raízes (Moreira, 1993; Ribeiro, 2004; Kabata-Pendias, 2000).

Diante ao exposto, o estudo da composição elementar em *Peperomia pellucida* justifica-se pelo fato desta espécie ser popularmente utilizada como uma planta medicinal e serem escassos os registros sobre a constituição de elementos estáveis e sobre as concentrações de radionuclideos naturais presentes nesta espécie. E devido aos dados alarmantes sobre a contaminação de produtos alimentícios por *Aspergillus flavus,* a avaliação antifúngica do óleo essencial de *Peperomia pellucida* visa à busca de substâncias naturais que possam ser utilizadas no controle de fungos toxigênicos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho de pesquisa teve por objetivos principais:

- ✓ Determinar a concentração de elementos estáveis e radionuclídeos naturais em amostras de folhas, partes aéreas e raízes de *Peperomia pellucida*, no extrato alcoólico, na infusão e no solo onde as plantas foram coletadas;
- ✓ Avaliar a atividade biológica do óleo essencial de *Peperomia pellucida* diante ao fungo *Aspergillus flavus;*
- ✓ Determinar os compostos químicos do óleo essencial de *Peperomia pellucida*.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Utilizar a técnica de Análise por Ativação Neutrônica Instrumental para determinar os elementos As, Ba, Br, Ce, Cl, Co, Cu, Cr, Cs, Eu, Fe, Hf, K, La, Lu, Mg, Mn, Na, Nd, Rb, Sb, Sc, Se, Sm, Ta, Tb, Th, U, Yb e Zn nas amostras da planta, nos extratos obtido pelos processos de maceração e infusão e nas amostras de solo.

- Utilizar a Contagem alfa e beta total após separação Radioquímica para determinar as concentrações de atividade dos radionuclídeos naturais ^{226}Ra, ^{228}Ra, ^{210}Pb em amostras de *Peperomia pellucida*, nos extratos obtidos por maceração e infusão e nas amostras de solo.

- Utilizar a técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS) para determinação de Cd e Pb e Espectrometria de Absorção Atômica com geração de Vapor Frio (CVAAS) para determinação

de Hg em amostras de *Peperomia pellucida,* seus extratos obtidos pelos processos de maceração e infusão e nas amostras de solo.

- Aplicar o Método do Disco de Difusão para avaliar a atividade do óleo essencial e dos extratos hexânico e etanólico de *Peperomia pellucida* em cultura de *Aspergillus flavus* verificando potencial atividade antifúngica.

- Estudar a constituição química do óleo essencial de *Peperomia pellucida* utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a um Espectrômetro de Massas.

- Contribuir para a formação de um banco de dados sobre a composição inorgânica e orgânica da espécie estudada que possa, posteriormente, fornecer subsídios para estudos farmacológicos e de interesse agrário.

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 Descrição dos pontos de coleta

As amostras foram coletadas no Jardim Botânico no estado do Rio de Janeiro e em alguns pontos nas suas proximidades.

O Jardim Botânico do Rio de Janeiro (FIG. 3.1) localiza-se no bairro de mesmo nome, na zona sul carioca. Possui uma área total de 137 hectares, área cultivada de 54 hectares, cerca de 15.300 exemplares de aproximadamente 4.300 espécies registradas em 194 famílias botânicas.

FIGURA 3.1 – Jardim Botânico do Rio de Janeiro.

O Jardim Botânico abriga as mais raras espécies de plantas da flora brasileira e de outros países. Entre os cerca de 8.200 exemplares da coleção viva do jardim, há diversas atrações, como as palmeiras imperiais, as espécies em extinção, como o pau-brasil, o aracá amarelo e o pau mulato; e os jardins japonês, sensorial, rotário, bíblico, com duas oliveiras provenientes de Portugal com mais de 1.000 anos e o novo Jardim dos Beija-Flores. Há também o

Orquidário que possui três mil exemplares de 600 espécies, o Bromeliário, que possui por volta de 1700 bromélias de diversas formações, o Violetário, a estufa das plantas insetívoras - que capturam e digerem insetos, a coleção dos cactos, considerada uma das maiores do Brasil e a coleção de plantas medicinais. São ao todo 197 canteiros de coleções de plantas e seis lagos, onde também estão inseridas plantas aquáticas, como espécies de vitórias-régias (Mizrahi, 2007).

O primeiro ponto de coleta (P1) está localizado dentro do Jardim Botânico, num local conhecido como Casa dos Pilões (FIG. 3.2).

A Casa dos Pilões é uma área de grande importância do Jardim Botânico, pois foi construída em 1800 pelos Portugueses para fazer parte da Fábrica de Pólvora, com o objetivo de produzir os explosivos que abasteciam o mercado brasileiro e era utilizado para conter revoltas populares (Mizrahi, 2007).

Neste ponto encontra-se o Rio dos Macacos, uma bacia hidrográfica importante no período regencial, que abastecia as residências e fábricas instaladas na época e ainda hoje irriga essa localização e parte do Jardim Botânico (Gouveia, 2007).

FIGURA 3.2 – Ponto de coleta: Casa dos Pilões (I), planta coletada (II) e Rio dos Macacos (III). Imagens: Lídio Parente, Fábio Sussa e Maria Teresa de Jesus Gouveia.

Os outros pontos de coleta (P2 e P3) estão localizados nas proximidades do Jardim Botânico.

Os pontos de coleta foram determinados com base na ocorrência da espécie estudada (FIG. 3.3).

FIGURA 3.3 - Pontos de coleta P1, P2 e P3.

3.2 Coleta e preparação das amostras para determinação multielementar.

Foram realizadas 4 coletas nos períodos de agosto de 2009 (P1), agosto de 2010 (P2), dezembro de 2010 (P3) e fevereiro de 2011 (P3). A espécie *Peperomia pellucida* (L) Kunth foi identificada pela Profa. Dra. Elsie F. Guimarães, do Instituto de Pesquisa Jardim Botânico, RJ. A exsicata[3] foi depositada no SVMA – Herbário, localizado no Parque do Ibirapuera, SP, s/nº PMSP 13184.

As amostras de solo foram coletadas nos três pontos (P1, P2 e P3) na faixa de 0 – 5 cm de profundidade.

Após a coleta, as amostras de planta e solo foram submetidas a uma limpeza para separar os materiais estranhos aderidos. A limpeza mecânica foi realizada utilizando-se pinças revestidas com filme de PVC e examinando-se as amostras visualmente.

[3] Exsicata é uma amostra de planta prensada e em seguida seca numa estufa, fixada em uma cartolina de tamanho padrão acompanhadas de uma etiqueta ou rótulo contendo informações sobre o vegetal e o local de coleta, para fins de estudo botânico.

As amostras de *Peperomia pellucida* foram lavadas com água ultrapura para eliminar os particulados de solo presentes em todas as estruturas da planta e secas sobre uma superfície a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram separadas em folhas, partes aéreas (compreendendo caule e folhas) e raízes (FIG. 3.4).

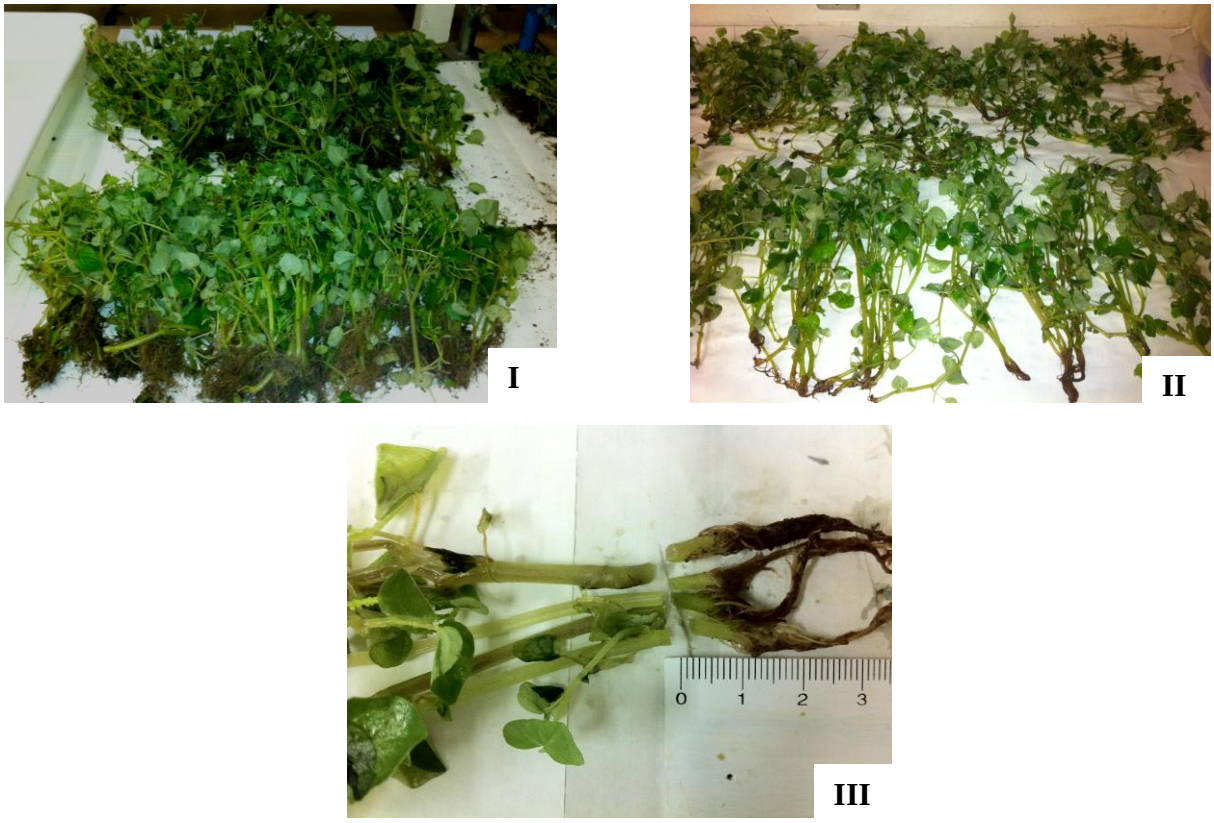


FIGURA 3.4 – Tratamentos das amostras. Limpeza (I), secagem das amostras após a lavagem (II) e separação das estruturas da planta em parte aérea e raiz (III).

Posteriormente, as amostras da planta foram secas em estufa a uma temperatura de 60°C até atingirem peso constante, pulverizadas em almofariz de vidro a uma granulometria de 100 mesh, homogeneizadas e analisadas individualmente (FIG. 3.5)

As amostras do solo foram secas em estufa a uma temperatura de 60°C, moídas a uma granulometria de 100 mesh, homogeneizada e repartidas em quantidades necessárias para realização de cada análise. Na FIG. 3.6 é apresentado o fluxograma dos procedimentos realizados nas amostras de solo para a realização das análises.

FIGURA 3.5 - Tratamento das amostras: Pesagem das amostras (I), secagem em estufa (II), amostras secas (III) e pulverização (IV).

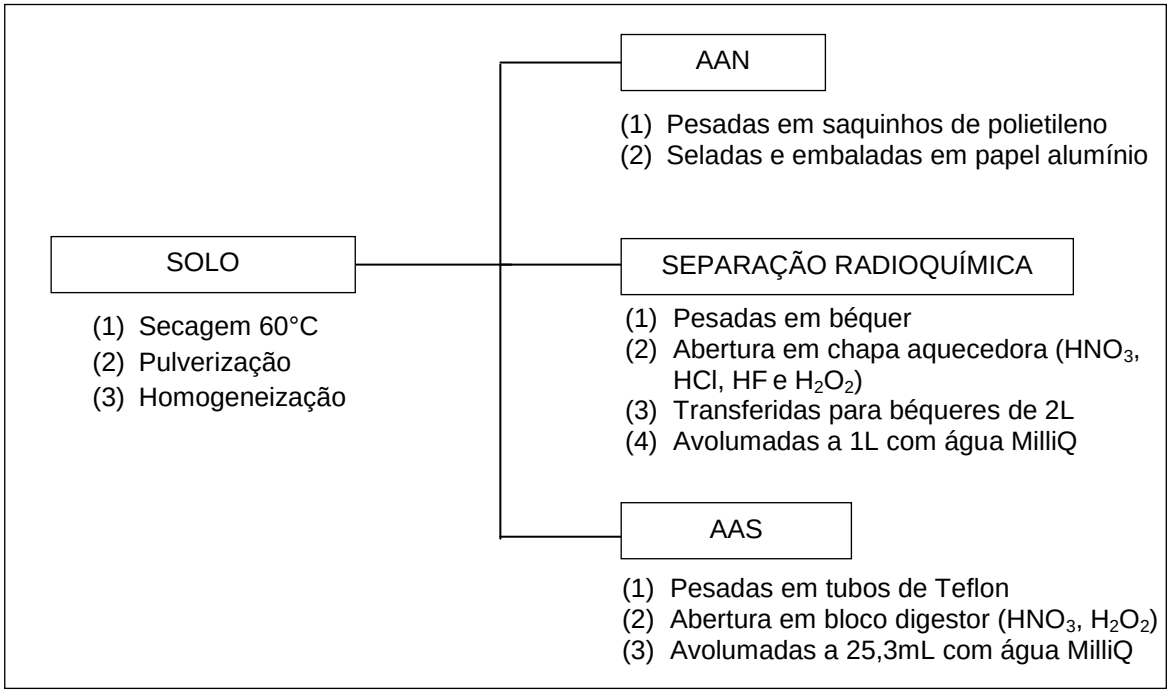


FIGURA 3.6 – Procedimentos realizados nas amostras de Solo para as análises.

3.2.1 Extração dos elementos em meio alcoólico: maceração

O método de extração utilizado foi por maceração. Este mesmo método é um dos utilizados para extração dos princípios ativos de plantas medicinais para produção de fitoterápicos. Para todos os procedimentos realizados, foram utilizadas as partes aéreas da planta, compreendendo as folhas e o caule.

Para a Análise por Ativação Neutrônica (AAN), o preparo da maceração foi realizado pesando-se de 0,5g a 1,0g de amostra pulverizada em béquer de 100 ml. A seguir adicionaram-se 50,0 ml de solução de álcool etílico 70%. A amostra foi deixada em maceração em temperatura ambiente durante 7 dias e frequentemente agitada. Após esse período, a solução foi filtrada e o resíduo foi descartado. Em seguida as soluções extrativas foram evaporadas próximo à secura e dissolvidas em meio ácido nítrico concentrado a frio, durante 1 dia e, posteriormente, foram colocadas em chapa aquecedora a 150ºC. Foi dada continuidade à adição de ácido nítrico concentrado e água oxigenada 30% até a remoção da matéria orgânica e dissolução dos minerais contidos na amostra (FIG. 3.7). No final as soluções foram completamente transferidas para papéis de filtro e estes foram acondicionados em embalagens de polietileno, selados e embalados em papel alumínio para a irradiação.

FIGURA 3.7 - Processo de extração e tratamento das amostras: Maceração em álcool (I), filtração da solução (II) e dissolução dos metais (III).

Na FIG. 3.8 é apresentado o fluxograma dos procedimentos realizados para obtenção do extrato alcoólico para AAN.

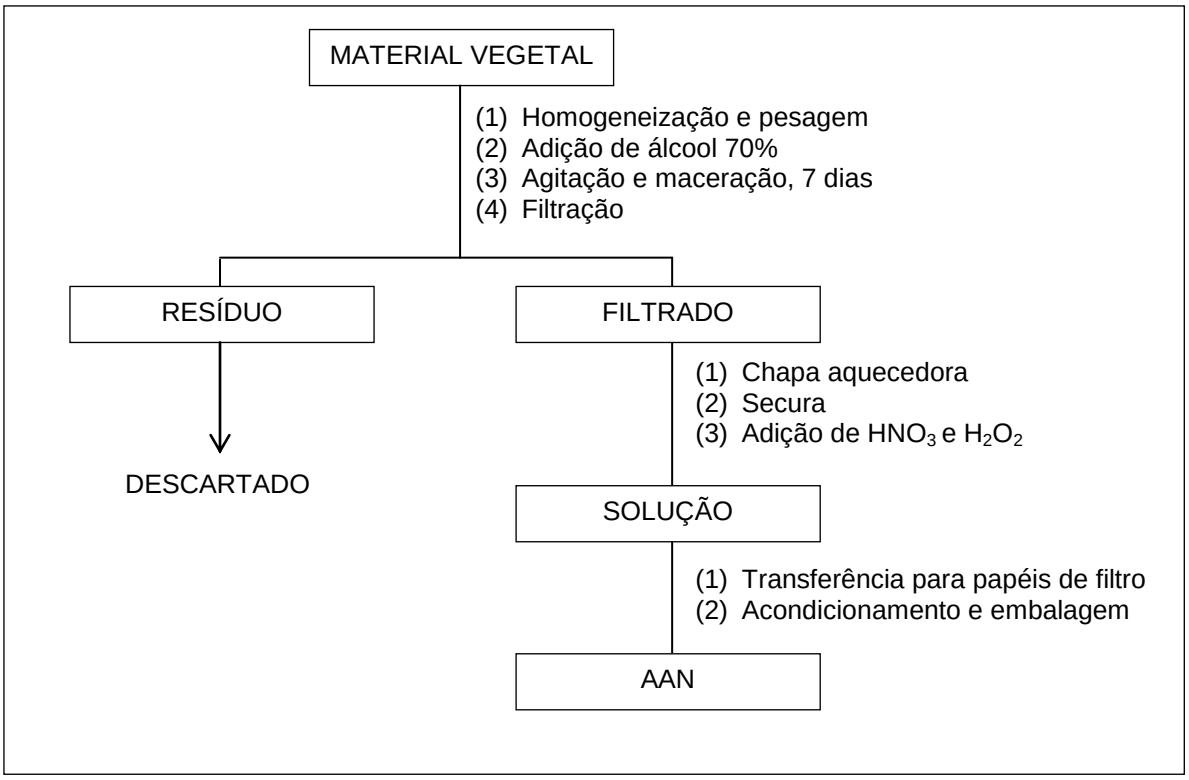


FIGURA 3.8 – Procedimentos realizados para obtenção do extrato alcoólico para AAN.

Para a determinação radioquímica de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb, o preparo da maceração foi realizado pesando-se de 0,5g a 1,0g de amostra e transferido para um béquer de 100 ml. A seguir adicionaram-se 50,0 ml de solução de álcool etílico 70%. A amostra foi deixada em maceração em temperatura ambiente durante 7 dias e frequentemente agitada. Após esse período, a solução foi filtrada e o resíduo foi descartado. Em seguida as soluções extrativas foram evaporadas próximo à secura e dissolvidas em meio ácido nítrico concentrado a frio durante 1 dia e, posteriormente, foram colocadas em chapa aquecedora a 150ºC. Foi dada continuidade a adição de ácido nítrico concentrado e água oxigenada 30% até a completa remoção da matéria orgânica e dissolução dos minerais contidos na amostra (FIG. 3.6) No final as soluções foram transferidas para béqueres de 2 L e avolumadas a 1 L com água do Milli-Q® para a determinação dos radionuclídeos.

Na FIG. 3.9 é apresentado o fluxograma dos procedimentos realizados para obtenção do extrato alcoólico para separação radioquímica.

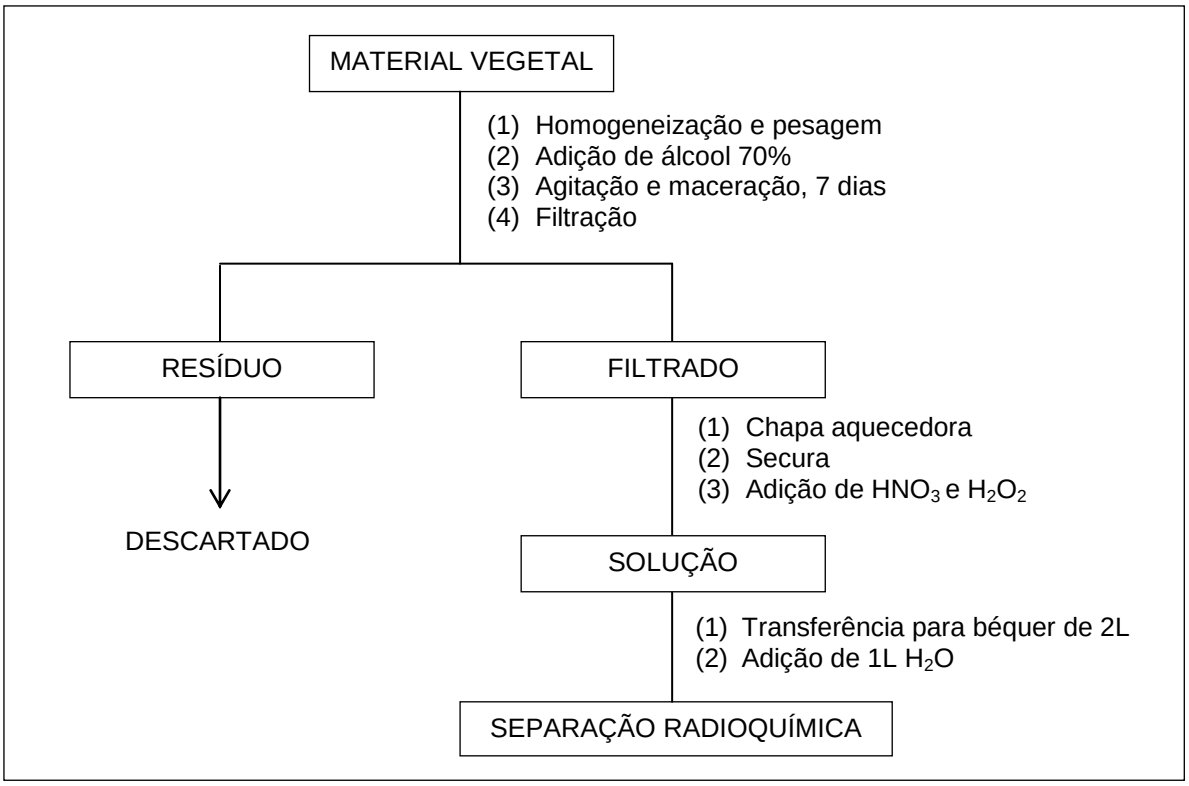


FIGURA 3.9 - Procedimentos realizados para obtenção do extrato alcoólico para separação radioquímica.

Para a análise por Espectrometria por Absorção Atômica (EAA), o preparo da maceração foi realizado pesando-se cerca de 0,5g de amostra e transferido para um béquer de 100 ml. A seguir adicionaram-se 50,0 ml de solução de álcool etílico 70%. A amostra foi deixada em maceração em temperatura ambiente durante 7 dias e frequentemente agitadas. Após esse período, a solução foi filtrada e o resíduo foi descartado (FIG. 3.6 I e II).

As soluções extrativas foram transferidas para tubos de teflon (FIG. 3.10), foram adicionados 4 ml de HNO_3 concentrado e 1 ml de H_2O_2. Posteriormente, as amostras foram submetidas à digestão a frio, durante 1 dia, e em seguida, colocadas em bloco digestor a temperatura de 90ºC por um período de 3h. No final as soluções em meio nítrico foram avolumadas a 25,3 ml com água do Milli-Q® e foram conduzidas para medida no laboratório de absorção atômica do LAN/IPEN-SP.

Todas as amostras foram preparadas em triplicata.

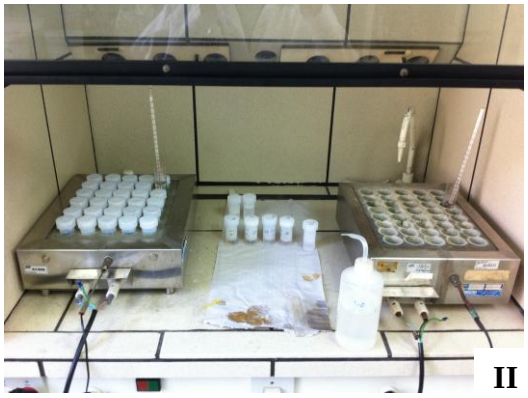


FIGURA 3.10 - Preparação das amostras para determinação por GFAAS. Tubos de Teflon (I) e bloco digestor (II).

Na FIG. 3.11 é apresentado o fluxograma dos procedimentos realizados para obtenção do extrato alcoólico para EAA.

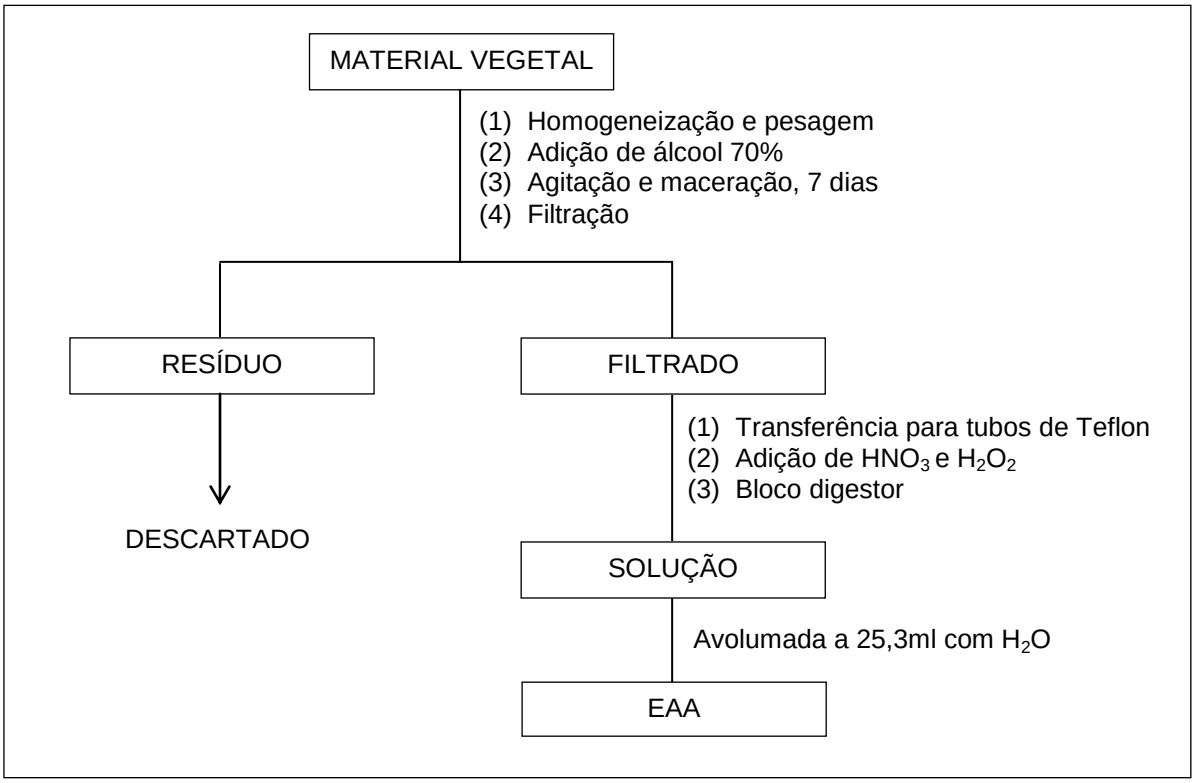


FIGURA 3.11 - Procedimentos realizados para obtenção do extrato alcoólico para EAA.

3.2.2 Extração dos elementos em meio aquoso: infusão

Considerando a forma pela qual as ervas medicinais são consumidas pela população, a extração em meio aquoso na forma de infusão é amplamente utilizada para caracterizar a disponibilidade de elementos no chá (Pereira, 2010).

Para a AAN, o preparo da infusão foi realizado pesando-se cerca de 0,5g de planta pulverizada em tubos de centrifuga com posterior adição de 50,0 ml de água Milli-Q® em ebulição no tubo. Essa mistura foi homogeneizada e mantida em repouso durante 5 minutos. Após esse período, a solução foi filtrada e o resíduo foi descartado. A solução final foi transferida para um béquer, colocadas em chapa aquecedora a 150ºC, evaporada próximo à secura e tratada em meio nítrico concentrado e H_2O_2 30% para remoção da matéria orgânica e dissolução dos minerais contidos na amostra (FIG. 3.12). No final as soluções foram completamente transferidas para papéis de filtro e estes foram acondicionados em embalagens de polietileno, selados e embalados em papel alumínio para a irradiação.

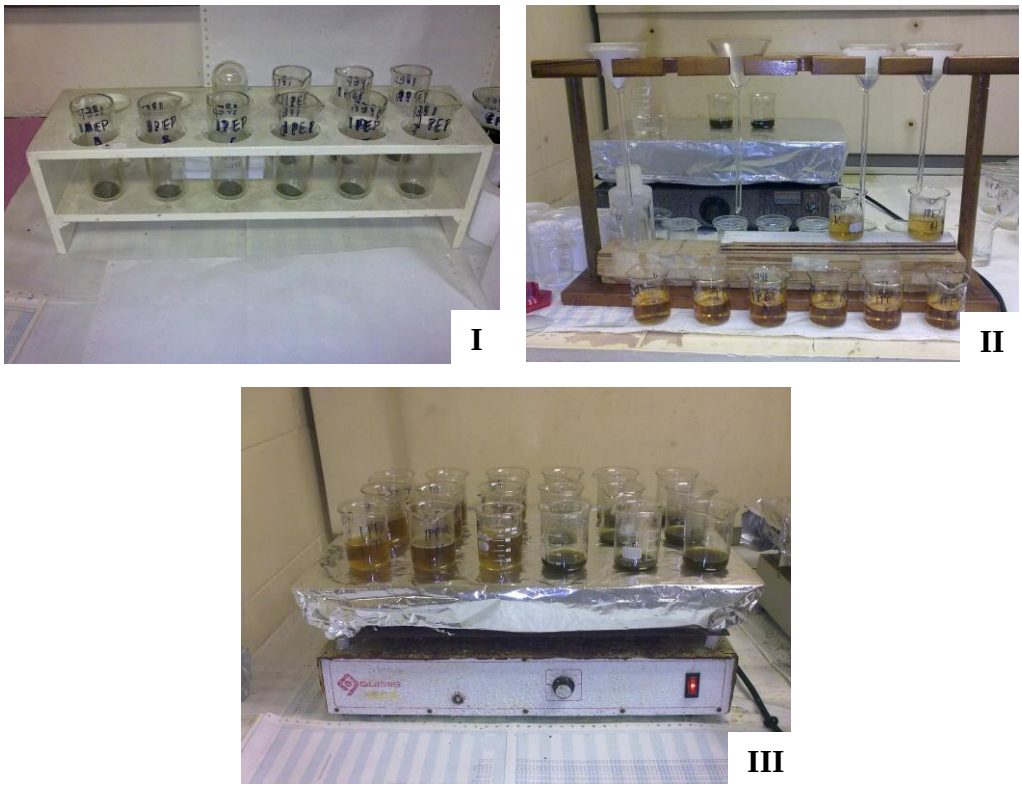


FIGURA 3.12 - Processo de infusão e tratamento das amostras: Tubos de centrífuga (I), filtração da solução (II) e dissolução dos metais (III).

Na FIG. 3.13 é apresentado o fluxograma dos procedimentos realizados para obtenção da infusão para AAN.

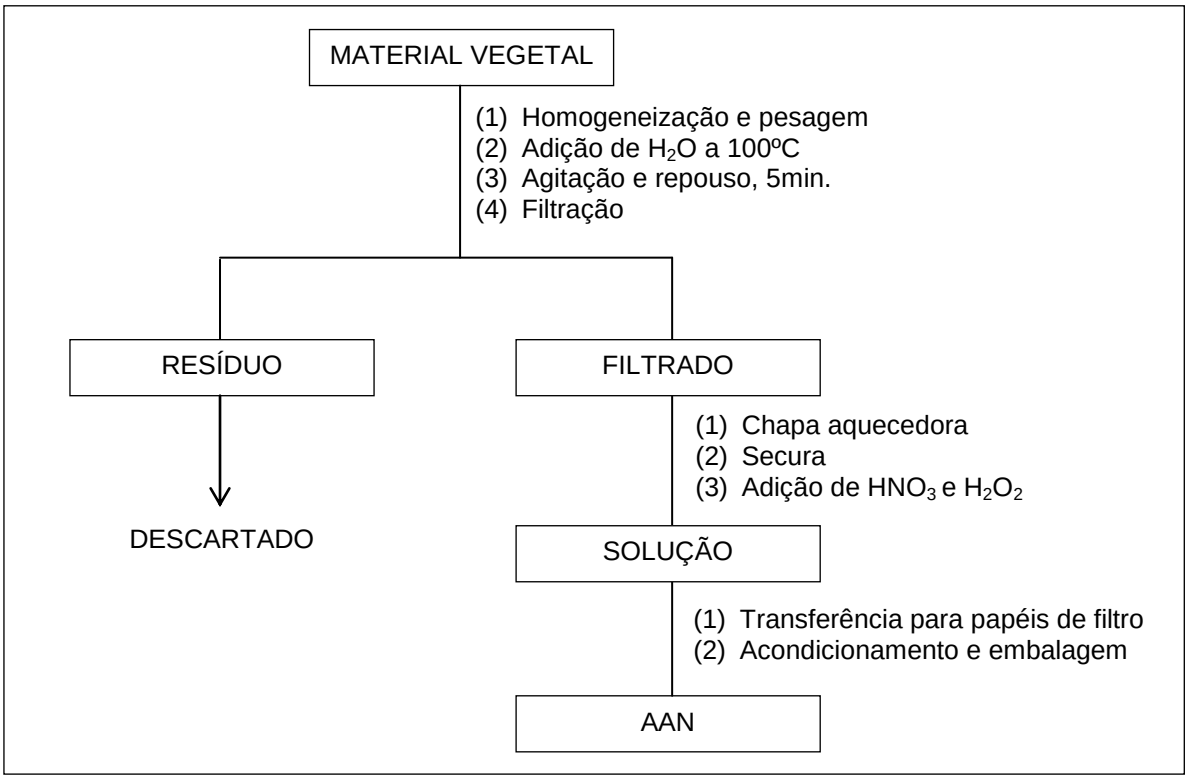


FIGURA 3.13 - Procedimentos realizados para obtenção da infusão para AAN.

Para a determinação radioquímica de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb, o preparo da infusão foi realizado pesando-se cerca de 0,5g a 1,0g de amostra. A amostra foi acondicionada em tubos de centrifuga com posterior adição de 50,0 ml de água Milli-Q® em ebulição no tubo. Essa mistura foi homogeneizada e mantida em repouso durante 5 minutos. Após esse período, a solução foi filtrada e o resíduo foi descartado. A solução final foi transferida para um béquer, colocadas em chapa aquecedora a 150ºC, evaporada próximo à secura e tratada em meio nítrico concentrado e H_2O_2 30% para remoção da matéria orgânica e dissolução dos minerais contidos na amostra (FIG. 3.12). No final as soluções foram transferidas para béqueres de 2 L e avolumadas a 1 L com água Milli-Q® para a quantificação do radionuclídeos.

Na FIG. 3.14 é apresentado o fluxograma dos procedimentos realizados para obtenção da infusão para separação radioquímica.

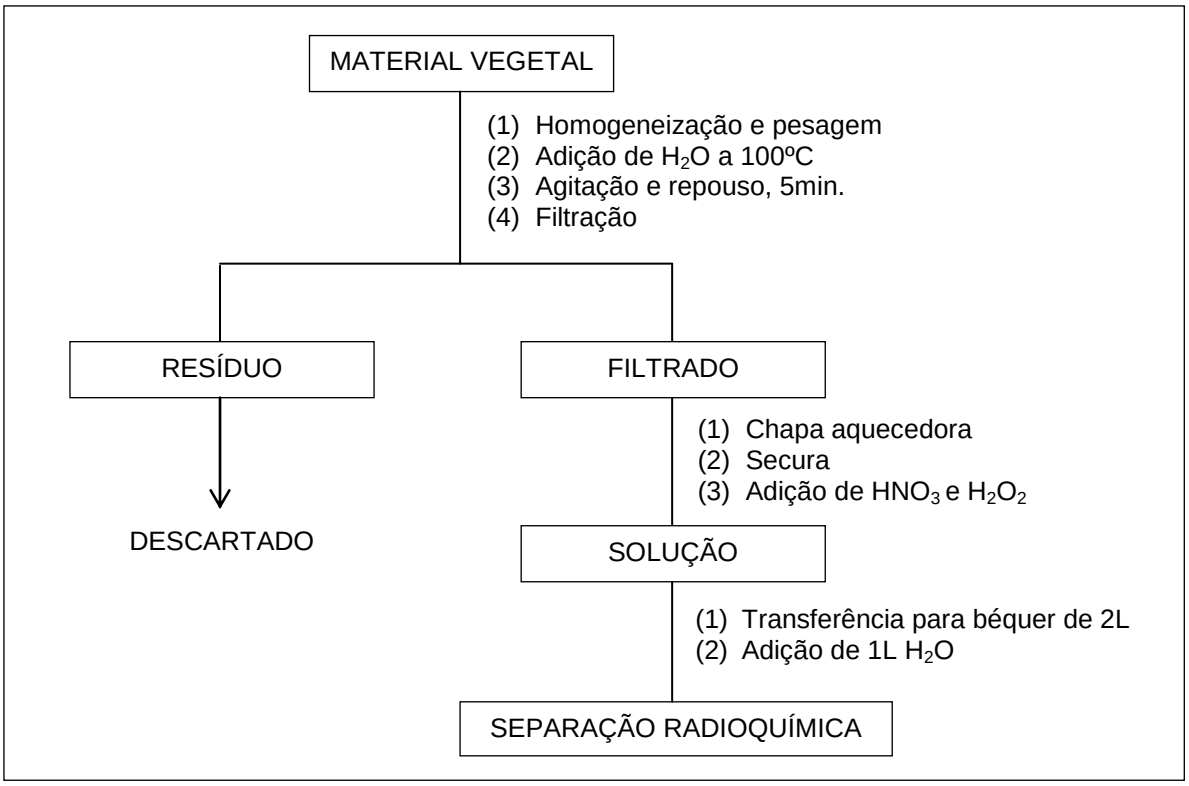


FIGURA 3.14 - Procedimentos realizados para obtenção da infusão para separação radioquímica.

Para a EAA, o preparo da infusão foi realizado pesando-se cerca de 0,5g de amostra em tubos de centrifuga com posterior adição de 50,0 ml de água Milli-Q® em ebulição no tubo. Essa mistura foi homogeneizada e mantida em repouso durante 5 minutos. Após esse período, a solução foi filtrada e o resíduo foi descartado (FIG. 3.12).

As soluções extrativas foram transferidas para tubos de Teflon (FIG. 3.10), foram adicionados 4 ml de HNO_3 concentrado e 1ml de H_2O_2. Posteriormente, as amostras foram submetidas à digestão a frio durante 1 dia e, em seguida, colocadas em bloco digestor a temperatura de 90ºC por um período de 3h. No final as soluções em meio nítrico foram avolumadas a 25,3 ml com água do Milli-Q® e foram conduzidas para medida no laboratório de absorção atômica do LAN/IPEN-SP.

Em todos os procedimentos, as amostras foram preparadas em triplicata.

Na FIG. 3.15 é apresentado o fluxograma dos procedimentos realizados para obtenção da infusão para EAA.

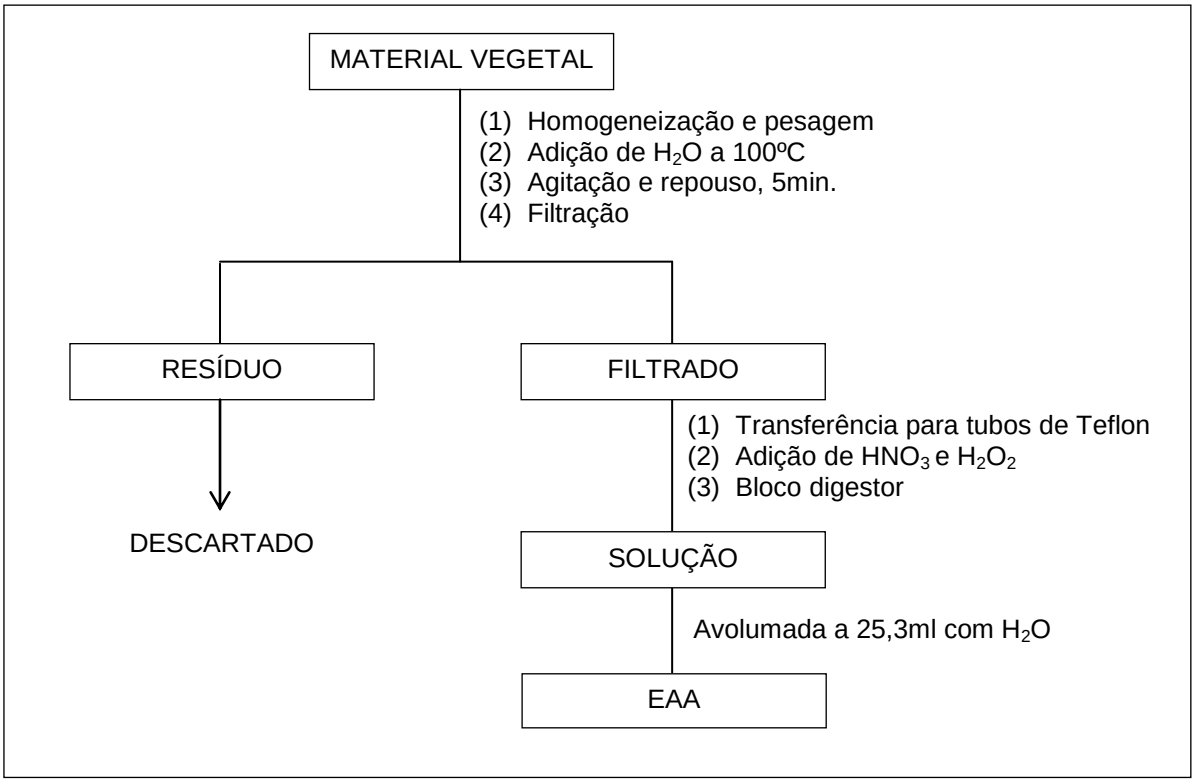


FIGURA 3.15 - Procedimentos realizados para obtenção da infusão para EAA.

3.3 Coleta e preparação das amostras para a avaliação da atividade antifúngica

Para avaliação da atividade antifúngica frente ao fungo *Aspergillus flavus* foram utilizadas as partes aéreas *in natura* de *Peperomia pellucida* coletadas no período de fevereiro de 2011 (P3).

Após a coleta, as amostras de *Peperomia pellucida* foram lavadas com água destilada para eliminar os particulados de solo presentes em todas as estruturas da planta e colocadas sobre uma superfície para secar a temperatura ambiente. Em seguida foram retiradas as raízes das plantas e descartadas. Da amostra total, uma alíquota foi separada para a preparação dos extratos hexânico e etanólico e da outra alíquota foi pesado cerca de 250g de amostras em embalagens individuais, embaladas em filme de PVC, lacradas e armazenadas sob resfriamento a 4ºC para extração do óleo essencial.

3.3.1 Preparo dos extratos hexânico e etanólico

O material vegetal separado para a extração foi seco em estufa a uma temperatura de 60°C por 24 horas, pulverizados em almofariz de vidro a uma granulometria de 100 mesh para aumentar a superfície de contato com os líquidos extratores e em seguida homogeneizados.

Foram pesados cerca de 20g do material vegetal seco, moído em um béquer e adicionado 150 ml de hexano. A solução foi deixada em repouso por 3 dias e após esse período, a solução foi filtrada e o filtrado foi transferido para um evaporador rotatório (FIG. 3.16) e o solvente foi evaporado. Ao material vegetal foram adicionados novamente 150 ml de hexano e realizados os mesmos procedimentos descritos acima até a obtenção do extrato, onde estão dissolvidas as substâncias miscíveis no meio hexânico. Este procedimento foi realizado por 3 vezes.

FIGURA 3.16 - Evaporador rotatório.

Na FIG. 3.17 é apresentado o fluxograma dos procedimentos realizados para obtenção do extrato hexânico das partes aéreas de *Peperomia pellucida*.

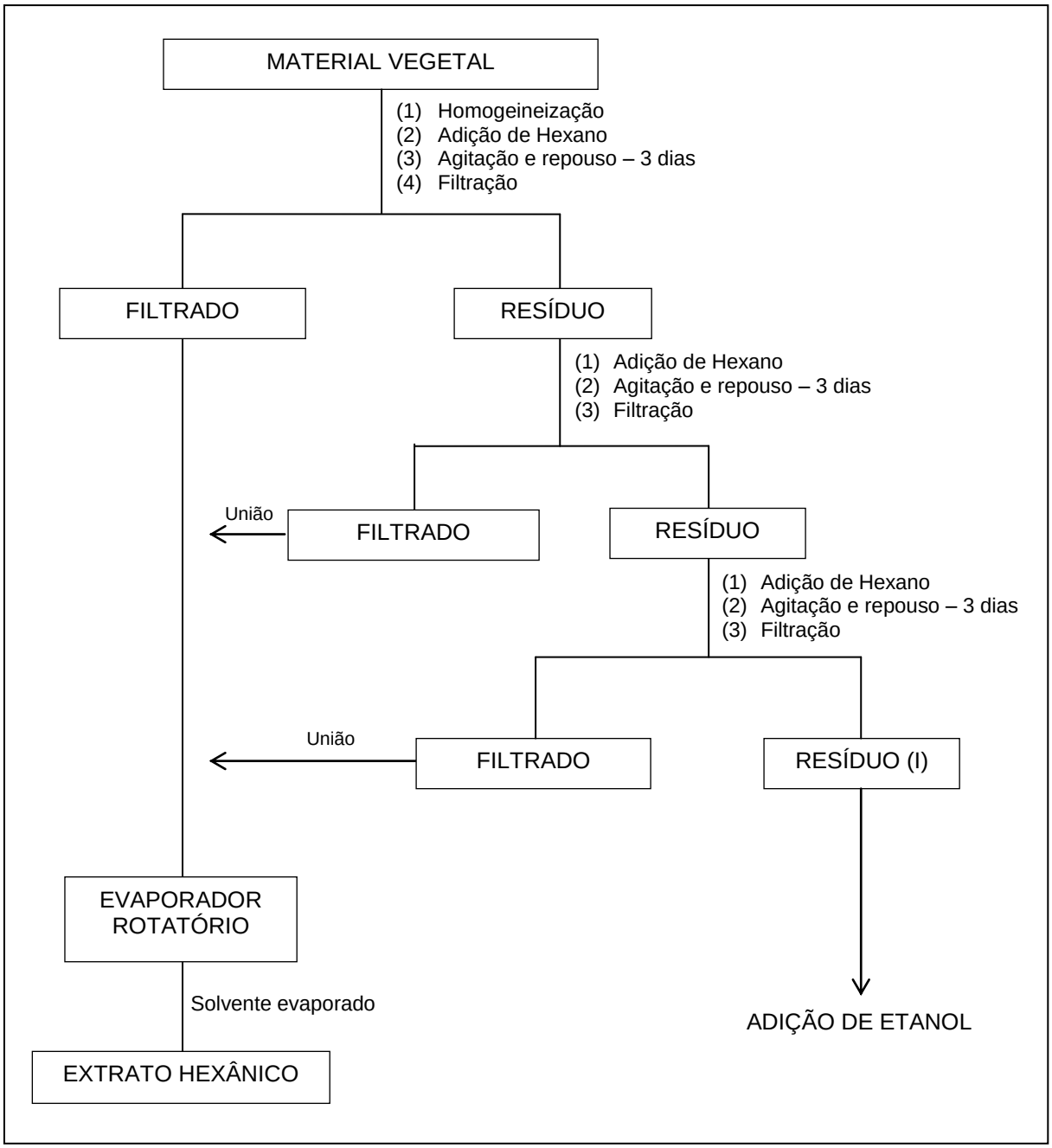


FIGURA 3.17 – Procedimentos realizados para obtenção do extrato hexânico das partes aéreas de *Peperomia pellucida*.

No mesmo material vegetal extraído com hexano foi adicionado 150 ml de etanol absoluto e a solução foi deixada em repouso por 3 dias para obtenção do extrato etanólico. Após esse período, a solução foi filtrada e o filtrado foi transferido para um evaporador rotatório (FIG. 3.16) e o solvente foi evaporado. Novamente foram adicionados 150 ml de etanol e prosseguiu-se com a extração por mais 2 vezes. Obteve-se um extrato com as substâncias miscíveis no meio alcoólico.

Na FIG. 3.18 é apresentado o fluxograma dos procedimentos realizados para obtenção do extrato etanólico das partes aéreas de *Peperomia pellucida*.

Os extratos hexânico e etanólicos obtidos foram armazenados em frasco âmbar e colocados em dessecador até a realização dos ensaios microbiológicos. Os ensaios foram realizados no Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo.

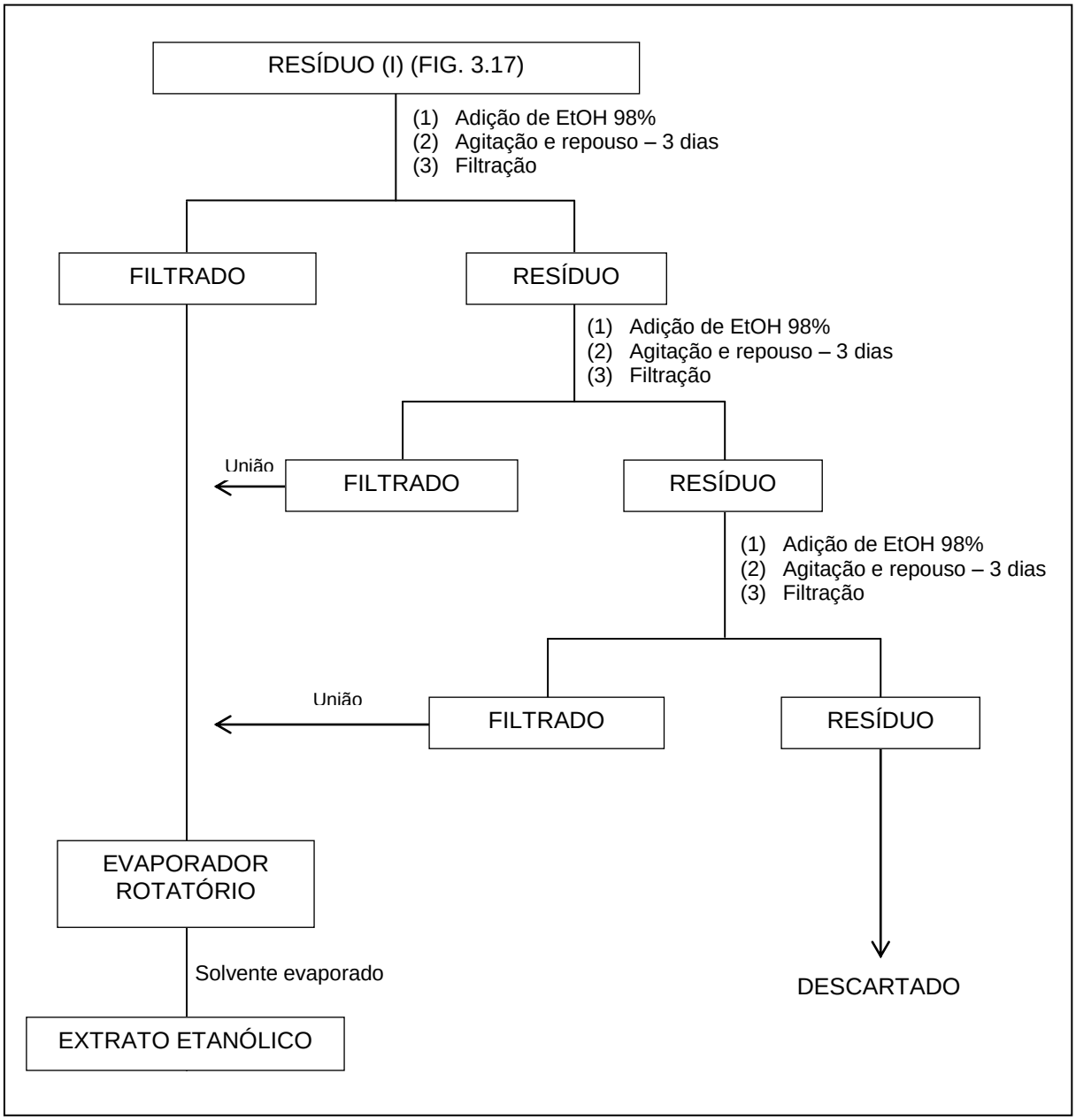


FIGURA 3.18 – Procedimento realizado para obtenção do extrato etanólico das partes aéreas de *Peperomia pellucida*.

3.3.2 Extração do óleo essencial de *Peperomia pellucida*

Para obtenção da fração volátil, as amostras da planta *in natura* foram submetidas à extração por hidrodestilação (FIG. 3.19) em aparelho de Clevenger segundo a Farmacopéia Brasileira (1988).

Cerca de 250g de amostra de *Peperomia pellucida* foi reduzida a pequenos fragmentos e colocados em um balão de fundo redondo com capacidade para 1000 mL. Foram adicionados 500 mL de água destilada e submetida à extração por 2h após a ebulição. Depois de obtido o hidrolato (mistura de água + óleo), o óleo foi separado da mistura com 150 mL hexano em funil de separação. Este procedimento foi repetido por 3 vezes. A fração orgânica foi submetida à secagem utilizando sulfato de sódio anidro para adsorver qualquer gotícula de água ainda presente na solução. Após 5 minutos em repouso a solução foi filtrada e deixada até a total evaporação do hexano a temperatura ambiente. O óleo obtido foi transferido para frascos âmbar e mantido sob refrigeração a 4°C até a realização dos ensaios microbiológicos.

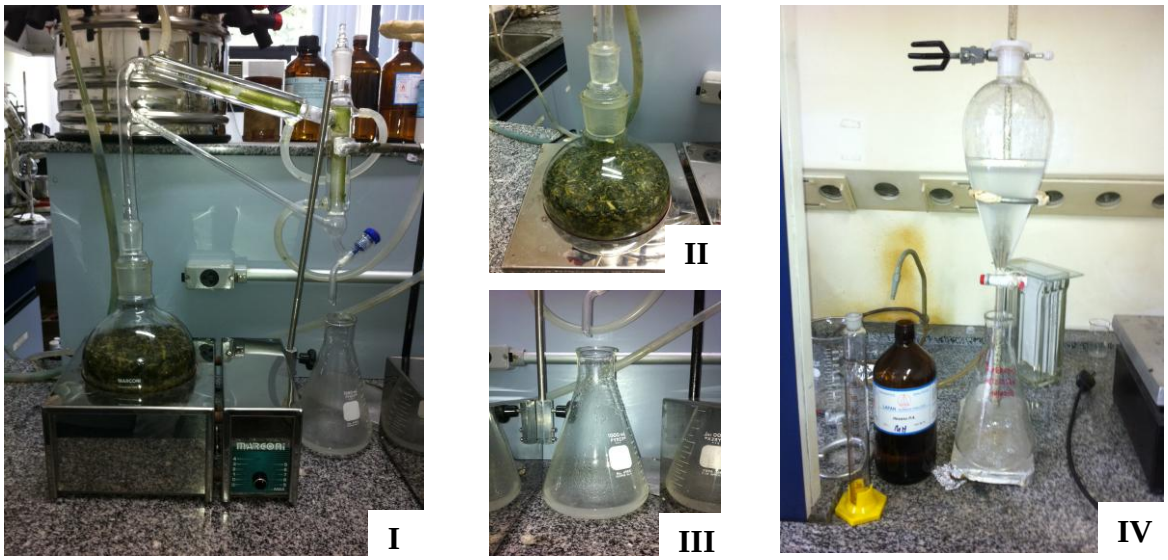


FIGURA 3.19 - Equipamentos utilizados no processo de extração do óleo essencial de *Peperomia pellucida*: Aparelho de Clevenger (I), balão fundo redondo (II), erlenmeyer (III) e funil de separação (IV).

O cálculo do rendimento (R%) do óleo obtido foi determinado pela Eq. 3.1.

$$R(\%) = \frac{\text{massa do óleo obtido}}{\text{massa total de planta } \textit{in natura}} \times 100 \qquad \text{(Equação 3.1)}$$

Na FIG. 3.20 é apresentado o fluxograma dos procedimentos realizados para obtenção do óleo essencial das partes aéreas de *P. pellucida*.

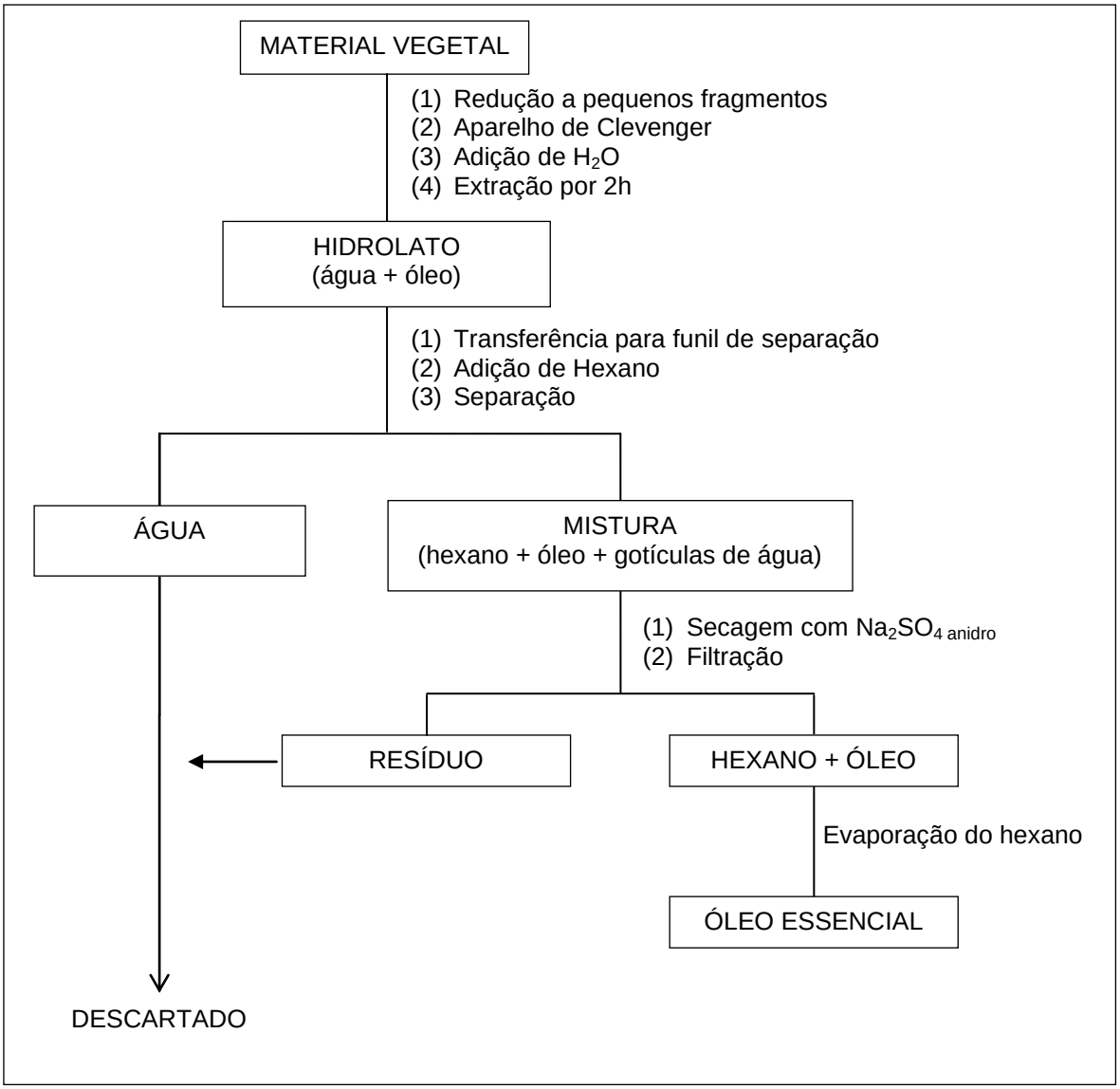


FIGURA 3.20 - Procedimentos realizados para obtenção do óleo essencial das partes aéreas de *P. pellucida*.

4. METODOLOGIAS ANALÍTICAS

4.1 Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (AANI)

4.1.1 Princípios do método

Esta técnica consiste no bombardeamento de um dado material, por nêutrons, formando radionuclídeos artificiais, seguido da medida da radioatividade induzida. O método baseia-se em uma reação nuclear resultante da interação de um nêutron (n) com um núcleo alvo produzindo um núcleo composto, em estado excitado, que irá decair de acordo com a meia vida do nuclídeo formado, através da emissão de um ou mais raios gama (γ) característicos. A reação (n, γ) é a mais comumente empregada em análise por ativação devido a sua maior probabilidade de ocorrência, tanto com nêutrons térmicos como com nêutrons epitérmicos. As atividades induzidas são determinadas por meio de detectores semicondutores que, atualmente, possuem grande capacidade para medir e discriminar as energias dos raios gama emitidos pelos nuclídeos excitados.

Em geral, a irradiação é feita com nêutrons térmicos e a radioatividade resultante é medida usando-se espectrometria dos raios γ emitidos pelos radioisótopos formados (IAEA, 1990).

A intensidade da radiação emitida é proporcional à concentração do nuclídeo na amostra e, uma vez que, cada radioisótopo, produzido no processo de ativação, possui características próprias de emissão (meia vida e energia das partículas ou radiação gama), é possível efetuar determinações por meio de comparação com a concentração em padrões certificados.

O procedimento geralmente utilizado para calcular a concentração de um elemento numa amostra desconhecida é irradiar esta amostra junto com um padrão de comparação, contendo uma quantidade conhecida do elemento de interesse. Este método comparativo permite determinar as concentrações desconhecidas dos elementos de interesse na amostra a partir das taxas de

contagens da amostra e do padrão, conhecendo as massas dos mesmos (Guimarães, 2011).

A equação utilizada para calcular a concentração de um elemento desconhecido na amostra em relação ao padrão de comparação é apresentada na Eq. 4.1.

$$C_{ai} = \frac{(A_{ai}\, m_p\, C_{pi})\, e^{-\lambda(ta - tp)}}{A_{pi}\, m_a} \qquad \text{(Equação 4.1)}$$

onde:

C_{ai} : concentração do elemento i na amostra (µg g^{-1} ou %)
C_{pi}: Concentração do elemento i no padrão (µg g^{-1} ou %)
A_{ai}: Atividade do elemento i na amostra (cps)
A_{pi}: Atividade do elemento i no padrão (cps)
m_a e m_p: massas da amostra e do padrão, respectivamente (g)
λ: Constante de decaimento do radioisótopo (t^{-1})
t_a - t_p : diferença de tempo entre as contagens da amostra e padrão, respectivamente (min).

A análise por ativação com nêutrons é um método de análise multielementar não destrutivo, podendo-se determinar até 40 elementos em uma mesma amostra. Apresenta alta sensibilidade para níveis de concentração da ordem de ppm e ppb, alta especificidade e alta seletividade (Silva, 1998; Fei et al., 2010; Moreira et al., 2007). Esta técnica tem sido empregada na caracterização elementar de amostras de plantas medicinais e vem sendo utilizada em diferentes estudos pelo grupo de pesquisadores do Laboratório de Ativação Neutrônica (LAN) do IPEN/CNEN-SP

4.1.2 Preparação e irradiação das amostras

Para a irradiação foram pesados aproximadamente 150 mg das amostras secas e moídas de Folhas (FPEP), Partes Aéreas (PPEP), Raízes (RPEP) e Solo (SPEP) que foram irradiadas juntamente com 150 mg dos materiais de referência certificados. Como materiais de referência certificados foram utilizados o IAEA-336 (Lichen), IAEA-Soil-7, NIST-8704 (Buffalo River Sediment-BRS), IWG-GIT-basalt (BE-N1), NIST-1696a (Estuarine Sediment-ES) e IAEA-326 (Radionuclides in Soil) cujos elementos e suas concentrações são mostrados na TAB. 4.1.

TABELA 4.1 - Elementos e suas concentrações (média ± desvio), em µg g^{-1}, nos materiais de referência utilizados para AAN.

Elemento	IAEA-336 (Lichen)	IAEA-Soil-7 (S7)	NIST-8704 (BRS)	NIST-1696a (ES)	IWG-GIT-basalt (BE-N1)	IAEA-326
As	0,6 ±0,2	13 ±2	17	6,2 ±0,2	1,8 ±0,3	
Ba	6 ±2	159 ±73	413 ±13	210	1025 ±30	
Br	13 ±3	7 ±5				
Ce	1,3 ±0,3	61 ±12	67 ±2	34	152 ±4	
Cl	1900 ±496					
Co	0,3 ±0,1	9 ±2	13,6 ±0,4	5	60 ±2	
Cr	1,1 ±0,4	60 ±40		41 ±2	360 ±12	
Cs	0,11 ±0,02	5 ±1	5,8 ±0,1		0,8 ±0,1	
Eu	0,023 ±0,005	1,0 ±0,3	1,31 ±0,04		3,6 ±0,2	
Fe(%)	0,04 ±0,02	2,6 ±0,2	3,4 ±0,1	2,01 ±0,04	8,98	
Hf		5,1 ±0,5	8 ±2		5,6 ±0,2	
K(%)	0,18 ±0,05	1,2 ±0,2	2,00 ±0,04	0,86 ±0,02	1,15 ±0,02	
La	0,7 ±0,2	28 ±2		17	82 ±15	
Lu	0,007 ±0,002	0,3 ±0,2			0,24 ±0,03	
Mn	63 ±18	631 ±69	5530 ±150	7410 ±170		
Na	320 ±85	2400 ±287		15	23600 ±400	
Nd		30 ±6		38	67 ±2	
Rb	1,8 ±0,4	51 ±11		0,3	47 ±2	
Sb	0,07 ±0,02	1,7 ±0,4	3,1 ±0,3	5	0,26 ±0,05	
Sc	0,17 ±0,03	8 ±2	11,3 ±0,2	0,19 ±0,03	22 ±2	
Se		0,4 ±0,3				
Sm	0,11 ±0,03	5,1 ±0,6			12,2 ±0,3	
Ta		0,8 ±0,3			6 ±2	
Tb	0,014 ±0,002	0,6 ±0,3			1,3 ±0,1	
Th	0,14 ±0,04	8 ±2	9,1 ±0,2	6	10,4 ±0,7	10±1
U		3 ±1	3,1 ±0,1	2	2,4 ±0,2	2,4±0,3
Yb	0,04 ±0,01	2,4 ±0,6			1,8 ±0,2	
Zn	30 ±10	104 ±20	408 ±15	49 ±2	120 ±13	

A determinação da concentração dos elementos de meia vida curta (Cl, Mg e Mn) foi feita após a irradiação por 3 minutos das amostras e para a determinação das concentrações dos elementos de meia vida longa (As, Ba, Br, Ce, Co, Cr, Cs, Eu, Fe, Hf, K, La, Lu, Na, Nd, Rb, Sb, Sc, Se, Sm, Ta, Tb, Th, U, Yb e Zn), as amostras foram irradiadas por um período de 8 horas. A concentração dos elementos As, Br, K, La, Nd, Na, Sb, Sm, Tb, U e Yb foi determinada num período de 7 a 10 dias após a irradiação das amostras e os demais, num período de 15 a 20 dias.

A contagem da atividade gama induzida foi feita utilizando-se um detector Intertechnique com eficiência nominal relativa de 25%, resolução de 2,1keV para o pico de 1332keV do ^{60}Co e eletrônica associada (FIG. 4.1). A análise dos espectros foi feita utilizando-se o programa Winnergamma (InterWinner, 1998).

Os materiais obtidos da preparação dos extratos descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2 foram irradiados nas mesmas condições de preparo e medidas descritas acima.

FIGURA 4.1 - Detector HPGe com janela de berílio e eletrônica associada.

Na TAB. 4.2 são mostrados os elementos determinados, os radioisótopos formados na ativação usados na medida, suas meias-vidas e energia dos raios gama utilizada na determinação de suas concentrações.

TABELA 4.2 - Elementos analisados por ativação neutrônica, radioisótopo formado na ativação, energia dos raios gama utilizados na espectrometria gama e suas respectivas meia-vida.

Elemento	Radioisótopo	E (keV)	Meia-Vida
As	^{76}As	559	26,32h
Ba	^{131}Ba	496	11,8d
Br	^{82}Br	554 e 776	35,3h
Ce	^{141}Ce	145	32,5d
Co	^{60}Co	1173 e 1332	5,72a
Cr	^{57}Cr	320	27,7d
Cs	^{134}Cs	795,85	2,06a
Eu	^{152}Eu	121 e 1408	13,33a
Fe	^{59}Fe	1099 - 1291,6	44,5d
Hf	^{181}Hf	482,18	742,39d
K	^{42}K	1524,58	12,36h
La	^{140}La	328 – 1596,21	40,27h
Lu	^{177}Lu	208,36	6,71d
Na	^{24}Na	1368,68	14,96h
Nd	^{174}Nd	91,1 - 531,01	10,98d
Rb	^{86}Rb	1076	18,66d
Sb	^{122}Sb	564 - 692	2,7d
Sc	^{124}Sc	889	83,81d
Se	^{75}Se	264	119,77d
Sm	^{153}Sm	103,18	46,27h
Ta	^{182}Ta	1221 - 1231	114,5d
Tb	^{160}Tb	879,38	72,3d
Th	^{233}Th	312,01	27d
U	^{239}Np	228,18 - 277,6	2,36d
Yb	^{169}Yb	177,21 - 197,98	32,02d
Zn	^{65}Zn	1115,6	243,9d

4.1.3 Verificação da metodologia

Para verificação da precisão e exatidão do método foram utilizados os materiais de referência IAEA-336 (Lichen), IAEA-Soil-7, NIST 8704 (Buffalo River Sediment - BRS), IWG-GIT-basalt (BE-N1), NIST-1696a (ES) e IAEA-326 (Radionuclides in Soil) calculando-se a concentração de um em função do outro irradiado simultaneamente. Foram realizadas 6 determinações para cada material de referência.

Na FIG. 4.2 é apresentada a razão entre o valor obtido e o valor certificado, ou de informação, conforme o caso. Pode-se verificar que, para a maioria dos elementos, os resultados obtidos apresentaram uma diferença de até 10% do valor certificado, poucos apresentaram uma diferença de até 20% e apenas para alguns elementos apresentam valores acima de 20%.

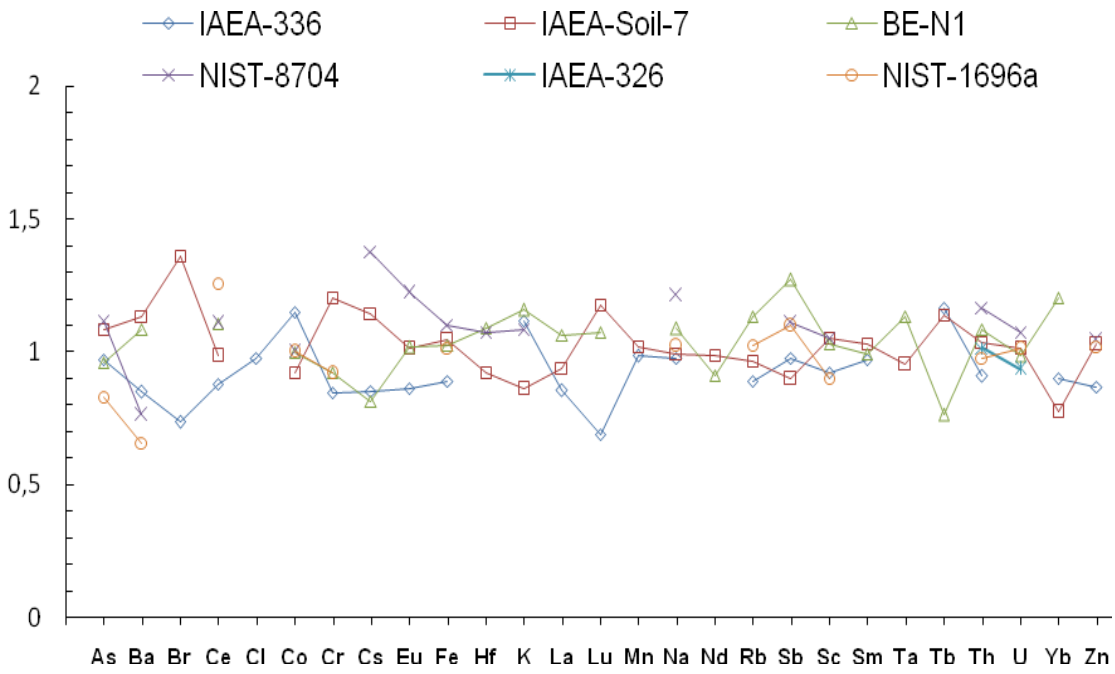


FIGURA 4.2 – Valores normalizados para os elementos determinados por AANI.

Nas TAB. 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8 são apresentados os valores de concentração para os elementos determinados nos materiais de referência analisados.

TABELA 4.3 - Concentração dos elementos (µg g^{-1}) certificados no material de referência IAEA 336 (Lichen), determinada pela técnica de AAN utilizando-se como padrões os materiais de referência BE-N1, Padrão Pipetado, BRS e Soil – 7; DPR% e ER%.

Elemento	**IAEA-336**	**BE-N1**	**Padrão Pipetado**	**BRS**	**Soil-7**	Média±DP	DPR %	ER %
	Valor certificado	Valor calculado	Valor calculado	Valor calculado	Valor calculado			
As	0,6 ±0,2	0,6±0,2		0,58 ±0,04	0,6 ±0,1	0,61 ±0,02	4,0	3,5
Ba	6 ±2	6±2			5 ±2	5,4 ±0,3	5,5	15,2
Br	13 ±3				9,5 ±0,3	9,5 ±0,3	3,3	26,5
Ce	1,3 ±0,3	1,10±0,05		1,14 ±0,08	1,12 ±0,01	1,12 ±0,02	1,9	12,5
Cl	1900 ±496		1851 ±176			1851 ±176	9,5	2,6
Co	0,3 ±0,1	0,36±0,02		0,31 ±0,08	0,35 ±0,01	0,34 ±0,03	8,4	16,4
Cr	1,1 ±0,4	1,04±0,06			0,82 ±0,03	0,93 ±0,16	16,8	12,0
Cs	0,11 ±0,02			0,09 ±0,02	0,10 ±0,02	0,09 ±0,01	13,0	14,9
Eu	0,023 ±0,005	0,023±0,003		0,020 ±0,001	0,018 ±0,006	0,020 ±0,002	12,3	11,5
Fe(%)	0,04 ±0,02	0,040±0,001		0,0375 ±0,0007	0,0380 ±0,0001	0,039 ±0,001	3,8	10,3
K(%)	0,18 ±0,05			0,17 ±0,02	0,23 ±0,06	0,20 ±0,04	21,7	11,6
La	0,7 ±0,2	0,57±0,02			0,56 ±0,02	0,56 ±0,01	2,1	14,6
Lu	0,007 ±0,002	0,005±0,001			0,005 ±0,002	0,0048 ±0,0003	6,5	31,0
Mn	63 ±18		62±2			62 ±2	3,2	1,6
Na	320 ±85	276±6	358±17	264 ±8	330 ±86	307 ±45	14,5	4,0
Rb	1,8 ±0,4	1,5±0,2			1,6 ±0,2	1,6 ±0,1	5,3	11,1
Sb	0,07 ±0,02	0,05±0,01			0,08 ±0,03	0,07 ±0,02	27,4	7,8
Sc	0,17 ±0,03	0,16±0,01		0,16 ±0,01	0,153 ±0,001	0,157 ±0,003	2,2	7,7
Sm	0,11 ±0,03	0,105±0,003			0,100 ±0,007	0,103 ±0,004	3,5	3,2
Tb	0,014 ±0,002				0,016 ±0,006	0,02 ±0,01		16,6
Th	0,14 ±0,04	0,13±0,01			0,13 ±0,02	0,127 ±0,003	2,3	9,2
Yb	0,04 ±0,01	0,03±0,01			0,04 ±0,01	0,03 ±0,01	32,7	9,9
Zn	30 ±10	24±3		28 ±2	26 ±1	26 ±2	6,7	14,5

TABELA 4.4 - Concentração dos elementos (µg g^{-1}) certificados no material de referência IAEA-Soil-7, determinada pela técnica de AAN utilizando-se como padrões os materiais de referência BE-N1, Lichen, BRS, ES e Padrão Pipetado; DPR% e ER%.

Elemento	**IAEA-Soil-7**	**BE-N1**	**Lichen**	**BRS**	**ES**	**Padrão Pipetado**	Média±DP	DPR %	ER %
	Valor certificado	Valor calculado	Valor calculado	Valor calculado	Valor calculado	Valor calculado			
As	13±2	14±1	14 ±2		16 ±1		15 ±1	8,3	10,5
Ba	159±73	152±27	195 ±59	159 ±18	243 ±28		187 ±41	22,1	17,8
Br	7±5		9,5 ±0,3				9,5 ±0,3	3,4	36,1
Ce	61±12	57±4	69,5 ±0,8	58 ±2	49 ±1		58 ±9	14,7	4,4
Co	9±2	8±1	7,3 ±0,3	8,9 ±0,2	8,9 ±0,2		8,4 ±0,7	8,8	5,9
Cr	60±40	69±7	79 ±5		66 ±3		71 ±7	9,5	18,6
Cs	5±1	7±2	63 ±2	5,3 ±0,2			6,1 ±0,8	12,3	13,0
Eu	1,0±0,3	1,0±0,1	1,1 ±0,1	0,85 ±0,03			1,0 ±0,1	13,7	1,7
Fe(%)	2,6±0,2	2,6±0,2	2,91 ±0,01	2,56 ±0,05	2,55 ±0,05		2,6 ±0,2	6,5	3,0
Hf	5,1±0,5	4,7±0,6		4,7 ±0,6			4,71 ±0,01	0,2	7,7
K(%)	1,2±0,2	1,1±0,4	1,0 ±0,3			1,1±0,1	1,0 ±0,1	7,2	14,0
La	28±2	28±2	25 ±12		26,9 ±0,3		26,4 ±1,5	5,9	5,8
Lu	0,3±0,2	0,31±0,02	0,4 ±0,2				0,4 ±0,1	21,9	24,0
Mn	631±69					642±9	642 ±9	1,4	1,7
Na	2400±287	2297±226	2406 ±627		2349 ±65	2522±83	2393 ±97	4,0	0,3
Nd	30±6	33±4			22 ±2		28 ±8	29,5	7,8
Rb	51±11	46±2	55 ±9		50 ±3		50 ±5	9,5	1,3
Sb	1,7±0,4	1,4±0,2	1,7 ±0,6		1,6 ±0,2		1,5 ±0,1	8,8	10,1
Sc	8,3±0,2	8,3±0,6	9,2 ±0,1	8,2 ±0,1	9,22 ±0,03		8,7 ±0,6	6,3	5,1
Sm	5,1±0,6	5,2±0,2	5,4 ±0,7				5,3 ±0,1	2,8	3,8
Ta	0,8±0,3	0,761±0,003					0,761 ±0,003	0,4	4,8
Tb	0,6±0,3	0,77±0,05	0,5 ±0,1				0,6 ±0,2	27,9	6,8
Th	8±2	7,7±0,3	10 ±1	7,7 ±0,2	8,5 ±0,1		8,4 ±0,9	10,9	2,2
U	3±1	2,7±0,2			2,6 ±0,5		2,6 ±0,1	2,3	0,5
Yb	2,4±0,6	1,7±0,3	2,2 ±0,8				1,9 ±0,3	17,0	19,5
Zn	104±20	95±11	119 ±14	111 ±5	102 ±6		107 ±10	9,7	2,7

TABELA 4.5 - Concentração dos elementos (µg g^{-1}) certificados no material de referência IWG-GIT-basalt (BE-N1), determinada pela técnica de AAN utilizando-se como padrões os materiais de referência Lichen e Soil-7; DPR% e ER%.

Elemento	**BE-N1**	**Lichen**	**Soil-7**	Média±DP	DPR %	ER %
	Valor certificado	Valor calculado	Valor calculado			
As	1,8 ±0,3	1,8 ±0,4	1,7 ±0,1	1,7 ±0,1	5,7	2,9
Ba	1025 ±30	1163 ±335	1087 ±195	1125 ±54	4,8	9,8
Ce	152 ±4	177 ±24	164 ±13	170 ±10	5,6	12,1
Co	60 ±2	49 ±9	66 ±12	57 ±12	20,9	4,8
Cr	360 ±12	365 ±61	315 ±34	340 ±36	10,5	5,5
Cs	0,8 ±0,1		0,7 ±0,2	0,7 ±0,2		18,8
Eu	3,6 ±0,2	3,6 ±0,6	3,7 ±0,3	3,6 ±0,1	1,8	1,2
Fe(%)	8,98	10 ±1	9,0 ±0,7	9,3 ±0,4	4,6	3,5
Hf	5,6 ±0,2		6,1 ±0,7	6,1 ±0,7	11,7	9,0
K(%)	1,15 ±0,02		1,3 ±0,5	1,3 ±0,5		15,7
La	82 ±15	95 ±15	83 ±5	89 ±8	9,0	8,4
Lu	0,24 ±0,03	0,3 ±0,1	0,23 ±0,01	0,3 ±0,1	21,9	13,1
Na	23600 ±400	27368 ±3437	24780 ±2442	26074 ±1830	7,0	10,5
Nd	67 ±2		61 ±6	61 ±6	9,4	8,9
Rb	47 ±2	55 ±9	52 ±2	54 ±2	3,4	14,1
Sb	0,26 ±0,05	0,35 ±0,06	0,32 ±0,04	0,34 ±0,02	6,1	28,8
Sc	22 ±2	23 ±3	22 ±2	23 ±1	3,7	3,8
Sm	12,2 ±0,3	12 ±2	12,0 ±0,6	12,2 ±0,2	1,7	0,4
Ta	6 ±2		6,5 ±0,6	6 ±1	9,8	13,2
Tb	1,3 ±0,1	0,9 ±0,2	1,03 ±0,04	1,0 ±0,1	8,7	25,3
Th	10,4 ±0,7	12 ±2	11,1 ±0,5	11,4 ±0,4	3,5	9,2
U	2,4 ±0,2		2,4 ±0,2	2,4 ±0,2	8,4	1,7
Yb	1,8 ±0,2	1,7 ±0,7	2,4 ±0,1	2 ±1	26,0	13,4
Zn	120 ±13		119 ±8	119 ±8		0,9

TABELA 4.6 - Concentração dos elementos (µg g^{-1}) certificados no material de referência NIST 8704 (Buffalo River Sediment -BRS), determinada pela técnica de AAN utilizando-se como padrões os materiais de referência Lichen, IAEA-326 e Soil-7; DPR% e ER%.

Elemento	**NIST-8704**	**Lichen**	**IAEA-326**	**Soil 7**	Média±DP	DPR %	ER %
	Valor certificado	Valor calculado	Valor calculado	Valor calculado			
As	17	19 ±3					11,8
Ba	413 ±13	217 ±65		412 ±95	315 ±138	43,8	23,8
Ce	67 ±2	76 ±4		69 ±7	73 ±5	6,8	9,0
Co	13,6 ±0,4	13 ±3		14 ±1	14 ±1	7,3	0,8
Cs	5,8 ±0,1	8 ±2		6,0 ±0,8	7,2 ±1,6	22,7	22,6
Eu	1,31 ±0,04	1,7 ±0,2		1,5 ±0,2	1,6 ±0,1	6,7	20,2
Fe(%)	4,0 ±0,1	4,5 ±0,6		3,98 ±0,06	4,2 ±0,4	8,7	6,8
Hf	8 ±2			9,0 ±0,5			7,1
K(%)	2,00 ±0,04	2,2 ±0,3					8,4
Na	5530 ±150	6692 ±840					21,0
Sb	3,1 ±0,3	3,4 ±0,5					10,7
Sc	11,3 ±0,2	12,1 ±0,6		11,3±0,1	12 ±1	4,8	3,9
Th	9,1 ±0,2	11 ±2	9,0 ±0,4	10±1	10 ±1	11,5	10,1
U	3,1 ±0,1		3,31 ±0,26		3,3 ±0,3		7,1
Zn	408 ±15	446±28		384±24	415 ±44	10,6	1,7

TABELA 4.7 - Concentração dos elementos (µg g^{-1}) certificados no material de referência NIST-1696a (ES), determinada pela técnica de AAN utilizando-se como padrão o material de referência Soil-7; DPR% e ER%.

	NIST-1696a	**Soil 7**	
Elemento	Valor certificado	Valor calculado	ER %
As	6,2±0,2	5,2±0,5	17,2
Ba	210	138±32	34,5
Ce	34	43±5	25,7
Co	5	5±1	0,1
Cr	41±2	38±8	8,2
Fe	2,01±0,04	2,03±0,05	1,2
Na	7410±170	7572±337	2,2
Rb	38	39±4	2,4
Sb	0,3	0,3±0,1	9,7
Sc	5	4,5±0,1	9,9
Th	5,8	5,6±0,8	2,6
U	2	2±1	1,1
Zn	49±2	50±4	1,8

TABELA 4.8 - Concentração dos elementos (µg g^{-1}) certificados no material de referência IAEA-326, determinada pela técnica de AAN utilizando-se como padrões os materiais de referência BRS e Lichen; DPR% e ER%.

	IAEA- 326	**BRS**	**Lichen**			
Elemento	Valor certificado	Valor encontrado	Valor encontrado	Média±DP	DPR %	ER %
Th	10 ±1	9,8 ±0,2	12 ±2	11 ±2	14,3	12,6
U	2,4 ±0,3	2,2 ±0,2				6,5

O desvio padrão relativo (DPR%) do método variou de 1,9% a 32,7% para o Lichen, de 0,2% a 29,5% para o Soil-7, de 1,7% a 26% para o BE-N1, de 4,8% a 43,8% para o BRS e de 14,3% para o IAEA-326.

O erro relativo (ER%) do método variou de 0,7% a 31% para o Lichen, de 0,3% a 36,1% para o Soil-7, de 0,4% a 28,8% para o BE-N1, de 0,8% a 23,8% para o BRS, de 0,1% a 34,5% para o ES e de 6,5% a 12,6% para o IAEA-326.

Para o controle de qualidade dos resultados obtidos pela técnica de AAN, utilizou-se o critério de Z-*score* (BODE, 1996). O cálculo da diferença padronizada ou de um valor Z de um resultado analítico é dado pela Eq. 4.2:

$$Z = \frac{Ci - Cref,i}{(\sigma_i^2 + \sigma_{ref,i}^2)^{1/2}} \qquad \text{(Equação 4.2)}$$

onde:

Ci = concentração do elemento i determinado no material de referência;
Cref,i = valor certificado de concentração ou de consenso para o elemento i;
σi = incerteza da concentração do elemento i na análise do material de referência;
$\sigma_{ref,}$ i = incerteza do valor de consenso ou certificado para o elemento i.

Considera-se para a técnica de AAN que um resultado é aprovado quando os valores de Z satisfazem a condição z < │3│. Esta condição garante que um resultado individual da amostra controle (material de referência) esta dentro do intervalo de confiança de 99% do valor verdadeiro ou aceito.

Nas FIG. 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 e 4.8 estão apresentados os valores de Z- *score* para os materiais de referência IAEA-336 (Lichen), IAEA-Soil-7, NIST 8704 (Buffalo River Sediment - BRS), IWG-GIT-basalt (BE-N1), NIST-1696a (ES) e IAEA-326, respectivamente. Todos os resultados obtidos para os elementos analisados nos matérias de referência encontraram-se dentro do intervalo desejado (z < │3│).

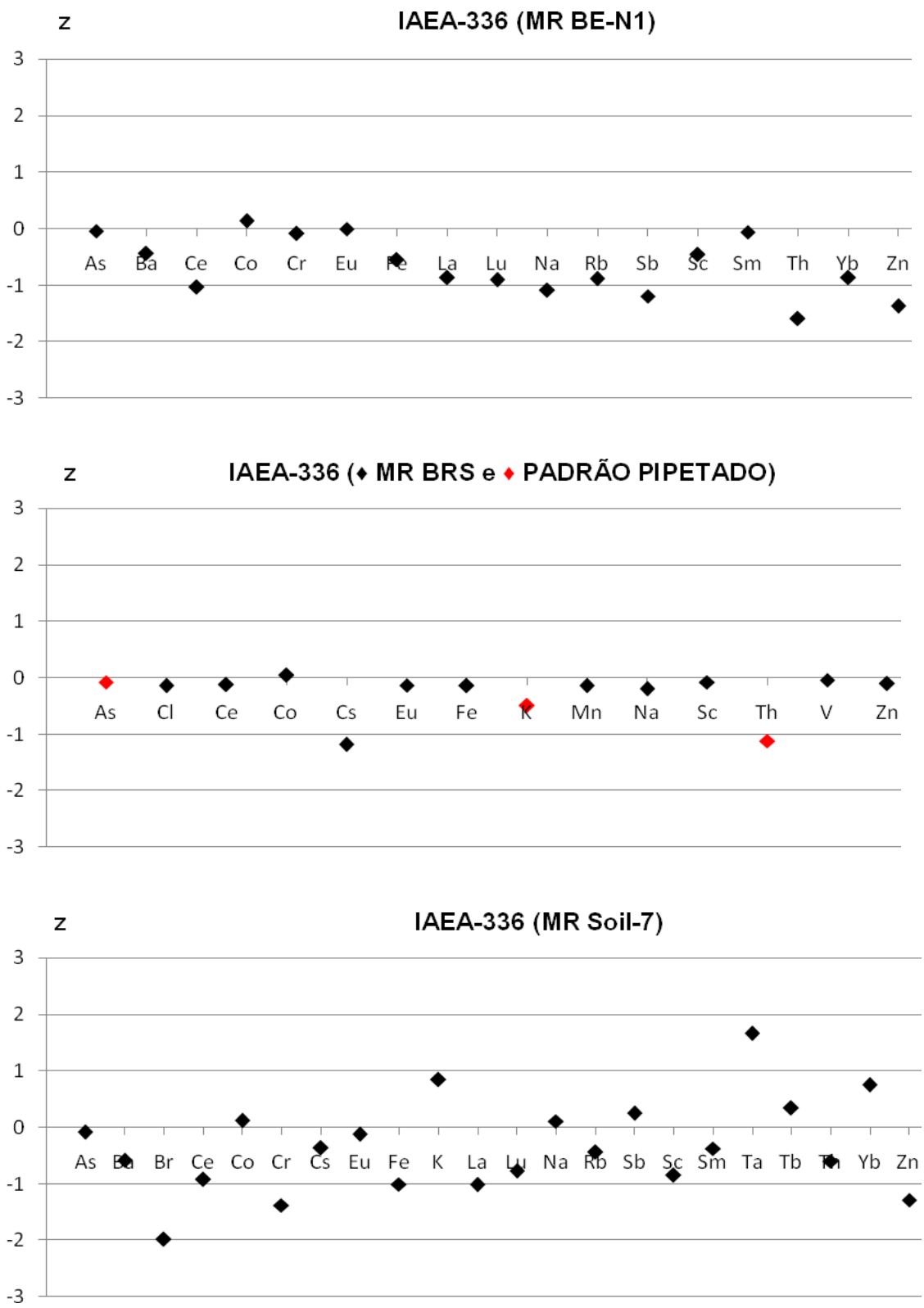
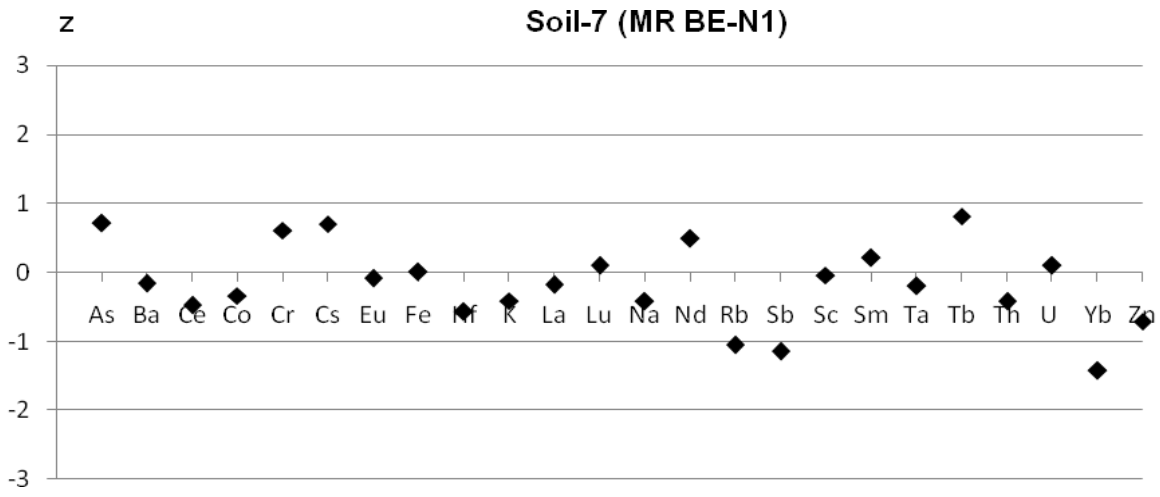
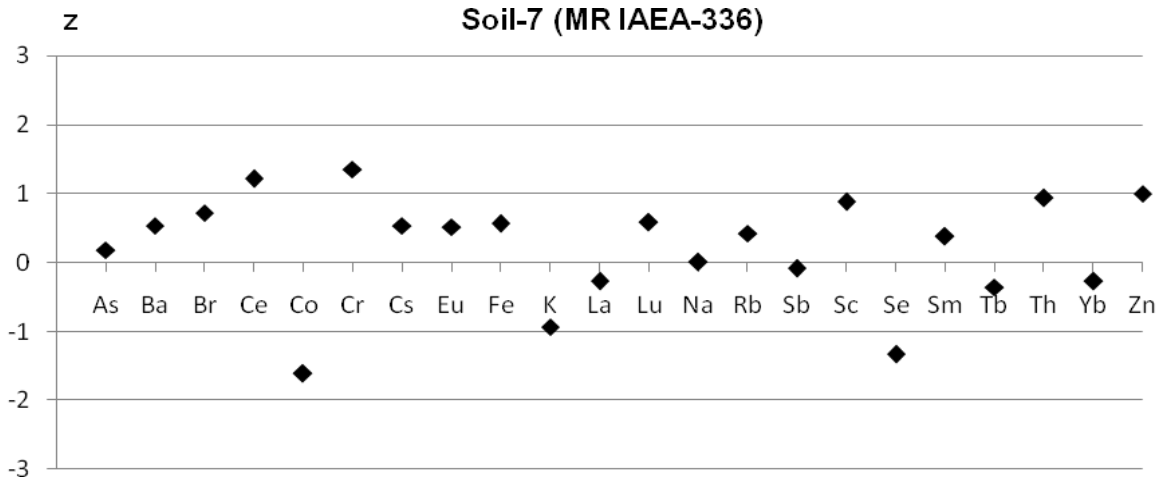
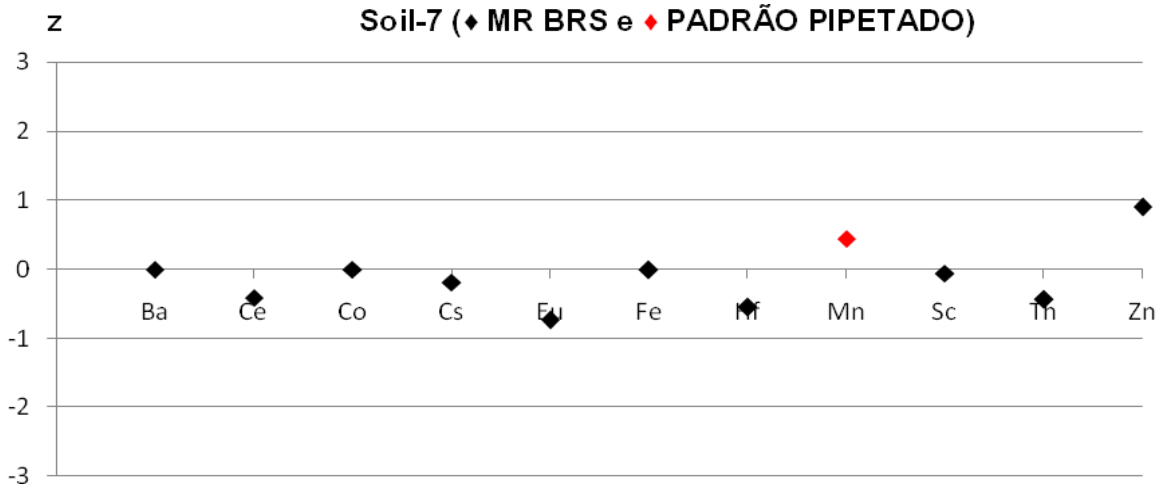


FIGURA 4.3 - Valores de Z-*score* obtidos na análise do material de referência IAEA-336 (Lichen), utilizando-se como padrão os materiais de referência BE-N1, BRS, PADRÃO PIPETADO e Soil-7.


z
Soil-7 (MR BE-N1)
3
2
1
0
-1
-2
-3
As Ba Ce Co Cr Cs Eu Fe Hf K La Lu Na Nd Rb Sb Sc Sm Ta Tb Th U Yb Zn


z
Soil-7 (MR IAEA-336)
3
2
1
0
-1
-2
-3
As Ba Br Ce Co Cr Cs Eu Fe K La Lu Na Rb Sb Sc Se Sm Tb Th Yb Zn


z
Soil-7 (♦ MR BRS e ♦ PADRÃO PIPETADO)
3
2
1
0
-1
-2
-3
Ba Ce Co Cs Eu Fe Hf Mn Sc Th Zn

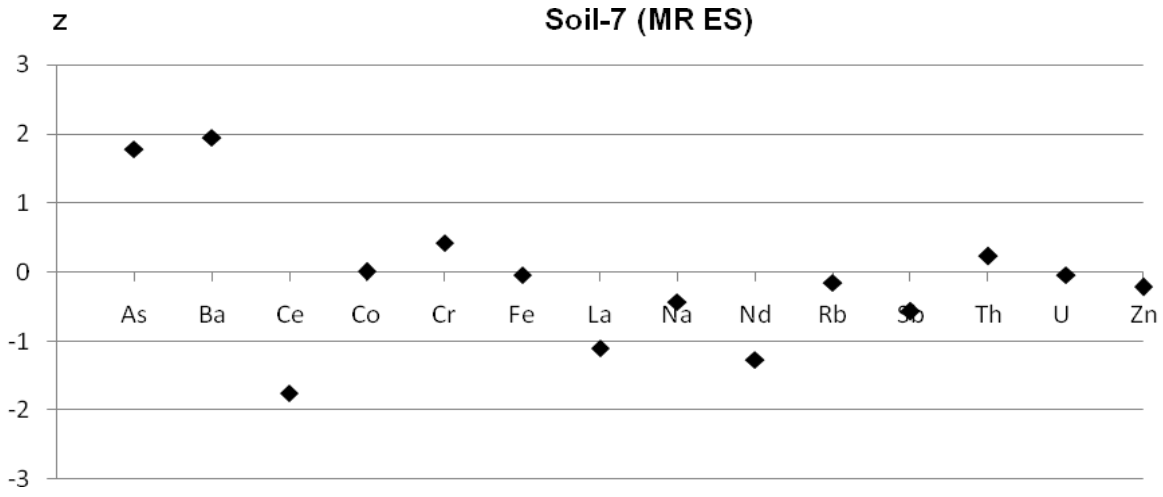


FIGURA 4.4 - Valores de Z-*score* obtidos na análise do material de referência IAEA-Soil-7, utilizando-se como padrão os materiais de referência BE-N1, IAEA-336, BRS, PADRÃO PIPETADO e ES.

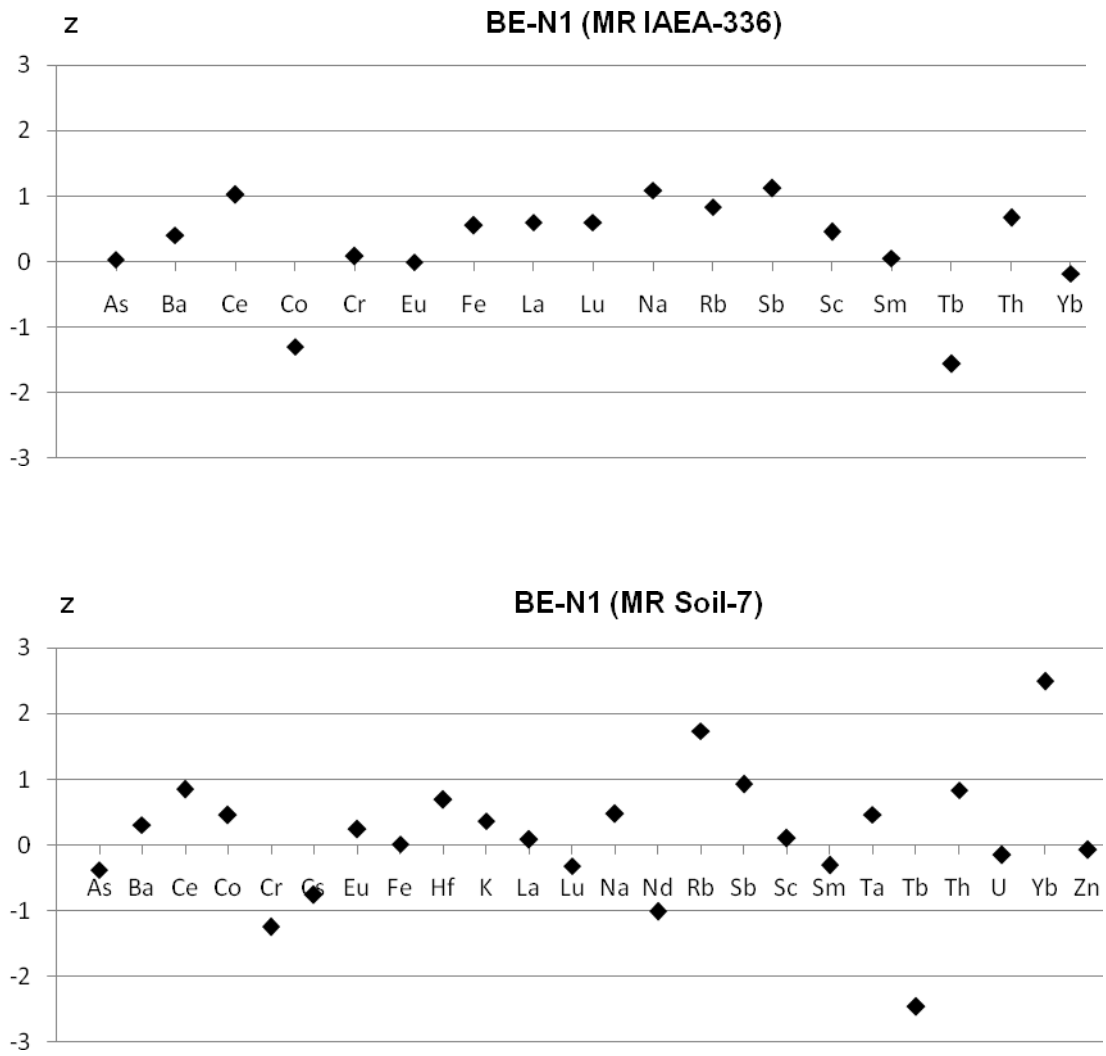


FIGURA 4.5 - Valores de Z-*score* obtidos na análise do material de referência IWG-GIT-basalt (BE-N1) utilizando-se como padrão os materiais de referência IAEA-336 e Soil-7.

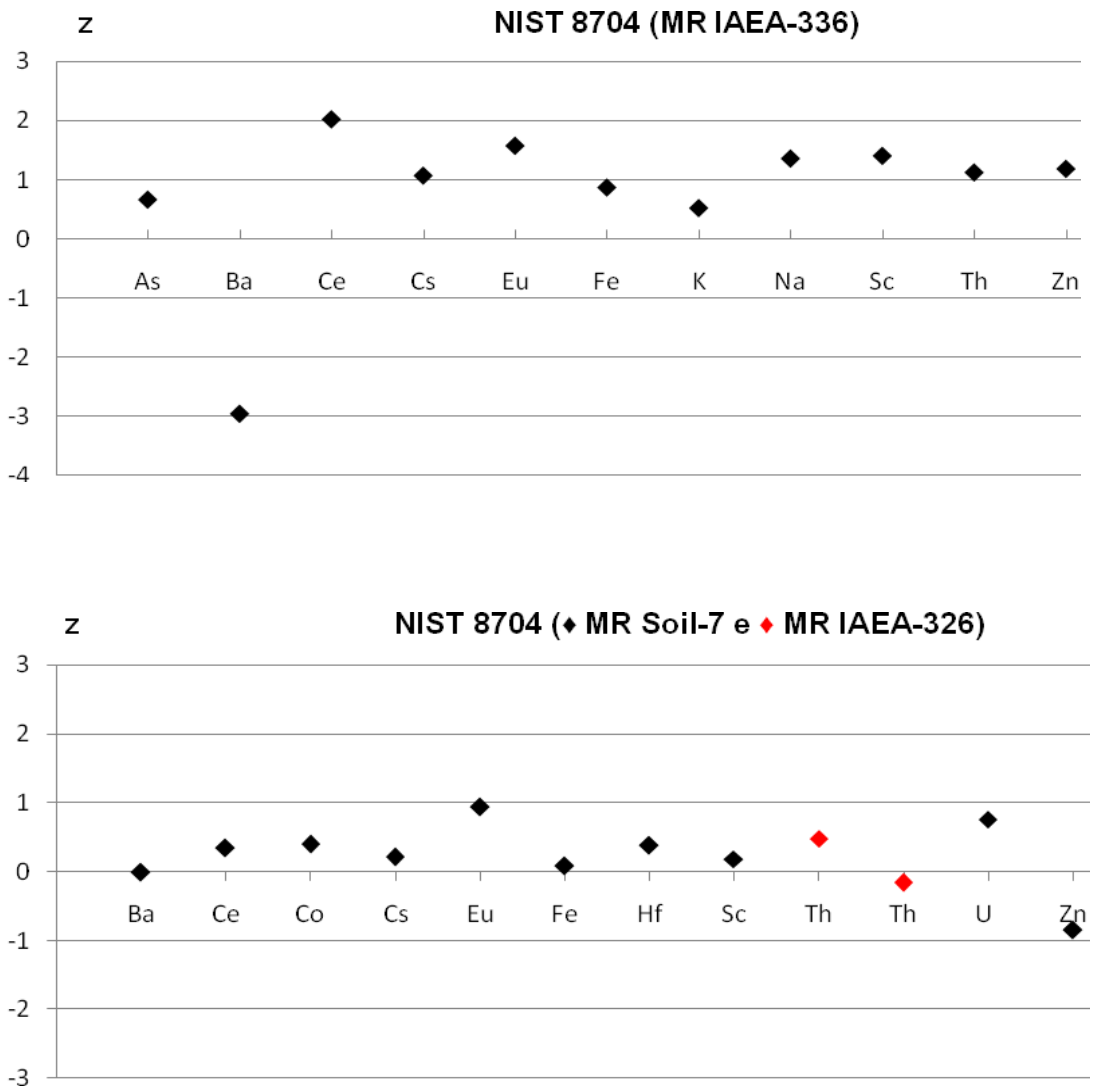


FIGURA 4.6 - Valores de *Z-score* obtidos na análise do material de referência NIST 8704 (BRS) utilizando-se como padrão os materiais de referência IAEA-336, Soil 7 e IAEA-326.

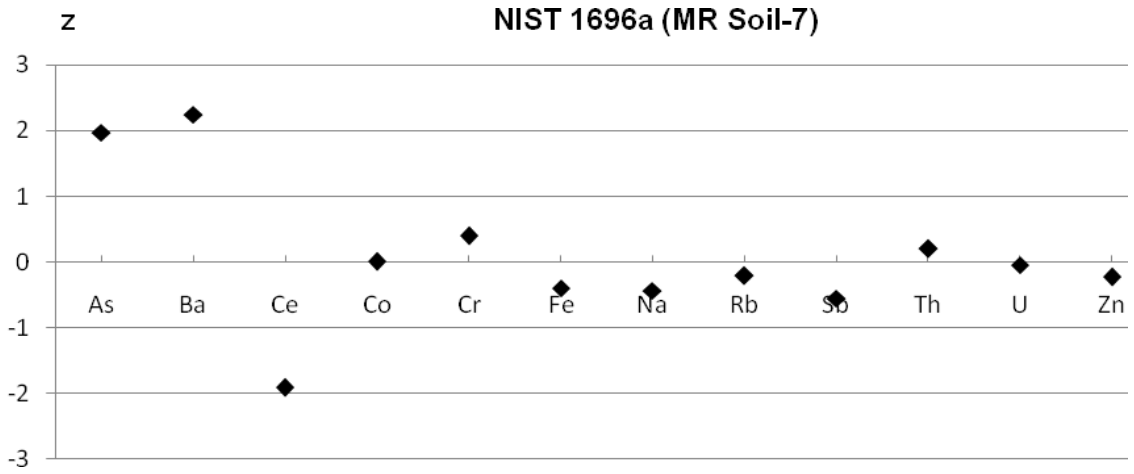


FIGURA 4.7 - Valores de Z-*score* obtidos na análise do material de referência NIST 1696a (ES) utilizando-se como padrão o material de referência Soil-7.

FIGURA 4.8 - Valores de Z-*score* obtidos na análise do material de referência IAEA-326 utilizando-se como padrão os materiais de referência BRS e IAEA-336.

O limite inferior de detecção (LID) e Quantificação (LQ) para a Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (AANI), sob as condições em que foram realizadas as medidas neste trabalho para análise das amostras de *Peperomia pellucida* e solo, foram calculados utilizando os materiais de referência IAEA-336, IAEA-Soil-7, a Eq. 4.3 (Keith et al., 1983) e a Eq. 4.4 (Guimarães, 2011), respectivamente:

$$LID = \frac{3\ V\ S_b}{T.C} \qquad \text{(Equação 4.3)}$$

onde:

S_b = desvio padrão da contagem da radiação de fundo;
V = valor certificado (mg kg^{-1});
T = tempo de contagem (s);
C = contagem no fotopico de elemento de interesse.

$$LQ = 3\ LID \qquad \text{(Equação 4.4)}$$

Foram analisadas 6 amostras de cada material de referência para determinação do LID. Na TAB. 4.9 são apresentados as médias dos valores de Limite Inferior de Detecção e Limite de Quantificação calculados para os elementos presentes nos materiais de referência IAEA-336 e IAEA-Soil 7.

TABELA 4.9 - Valores de Limite Inferior de Detecção (LID) e Limite de Quantificação (LQ) da técnica de AAN (mg kg^{-1}), exceto onde indicado por %, obtidos para os elementos nos materiais de referência IAEA-336 e IAEA-Soil 7.

Elemento	IAEA-336		IAEA-Soil 7	
	LID	LQ	LID	LQ
As	0,08	0,24	0,4	1,2
Ba	3	9	33	99
Br	0,1	0,3	0,3	0,9
Ce	0,2	0,6	0,5	1,5
Co	0,02	0,06	0,11	0,33
Cr	0,2	0,6	0,9	2,7
Cs	0,04	0,12	0,23	0,69
Eu	0,008	0,024	0,03	0,09
Fe(%)	0,002	0,006	0,008	0,024
Hf			0,11	0,3
K(%)	0,09	0,27	0,32	0,96
La	0,02	0,06	0,11	0,33
Lu	0,001	0,003	0,007	0,021
Na	4	12	32	96
Nd	0,6	1,8	3,1	9
Rb	0,3	0,9	4	12
Sb	0,009	0,027	0,04	0,12
Sc	0,002	0,006	0,02	0,06
Se	0,11	0,3	0,26	0,78
Sm	0,002	0,006	0,01	0,03
Ta			0,19	0,57
Tb	0,005	0,015	0,11	0,3
Th	0,02	0,06	0,11	0,3
U			0,26	0,78
Yb	0,02	0,06	0,2	0,6
Zn	0,9	2,7	3,8	11,4

4.2 Determinação Radioquimica de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb nas amostras de *Peperomia pellucida*, extratos e solo

4.2.1 Princípios do método

Foi utilizado o procedimento radioquímico seqüencial para a determinação de ^{226}Ra, ^{228}Ra segundo Oliveira (1993) e para a determinação de ^{210}Pb segundo Moreira (1993).

Esta metodologia consiste na determinação dos isótopos ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb, após a separação radioquímica destes radionuclideos de outros radionuclideos naturais das series do ^{238}U e ^{232}Th, através de coprecipitações sucessivas, seguida das contagens alfa e beta total em um detector proporcional de fluxo gasoso de baixo background.

O equipamento de medida utilizado foi um detector, marca Berthold, modelo Lb 770. Esse equipamento possui dez detectores de 60 mm de diâmetro e um contador de guarda em anticoincidência. O gás utilizado nos detectores é o gás P-10, uma mistura de 90% de argônio e 10% metano. As medidas foram feitas simultaneamente nos dez detectores durante 200 minutos.

Esta técnica apresenta como principais vantagens, uma baixa radiação de fundo e, consequentemente, um limite inferior de detecção suficiente para medir amostras contendo níveis de radioatividade ambientais, nas quais os radionuclideos estão presentes, na maior parte das vezes, em concentrações muito baixas ou mesmo traço.

4.2.2 Procedimento experimental para as análises dos radionuclídeos ^{226}Ra e ^{228}Ra.

Foram pesadas alíquotas de 1g a 5g das amostras pulverizadas das Folhas (FPEP), Partes Aéreas (PPEP), Raízes (RPEP) e cerca de 0,5g das amostras do Solo (SPEP) em béquer de vidro. As amostras foram submetidas à digestão em meio acido nítrico concentrado a frio, durante 1 dia, e posteriormente colocadas em chapa aquecedora a 100º C. Foi dada a continuidade ao tratamento com $HNO_{3conc.}$ e H_2O_2 30% até a completa remoção da matéria orgânica e, para eliminação da sílica, as amostras foram transferidas para béquer de teflon e tratadas por meio da adição de 10 mL de HF. Esta solução foi evaporada próximo à secura e tratada com alíquotas de HNO_3 para eliminação do excesso de HF, em

seguida foram adicionadas alíquotas de 5 mL de H_2O_2 (três vezes) para eliminação total da matéria orgânica.

As amostras, depois de solubilizadas totalmente, foram colocadas em béqueres de 2 L e avolumadas para 1 L com água superpura do Milli-Q®.

Foram adicionados 1 mL de carregador de Ba^{2+} e 1 mL de carregador Pb^{2+}, 7 mL de ácido cítrico e três gotas do indicador vermelho de metila (solução de rosa – meio ácido). A função dos carregadores é aumentar a concentração de bário e chumbo nas amostras para atingir os produtos de solubilidade para a precipitação. A função do ácido cítrico é de complexar o chumbo e o ferro presentes nas amostras para que estes não precipitem como hidróxidos – $Fe(OH)_3$ e $Pb(OH)_2$ – após a adição do hidróxido de amônio na etapa seguinte.

A solução foi agitada em agitador magnético e foi adicionado $NH_4OH_{(conc.)}$ até a viragem do indicador da coloração rosa para amarela (pH em torno de 4,5 – 5,0) e a solução foi colocada em chapa aquecedora. Depois de aquecida, adicionou-se 50 mL de H_2SO_4 3 mol L^{-1}. Todos os íons que formam sulfatos insolúveis precipitam neste momento, porém, para o método realizado, os que interessam são bário, rádio e chumbo (M^{2+}) (Eq 4.5). Esperou a decantação até o dia seguinte – envelhecimento do precipitado.

$$\boxed{M^{2+} + SO_4^{2-} \rightarrow MSO_4\downarrow} \qquad \text{(Equação 4.5)}$$

No dia seguinte separou-se o sobrenadante, que foi descartado. O precipitado foi transferido para tubos de centrífuga com o auxílio de água superpura do Milli-Q®, centrifugado e descartou-se o sobrenadante novamente. Ao precipitado, adicionou-se 2,0g de NTA, ácido nitrilo tri-acético, 40 mL de água super pura do MilliQ®, 7 mL de solução de NaOH 6 mol L^{-1} e três gotas de indicador vermelho de metila – solução amarela – e aqueceu-se em chapa aquecedora para dissolvê-lo. O NTA dissolve o precipitado em meio básico – adição do hidróxido de sódio – complexando o chumbo e deixando o rádio em solução.

Foram adicionados 5,0 mL de sulfato de amônio, $(NH_4)_2SO_4$ (25 mg/mL), e precipitou-se o bário e o rádio após adição de ácido acético glacial, deixando o chumbo complexado em solução com o ácido nitrilo tri-acético. A solução foi deixada para decantar até o dia seguinte. A solução foi então

centrifugada e foi separado o sobrenadante para análise do chumbo. O precipitado foi lavado com solução de acetato de amônio (NH_4CH_2COOH) 20%, e centrifugado novamente, adicionando o sobrenadante à solução anterior de Pb^{2+}. A lavagem foi feita com acetato de amônio para complexar qualquer chumbo que ainda estivesse adsorvido ao precipitado.

O precipitado foi dissolvido com 2,0g de EDTA, 40 mL de água super pura do MilliQ® e 5 mL de hidróxido de amônio concentrado em banho-maria. Após a dissolução, adicionou-se 5 mL de sulfato de amônio, $(NH_4)_2SO_4$ (25 mg/mL), e precipitou-se o bário e o rádio após adição de ácido acético glacial. Foi anotado o dia da precipitação. A solução foi filtrada à vácuo com papel de filtro Millipore® e o rendimento químico foi determinado gravimetricamente. O ^{226}Ra e ^{228}Ra foram medidos após 21 dias da data da precipitação. Este tempo é necessário para que o ^{226}Ra entre em equilíbrio com seus filhos e para que as contribuições dos outros isótopos de radio emissores alfa (^{223}Ra e ^{224}Ra) sejam nulas, e ainda suficiente para o equilíbrio $^{228}Ra/^{228}Ac$ seja igualmente atingido.

Os materiais obtidos da preparação dos extratos descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2 foram tratados nas mesmas condições de preparo e medidas descritas acima.

4.2.3 Determinação da concentração de atividade do ^{226}Ra e ^{228}Ra.

4.2.3.1 Cálculo da concentração de atividade do ^{226}Ra

A concentração de atividade de ^{226}Ra é determinada segundo a fórmula:

$$A\,(^{226}Ra) = \frac{R_a - R_0}{Rq \cdot E \cdot m \cdot fabs \cdot [1 + k\,(1-e^{-\lambda t})]} \quad (Bq\ kg^{-1})$$

onde:

A (^{226}Ra) = concentração de atividade de ^{226}Ra da amostra em Bq kg^{-1}

Ra = taxa de contagem total da amostra em cps

R_0 = taxa de contagem da radiação de fundo em cps

Rq = rendimento químico

E = eficiência de contagem em cps dps^{-1}

m = massa da amostra em kg

fabs (^{226}Ra) = coeficiente de auto absorção do ^{226}Ra no precipitado de $RaSO_4$

λ = constante de desintegração do ^{222}Rn (0,181d^{-1})

t = tempo transcorrido entre a precipitação do $^{226}RaSO_4$ e a contagem, em dias

k= constante de auto absorção

4.2.3.2 - Cálculo da concentração de atividade do ^{228}Ra

A concentração de atividade de ^{228}Ra é determinada segundo a fórmula:

$$A\,(^{228}Ra) = \frac{R_a - R_0}{Rq \cdot E\beta(^{228}Ra) \cdot m} - \frac{E\beta\,(^{226}Ra) \cdot A\,(^{226}Ra)}{E\beta(^{228}Ra)} \quad (Bq\ kg^{-1})$$

onde:

A (^{228}Ra) = concentração de atividade de ^{228}Ra da amostra em Bq kg^{-1}

Ra = taxa de contagem total da amostra em cps

R_0 = taxa de contagem da radiação de fundo em cps

Rq = rendimento químico

Eβ(^{228}Ra) = eficiência de contagem beta em cps dps^{-1}

E (^{226}Ra) = eficiência de contagem beta em cps dps^{-1}

A (^{226}Ra) = concentração de atividade de ^{226}Ra da amostra em Bq kg^{-1}

m = massa da amostra em kg

4.2.4 Procedimento experimental para análise do ^{210}Pb

O sobrenadante que contém o Pb^{2+} foi aquecido em banho-maria e adicionou-se 1 mL de sulfeto de sódio, Na_2S 1 mol L^{-1}, para precipitar o chumbo como sulfeto (Eq. 4.6). A solução foi deixada para decantar até o dia seguinte. Esperou-se um dia para centrifugar o precipitado, pois o processo libera H_2S.

$$Pb^{2+} + S^{2-} \rightarrow PbS\downarrow \qquad \text{(Equação 4.6)}$$

Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com água super pura do MilliQ® e centrifugado novamente. Aqueceu-se em banho-maria e dissolveu-se o precipitado com algumas gotas de ácido nítrico concentrado – o chumbo passa para a solução e forma-se enxofre elementar (Eq.4.7).

$$3PbS + 8HNO_3 \rightarrow 3Pb^{2+} + 6NO^-_3 + 3S\downarrow + 2\,NO\uparrow + 4H_2O \qquad \text{(Equação 4.7)}$$

A solução foi filtrada com papel de filtro qualitativo, faixa preta, e ajustou-se o pH com solução de acetato de amônio 40% (pH entre 4,5 – 5,0). A solução foi aquecida em chapa aquecedora e adicionaram-se 2,5 mL de solução de cromato de sódio, Na_2CrO_4 30% para precipitar o chumbo como cromato (Eq. 4.8).

$$Pb^{2+} + CrO_4^{2-} \rightarrow {}^{210}PbCrO_4\downarrow \qquad \text{(Equação 4.8)}$$

Foi anotado o dia da precipitação e a solução foi filtrada à vácuo com papel de filtro Millipore®. O rendimento químico foi determinado gravimetricamente a partir da massa de carregador estável de chumbo adicionado. Adicionou-se 1 mL de solução de carregador, no inicio do procedimento radioquímico, de concentração igual a 20 mg mL^{-1}, que corresponde a uma massa de $PbCrO_4$ de

31,2 mg. O Pb foi medido após 10 dias da data da precipitação, tempo necessário para que seja estabelecido o equilíbrio radioativo entre o ^{210}Pb e ^{210}Bi.

4.2.4.1 – Cálculo da concentração de atividade do ^{210}Pb

A concentração de atividade de ^{210}Pb é determinada segundo a fórmula:

$$A\,(^{210}Pb) = \frac{R_a - R_0}{Rq \cdot E \cdot m \cdot (1-e^{-\lambda t})}\ (Bq\ kg^{-1})$$

onde:

A = concentração de atividade da amostra em Bq kg^{-1}

Ra = taxa de contagem total da amostra em cps

R_0 = taxa de contagem da radiação de fundo em cps

Rq = rendimento químico

E = eficiência de contagem em cps dps^{-1}

m = massa da amostra em kg

t = tempo transcorrido entre a precipitação do $PbCrO_4$ e a contagem, em dias

λ = constante de desintegração do ^{210}Bi ($0{,}183 d^{-1}$)

4.2.5 Determinação da radiação de fundo, do limite inferior de detecção e verificação da metodologia

A radiação de fundo do contador proporcional (FIG 4.9) foi realizada fazendo uma medida nas mesmas condições em que foram medidas as amostras. O valor obtido para cada detector foi utilizado no cálculo da concentração de atividade do ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb.

FIGURA 4.9 - Contador proporcional de baixa radiação de fundo.

O limite inferior de detecção (LID), com confiabilidade de 95%, para as determinações de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb são apresentadas na TAB. 4.10. Para o cálculo do LID foi utilizado a Eq. 4.9:

$$LID = \frac{4{,}66 \cdot S_b}{T_c \cdot EF \cdot RQ \cdot m} \qquad \text{(Equação 4.9)}$$

onde:

LID = Limite inferior de detecção (Bq kg^{-1})

S_b = desvio padrão da contagem da radiação de fundo (contagem)

EF = eficiencia de contagem (cps dps^{-1})

m = massa da amostra (em kg)

T_c = tempo de medida (s)

RQ = rendimento químico

4,66 = valor que corresponde a um risco pré-estabelecido de que existe um certo nível de atividade na amostra, quando na realidade não existe e de que não existe atividade na amostra quando na realidade existe, considerando-se um nível de 95% de confiança.

TABELAS 4.10 - Valor médio do Limite Inferior de Detecção (LID) para os radionuclídeos ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb em mBq kg^{-1}.

Radionuclídeo	LID (mBq kg^{-1})
^{226}Ra	2,2
^{228}Ra	3,7
^{210}Pb	4,9

Para a verificação da precisão (DPR%) e exatidão (ER%) da metodologia foi utilizado o material de referência IAEA-326 (Radionuclides in Soil). Foram utilizadas para a determinação de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb nove amostras com massa de aproximadamente 0,5 g e adicionados 1 mL de carregador de Ba^{2+} e 1 mL de carregador de Pb^{2+} para o cálculo de rendimento químico. Na TAB. 4.11 são apresentados os valores obtidos para DPR% e ER%.

TABELA 4.11 - Média das concentrações obtidas de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb em Bq kg^{-1}, para o material de referência IAEA-326.

Elementos	n	Média ±desvio	Valor certificado	DPR%	ER%
^{226}Ra	9	37,3 ±0,5	32,6 ±6,1	1,2	14,3
^{228}Ra	9	46,2 ±1,1	40,1 ±4,2	2,4	15,1
^{210}Pb	9	58,2 ±1,6	53,3 ±10,7	2,7	9,9

Os resultados obtidos para DRP% e ER% indicam boa precisão e exatidão para a contagem alfa e beta total após separação radioquímica e o método de abertura utilizado neste estudo.

4.3 Espectrometria de Absorção Atômica (EAA)

A análise pelas técnicas de espectrometria de absorção atômica teve por objetivo a determinação da concentração de Cd, Pb e Hg nas amostras do vegetal seco, nos extratos obtidos por maceração e infusão e no solo coletado.

A espectrometria de absorção atômica é um método sensível para a determinação quantitativa de mais de 60 elementos, a partir da medida da intensidade da radiação transmitida convertida em um sinal analítico por um detector. Os limites de detecção para EAA são da ordem de ppm a ppb (Skoog et al., 1998).

Em Espectrometria de Absorção Atômica, a amostra é exposta à radiação de comprimentos de onda específicos emitida por uma lâmpada, cujas energias dos fótons emitidos são exatamente as mesmas que podem ser absorvidas pelos átomos livres do elemento de interesse. Existe uma lâmpada para cada elemento que se deseja determinar. A luz dirigida através da nuvem do elemento atomizado em uma chama ou cubeta de forno de grafite passa por um monocromador até atingir o detector. A quantidade de energia absorvida naquele comprimento de onda específico é diretamente proporcional à concentração do elemento na amostra (Arine, 2000).

Existem diferentes técnicas empregadas para a quantificação de qualquer elemento metálico usando-se as absorções características dos átomos. As principais diferenças entre as técnicas se originam dos processos de atomização, capazes de converter o analito em átomos livres. Um tipo comum de atomizador é o forno de grafite (aquecimento eletrotérmico), que apresenta alta sensibilidade, podendo determinar metais ao nível de ppb e ppt (Arine, 2000). A alta sensibilidade é devida à capacidade de gerar átomos rapidamente e mantê-los no caminho óptico por mais tempo. As temperaturas no forno de grafite por indução atingem de 2000 a 3000°C, proporcionando a atomização da amostra (Skoog et al., 1998).

4.3.1 Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite (GFAAS)

4.3.1.1 Procedimento experimental para as análises de Cd e Pb por Espectrometria de Absorção Atômica por Forno de Grafite

Foram pesadas alíquotas de cerca de 100mg das amostras pulverizadas de Folhas (FPEP) e Partes Aéreas (PPPE), cerca de 50mg das amostras de Raízes (RPEP), cerca de 70mg das amostras do Solo (SPEP) e aproximadamente 0,5g de cada material certificado (NIST 1515 - Apple Leaves e NIST 1542 - Peach Leaves) em tubos de Teflon. Em seguida foram adicionados 4 ml de HNO_3 concentrado e 1ml de H_2O_2 20% (v/v). Posteriormente, as amostras foram submetidas à digestão a frio, durante 1 dia e em seguida colocadas em bloco digestor a temperatura de 90ºC por um período de 3h. No final as soluções em meio nítrico foram avolumadas a 25,3 ml com água Milli-Q®.

As amostras digeridas, juntamente com os materiais obtidos da preparação dos extratos descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2 foram analisados no equipamento de GFAAS modelo AAnalyst 800 da Perkin Elmer (FIG 4.10) do Laboratório de Absorção Atômica do LAN/IPEN-SP.

FIGURA 4.10 - Equipamento de GFAAS modelo AAnalyst 800 da Perkin Elmer para determinação de Cd e Pb.

4.3.1.2 Calibração do equipamento de GFAAS e medida das amostras

Antes da determinação de Cd e Pb nas amostras de planta, extrato e solo foram preparadas soluções de Cd e Pb a partir de soluções estoque (SE) destes mesmos elementos e de solução de HNO_3 0,2% (v/v) (Merck), usado como diluente, para construção da curva de calibração do equipamento. As soluções da curva de calibração são apresentadas na TAB. 4.12 e as curvas de calibração para Cd e Pb são apresentadas nas FIG. 4.11 e 4.12, respectivamente.

TABELA 4.12 - Soluções utilizadas na construção da curva de calibração para determinação de Cd e Pb pela técnica de GFAAS.

Soluções de calibração	Concentração calculada (µg L^{-1})	
	Cd	Pb
Branco	0	0
SE-1	1,335	23,75
SE-2	2,670	47,5
SE-3	4,006	71,25
SE-4	5,341	95
SE-5	6,676	118,75

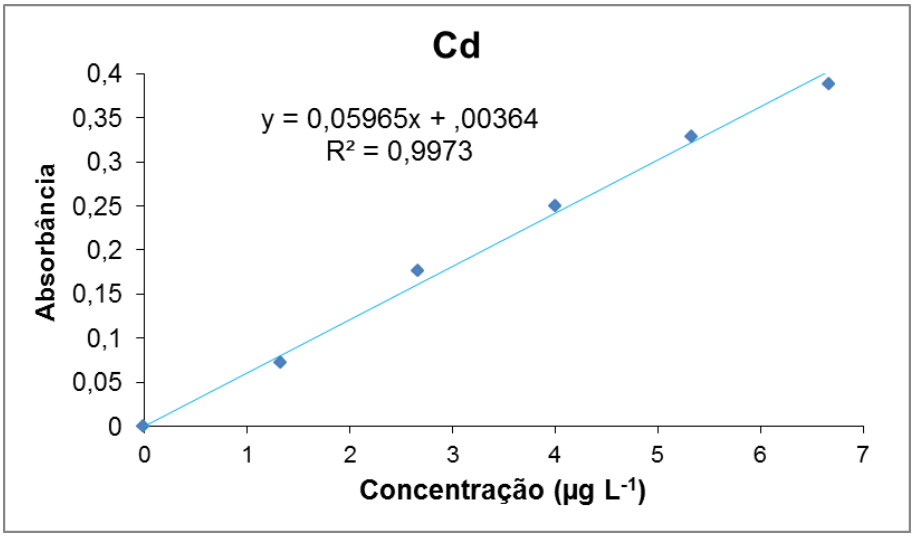


FIGURA 4.11 - Curva de calibração para Cd obtida por GFAAS.

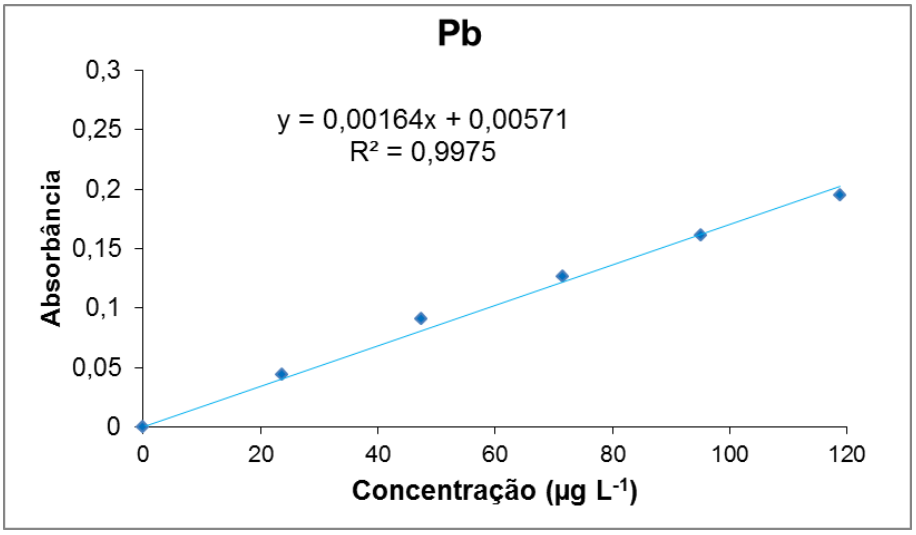


FIGURA 4.12 - Curva de calibração para Pb obtida por GFAAS.

Utilizou-se o programa *Winlab 32 for AAS* versão 6.2.0.0079 (Perkin Elmer) para a construção da curva analítica e leitura das amostras. O sinal analítico foi determinado a partir da área do pico de absorção e utilizou-se o modo de regressão linear para o ajuste da curva.

A linearidade das curvas de calibração foi checada tanto de forma visual no momento das medidas, como também pelo coeficiente de correlação linear das curvas (R). Obteve-se um valor do coeficiente de correlação linear R > 0,99. Dessa forma a reta foi considerada um modelo matemático adequado para esse estudo, onde o sinal do equipamento é diretamente proporcional a concentração dos analitos quantificados.

Na TAB. 4.13 são apresentados os parâmetros de determinação de Cd e Pb ajustados para o equipamento de GFAAS.

TABELA 4.13 - Parâmetros de determinação de Cd e Pb ajustados para análise.

Parâmetros de determinação	**Cd**	**Pb**
Lâmpada	EDL	EDL
Comprimento de onda	228,8 nm	283,3 nm
Fenda	0,7 nm	0,7 nm
Corrente da lâmpada	230 mA	440 mA
Volume de injeção de amostra	20 µL	20 µL
Volume de injeção de modificador químico	10 µL	10 µL

A medida de absorbância da amostra no equipamento de GFAAS é feita quando ocorre a etapa de atomização, que ocorre devido ao aquecimento eletrotérmico do forno de grafite. Na TAB. 4.14 são apresentadas as etapas de aquecimento do forno de grafite utilizadas para cada leitura efetuada no equipamento.

TABELA 4.14 - Etapas de aquecimento do forno de grafite para determinação de Cd e Pb.

Etapa	**Temperatura (°C)**		**Rampa de aquecimento (°C s^{-1})**		**Patamar (s)**		**Fluxo interno de argônio (mL min^{-1})**	
	Cd	**Pb**	**Cd**	**Pb**	**Cd**	**Pb**	**Cd**	**Pb**
Secagem 1	110	110	1	1	30	30	250	250
Secagem 2	130	130	15	15	30	30	250	250
Pirólise	500	500	10	10	20	20	250	250
Atomização	1500	1500	0	0	5	5	0	0
Limpeza	2450	2450	1	1	3	3	250	250

4.3.1.3 Verificação da metodologia

Para verificação da confiabilidade dos resultados na determinação de Cd e Pb por GFAAS foram utilizados os materiais de referência certificados Apple Leaves e Peach Leaves. Na TAB. 4.15 são apresentados os valores obtidos para o desvio padrão relativos (DPR%) e erro relativo (ER%) da metodologia na análise dos materiais de referência.

TABELA 4.15 - Média das concentrações obtidas de Cd e Pb, em ng g^{-1}, para os materiais de referência NIST 1515 (Apple Leaves) e NIST 1542 (Peach Leaves).

Cd (ng g^{-1})					**Pb** (ng g^{-1})				
	Valor Obtido	**Valor Certificado**	**DPR (%)**	**ER (%)**		**Valor Obtido**	**Valor Certificado**	**DPR (%)**	**ER (%)**
n=2					n=2				
Apple Leaves	17±0,4	13±2	2,7	29	Apple Leaves	560±40	470±20	7,6	18,9
Peach Leaves	25±2	26±3	7,1	2,3	Peach Leaves	850±20	870±30	2,6	2,6

n = número de determinações

4.3.2 Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (CVAAS)

4.3.2.1 Princípio do método

A técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio, CVAAS (*Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry*) consiste de um método de atomização frequentemente utilizado na determinação de mercúrio por Espectrometria de Absorção Atômica, por tratar-se de um elemento metálico com considerável pressão de vapor à temperatura ambiente. O método promove a vaporização fria do mercúrio presente na amostra, seguida pela medida de absorção atômica (Skoog et al., 1998).

O mercúrio é convertido a Hg^{2+} por tratamento das amostras com uma mistura oxidante que pode ser HNO_3 e/ou H_2SO_4 (ácido nítrico e ácido sulfúrico), seguida pela redução do Hg^{2+} para mercúrio metálico (Hg^0) pela reação com $SnCl_2$ (Eq. 4.10).

$$\boxed{Hg^{2+} + Sn^{2+} \rightarrow Hg^0 + Sn^{4+}} \qquad \text{(Equação 4.10)}$$

A redução é feita em sistema fechado, usando argônio ou nitrogênio, como gás de arraste, que borbulha na solução. Os átomos de mercúrio metálico são transportados pelo gás para um tubo de absorção, que é colocado no percurso óptico do espectrômetro de absorção atômica, onde é realizada a medida de absorção a 253,7 nm. A quantidade absorvida é proporcional à quantidade do elemento de interesse da amostra. A quantificação do metal se dá com comparação do sinal analítico obtido na leitura da amostra, com a curva analítica (Skoog et al., 1998; Beaty e Kerber, 1993; Baccan, 1994).

4.3.2.2 Procedimento experimental para as análises de Hg por espectrometria de absorção atômica com geração por vapor frio (CVAAS)

As mesmas soluções preparadas descritas no item 4.3.1.1 juntamente com os materiais obtidos da preparação dos extratos descrito nos itens 3.2.1 e 3.2.2 foram analisadas no equipamento de CVAAS, marca Perkin Elmer, modelo FIMS 100 (*Flow Injection Mercury System*) (FIG. 4.13), do Laboratório de Absorção Atômica do LAN/IPEN-SP para as análises de Hg.

As massas utilizadas, das amostras descritas anteriormente, foram determinadas em função de uma avaliação prévia das concentrações dessas amostras.

FIGURA 4.13 - Equipamento de CVAAS marca Perkin Elmer, modelo FIMS 100 (*Flow Injection Mercury System*) para determinação de Hg.

4.3.2.3 Calibração do equipamento de CVAAS e verificação da metodologia

Antes de dar inicio aos procedimentos para determinação de Hg nas amostras, procedeu-se a verificação dos parâmetros de ajuste do equipamento: vazão de $SnCl_2$ 1,1% (m/v) para 4 a 6 mL min.$^{-1}$; ajuste da vazão de HCl 3% (v/v) para 9 a 11 mL min.$^{-1}$; leitura da solução teste de Hg (10,07 ng mL^{-1}) e calibração do equipamento com as soluções padrão (SP) da curva de calibração de modo a obter os valores de interceptação da curva, inclinação e coeficiente de correlação ou seja, construção da curva de calibração para posterior leitura das amostras.

As soluções para a construção da curva analítica – digeridas juntamente com as amostras – e a solução teste (10,07 ng mL^{-1}) foram preparadas a partir de solução padrão de mercúrio (1157,93 ± 0,01 ng mL^{-1}) pipetadas com pipetador automático e diluídas em balão volumétrico calibrado com água do Milli-Q®.

A solução de $SnCl_2$ 1,1% (m/v) foi utilizada para promover a redução do mercúrio iônico à mercúrio metálico, conforme mostrado na Eq. 4.9, e a solução HCl 3% (v/v) foi utilizada como carregador no sistema de injeção em fluxo. Em seguida, procedeu-se a leitura das soluções padrão e do branco para construção da curva analítica, utilizando-se o programa *Winlab 32 for AAS* versão 6.2.0.0079 (Perkim Elmer) e iniciou-se a leitura das amostras da planta, dos extratos, do solo e dos materiais de referência no comprimento de onda de 253,7 nm. O sinal analítico foi determinado a partir da área do pico de absorção e utilizou-se o modo de regressão linear para o ajuste da curva.

Na TAB. 4.16 são apresentadas as concentrações das soluções padrão para a construção da curva analítica. Na FIG. 4.14 é mostrada a curva de calibração.

TABELA 4.16 - Concentração das soluções utilizadas na curva analítica para determinação de Hg por CVAAS.

Soluções de calibração	**Concentração calculada (µg L^{-1})**
	Hg
Branco	0
SP-1	1,6333
SP-2	4,667
SP-3	9,334
SP-4	11,668
SP-5	16,335

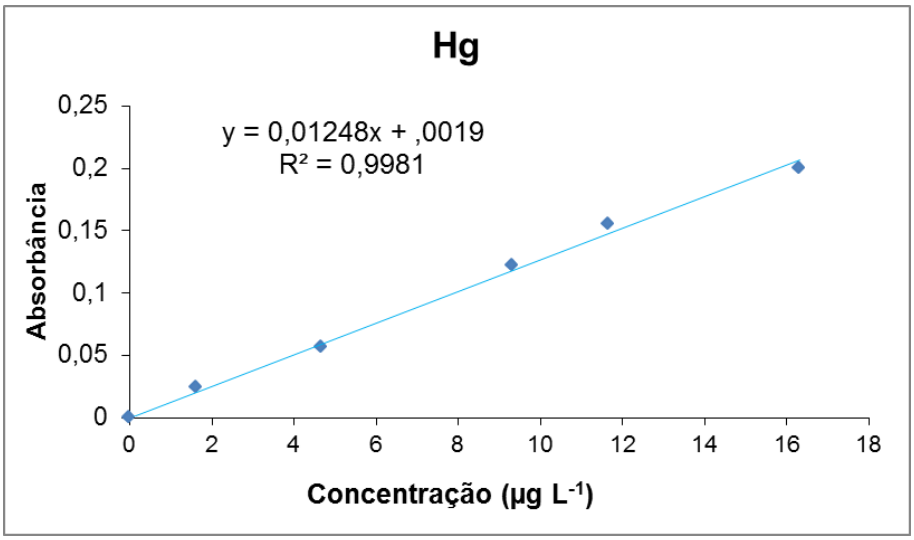


FIGURA 4.14 - Curva de calibração para Hg obtida por CVAAS.

Neste caso, a linearidade das curvas de calibração também foi verificada tanto de forma visual no momento das medidas, como também pelo coeficiente de correlação linear (R). Obteve-se um valor do coeficiente de correlação linear R > 0,99. Dessa forma a reta foi considerada um modelo matemático adequado para esse estudo, onde o sinal do equipamento é diretamente proporcional a concentração dos analitos quantificados.

Para verificação da metodologia quanto à precisão e exatidão foram utilizados os materiais de referência NIST 1515 (Apple Leaves) e NIST 1542 (Peach Leaves). Os materiais de referência foram submetidos aos mesmos procedimentos das amostras e apresentaram valores de concentração abaixo do limites de quantificação (LQ).

O limite de quantificação (LQ) corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excetuando-se o branco). Em geral, é considerado como a média do branco mais 5, 6 ou 10 vezes o desvio padrão. Este procedimento foi utilizado no cálculo de Limite Inferior de Detecção para a técnica por Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (GFAAS) e Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (CVAAS) (Guimarães, 2011).

O Limite Inferior de Detecção e o Limite de Quantificação para determinação de Cd, Pb e Hg são apresentados na TAB. 4.17

TABELA 4.17 – Limite Inferior de Detecção (LID) e Limite de Quantificação (LQ) para Cd, Pb e Hg.

Elemento	LID (µg g^{-1})	LQ (µg g^{-1})
Cd	0,007	0,009
Pb	0,066	0,242
Hg	1,0	10

4.4 Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Peperomia pellucida*

4.4.1 Princípio do método

Os testes foram conduzidos utilizando o método do disco de difusão. Os ensaios de difusão são métodos quantitativos, nos quais o efeito pode ser graduado. Fundamentam-se na difusão da substância a ser ensaiada em um meio de cultura sólido e inoculado com o microrganismo. A partir da difusão ocorre o aparecimento de um halo no qual não há crescimento do microrganismo, denominado halo de inibição.

Dentre as técnicas de difusão, esse método também é o mais adequado para se trabalhar com extratos vegetais coloridos e/ou extraídos com solventes orgânicos, pois é possível evaporar o solvente do disco, antes da colocação deste no meio de cultura e a cor não irá interferir na leitura dos resultados. Assim como, o pequeno volume necessário é uma vantagem observada quando essa técnica é empregada (Naghetini, 2006).

4.4.2 Determinação dos componentes químicos do óleo essencial de *Peperomia pellucida*

Para caracterização físico-química foi realizado o perfil cromatográfico das amostras de óleo essencial de *Peperomia pellucida*.

O perfil cromatográfico foi conduzido em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM, Shimadzu, QP-5000), dotado de coluna capilar de sílica fundida OV - 5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm Ohio Valley Specialty Chemical, Inc.), operando por impacto de elétrons (70 eV), realizado no Laboratório de Fitoquímica do Instituto Agronômico, Campinas e a identificação das substâncias foi realizada no Centro de Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo pela Profa. Dra. Joana D’arc Felício.

A identificação das substâncias foi efetuada através da comparação dos seus espectros de massas com o banco de dados do sistema CG-EM, literatura (McLafferty and Stauffer, 1989) e índice de retenção (Adams, 2001).

4.4.3 Microrganismo teste

A cultura do fungo *Aspergillus flavus* foi isolada de amendoim e gentilmente cedida pelo Instituto de Biociências da USP – São Paulo - SP.

4.4.4 Reagentes e padrão antifúngico

Foram utilizados reagentes de grau analítico. Utilizou-se como meio de cultivo BDA (batata-dextrose-ágar – BDA–MERCK), discos de papel estéreis de 6 mm, e placas de Petri descartáveis (100 x 20 mm). Como controle positivo foi empregado o fungicida Derosal® 500 Bayer.

4.4.5 Preparo do inóculo

Aspergillus flavus foi inoculado em meio de cultura BDA e mantido por 10 dias a 25 ºC. No 11º dia foi preparada uma suspensão de esporos desta cultura, adicionando uma solução estéril de água destilada + Tween 80 (0,2 %) (FIG. 4.15).

FIGURA 4.15 - *Aspergillus flavus* em meio de cultura BDA.

4.4.6 Ensaios microbiológicos

A solução com os esporos de *Aspergillus flavus* foram inoculadas nas placas de Petri preparadas com o meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar – BDA–MERCK) por meio da técnica de *Swab* (FIG. 4.16 III)

Discos de papéis estéreis de 6 mm de diâmetro foram adicionados assepticamente na área central da placa de Petri e foram impregnados com

diferentes alíquotas do óleo *in natura* (100%), óleo diluído em 50% e com os extratos hexânicos e etanólicos. A solução diluída a 50% foi preparada com 30 µL de óleo essencial de *Peperomia pellucida* + 30 µL de óleo de soja. Os discos foram impregnados com 5 µL e 15 µL do óleo diluído, 5 µL e 10 µL do óleo essencial *in natura* e 5 µL e 15 µL de cada um dos extratos hexânico e etanólico de *Peperomia pellucida*. Para controles positivos, os discos de papel foram impregnados com o fungicida Derosal®. As placas foram incubadas por 5 dias a temperatura de 25°C. O diâmetro dos halos foi medido com régua considerando o diâmetro total do disco (em mm). Os testes foram realizados em triplicatas e os experimentos foram realizados em duas repetições (FIG. 4.16).

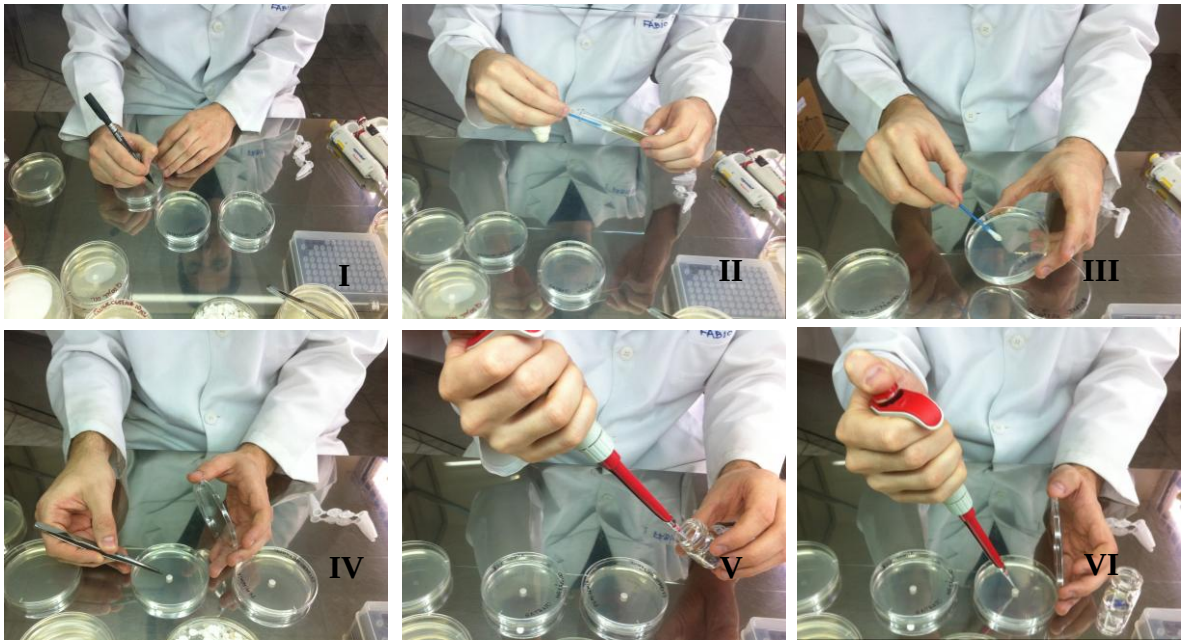


FIGURA 4.16 - Etapas dos ensaios microbiológicos: Identificação das placas (I), solução de esporos (II), inoculação do fungo no meio de cultura pela técnica de *Swab* (III), adição dos discos de papéis no centro das placas (IV), pipetagem de diferentes aliquotas do óleo essencial e dos extratos (V) e impregnação (VI).

4.4.7 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância pelo teste de ANOVA com nível de significância de $p < 0,05$ e o teste de Tukey-Kramer para análise de variância por comparação múltipla com nível de significância $p < 0,05$ e $q > 4,457$, utilizando o programa GraphPad Instat versão 2.00.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados de concentração para os elementos determinados por Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (AANI)

São apresentados a seguir os elementos determinados, suas concentrações e incertezas nas análises realizadas em duplicatas nas diferentes partes estudadas de *Peperomia pellucida*, Folhas (FPEP), Partes Aéreas, compreendendo folhas e caule (PPEP) e Raiz (RPEP); nos extratos obtidos pelos processos de Maceração (MPEP) e Infusão (IPEP) e no Solo (SPEP) em diferentes pontos de coleta. Os locais de coletas foram o Jardim Botânico do Rio de Janeiro e alguns pontos em suas proximidades. Os pontos de coleta estão localizados numa área metropolitana e que apresenta grande influência do trafego urbano e da deposição atmosférica dos poluentes emitidos por diferentes fontes de poluição, principalmente veiculares.

Na TAB. 5.1 são apresentados os elementos determinados e suas concentrações nas amostras PPEP, RPEP e SPEP coletados no período de agosto de 2009, ponto 1 (P1).

Na TAB. 5.2 encontram-se os elementos determinados e suas concentrações nas amostras PPEP, RPEP e SPEP coletadas em agosto de 2010, ponto 2 (P2). Os extratos MPEP e IPEP referentes a esta coleta são mostrados na TAB. 5.3.

Os elementos determinados e suas concentrações nas amostras FPEP, PEPP, RPEP e SPEP coletadas em dezembro de 2010, ponto 3 (P3) são mostrados na TAB. 5.4. Os extratos MPEP e IPEP referentes a esta coleta são mostrados na TAB. 5.5.

TABELA 5.1 - Concentrações e desvios, em µg g^{-1}, determinados por ativação neutrônica para as amostras PPEP, RPEP e SPEP coletadas no ponto P1.

Amostra	As	Ba	Br	Ce	Co
PPEP	11 ±1	268 ±41	15 ±4	57 ±3	1,96 ±0,08
RPEP	13 ±2	310 ±42	14 ±5	182 ±11	3,7 ±0,1
SPEP	8 ±1	538 ±53	13 ±3	219 ±10	9,5 ±0,3
	Cr	**Cs**	**Eu**	**Fe(%)**	**Hf**
PPEP	11 ±1	0,8 ±0,1	0,55 ±0,04	0,656 ±0,006	2,67 ±0,09
RPEP	16 ±2	1,1 ±0,2	0,76 ±0,06	0,927 ±0,003	6,5 ±0,2
SPEP	46 ±4	3,2 ±0,3	2,1 ±0,1	3,45 ±0,01	14,7 ±0,3
	K(%)	**La**	**Lu**	**Na**	**Nd**
PPEP	3,8 ±0,5	23,6 ±0,3	0,10 ±0,02	3370 ±63	17 ±2
RPEP	4,3 ±0,9	81 ±1	0,16 ±0,04	3858 ±113	62 ±6
SPEP	1,0 ±0,5	100 ±1	0,6 ±0,1	4197 ±89	78 ±6
	Rb	**Sb**	**Sc**	**Sm**	**Ta**
PPEP	75 ±6	0,6 ±0,1	2,15 ±0,07	3,5 ±0,1	0,37 ±0,05
RPEP	65 ±5	0,7 ±0,1	2,9 ±0,1	12,0 ± 0,4	0,49 ±0,07
SPEP	105 ±6	1,7 ±0,2	11,4 ±0,3	15,1 ± 0,4	1,67 ±0,17
	Tb	**Th**	**U**	**Yb**	**Zn**
PPEP	0,36 ±0,06	8,2 ±0,6	1,4 ±0,2	0,79 ±0,08	173 ±11
RPEP	0,8 ±0,1	30 ±2	3,6 ±0,6	0,98 ±0,08	262 ±16
SPEP	1,4 ±0,2	30 ±2	5,0 ±0,5	4,02 ±0,28	301 ±13

PPEP – Partes aéreas
RPEP – Raiz
SPEP – Solo
nd = não determinado

TABELA 5.2 - Concentrações e desvios, em µg g^{-1}, determinados por ativação neutrônica para as amostras PPEP, RPEP e SPEP coletadas no ponto P2.

Amostra	As	Ba	Br	Ce	Co
PPEP	0,51 ±0,04	206 ±12	15 ±1	5,8 ±0,2	0,44 ±0,02
RPEP	2,6 ±0,4	252 ±17	14 ±1	26 ±2	1,9 ±0,1
SPEP	6,9 ±0,3	468 ±34	23 ±2	211 ±20	8,6 ±0,4
	Cr	**Cs**	**Eu**	**Fe(%)**	**Hf**
PPEP	2,5 ±0,4	0,25 ±0,04	0,083 ±0,009	0,163 ±0,006	0,34 ±0,04
RPEP	9 ±1	0,9 ±0,1	0,28 ±0,18	0,622 ±0,021	1,1 ±0,1
SPEP	48 ±7	3,5 ±0,4	1,7 ±0,2	3,5 ±0,1	8,8 ±0,8
	K(%)	**La**	**Lu**	**Na**	**Nd**
PPEP	3,5 ±0,3	3,5 ±0,3	0,03 ±0,01	1494 ±77	1,4 ±0,5
RPEP	3,8 ±0,3	11,8 ±0,9	0,11 ±0,05	1885 ±98	4,3 ±1,4
SPEP	1,4 ±0,1	92 ±7	0,5 ±0,2	4019 ±214	28 ±9
	Rb	**Sb**	**Sc**	**Sm**	**Th**
PPEP	68 ±12	0,14 ±0,01	0,47 ±0,02	0,42 ±0,04	0,89 ±0,04
RPEP	110 ±19	0,40 ±0,03	1,99 ±0,09	1,5 ±0,1	3,3 ±0,2
SPEP	105 ±19	1,27 ±0,12	10,5 ±0,5	11 ±1	28 ±1
	U	**Zn**			
PPEP	<LID	130 ±9			
RPEP	0,42 ±0,02	321 ±22			
SPEP	3,2 ±0,2	387 ±24			

PPEP – Partes aéreas
RPEP – Raiz
SPEP – Solo

TABELA 5.3 - Concentrações e desvios, em µg g^{-1}, determinados por ativação neutrônica para as amostras MPEP e IPEP de *Peperomia pellucida* coletada no ponto P2.

Amostra	**As**	**Ba**	**Br**	**Ce**	
MPEP	<LID	3,1 ±0,4	3,3 ±0,3	<LID	
IPEP	0,11 ±0,01	21 ±2	2,7 ±0,3	<LID	
	Co	**Cr**	**Cs**	**Eu**	
MPEP	0,103 ±0,003	1,6 ±0,1	0,061 ±0,005	<LID	
IPEP	0,118 ±0,003	0,6 ±0,1	0,055 ±0,004	<LID	
	Fe(%)	**Hf**	**La**	**Lu**	
MPEP	0,0022 ±0,0001	<LID	0,149 ±0,004	<LID	
IPEP	0,0026 ±0,0001	<LID	0,18 ±0,01	<LID	
	Na	**Rb**	**Sb**	**Sc**	
MPEP	1456 ±113	51 ±3	0,021 ±0,001	0,0031 ±0,0001	
IPEP	1411 ±61	50 ±3	0,11 ±0,01	0,0071 ±0,0002	
	Sm	**Ta**	**Th**	**U**	**Zn**
MPEP	0,035 ±0,002	<LID	<LID	<LID	30 ±1
IPEP	0,065 ±0,003	nd	<LID	<LID	38 ±1

MPEP – Maceração
IPEP – Infusão
nd = não determinado

TABELA 5.4 - Concentrações e desvios, em µg g^{-1}, determinados por ativação neutrônica para as amostras FPEP, PPEP, RPEP e SPEP coletadas no ponto P3.

Amostra	As	Ba	Br	Ce	
FPEP	1,1 ±0,1	154 ±6	19,2 ±0,6	8,4 ±0,5	
PPEP	0,9 ±0,1	175 ±16	18 ±2	1,9 ±0,1	
RPEP	5,4 ±0,4	188 ±17	7 ±1	5,7 ±0,4	
SPEP	19 ±1	374 ±34	8 ±1	149 ±7	
	Cl	**Co**	**Cr**	**Cs**	
FPEP	21672 ±1078	0,37 ±0,01	8,0 ±0,5	0,11 ±0,01	
PPEP	17891 ±471	0,45 ±0,01	4,5 ±0,3	0,24 ±0,03	
RPEP	nd	1,22 ±0,04	6,2 ±0,4	0,60 ±0,08	
SPEP	nd	7,7 ±0,2	40 ±3	2,2 ±0,3	
	Eu	**Fe(%)**	**Hf**	**K(%)**	
FPEP	nd	0,061 ±0,001	nd	nd	
PPEP	0,03 ±0,01	0,058 ±0,001	0,115 ±0,006	5,9 ±0,8	
RPEP	0,16 ±0,05	0,230 ±0,005	0,235 ±0,008	4,1 ±0,7	
SPEP	1,2 ±0,3	3,28 ±0,07	9,0 ±0,2	1,8 ±0,4	
	La	**Lu**	**Mg**	**Mn**	
FPEP	4,6 ±0,3	nd	13156 ±1400	61 ±8	
PPEP	0,94 ±0,03	0,007 ±0,001	13731 ±573	61 ±7	
RPEP	5,5 ±0,2	0,04 ±0,01	nd	nd	
SPEP	72 ±2	0,34 ±0,05	nd	nd	
	Na	**Nd**	**Rb**	**Sb**	
FPEP	1046 ±46	nd	nd	0,042 ±0,005	
PPEP	1601 ±79	nd	111 ±8	0,08 ±0,01	
RPEP	2028 ±72	4,7 ±0,6	82 ±4	0,17 ±0,01	
SPEP	5410 ±190	62 ±4	108 ±15	0,71 ±0,05	
	Sc	**Sm**	**Th**	**U**	**Zn**
FPEP	0,147 ±0,004	0,54 ±0,03	1,66 ±0,09	<LID	114 ±3
PPEP	0,17 ±0,01	0,15 ±0,01	0,27 ±0,01	<LID	162 ±7
RPEP	0,91 ±0,03	0,90 ±0,03	0,93 ±0,05	<LID	279 ±12
SPEP	9,6 ±0,3	11,8 ±0,4	31 ±2	3,0 ±0,2	241 ±10

FPEP – Folhas
PPEP – Partes aéreas
RPEP – Raiz
SPEP – Solo
nd – não determinado

TABELA 5.5 - Concentrações e desvios, em µg g^{-1}, determinados por ativação neutrônica para as amostras MPEP e IPEP de *Peperomia pellucida* coletada no ponto P3.

Amostra	**Ba**	**Br**	**Ce**	**Cl**
MPEP	20 ±2	2,3 ±0,2	0,63 ±0,06	6158 ±289
IPEP	24 ±2	2,6 ±0,7	nd	1992 ±111
	Co	**Cr**	**Cs**	**Fe(%)**
MPEP	0,128 ±0,004	0,38 ±0,03	0,11 ±0,01	0,0027 ±0,0001
IPEP	0,178 ±0,005	1,11 ±0,09	0,15 ±0,02	0,0036 ±0,0001
	K(%)	**La**	**Mg**	**Mn**
MPEP	nd	0,114 ±0,007	5150 ±312	10,8 ±0,2
IPEP	4,6 ±0,8	0,062 ±0,004	2406 ±126	20,6 ±0,3
	Na	**Rb**	**Sb**	**Sc**
MPEP	1335 ±50	108 ±6	0,038 ±0,003	0,0035 ±0,0001
IPEP	1557 ±29	103 ±4	0,054 ±0,006	0,0055 ±0,0002
	Sm	**Th**	**U**	**Zn**
MPEP	0,009 ±0,002	<LID	<LID	27 ±1
IPEP	nd	<LID	<LID	70 ±3

MPEP – Maceração
IPEP – Infusão
nd = não determinado

5.2 Resultados de concentração de atividade dos elementos ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb determinados por contagem alfa e beta total após separação radioquímica

Nas tabelas a seguir são apresentados os resultados das concentrações de atividade de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb e suas incertezas.

Na TAB. 5.6 são apresentados os resultados das concentrações de atividade de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb nas Partes Aéreas da planta, compreendendo caule e folhas (PPEP) e no Solo (SPEP) coletados no ponto P1. Na TAB. 5.7 são apresentados os resultados das concentrações de atividade de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb nas Partes Aéreas da planta (PPEP), no Solo (SPEP) coletados no ponto P2 e nos extratos obtidos por Maceração (MPEP) e Infusão (IPEP). Os resultados da concentração de atividade de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb nas Folhas (FPEP), Partes Aéreas (PPEP), Raiz (RPEP), Solo (SPEP) coletados no P3 e nos extratos (MPEP e IPEP) são mostrados na TAB. 5.8.

TABELA 5.6 - Concentração de atividade de ^{226}Ra,^{228}Ra e ^{210}Pb, em Bq kg^{-1}, nas amostras PPEP e SPEP coletadas no P1.

Amostra	^{226}Ra	^{228}Ra	^{210}Pb
PPEP	22 ± 1	54 ± 12	51 ± 10
SPEP	55 ± 2	103 ± 13	119 ± 10

PPEP – Partes aéreas
SPEP – Solo

TABELA 5.7 - Concentração de atividade de ^{226}Ra,^{228}Ra e ^{210}Pb e desvios, em Bq kg^{-1}, nas amostras PPEP, do SPEP, do MPEP e da IPEP coletadas no P2.

Amostra	**^{226}Ra**	**^{228}Ra**	**^{210}Pb**
PPEP	20 ± 1	43 ± 11	132 ± 8
SPEP	44 ± 2	68 ± 8	259 ± 9
MPEP	12 ± 1	25 ± 7	30 ± 6
IPEP	15 ± 1	28 ± 5	32 ± 7

PPEP – Partes aéreas
SPEP – Solo
MPEP – Maceração
IPEP – Infusão

TABELA 5.8 - Concentração de atividade de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb e desvios, em Bq kg^{-1}, nas amostras FPEP, PPEP, RPEP,SPEP, MPEP e IPEP coletadas no P3.

Amostras	^{226}Ra	^{228}Ra	^{210}Pb
FPEP	<10	<10	39 ± 5
PPEP	8,5 ± 0,2	2,8 ± 0,3	52 ± 3
RPEP	23,2 ± 0,2	10 ± 1	58 ± 6
SPEP	37 ± 1	46 ± 4	93 ± 3
MPEP	5,3 ± 0,1	<LID	22 ± 3
IPEP	6,2 ± 0,1	<LID	24 ± 3

FPEP – Folhas
PPEP – Partes aéreas
RPEP – Raiz
SPEP – Solo
MPEP – Maceração
IPEP – Infusão

5.3 Resultados de concentração para Cd, Hg e Pb nas amostras determinadas por Espectrometria de Absorção Atômica (AAS)

As amostras de *Peperomia pellucida* e do solo coletadas nos pontos P2 e P3 foram submetidas à determinação de Hg (CVAAS), Cd e Pb (GFAAS). Foram analisadas as amostras de Folhas (FPEP), Partes Aéreas, compreendendo folhas e caule (PPEP), Solo (SPEP) e os extratos obtidos por Maceração (MPEP) e Infusão (IPEP). As análises foram feitas em duplicatas.

Nas TAB. 5.9 e 5.10 são apresentados os resultados das concentrações dos elementos Hg (CVAAS), Cd e Pb (GFAAS) e desvios nas amostras PPEP, RPEP, SPEP e nos extratos MPEP e IPEP coletadas no ponto P2 e P3, respectivamente.

TABELA 5.9 - Concentração de Hg total (CVAAS), em µg g^{-1}; Cd e Pb (GFAAS), em µg g^{-1}, determinada nas amostras coletas no ponto P2.

Amostra (n=2)	Hg	Cd	Pb
FPEP	< LID	nd	nd
PPEP	< LID	2,14 ± 0,05	7,1 ± 0,8
RPEP	< LID	2,041 ± 0,004	12,6 ± 0,1
SPEP	< LID	2,157 ± 0,005	69 ± 3
MPEP	< LID	0,0656 ± 0,0004	3,2 ± 0,2
IPEP	< LID	0,203 ± 0,001	5,12 ± 0,01

FPEP – Folhas
PPEP – Partes aéreas
RPEP – Raiz
SPEP – Solo
MPEP – Maceração
IPEP – Infusão
LD – Limite de Detecção
nd = não determinado

TABELA 5.10 - Concentração de Hg total (CVAAS), Cd e Pb (GFAAS), em µg g^{-1}, determinada nas amostras coletas no ponto P3.

Amostra (n=2)	Hg	Cd	Pb
FPEP	< LID	1,826 ± 0,009	11,7 ± 0,3
PPEP	< LID	2,184 ± 0,005	14,1 ± 0,5
RPEP	< LID	1,23 ± 0,01	28 ± 1
SPEP	< LID	0,702 ± 0,003	54,2 ± 0,5
MPEP	< LID	0,130 ± 0,002	2,51 ± 0,02
IPEP	< LID	0,209 ± 0,001	1,7 ± 0,2

FPEP – Folhas
PPEP – Partes aéreas
RPEP – Raiz
SPEP – Solo
MPEP – Maceração
IPEP – Infusão
LD – Limite de Detecção

5.4 Resultados da avaliação da atividade antifúngica frente ao fungo *Aspergillus flavus* e da constituição química do óleo essencial de *Peperomia pellucida*.

O óleo essencial das partes aéreas *in natura*, compreendendo caule e folhas de *Peperomia pellucida,* apresentou um rendimento de 0,032% (TAB. 5.11).

TABELA 5.11 - Rendimento do óleo essencial obtidos das partes aéreas frescas de *Peperomia pellucida* coletada no ponto P3.

Coleta (P3)	Ensaio	Rendimento (g/100g)
14.02.11	12.05.11	0,032

5.4.1 Teste do Disco de Difusão

Na TAB. 5.12 estão apresentados os valores dos halos de inibição nos testes de atividade antifúngica do óleo essencial contra o fungo *Aspergillus flavus.*

Os ensaios microbiológicos foram feitos com as amostras frescas de *P. pellucida* coletadas no ponto P3, em triplicatas e os experimentos foram realizados em duas repetições.

TABELA 5.12 - Halos de inibição do crescimento (mm e %) obtidos para diferentes alíquotas do óleo essencial de *Peperomia pellucida* e para Derosal® (Controle Positivo) contra o fungo *Aspergillus flavus.*

Óleo essencial de *Peperomia pellucida* (n=6)					Derosal® (n=3)
Alíquotas	2,5 µL	5,0 µL	7,5 µL	10,0 µL	
	Halos de inibição (mm) Média ± DP				
Aspergillus flavus	8,4±0,5	10,5±0,4	9,5±0,6	12,3±0,3	21±1
Inibição do crescimento (%)	40	50	45	55	100

DP = Desvio Padrão
n = número de determinações

O efeito inibidor no crescimento de *Aspergillus flavus* por diferentes alíquotas do óleo essencial de *Peperomia pellucida* e a projeção da CI_{50} para o óleo essencial de *P. pellucida* em *A. flavus* são apresentados na FIG. 5.1. O valor de CI_{50} considerado foi a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir visualmente 50% do crescimento fúngico.

Pode-se observar pela projeção de CI_{50} que o volume de 5 µL inibi 50% do crescimento do fungo *Aspergillus flavus*.

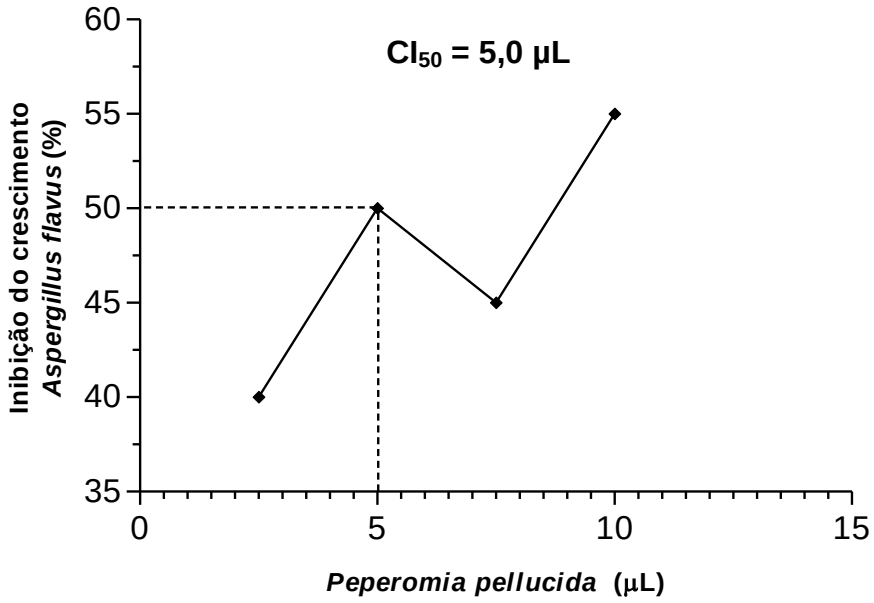


FIGURA 5.1 - Efeito inibidor por diferentes alíquotas do óleo essencial e a projeção CI_{50}.

Os extratos hexânico e etanólico de *Peperomia pellucida* não apresentaram efeito antifúngico em nenhuma das concentrações ensaiadas frente ao fungo *Aspergillus flavus*.

5.4.2 Constituição química do óleo essencial de *Peperomia pellucida*

A composição química dos óleos voláteis de *Peperomia pellucida* foi realizada nas amostras coletadas no ponto P3. Para a determinação do perfil químico do óleo essencial procedeu-se inicialmente a análise por cromatografia gasosa (GC/MS). O resultado preliminar da caracterização por GC/MS foi submetido aos valores tabelados de índice de retenção para interpretação dos espectros de massas. Foram determinadas 16 substâncias das quais 14 foram identificadas, que representam cerca de 98,35% do total de componentes do óleo de *P. pellucida*. (TAB. 5.13).

TABELA 5.13 - Componentes determinados no óleo essencial de *P. pellucida*

Pico	Substância	Tempo de retenção (min)	[%]	IR*	IR**
Hidrocarbonetos de cadeia longa			**2,95**		
1	n-dodecano	16,53	0,48	1199	1199
3	n-tetradecano	24,93	1,72	1394	1399
8	n-pentadecano	29,03	0,70	1493	1500
Sesquiterpenos hidrocarbonados			**27,33**		
4	*trans*-cariofileno	25,73	2,62	1413	1418
5	aromadendreno	27,49	0,83	1456	1462
6	γ-muuroleno	28,25	0,99	1474	1477
7	biciclogermacreno	28,87	1,01	1490	1494
9	(*E,E*)-α-farneseno	29,34	0,57	1501	1508
10	germacreno B	31,44	20,86	1555	1556
Sesquiterpenos oxigenados			**13,42**		
11	*trans*-nerolidol	31,52	1,60	1557	1564
13	espatulenol	32,25	0,77	1576	1576
14	óxido de cariofileno	32,79	10,83	1590	1581
Fenilpropanóides			**56,30**		
15	dilapiol	33,86	53,35	1618	1620
16	apiol	35,90	2,02	1673	1678
Não identificados (ni)			**1,68**		
2	ni	16,83	0,64	1226	ni
12	ni	32,03	1,01	1570	ni
	Total		**100,00**		

(*) Índice de retenção experimental;
(**) Índice de retenção literatura (Adams, 2001).

Nas FIG. 5.2 e 5.3 são apresentados, respectivamente, o cromatograma do óleo essencial de *Peperomia pellucida* e as estruturas químicas das substâncias identificadas.

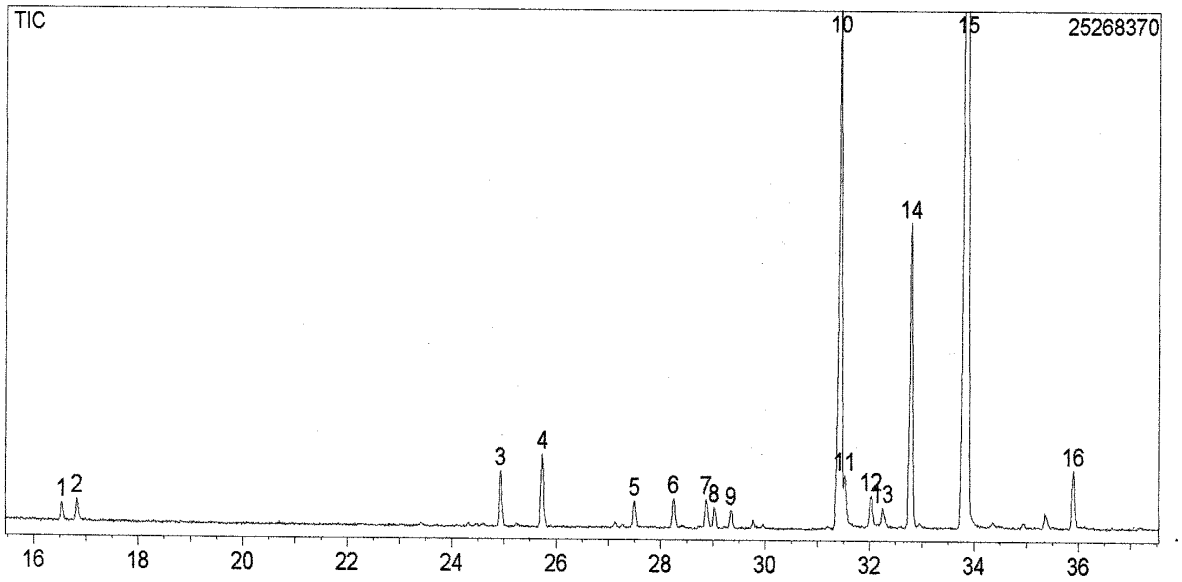


FIGURA 5.2 - Cromatograma do óleo essencial de *Peperomia pellucida*: (1) n-dodecano, (2) ni, (3) n-tetradecano, (4) *trans*-cariofileno, (5) aromadendreno, (6) γ-muuroleno, (7) biciclogermacreno, (8) n-pentadecano, (9) (*E,E*)-α-farneseno, (10) germacreno B, (11) *trans*-nerolidol, (12) ni, (13) espatulenol, (14) óxido de cariofileno, (15) dilapiol, (16) apiol.

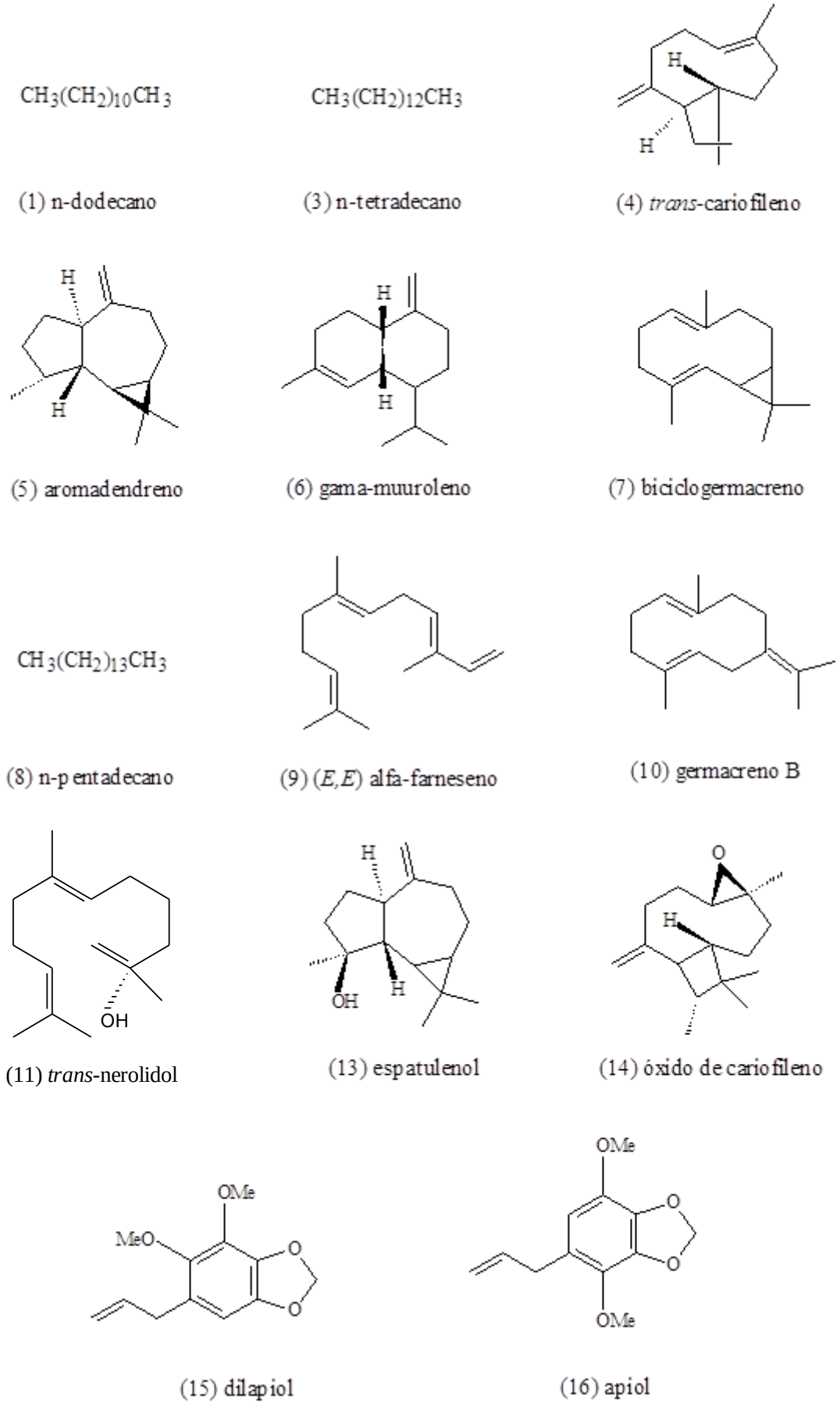


Figura 5.3 - Estruturas químicas identificadas no óleo essencial obtido das partes aéreas de *Peperomia pellucida.*

6. DISCUSSÃO

Para uma melhor visualização dos resultados obtidos pela Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (INAA), Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) e Contagem alfa e beta total com Separação Radioquímica, os elementos determinados e suas concentrações e atividades são apresentados na forma gráfica. Pelos mesmos motivos os resultados obtidos pelos ensaios com o Teste do Disco de Difusão são apresentados em formato de figura.

6.1 Elementos estáveis e radionuclídeos

Nas FIG. 6.1, 6.2, 6.3 e 6.4 são apresentadas as concentrações (mg kg^{-1}), exceto onde indicado por (%), dos elementos As, Ba, Br, Cl, Co, Cr, Cs, Fe, Hf, K, Na, Rb, Sb, Mg, Mn, Ta, Th, U, Zn e dos Elementos Terras Raras –ETR (Ce, Eu, Lu, La, Nd, Sc, Sm, Tb e Yb) determinados nas amostras de Folhas (FPEP), Partes Aéreas, compreendendo caule e folhas (PPEP), Raiz (RPEP) e Solo (SPEP) pela técnica de Análise por Ativação Neutrônica Instrumental (INAA).

A concentração elementar nas Folhas de *Peperomia pellucida* foi determinada apenas nas amostras coletadas no ponto P3 (Dezembro de 2010).

Os elementos Cl, Mg e Mn foram determinados apenas nas Folhas (FPEP) e nas Partes Aéreas (PPEP) nas amostras coletadas no ponto P3.

Como foi proposto no objetivo deste trabalho, apresentam-se os resultados referentes aos teores de As, Ba, Br, Co, Cr, Cs, Fe, Hf, K, Na, Rb, Sb, Mg, Mn, Se, Ta, Th, U e Zn e dos teores de ETR, seu comportamento nas diferentes partes da planta e a absorção a partir do solo. Observando-se os teores obtidos para a maioria dos elementos, as concentrações obedecem ao seguinte comportamento em ordem decrescente: SPEP>RPEP>PPEP>FPEP nos três pontos coletados (P1, P2 e P3). No entanto, para alguns elementos como o As, Br, Ce, Cl, Cr, La e Sm, não é observado este comportamento no ponto P3, sendo as concentrações maiores nas Folhas (FPEP) que nas Partes Aéreas.

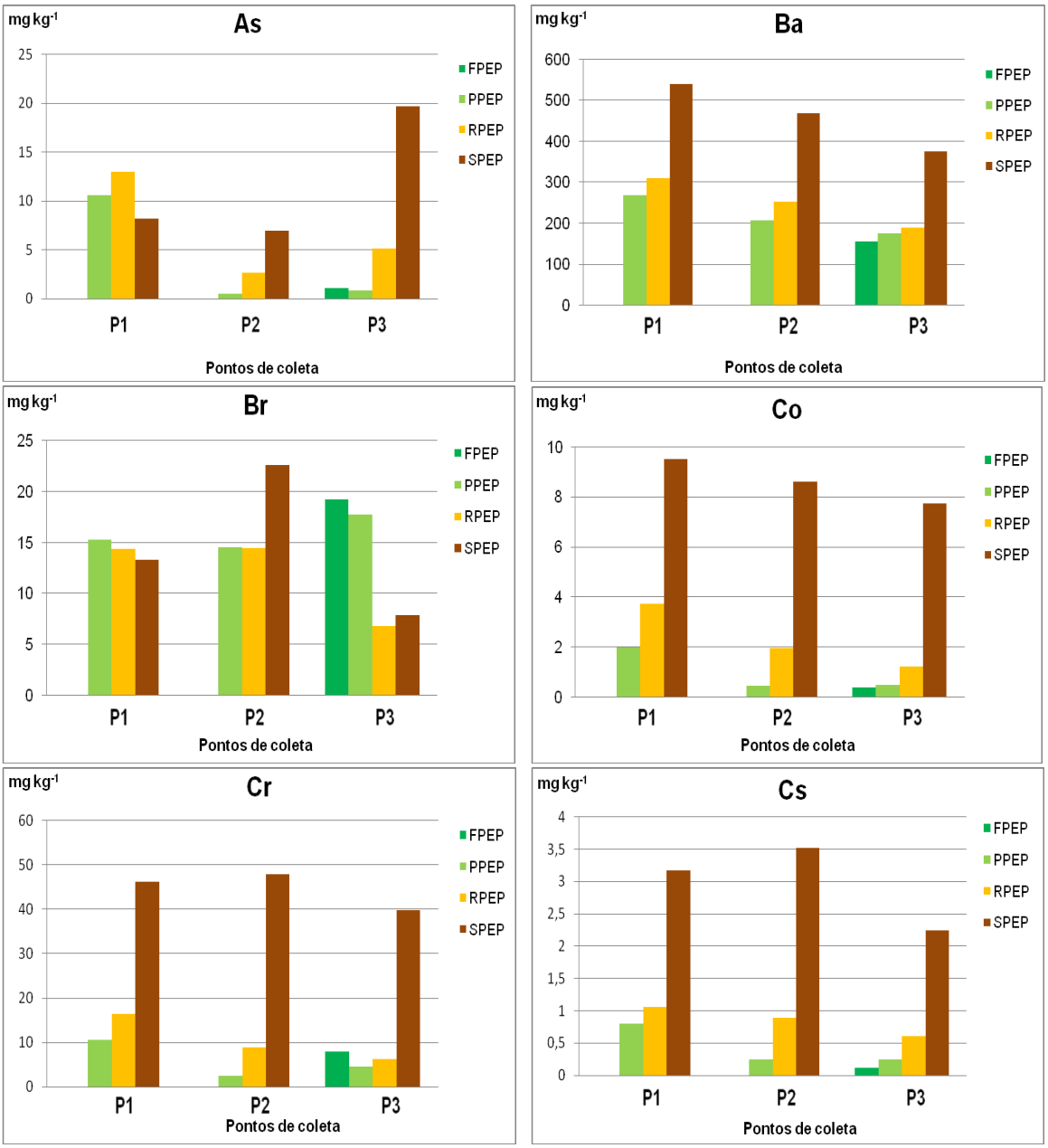


FIGURA 6.1 - Concentração (mg kg^{-1}) de As, Ba, Br, Co, Cr e Cs nas amostras de FPEP, PPEP, RPEP e SPEP nos pontos coletados P1, P2 e P3.

E para os elementos K e Rb (FIG. 6.2), as concentrações nas Partes Aéreas (PPEP) são maiores que na Raiz (RPEP) e Solo (SPEP). Isso se deve ao fato que nem todos os elementos são igualmente retidos nas diferentes partes de uma planta. Fatores, como estágios de desenvolvimento da planta, tempo de exposição ao elemento (Martins, 2009) e a interferência de outros metais no solo podem influenciar na translocação dos elementos da raiz para caule e folhas (Silva, 2007). Deve-se observar que neste estudo foram analisadas todas as

plantas coletadas sem uma separação ou classificação em função de seu estágio de crescimento.

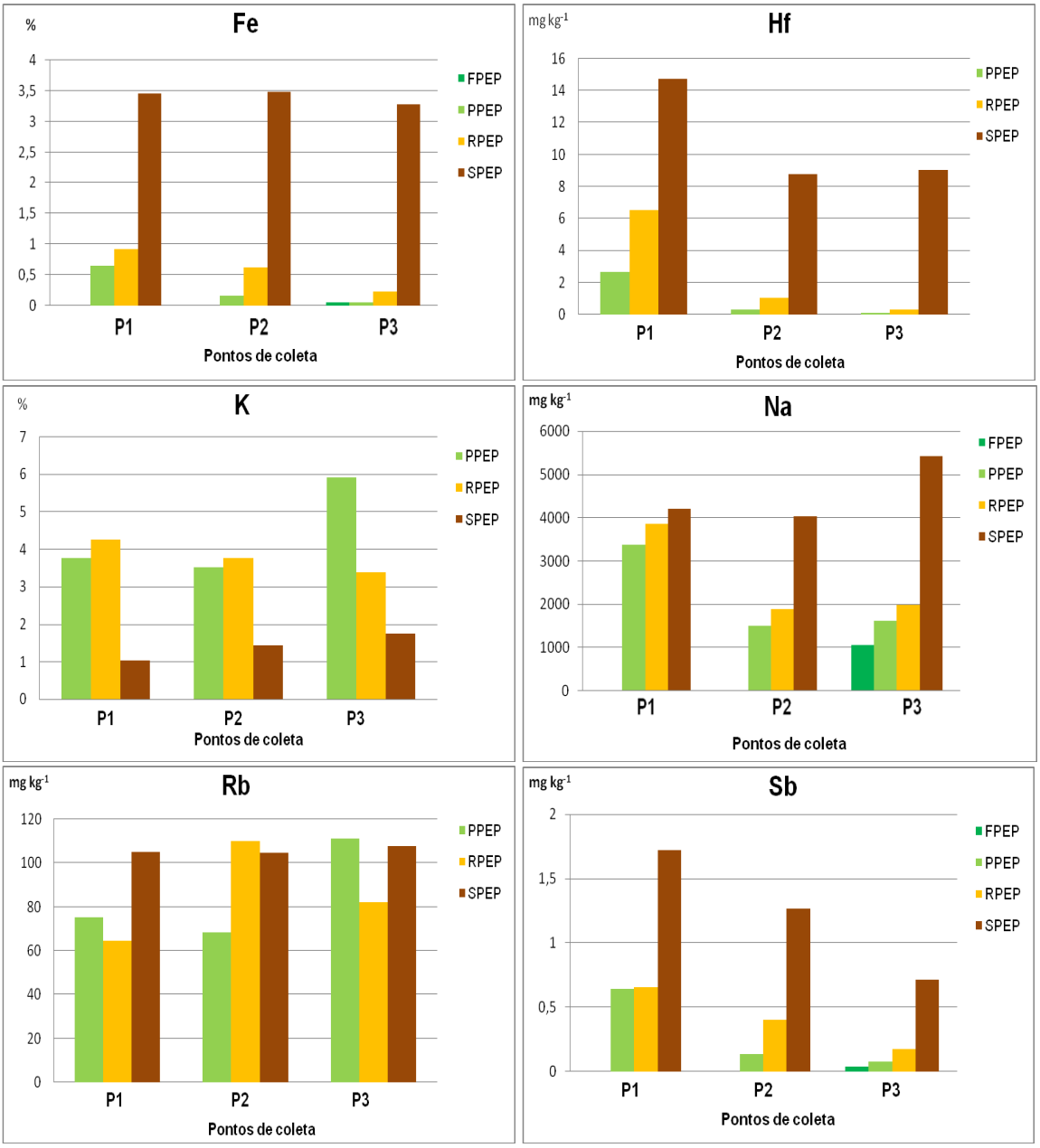


FIGURA 6.2 - Concentração (mg kg^{-1}), exceto onde indicado (%), de Fe, Hf, K, Na, Rb e Sb nas amostras de FPEP, PPEP, RPEP e SPEP nos pontos coletados P1, P2 e P3.

Pode-se observar que as amostras das Partes Aéreas (PPEP) coletadas no ponto P1 apresentaram concentrações mais elevadas dos elementos em relação aos pontos P2 e P3, com exceção para os elementos Br, K

e Rb que apresentaram concentrações mais elevadas nas Partes Aéreas das amostras coletadas no ponto P3 (FIG. 6.1 e 6.2).

A pesquisa de metais e elementos traços em *Peperomia pellucida* revela, dentre os elementos determinados, a presença de minerais de importância na fisiologia humana, como o potássio, magnésio, cloro, ferro, sódio, cobalto, cromo e zinco.

Para o cobalto (FIG. 6.1), verificam-se concentrações de 0,44 mg kg^{-1} a 1,96 mg kg^{-1} para as Partes Aéreas de *P. pellucida* (PPEP) e concentração de 0,37 mg kg^{-1} nas Folhas (FPEP). O Co é essencial para o ser humano para a síntese de vitamina B_{12}. A recomendação diária de ingestão de vitamina B_{12} para adultos é 3 µg (0,13 µg Co) (Kabata-Pendias, 2007).

As concentrações de Cr (FIG. 6.1) variaram de 2,5 mg kg^{-1} a 11 mg kg^{-1} nas Partes Aéreas (PPEP) e nas Folhas a concentração foi de 8,0 mg kg^{-1}. No ser humano o cromo é um elemento essencial usado como co-fator para síntese de insulina, participa no controle dos índices de colesterol e de triglicérides no sangue. A sua toxicidade esta relacionada com seu estado de oxidação. O Cr^{6+} é considerado altamente toxico e alguns compostos de Cr^{6+} são carcinogênicos (Reimman e Caritat, 1998). A ingetão recomendada de Cr varia de 50 a 250 µg dia^{-1} (Azevedo, 2003). Segundo a recomendação diária de Cr prescrita pela agência de alimentos dos Estados Unidos (*Food and Drug Administration-FDA*) para alimentos é de 0,12 mg kg^{-1} (Saidelles, 2010).

A concentração de sódio (FIG. 6.2) na planta variou de 1046 mg kg^{-1} a 3370 mg kg^{-1}, incluindo Folhas e Partes Aéreas. No estudo realizado por Saidelles et al. (2010) foram encontradas variações de concentrações entre 251 a 1712 µg g^{-1}, para este elemento em amostras de erva-mate. O sódio, assim como o potássio, é um elemento responsável pelo equilíbrio ácido-base pela estabilidade osmótica das células. Atua ativamente na condução de impulsos nervosos e na formação da apatita, importante mineral constituinte dos ossos (Berdanier, 1994). O consumo excessivo pode causar ou agravar problemas de hipertensão (Mattos, 2011).

As concentrações de Fe (FIG. 6.2) foram de 610 mg kg^{-1} (0,061%) nas Folhas (FPEP) e variam de 600 mg kg^{-1} (0,06 %) a 6000 mg kg^{-1} (0,6 %) nas Partes Aéreas (PPEP) de *P. pellucida.* Em nosso organismo o ferro, por fazer parte de moléculas de hemoglobina e mioglobina, é um nutriente indispensável no

transporte de oxigênio e respiração celular. Por outro lado, o excesso pode causar hemocromatose, caracterizada principalmente por pigmentação da pele e cirrose hepática (Silva e Williams, 1993). A necessidade de Fe para um adulto é de 20 mg dia^{-1} e para uma criança é de 10 mg dia^{-1} (Naidu, 1999).

Nas amostras de *Peperomia pellucida* deste estudo, observou-se como esperado, concentrações relativamente altas de K e Mg conforme mostrado nas Fig. 6.2 e 6.3, respectivamente. Para o potássio verificam-se elevados teores entre 3,5 % a 5,9 % nas Partes Aéreas (PPEP), concordando com muitos trabalhos referentes à quantificação de metais em plantas, sendo referido que este é um dos minerais mais abundantes em espécies vegetais (Silveira, 2009). A *P. pellucida* apresenta uma concentração bastante superior ao valor geralmente determinado para matéria seca de plantas que é de 1,9% de potássio. Nos seres humanos este elemento participa juntamente com o sódio no balanço ácido-base do organismo, influi no ritmo cardíaco e é necessário para o funcionamento dos nervos, metabolismo de glicídios e metabolismo do oxigênio a nível cerebral (Vaz, 1995). Porém, em excesso pode causar hipercalemia, que provoca variações eletrocardiográficas significativas no coração (Barbosa e Sztanjnbok, 1999).

Para o magnésio, verifica-se quantidade apreciável de 13156 mg kg^{-1} e 13731 mg kg^{-1} (1,4%) nas Folhas (FPEP) e nas Partes Aéreas (PPEP), respectivamente. A matéria seca das plantas geralmente é constituída de 0,2% de magnésio que, apresenta nos seres humanos, um importante papel no metabolismo de fosfatos, diminui o risco cardíaco e previne o aumento da pressão arterial. A dosagem diária recomendada para crianças é de 40 - 250 mg dia^{-1}, para adolescentes e adultos de 300 a 400 mg dia^{-1} e para gestantes 450 mg dia^{-1} (Vaz, 1995).

As concentrações de Zn (FIG. 6.3) variam na planta, incluindo as Folhas e as Partes Aéreas, de 130 mg kg^{-1} a 173 mg kg^{-1}. No organismo o zinco é um elemento importante para o crescimento, reprodução, ativação de reações catalisadas por enzimas antioxidantes, funções imunológicas (Thunus, 1994), além de apresentar uma potencial propriedade cicatrizante, promovendo a cicatrização de queimaduras e feridas de pele (Moraes, 2000). A recomendação diária de ingestão para um adulto é de 10 a 15 mg (OMS, 1996). Visto que a planta inteira é utilizada como cicatrizante, uma vez que as Folhas e as Partes

Aéreas de *Peperomia pellucida* apresentaram concentrações elevadas, somando-se às concentrações encontradas na raiz, que variaram de 262 mg kg^{-1} a 321 mg kg^{-1}, a propriedade cicatrizante de *Peperomia pellucida* pode estar relacionada com a presença desse mineral em sua constituição.

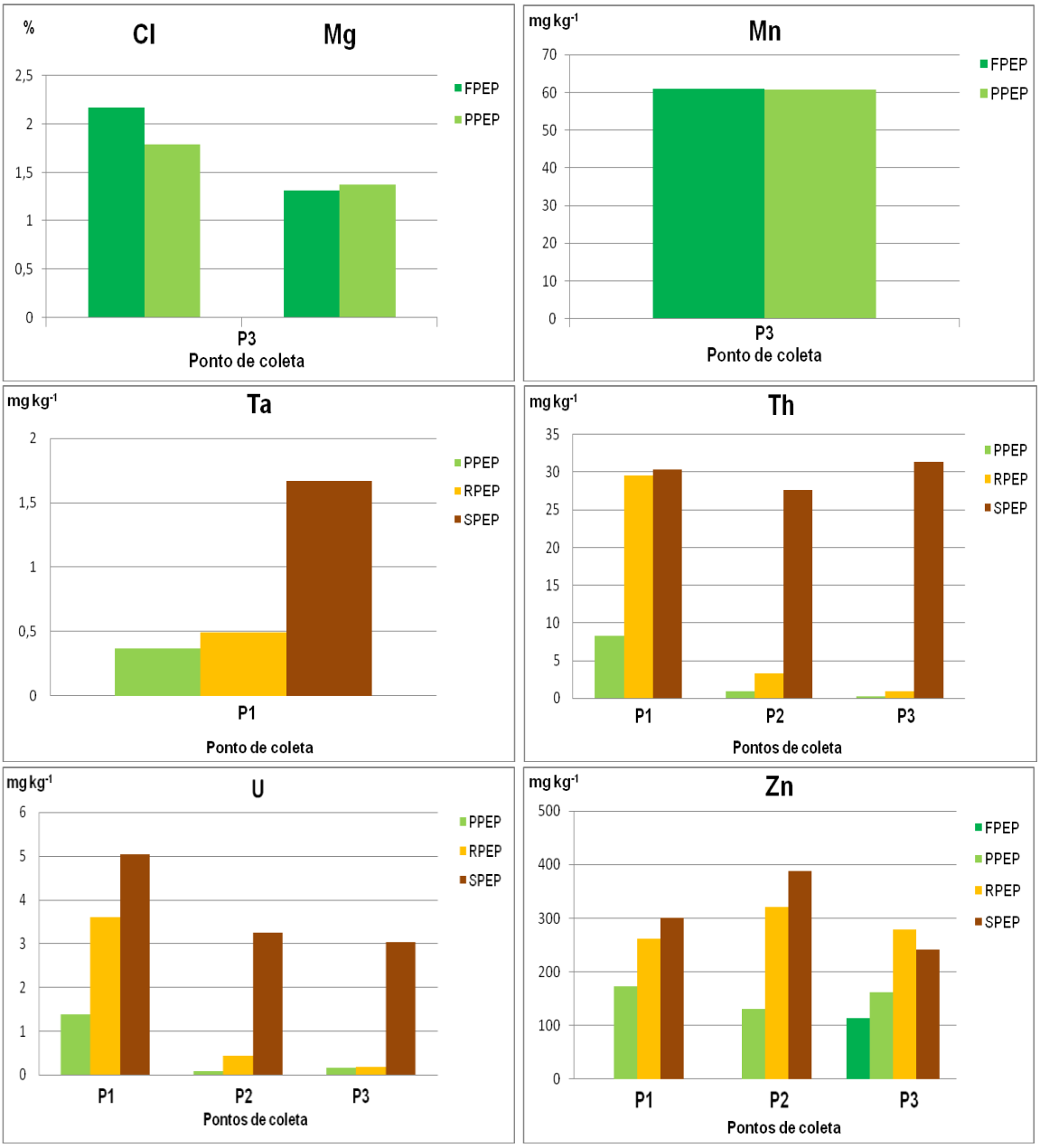


FIGURA 6.3 - Concentração (mg kg^{-1}) de Cl, Mg, Mn, Ta, Th, U e Zn nas amostras de FPEP, PPEP, RPEP e SPEP nos pontos coletados P1, P2 e P3.

Fei et al. (2010) determinaram concentrações de Co, Cr, Fe e Zn em plantas medicinais, os quais apresentaram concentrações médias de 0,5 µg g^{-1}, 2,3 µg g^{-1}, 750 µg g^{-1} e 25 µg g^{-1}, respectivamente.

Martins et al. (2009) determinaram o conteúdo de Mg em folhas de *Piper callosum* Ruiz & Pav, o qual apresentou concentrações entre 2737 µg g^{-1} a 5529 µg g^{-1}, e observaram para o Fe teores entre 103 µg g^{-1} a 190 µg g^{-1} nas folhas e para o Zn foi observado concentração de 30,3 µg g^{-1}.

Egwuche et al. (2011) realizaram um estudo preliminar da composição química de *Peperomia pellucida* e determinaram a concentração de Mg em 0,62%, K em 0,59%, Mn em 0,43 mg kg^{-1} e Fe em 0,66 mg kg^{-1}.

Ray e George (2010) determinaram Zn nas partes aéreas de *Peperomia pellucida* na concentração de 321 mg kg^{-1}.

Verifica-se que os valores encontrados no presente estudo foram maiores que os valores encontrados por esses autores, com exceção do Zn determinado por Ray e George (2010).

Na FIG. 6.4 são apresentados os resultados referentes aos teores de Elementos Terras Raras (ETR), seu comportamento e absorção pela planta da espécie *Peperomia pellucida* a partir do solo, nos pontos de coletas P1, P2 e P3.

Os ETR são geralmente absorvidos em quantidades muito pequenas através da mucosa gastrointestinal. No homem, eles tendem a se acumular no fígado e nos ossos.

Os resultados das concentrações dos ETR demonstram que a absorção pela planta e a abundância no solo decrescem na seguinte ordem Ce> La> Nd> Sm> Yb > Eu> Tb> Lu. Estes resultados estão de acordo com Merian (1991) e Kabata-Pendias (2007).

Na FIG. 6.5 são apresentados as concentrações dos elementos Cd e Pb nas Folhas (FPEP), Partes Aéreas – caules e folhas (PPEP), Raiz (RPEP) e Solo (SPEP) determinados por Espectrometria de Absorção Atômica. As concentrações de Hg nas amostras analisadas não são mostradas, pois apresentaram concentrações menores do que o LID do método.

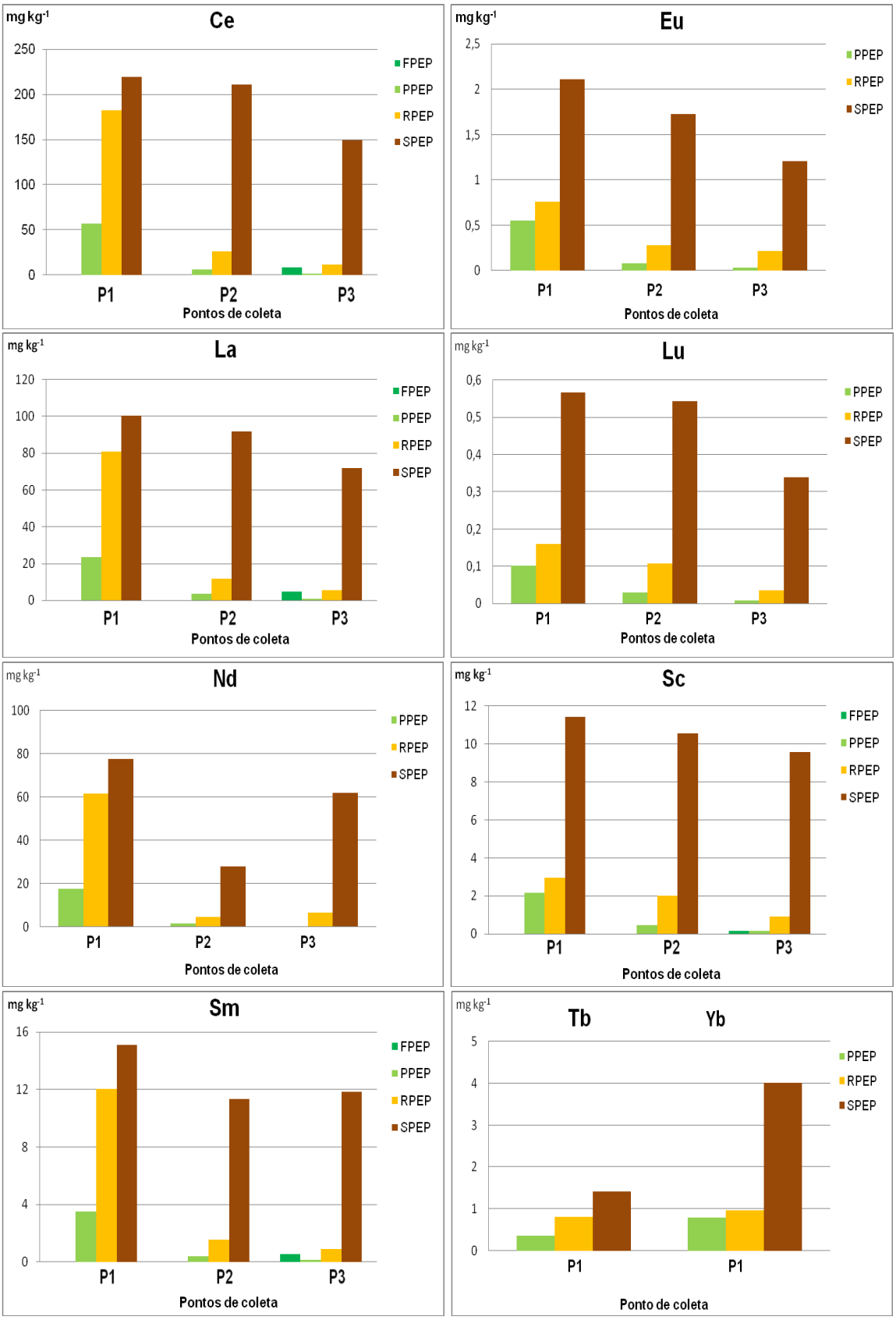


FIGURA 6.4 - Concentração (mg kg^{-1}) dos Elementos Terras Raras (Ce, Eu, La, Lu, Nd, Sc, Sm, Tb e Yb) nas amostras de FPEP, PPEP, RPEP e SPEP nos pontos coletados P1, P2 e P3.

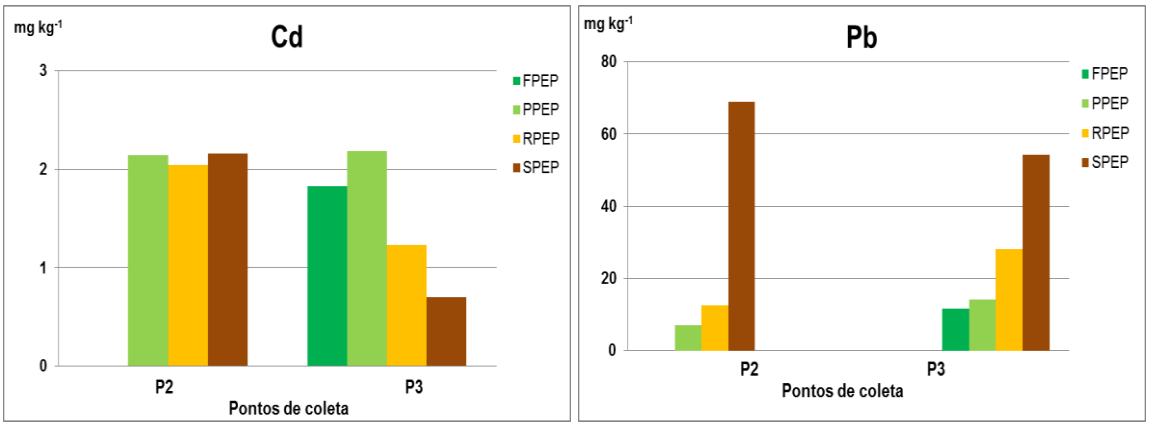


FIGURA 6.5 - Concentração (mg kg^{-1}) dos elementos Cd e Pb nas amostras de FPEP, PPEP, RPEP e SPEP nos pontos coletados P2 e P3.

O cádmio é considerado um elemento tóxico e não essencial aos organismos. É considerado carcinogênico e sua ingestão excessiva pode provocar náusea, vômito, diarreia, distúrbios sensoriais, falência renal além de danos no fígado, ossos e sangue (Reimann e Caritat, 1998). A concentração média de Cd nas Partes Aéreas da planta foi de 2,16 ± 0,03 mg kg^{-1} e nas Folhas foi de 1,826 ± 0,009 mg kg^{-1}. Os teores de cádmio aceitos pelas Farmacopéias Alemã e Européia para vegetais: folhas, frutos e raízes é 0,1 mg kg^{-1}.

Conforme pesquisa de Flores et al. (2009) realizado com plantas medicinais (*Casearia sylvestris, Pfaffia sp.* e *Phyllanthus niruri*) as concentrações de Cd foram inferiores (entre 0,10 a 0,15mg kg^{-1}) às encontradas para amostras de *Peperomia pellucida* do presente estudo. Segundo estudo de Saidelles et al. (2010) realizado com erva-mate a variação da concentração foi de 0,35 a 1,21 mg kg^{-1} para Cd.

Nas Folhas de *P. pellucida* foram determinadas concentrações médias de chumbo de 11,7 mg kg^{-1} e nas Partes Aéreas concentrações médias de 7,1 mg kg^{-1} e 14,1 mg kg^{-1} nas amostras coletadas no ponto P2 e P3, respectivamente. O Pb é tóxico e não essencial ao organismo humano e níveis elevados de chumbo interferem no metabolismo das hemácias provocando aumento da pressão sanguínea, derrame, doença renal e câncer (Reimann e Caritat, 1998). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, (OMS), o limite máximo de Pb permitido para alimentos é de 10 mg kg^{-1} (WHO, 1996), enquanto que a Portaria 685 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tolera limites entre 0,05 a 2,0 mg.kg^{-1} em alimentos

(Brasil, 1998). Os resultados obtidos neste estudo encontram-se dentro dos limites permitidos pela WHO e acima dos valores tolerados pela ANVISA.

Foram calculados, também, os teores de Cd e Pb nas preparações de Infusão (IPEP) e Maceração (MPEP). Os valores de Cd correspondem a uma média de 0,203 ± 0,001 mg kg^{-1}nas amostras de chá-infusão e 0,100 ± 0,001 mg kg^{-1} nas amostras obtidas por maceração. Segundo a Portaria nº 685 da ANVISA (Brasil, 1998) o limite estabelecido para refrescos e refrigerantes é de 0,2 µg g^{-1}ou 0,2 mg L^{-1}. A legislação brasileira não estabelece níveis permitidos de metais em chá, apenas em refrescos e refrigerantes (Vulcano, 2008).

Pelos valores apresentados, observa-se que as concentrações de Cd e Pb nas amostras da planta *in natura* estão muito acima dos valores aceitos pelas farmacopéias citadas. O Pb é encontrado frequentemente em altas concentrações em plantas cultivadas perto de rodovias, fábricas de baterias, entre outras fontes. As altas concentrações para Cd e Pb observadas neste trabalho para o solo e amostras de *Peperomia pellucida* coletadas no Jardim Botânico e em suas proximidades, no Rio de Janeiro, podem estar relacionadas a alguns destes fatores.

Em relação aos teores de Cd e Pb na infusão e na maceração, as concentrações médias estão dentro do limite permitido pela legislação brasileira para refrescos e refrigerantes.

Na FIG. 6.6 são apresentados os resultados obtidos para as concentrações de atividade em Bq kg^{-1} dos radionuclídeos (^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb) nas amostras FPEP (Folhas), PPEP(Partes Aéreas), RPEP (Raiz) e SPEP (Solo).

A concentração dos radionuclídeos nas amostras analisadas apresentou uma tendência igual a dos elementos estáveis, onde SPEP > RPEP > PPEP > FPEP.

Nas Partes Aéreas da planta (PPEP) observa-se que as concentrações de atividade de ^{226}Ra são menores do que as atividades do ^{228}Ra nos pontos P1 e P2. No ponto P3 as concentrações de atividade de ^{226}Ra são maiores do que as atividades de ^{228}Ra. Como o ^{228}Ra pertence a série do ^{232}Th e o ^{226}Ra pertence à série do ^{238}U, estes resultados estão de acordo com os valores obtidos para U e Th pela AANI apresentados na FIGURA 6.3.

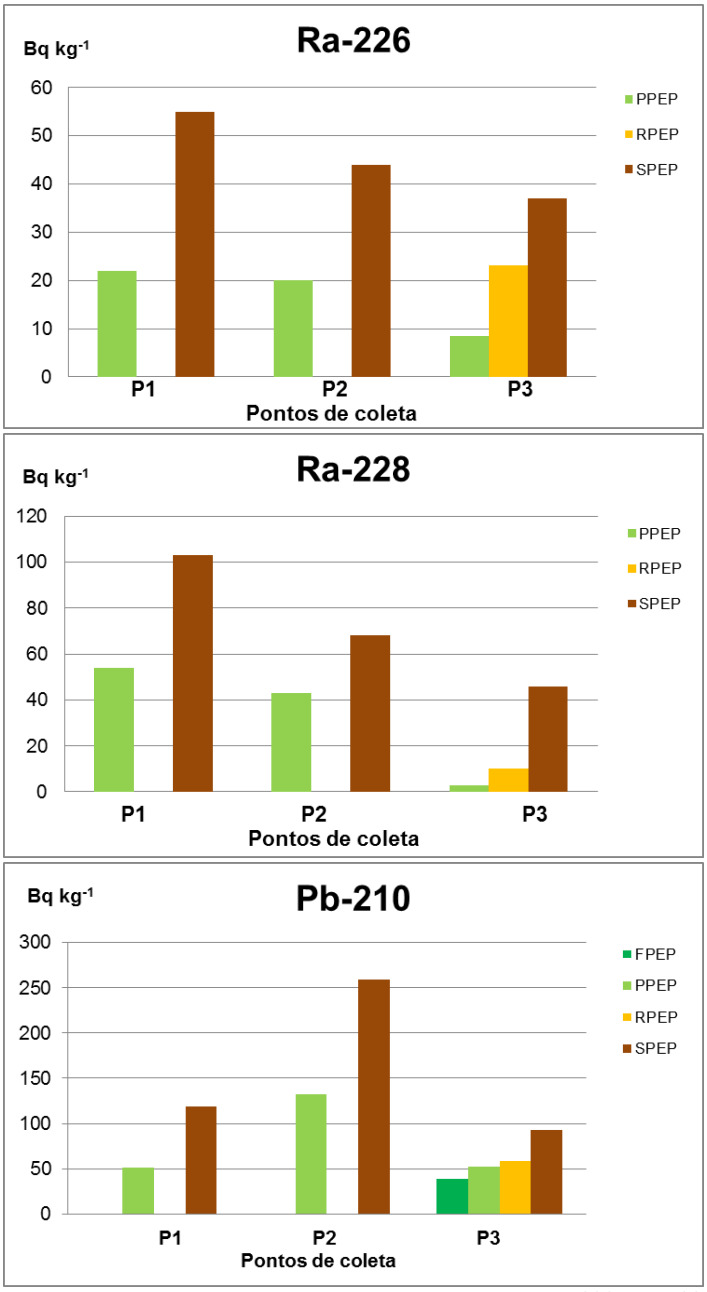


FIGURA 6.6 - Concentração de atividade (Bq kg^{-1}) de ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb nas amostras coletadas nos pontos P1, P2 e P3.

A concentração de ^{210}Pb variou de 51Bq kg^{-1} a 119 Bq kg^{-1} nas Partes Aéreas (PPEP) de *Peperomia pellucida* e apresentou concentração de atividade de 39 Bq kg^{-1} nas Folhas (FPEP) coletadas no ponto P3. O ^{210}Pb ocorre naturalmente nas plantas, como resultado da captação do solo, mas também pela incorporação deste radionuclideo pelas folhas através da deposição atmosférica e a transferência através do sistema radicular é bastante pequena (Bunzl e Trautmannsheimer, 1999).

6.1.1 Discussão das análises dos extratos da planta medicinal

Os procedimentos de extração por maceração, uma técnica bastante aplicada em drogas vegetais que possuem substâncias ativas extraíveis, e a infusão foram realizados para a determinação dos elementos e suas concentrações nestas soluções extrativas.

A infusão apresenta resultados satisfatórios na determinação de elementos em ervas medicinais (Pereira, 2010). A infusão da planta medicinal *Peperomia pellucida* foi realizada simulando a forma de preparação de chás pela população.

Na FIG. 6.7 são apresentados os elementos estáveis determinados e os níveis em porcentagens nos extratos obtidos por Maceração (MPEP) e Infusão (IPEP) das partes aéreas de *Peperomia pellucida*.

A maioria dos elementos determinados nas Partes Aéreas de *Peperomia pellucida* também foi determinada nos seus respectivos extratos. No entanto, alguns elementos ficaram abaixo do Limite Inferior de Detecção e Quantificação, como por exemplo, o Nd no ponto P2 e os elementos As, Eu, Hf, Lu, e Nd no ponto P3.

Observa-se nas FIG. 6.7 que a maioria dos metais é extraída em maior quantidade pelo método de infusão. Estes resultados estão de acordo com Rodrigues (2009), que avaliaram as diferentes formas de preparação dos chás (infusão, decocção e maceração).

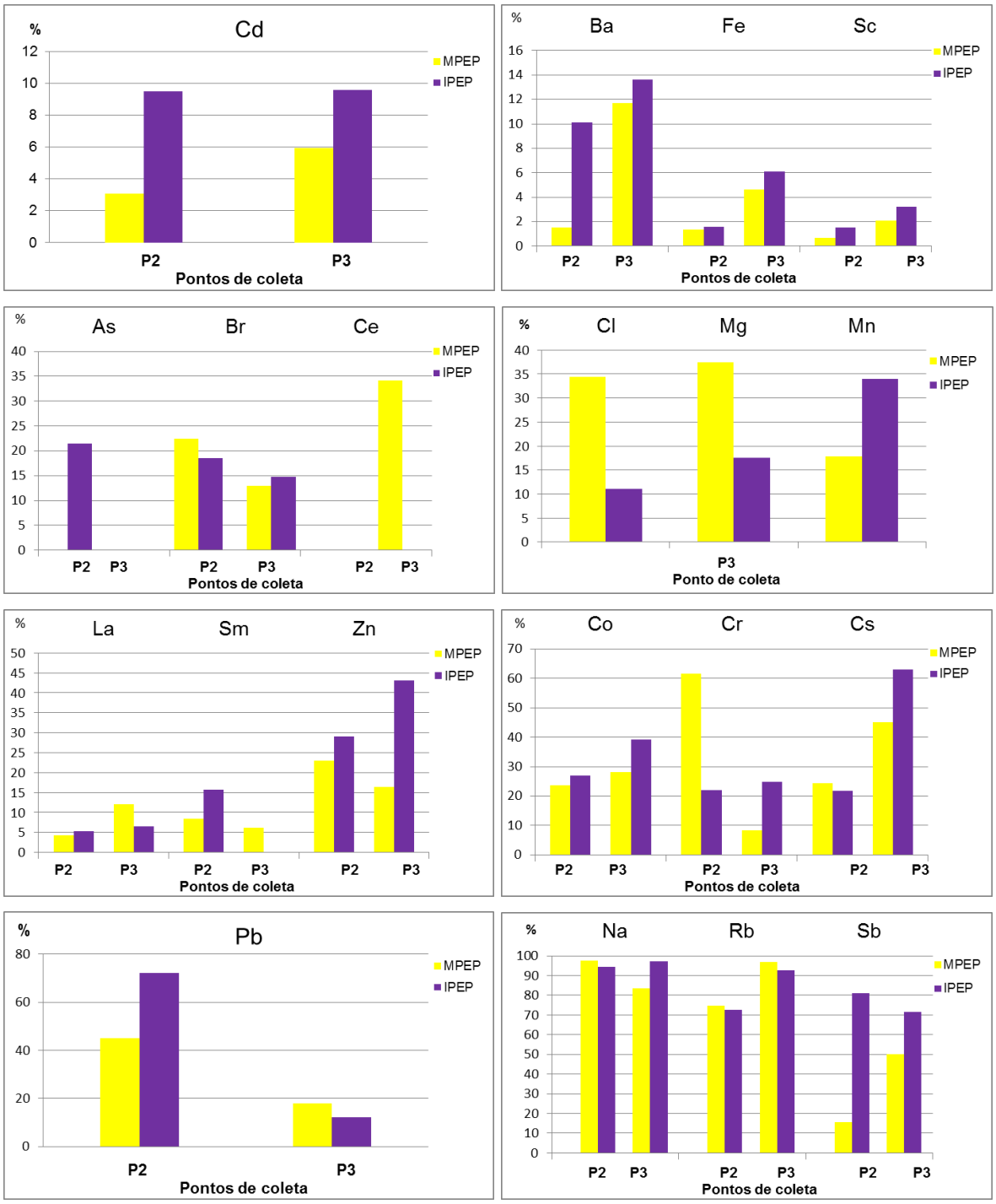


FIGURA 6.7 - Porcentagem dos elementos extraídos por Maceração (MPEP) e Infusão (IPEP) das amostras coletadas nos pontos P2 e P3.

Na FIG. 6.8 são apresentados os níveis de porcentagens dos radionuclídeos extraídos pelos processos de Maceração (MPEP) e Infusão (IPEP) das partes aéreas de *Peperomia pellucida*.

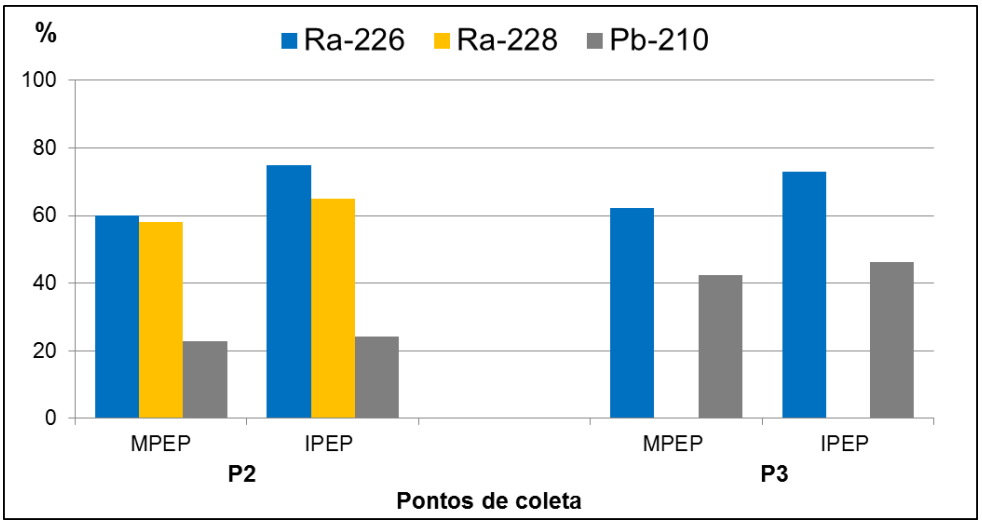


FIGURA 6.8 - Porcentagem dos radionuclídeos ^{226}Ra, ^{228}Ra e ^{210}Pb extraídos por Maceração (MPEP) e Infusão (IPEP) das amostras coletadas nos pontos P2 e P3.

Observa-se que houve grande variação na extração dos metais pelos processos de maceração e infusão. Esta diferença esta relacionada com a interação dos metais com as substâncias presentes nas estruturas da planta, como as macromoléculas e micromoléculas e a solubilidade dos metais nos diferentes solventes (Veiga et al.,2007).

6.1.2 Tratamento estatístico dos dados de AAN e Separação Radioquímica

As concentrações dos minerais analisados apresentaram uma grande variação. Como dito anteriormente a composição do solo, clima, forma de plantio, idade, características do solo, matéria orgânica, umidade e adubação são algumas justificativas para a variação dos elementos entre plantas de mesma espécie (Martins, et al. 2009; Pereira, 2010).

6.1.2.1 Análise de Agrupamento

A análise hierárquica de agrupamento, ou análise *clusters*, foi realizada com os resultados obtidos pelas técnicas de Análise por Ativação Neutrônica (AAN) e determinação Radioquímica.

Foi aplicado o método de Ward de ligação, ou método da mínima variância, e a distância euclidiana quadrática foi utilizada como medida da distância entre os grupos. O dendrograma obtido para verificar a semelhança entre as 9 amostras de *Peperomia pellucida*, encontra-se apresentado na FIG. 6.9.

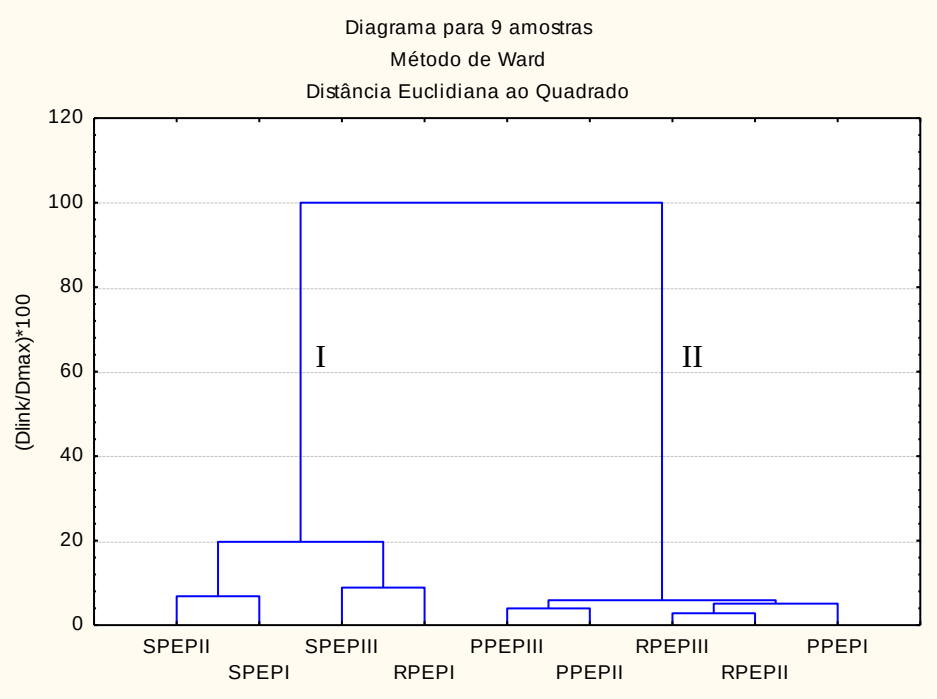


FIGURA 6.9 – Dendrograma da análise de agrupamento entre as observações das amostras de PPEP, RPEP e SPEP nos 3 pontos de coleta.

No dendrograma da FIG. 6.9 podem-se distinguir dois grupos principais: I e II. No grupo I encontram-se agrupados principalmente as amostras de Solo (SPEP) e no grupo II as amostras das Partes Aéreas (PPEP) e Raiz (RPEP) de *Peperomia pellucida*.

Excetuando-se a amostra RPEPI, pode-se observar uma separação entre as amostras de solo e as amostras das plantas – Raízes e Partes Aéreas.

Este resultado indica que o local em que as plantas foram coletadas pouco influenciou na composição dos elementos nas diferentes partes analisadas visto que os solos não foram agrupados com suas respectivas plantas.

No dendrograma, obtido a partir das variáveis determinadas, da FIG. 6.10 verificam-se a formação de dois grupos A e B distintos e que se subdividem em vários sub-grupos.

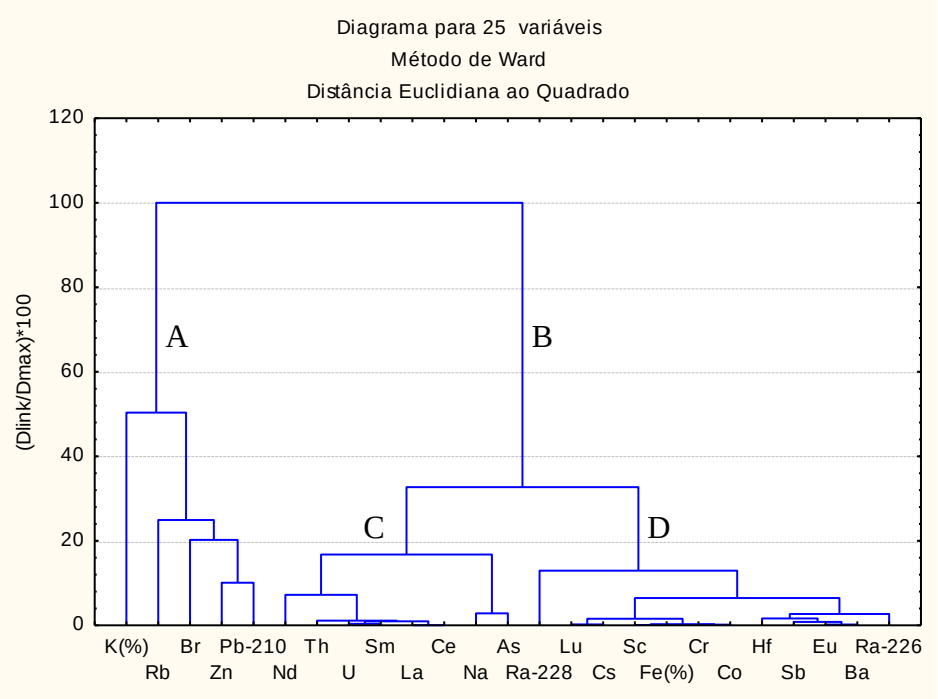


FIGURA 6.10 - Dendrograma resultante da análise de agrupamento para 25 variáveis.

O grupo A é composto por elementos K, Rb, Br, Zn e Pb-210 que apresentaram maiores concentrações na planta em relação aos outros elementos. O K e Rb são facilmente absorvidos pelas plantas, sendo o primeiro importante para os processos metabólicos; o ^{210}Pb encontra-se em concentrações elevadas nas plantas devido a deposição atmosférica deste elemento nas folhas e o Zn esta relacionado com a capacidade de acumulação deste elemento pela espécie estudada, pois desempenha funções metabólicas essenciais em plantas, sendo um componente ativo de uma variedade de enzimas que estão relacionadas com o metabolismo de carboidratos, proteínas entre outros (Kabata-Pendias, 2007).

O grupo B apresentou alguns agrupamentos já esperados: C e D distintos. O grupo C compreende predominantemente os ETR que apresentam

absorção similar pelas plantas e o grupo D predominantemente os metais que também apresentam similaridade na absorção pelas plantas.

6.1.2.2 Coeficiente de Correlação

Para os elementos determinados por AAN e Separação Radioquímica também foram calculados os coeficientes de correlação das três campanhas de coleta. O coeficiente de correlação evidencia se as correlações entre as variáveis estudadas são ou não significativas a um dado nível de significância. Neste caso foi utilizado um nível de significância $p < 0,05$, e os resultados são mostrados na TAB.6.1.

Pode-se verificar que os resultados obtidos concordam com a análise de agrupamento realizada para as 25 variáveis (FIG. 6.10). Observa-se que o K apresenta correlações negativas significativas com os demais elementos. A correlação negativa dos elementos K e Rb, agrupados no mesmo grupo, indica que, apesar da similaridade química entre eles, há uma diferença significativa na absorção destes metais pelas plantas. A disponibilidade de K para a maioria das plantas aumenta em solos menos ácido, enquanto que o Rb é facilmente absorvido em solos ácidos (Kabata-Pendias, 2007).

Os demais elementos do grupo A da FIG 6.10, Br, Zn e ^{210}Pb, não representam correlações significativas com nenhum dos outros elementos.

Com relação aos elementos pertencentes ao grupo B da FIG 6.10, verifica-se que suas concentrações apresentam variação relativamente pequena nas amostras de solo enquanto que as amostras de Raízes e Partes Aéreas apresentam variação relativamente grande (FIG. 6.11). Estes resultados indicam que a concentração no solo dos elementos considerados não é o fator determinante para os teores encontrados nas plantas e, outros fatores como, por exemplo, a idade da planta, devem predominar, visto que foram analisadas todas as amostras encontradas durante a coleta independentemente de seu estágio de crescimento.

TABELA 6.1 – Coeficientes de correlação calculados para os elementos determinados por AAN e Separação Radioquímica ($p < 0,05$).

	^{226}Ra	^{228}Ra	^{210}Pb	As	Ba	Br	Ce	Co	Cr	Cs	Eu	Fe	Hf	K	La	Lu	Na	Nd	Rb	Sb	Sc	Sm	Th	U	Zn
^{226}Ra	1,00																								
^{228}Ra	0,81	1,00																							
^{210}Pb	0,49	0,40	1,00																						
As	0,29	0,11	-0,23	1,00																					
Ba	0,98	0,88	0,54	0,33	1,00																				
Br	0,26	0,51	0,79	-0,32	0,41	1,00																			
Ce	0,96	0,80	0,58	0,42	0,99	0,41	1,00																		
Co	0,96	0,74	0,52	0,50	0,96	0,27	0,99	1,00																	
Cr	0,94	0,71	0,58	0,49	0,95	0,33	0,99	1,00	1,00																
Cs	0,94	0,73	0,66	0,35	0,96	0,44	0,99	0,97	0,98	1,00															
Eu	0,98	0,84	0,52	0,37	1,00	0,37	0,99	0,97	0,96	0,97	1,00														
Fe	0,92	0,70	0,55	0,54	0,94	0,28	0,97	0,99	1,00	0,96	0,95	1,00													
Hf	0,97	0,85	0,37	0,45	0,97	0,20	0,95	0,96	0,93	0,91	0,97	0,93	1,00												
K	-0,97	-0,71	-0,56	-0,38	-0,94	-0,23	-0,95	-0,98	-0,97	-0,96	-0,95	-0,97	-0,94	1,00											
La	0,96	0,79	0,55	0,45	0,98	0,36	1,00	0,99	0,99	0,98	0,99	0,98	0,96	-0,97	1,00										
Lu	0,97	0,81	0,63	0,33	0,99	0,43	0,99	0,98	0,98	0,99	0,99	0,96	0,94	-0,96	0,99	1,00									
Na	0,69	0,51	0,18	0,87	0,74	0,04	0,80	0,84	0,84	0,75	0,76	0,87	0,79	-0,75	0,82	0,74	1,00								
Nd	0,86	0,72	0,07	0,63	0,84	-0,11	0,82	0,87	0,82	0,74	0,84	0,84	0,94	-0,84	0,84	0,79	0,83	1,00							
Rb	0,88	0,52	0,43	0,60	0,86	0,08	0,91	0,96	0,96	0,92	0,89	0,96	0,88	-0,95	0,93	0,90	0,86	0,83	1,00						
Sb	0,95	0,91	0,46	0,25	0,98	0,44	0,94	0,89	0,88	0,91	0,97	0,85	0,94	-0,86	0,93	0,94	0,66	0,79	0,76	1,00					
Sc	0,95	0,74	0,53	0,51	0,96	0,28	0,99	1,00	1,00	0,97	0,97	1,00	0,96	-0,98	0,99	0,97	0,85	0,86	0,96	0,89	1,00				
Sm	0,95	0,78	0,42	0,54	0,97	0,21	0,97	0,99	0,97	0,94	0,97	0,98	0,98	-0,96	0,98	0,96	0,87	0,92	0,94	0,91	0,99	1,00			
Th	0,89	0,69	0,44	0,64	0,92	0,21	0,95	0,98	0,98	0,92	0,92	0,99	0,94	-0,94	0,97	0,93	0,92	0,89	0,95	0,83	0,98	0,98	1,00		
U	0,97	0,86	0,37	0,46	0,98	0,24	0,96	0,96	0,93	0,92	0,98	0,93	1,00	-0,93	0,97	0,95	0,80	0,92	0,87	0,96	0,95	0,98	0,93	1,00	
Zn	0,72	0,32	0,61	0,12	0,67	0,32	0,73	0,72	0,75	0,82	0,72	0,69	0,58	-0,73	0,71	0,76	0,44	0,39	0,77	0,65	0,70	0,63	0,61	0,60	1,00

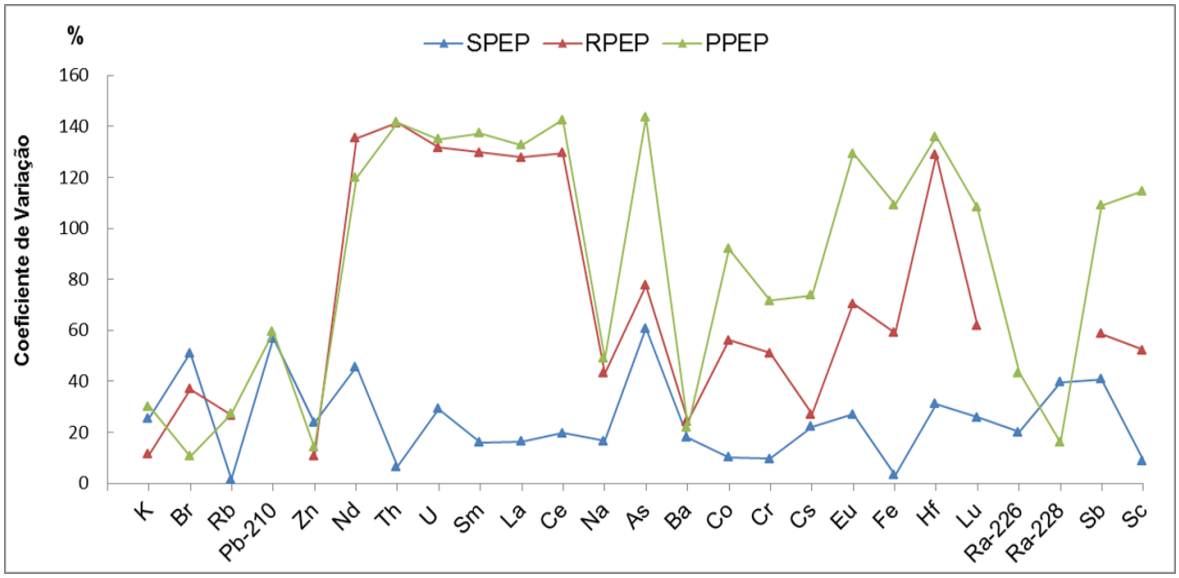


FIGURA 6.11 – Coeficiente de variação dos elementos determinados no Solo, Raiz e Partes Aéreas.

6.2 Avaliação dos testes com Disco de Difusão e da constituição do óleo essencial de *Peperomia pellucida***.**

O rendimento do processo de obtenção do óleo essencial apresentado na TAB. 5.11 esta de acordo com os valores descritos na literatura (Ferreira, 2009; Takera, 2009) dentre eles, 0,03% a 0,04 %.

No presente estudo, o óleo essencial de *Peperomia pellucida* apresentou atividade antifúngica contra o fungo *Aspergillus flavus*.

O óleo essencial de *P. pellucida* mostrou efeito inibidor do crescimento para todos os volumes de óleo essencial utilizados, extremamente significante ($p < 0,001$) quando comparado com o controle. Por outro lado, não houve diferença significativa quando se comparam entre si os efeitos obtidos com os volumes de 2,5-7,5; 5,0-7,5 e 5,0-10,0 µl.

O óleo de *Peperomia pellucida* possui um princípio ativo chamado dilapiol, que tem ação fungicida reconhecida (Sousa et al. 2008), portanto, deveria provocar um resultado positivo (produção de halo de inibição), pois a maior ou menor atividade biológica dos óleos essenciais tem se mostrado dependente de seus constituintes químicos que são responsáveis pelas propriedades antissépticas, antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias (Craveiro et al., 1981; Souza, et. al., 2005).

Na FIG. 6.12 é apresentado o efeito inibidor no crescimento de *A. flavus*, por diferentes concentrações de óleo essencial de *P. pellucida*.

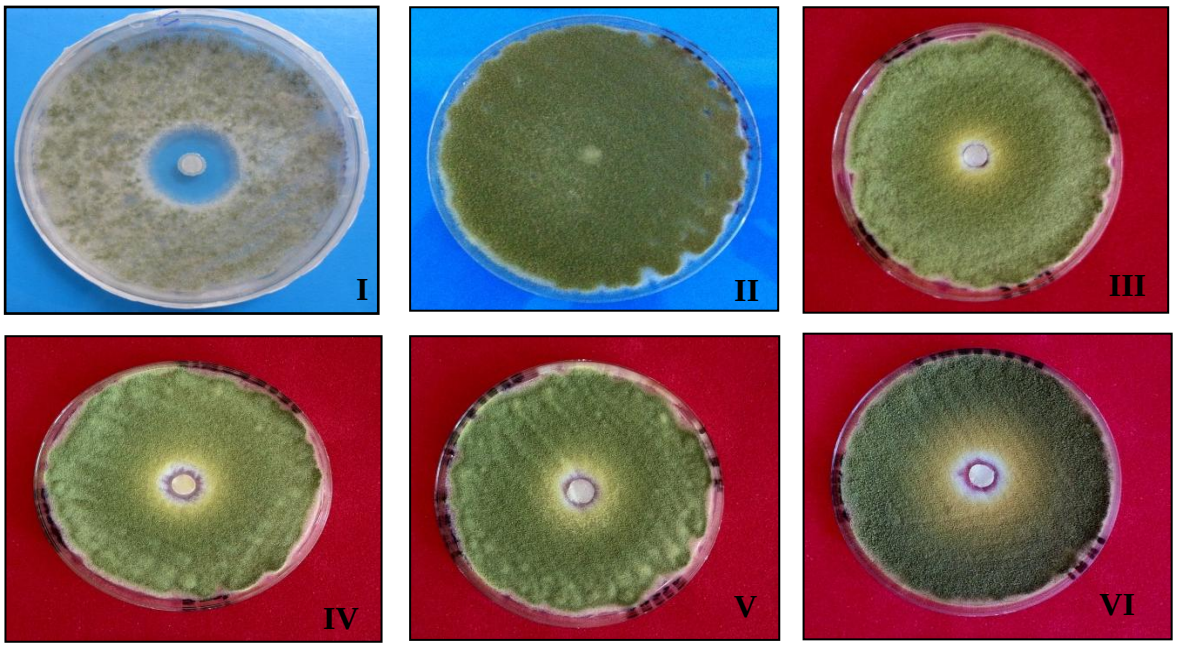


FIGURA 6.12 - Halos de inibição do crescimento do *A. flavus* em discos de papel pelo controle positivo (fungicida) (I), pelo controle negativo (H_2O) (II) e pelas alíquotas de 2,5 µL (III), 5,0 µL (IV), 7,5 µL (V) e 10,0 µL (VI) do óleo essencial de *P. pellucida.*

Os extratos hexânico e etanólico obtidos da planta não apresentaram o mesmo efeito fungicida. Estes resultados podem ser justificados pelo método utilizado na avaliação antifúngica, pela a técnica de extração empregada ou pela ausência de constituintes químicos presentes nos diferentes extratos analisados responsáveis pela atividade antifúngica. O fato de não ter sido verificado resultado positivo para a atividade fungicida dos extratos hexânico e etanólico não invalida novos estudos para atividade antifúngica.

Dos 14 constituintes identificados (n-dodecano, n-tetradecano, n-pentadecano, *trans*-cariofileno, aromadendreno, γ-muuroleno, biciclogermacreno, (*E,E*)-α-farneseno, germacreno B, *trans*-nerolidol, espatulenol, óxido de cariofileno, dilapiol e apiol) 5 deles ainda não tinham sido identificados como constituintes de *Peperomia pellucida*, são eles: n-dodecano, n-tetradecano, n-pentadecano, aromadendreno e espatulenol.

O dilapiol, principal constituinte do óleo essencial de *P. pellucida* em estudo (53,35%), também já foi relatado na literatura como constituinte principal do óleo essencial de *P. pellucida* (Lira, 2007).

Silva et al. (1999) identificaram 23 substâncias no óleo essencial de *Peperomia pellucida*. E os componentes majoritários encontrados no óleo de *P. pellucida* foram dilapiol (39,7%) e (*E*)-cariofileno (10,7%).

Takera et al. (2009) identificaram como componentes majoritários no óleo essencial de *P. pellucida* o dilapiol, *trans*-cariofileno e biciclogermacreno.

Souza et al. (2009) identificaram como constituintes majoritários nas folhas de *P. pellucida* o apiol (45,21%), azuleno (13,45%) e carotol (7,4%).

No presente estudo foi determinado uma quantidade menor de (*E*)-cariofileno (2,62%) e biciclogermacreno (1,01%). O germacreno D foi relatado anteriormente como constituinte do óleo essencial de *P. pellucida*, porém o germacreno B (20,86%) foi um dos constituintes majoritários identificados e o germacreno D não foi identificado, assim como o azuleno e o carotol.

O *trans*-nerolidol constituinte identificado no presente estudo na porcentagem de 1,60%, é o principal constituinte de *P. serpens* (Maia, 2009). O óxido de cariofileno (10,83%) também foi uns dos constituintes majoritários determinados neste estudo.

Conforme visto, as diferenças químicas na constituição do óleo essencial de *P. pellucida* estão relacionadas com diversos fatores como, sazonalidade, ritmo circadiano, idade e desenvolvimento, radiação ultravioleta, nutrientes do solo, poluição atmosférica, temperatura, disponibilidade hídrica, altitude e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (Gobbo-Neto e Lopes, 2007).

Quanto à atividade fungicida os resultados obtidos são inéditos visto que não há nenhum relato da atividade fungicida do óleo essencial de *P. pellucida* contra *A. flavus* na literatura. De acordo com trabalhos realizados com o dilapiol, esta substância possui atividade fungicida, podendo estar relacionado com esta propriedade na planta estudada (Ferreira et al., 2009).

Vários autores têm relatado a inibição do crescimento fúngico e da biossíntese de aflatoxinas por *A. flavus*, com óleos essenciais, destacamos Aquino et al. (2011) e Nogueira et al. (2010). Pesticidas baseados nos óleos essenciais de plantas ou nos seus constituintes têm demonstrado eficácia diante a uma série de pragas em produtos armazenados (Koul et al., 2008).

7. CONCLUSÕES

As técnicas analíticas utilizadas neste estudo (Análise por Ativação Neutrônica, Contagem alfa e beta total após separação radioquímica e Espectrometria de Absorção Atômica) apresentaram sensibilidade, precisão e exatidão adequadas para a determinação dos metais e radionuclídeos nas folhas, partes aéreas, raízes e nos extratos da planta, bem como nas amostras de solo.

As análises dos materiais de referência indicaram que os procedimentos analíticos adotados permitem a determinação das concentrações desses elementos com boa precisão e exatidão.

Este estudo ganha grande importância pela contribuição com o levantamento de dados sobre a constituição inorgânica da planta estudada, nos seus extratos e no solo onde foram coletadas.

Observou-se que os teores obtidos para a maioria dos elementos e radionuclídeos obedecem ao seguinte comportamento em ordem decrescente: SPEP>RPEP>PPEP>FPEP nos três pontos coletados (P1, P2 e P3). No entanto, também foi observado que elementos como o As, Br, Cl e Cr podem se acumular preferencialmente nas folhas.

Com relação aos resultados obtidos para as concentrações encontradas na planta e nos extratos, convém salientar que elementos com importantes funções biológicas no organismo humano foram determinados, como Co, Cr, Na, Zn, K e Mg. Para o K e Mg foram encontrados níveis elevados de concentração. Os elementos Zn e Cr estão envolvidos em processos cicatrizantes no organismo humano, promovendo a cicatrização de feridas e queimaduras. Pode-se inferir que a potencial propriedade cicatrizante de *Peperomia pellucida* deve estar relacionada com a presença destes elementos em sua constituição.

Por outro lado, também foram determinados concentrações em níveis elevados de elementos tóxicos, como Cd e Pb. Os teores destes elementos encontram-se acima das concentrações permitidas pelas Farmacopéias Alemã e Européia, OMS e ANVISA; e as concentrações dos elementos As e Sb

encontrados foram elevados nas amostras coletadas no ponto P1 e baixos em P2 e P3.

Discutem-se também informações pertinentes à presença de metais em plantas consumidas pela população com fins medicinais, tais como a localização de cultivo e absorção. Pôde-se observar concentrações elevadas de Pb nas Partes Aéreas da planta que podem estar relacionadas com o cultivo próximo à centro metropolitanos, onde a quantidade de poluentes atmosféricos é elevada.

As amostras do presente estudo podem ser caracterizadas, quanto a sua composição mineral, pelos elevados teores de K, Rb, Br, Zn e Pb-210, cuja variação de concentração na planta é semelhante à variação de concentração encontrada no solo onde foram coletadas.

É importante a divulgação dos riscos a que estão expostos os consumidores que se automedicam com plantas medicinais, tomando-se por base a variedade de elementos encontrados na infusão e as suas concentrações podem ultrapassar os valores seguros para o consumo. Observou-se que a extração dos elementos estáveis na infusão variou de 10% a 100%. E para os radionuclídeos, a porcentagem de extração variou de 20% a 80%. Cabe uma atenção maior para o isótopo ^{210}Pb, que foi extraído numa proporção de aproximadamente 50%.

Este estudo contribui com uma estratégia adequada para o controle de qualidade na produção de fitoterápicos, atendendo às novas normas das agências reguladoras, como a Resolução-RDC n° 48 da ANVISA. Entre as exigências estão a necessidade de pesquisa de metais pesados.

Foi comprovada a ação antifúngica do óleo essencial de *Peperomia pellucida* contra o fungo *Aspergilus flavus*. Os resultados obtidos nesta avaliação são inéditos, visto que não há nenhum relato desta atividade na literatura. O óleo mostrou efeito inibidor no crescimento do fungo para todos os volumes utilizados e, para o teste padronizado do disco de difusão, a projeção de CI_{50} mostrou que o volume de 5 µL inibiu 50% do crescimento do fungo.

Os extratos hexânicos e etanólicos não apresentaram atividade antifúngica, embora estes resultados não invalidem novos estudos sobre a atividade fungicida diante ao *Aspergillus flavus*.

Apresentam-se neste estudo substâncias inéditas identificadas no óleo essencial, como n-dodecano, n-tetradecano, aromadendreno, n-pentadecano e

espatulenol e substâncias fungicidas presentes na sua composição orgânica, como o dilapiol e apiol.

Desta forma, pelos resultados da atividade fungicida e dos constituintes identificados neste trabalho, o óleo essencial de *Peperomia pellucida* pode vir a ser usado no controle de fungos, em especial o *A. flavus*, que contaminam alimentos causando perdas econômicas significativas e danos à saúde animal, por apresentar menor risco ao meio ambiente, comparados com os pesticidas sintéticos e pode vir a ser usado como um produto com uma possível ação terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P**.** ***Identification of Essential Oil Components by Gas Cromatography / Mass Spectroscopy***, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, USA, 2001.

ADEODATO, S.; OLIVEIRA, L.; OLIVEIRA, V. Uma farmácia no fundo do quintal. ***Revista Globo Ciências***, v.6, n.64, p. 44-49, 1996.

ALMEIDA, M. M. B.; LOPES, M. F. G.; NOGUEIRA, C. M. D.; MAGALHÃES, C. E. C. MORAIS, N. M. T. Determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais. ***Ciência e Tecnologia de Alimentos***, Campinas, v. 22(1), p. 94-97, 2002.

ALVARENGA, F. C. R.; GARCIA, E. F.; BASTOS, E. M. A. F.; GRANDI, T. S. M.; DUARTE, M. G. R. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. ***Brazilian Journal of Pharmacognosy***, 19(2A): p. 442-448, Abr./Jun. 2009.

ALVIM, N. A. T.; FERREIRA, M. A.; CABRAL. I. E.; ALMEIDA FILHO, A. J. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. ***Revista Latino americana de Enfermagem***, v. 14, p. 3, 2006.

AMAIKE, S.; KELLER, N. P. *Aspergillus flavus.* ***Annual Review of Phytopathology***, v. 49, p. 10.1–10.27, 2011.

AQUINO, S.; D'ARC FELICIO, J.; GONÇALEZ, E. Methods for preventing and control mycotoxins and mycotoxigenic fungi. In: Mycotoxicoses in Animals Economically Important. ***Nova Science Publishers Inc***, New York, ISBN: 978-1-61668-195-1, 2011.

ARINE, D. R. **Análise de águas de superfície e sedimentos de rios da região de Iperó, SP, por Espectrometria de Absorção Atômica e por Ativação Neutrônica**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, SP.

ARRIGONI-BLANK, M. F.; DMITRIEVA, E. G; FRANZOTTI, E. M.; ANTONIOLLI, A. R.; ANDRADE, M. R.; MARCHIORO, M. Anti-inflamatory and analgesic activity of *Peperomia pellucida* (L) HBK (Piperaceae). ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 91, p. 215-218, 2004.

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

AZIBA, P. I.; ADEDEJI, A.; EKOR, M.; ADEYEMI, O. Analgesic activity of *Peperomia pellucida* aerial parts in mice. ***Fitoterapia***, v. 72, p. 57–58, 2001.

BACCAN, N. ***Introdução à Espectrometria de Absorção Atômica***: UNICAMP, Campinas, 1994.

BADKE, M. R. **Conhecimento popular sobre o uso de plantas medicinais e o cuidado de enfermagem**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

BARBOSA, A. P.; SZTAJNBOK, J. Distúrbios hidroeletrolíticos. ***Jornal de Pediatria***, v. 75, Supl. 2, 1999.

BEATY, R. D.; KERBER, J. D***. Concepts, Instrumentations and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry***: Perkin Elmer, USA, 1993.

BERDANIER, C. D. ***Advanced Nutrition*** – Micronutrients. New York: CRC Press, 1994.

BIAZZI, E. ***O maravilhoso poder das plantas***. Tatui, SP.: Casa Publicadora Brasileira, 2004.

BODE, P. ***Instrumental and organizational aspects of a neutron activation analysis laboratory***: Interfaculty Reactor Institut., Delft, Netherlands, p. 147, 1996.

BUNZL, K., TRAUTMANNSHEIMER, M., Transfer of ^{238}U, ^{226}Ra and ^{210}Pb from slag-contaminated soils to vegetables under field conditions. ***The Science of the Total Environment***, v. 231, p. 91-99. 1999.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAMPESATO, V. R. **Uso de plantas medicinais durante a gravidez e risco para malformações congênitas**. 2005. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

CARVALHO, M. L.; MAGALHÃES, T.; BECKER, M. Trace elements in human cancerous and healthy tissues: a comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE. ***Spectrochimica Acta***, v. 62, p. 1004-1011, 2007.

COELHO, S. R. Levantamento de plantas medicinais em comunidades de Rio Novo do Sul, Iconha, Itapemirim e Cahoeiro de Itapemirim. In: ENCONTRO SOBRE PLANTAS MEDICINAIS, v. 1, p. 13-27, 1989.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. de A.; ALENCAR, J. W. de; MACHADO, M. I. L. Óleos essenciais de plantas do Nordeste. Fortaleza: ***UFC***, p. 210, 1981.

CUNHA, M. C. L.; NARDI, L. V. S.; FORMOSO, M. L. L. Absorption and Fractionation of Rare Earth Elements by Plants: a Comparative Study of Plants in Diverse Geological Contexts. ***Revista do Instituto de Geociências***, v. 10(1), p. 53-59, 2010.

CUNHA, P. A. Aspectos Históricos Sobre Plantas Medicinais, Seus Constituintes Activos e Fitoterapia. 2005. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br> (acessado em maio de 2010).

DE FEO, V.; BELAUNDE, A. J.; SANDOVAL, J. G.; SENATORE, F.; FORMISANO, C. Antibacterial activity and composition of the essential oil of *Peperomia galioides* HBK (Piperaceae) from Peru. ***Natural Product Communications***, v. 3, p. 933-936, 2008.

DESIDERI, D. MELI, M. A. ROSELLI, C. Natural and artificial radioactivity determination of some medicinal plants. ***Journal of Environmental Radioactivity***, v. 101, p. 751-756, 2010.

DIAS, J. P. S. **A Farmácia e a História**: Uma introdução à História da Farmácia, da Farmacologia e da Terapêutica. Lisboa, 2005.

DIGNANI, D. F. ***Peperomia blanda* (Piperaceae): Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante**. 2009. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, SP.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S.G.; Formalin test – quantitative study of analgesic effects of morphine, meperidine, and brain-stem stimulation in rats and cats. ***Pain***, v. 4, p. 161-174, 1977.

EGWUCHE, R. U.; ODETOLA, A. A.; ERUKAINURE, O.L. Preliminary investigation into the chemical properties of *Peperomia pellucida* (L). ***Research Journal of Phytochemistry***, v. 5(1), p. 48-53, 2011.

ESPER, R. H. **Óleos Essenciais de Mentrasto e Orégano no Controle de** *Aspergillus flavus* **em Milho e Soja**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Instituto Biológico, SP.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 1988. 4. ed., São Paulo: Atheneu, parte 2.

FEBRAFARMA 2007. Fitoterápico atrai investimentos. Disponível em: <http://www.febrafarma.org.br/materias > (acessado em agosto de 2009).

FEI, T.; DEHONG, L.; FENGQUN, Z.; JUNHUA, L.; HUA, T.; XIANGZHONG, K. Determination of trace elements in Chinese medicinal plants by instrumental neutron activation analysis. ***Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry***, v. 284, p. 507–511, 2010.

FELIPPE, L. G.; BALDOQUI, D. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; GUIMARÃES, E. F.; CICARELLI, R. M. B.; FURLAN, M. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from *Peperomia blanda*. ***Phytochemistry***, v. 69, p. 445-450, 2008.

FERREIRA M. O. M.; SATO, I. M.; SALVADOR, V. L. R. Validação da Metodologia analítica na determinação de componentes inorgânicos em plantas medicinais *Valeriana officinalis*, *Ginkgo folium* e *Echunodorus macrophyllus* ***Anais do Congresso de Metrologia***, Recife, Pernambuco, BRASIL, 2003.

FERREIRA, A. D. M.; TAKEARA, R.; LOPES, N. P.; TURATTI, I. C. C. Perfil químico do óleo essencial de *Peperomia pellucida*. 61ª Reunião Anual da SBPC Amazônia: Ciência e Cultura, Manaus, Amazônia, 2009.

FERREIRA, D. M. **Flora do Parque Estadual do Itatiaia – Brasil:** *Peperomia* **Ruiz & Pav. (Piperaceae).** 2007. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ.

FLORES, E. M. M. Determination of Cd and Pb in medicinal plants using solid sampling flame atomic absorption spectrometry. ***International Journal of Environmental Analytical Chemistry***, v. 89(2), p. 129-140, 2009.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MultiCiência: Construindo a história dos produtos naturais**. 2006. Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a-047.pdf> (acessado em março de 2011).

GHIASSI-NEJAD, M.; BEITOLLAHI, M. M.; ASEF, M.; REZA-NEJAD, F. Exposure to ^{226}Ra from consumption of vegetables in the high level natural radiation area of Ramsar-Iran. ***Journal of Environmental Radioactivity***, v. 66, p. 215–225, 2003.

GOBBO-NETO, L., LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. ***Química Nova***, v. 30(2), p. 374-381, 2007.

GOUVEIA, M. T. **Rio dos Macacos**: paisagens e personagens de um rio / Maria Teresa Gouveia. - Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2007.

GREIG, N. Introduction. (2004) In: NAVARRO, L. B. **Variabilidade de fenilpropanóides, lignanas tetraidrofurânicas e aristolactamas** em *Piper solmsianum* C. DC. 2009. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, SP.

GUIMARÃES, E. F.; GIORDANO, L. C. S. Piperaceae do Nordeste Brasileiro I: Estado do Ceará. ***Rodriguésia***, v. 55 (84), p. 21-46, 2004.

GUIMARÃES, G. M. **Avaliação da concentração de metais e elementos traço em amostras de sedimento do Reservatório Guarapiranga, São Paulo-SP, Brasil**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, SP.

IAEA – TECDOC – 564 (1990) Practical aspects of operating a neutron analysis laboratory, International Atomic Energy Agency, Vienna.

INTERWINNER (release 1st of June 1998) ***Spectrometry Program*** Family Version 4. 1, 1998.

IVYENGAR, G. V.; KOLLMER, W. E.; BROWEN, H. J. M. The elemental composition of human tissues and body fluids. ***Weinheim: Verlag Chemie***, 1970.

JARAMILLO, M.A.; MANOS, P.S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). ***American Journal of Botany***, v. 88, p. 706-716, 2001.

KABATA-PENDIAS, ALINA.; MUKHERJEE, A. B. Trace Elements from Soil to Human. ISBN-10 3-540-32713-4. 2007.

KAKOSY, T., HUDAK, A., NARAY, M. Lead intoxication epidemic caused by ingestion of contaminated ground paprika. ***Journal of Toxicology. Clinical Toxicology***, v. 34, p. 507-511, 1996.

KEITH, L. H.; CRUMMET, W.; DEEGAR, J. P.; LIBBY, R. A.; TAYLOR, J. K.; WENTER, G. Principles of environmental analysis. ***Analytical Chemistry***, v. 55, p. 5510-5518, 1983.

KHAN, A.; RAHMAN, M.; ISLAM, S. Antipyretic Activity of *Peperomia pellucida* Leaves in Rabbit. ***Turkish Journal Biology***, v. 32, p. 37-41, 2007.

KHAN, M. R.; OMOLOSO, A. D. Antibacterial activity of *Hygrophila stricta* and *Peperomia pellucida*. ***Fitoterapia***. v. 73, p. 251-254, 2002.

KITAMURA, R. O. S.; ROMOFF, P.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J.; LAGO, J. H. G. Chromenes from *Peperomia serpens* (Sw) Loudon (Piperaceae). ***Phytochemistry***, v. 67, p. 2398-2402, 2006.

KLEMENT, A. W. Handbook of environmental radiation. Allen Brodsky, Editor-in-chief. CRC Press, nc. Boca Raton, Florida, 1982. In: **Determinação de ^{210}Pb em águas minerais da cidade de Águas da Prata**. 1993. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, SP.

KOUL, O.; WALIA, S.; DHALIWAL, G. S. Essential Oils as Green Pesticides: Potential and Constraints. ***Biopesticide International***, v. 4(1), p. 63-84, 2008.

KRISHNAN, S.; MANAVATHU, E. K.; CANDRASEKAR, P. H. *Aspergillus flavus*: an emerging non-fumigatus *Aspergillus* species of significance. ***Mycoses***, v. 52, p. 206–222, 2009.

LAGO, J. H. G.; OLIVEIRA, A.; GUIMARÃES, E. F.; KATO, M. J. 3-ishwarone and 3- ishwarol, are sesquiterpenes in essential oil from leaves of *Peperomia orephila Hensch.* ***Journal Brazilian Chemical Society***, v. 18, p. 638-642, 2007.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P. ***Plantas medicinais:*** do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular. Belém, PA, 2008.

LEONARDO, L. **Utilização de Liquens como bioindicadores contaminação atmosférica por Radionuclídeos Naturais e metais em região impactada por TENORM**. 2010. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, SP.

LÉSNIEWICZ, A.; JAWORSKA, K.; ZYRNICKI, W. Macro and micronutrients and their bioavailability in polish herbal medicaments. ***Food Chemistry***, v. 99, p. 670, 2006.

LI, N.; WU, J.; HASEGAWA, T.; SAKAI, J.; BAI, L.; WANG, L.; KAKUTA, S.; FURUYA, Y.; OGURA, H.; KATAOKA, T.; TOMIDA, A.; TSURUO, T.; ANDO, M. Bioactive polyketides from *Peperomia duclouxii*. ***Journal of Natural Products***, v. 70, p. 998-1001, 2007.

LINDHU, U. Nuclear microscopy. Its role and future in medicine and trace-element biology. Nuclear ***Instruments and Methods in Physics Research B***, v. 54, p. 160-170, 1991.

LIRA, P. N. B.; SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; SOUSA, P. J. C.; SILVA, N. N. S.; MAIS, J. G. S. Componentes voláteis de óleos essenciais de *Peperomia* e toxicidade frente a *Artemia salina*, 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, São Paulo (2007).

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; ARIAS, A. R. D.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A. New prenylated quinones from *Peperomia galioides.* ***Journal of Natural Products***, v. 59, p. 694-697, 1996.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; BARRIOUS, A. A.; FOURNET, A.; DUCROT, P. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. ***Journal of Natural Products***, v. 58, p. 324-328, 1995.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. ***Quimica Nova***, v. 32(3), p. 1-29, 2009.

MARTIN JR, D. W.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W.; GRANNER, D. K. Harper's Review of Biochemistry. 20 ed. California: Lange Medical Publication,1985.

MARTINS, A. S.; ALVES, C. N.; LAMEIRA, O. A.; SANTOS, A. S.; MÜLLER, R. C. S. Avaliação de minerais em plantas medicinais amazônicas. ***Revista Brasileira de Farmacognosia***, v. 19(2B), p. 621-625, 2009

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. de; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J.E. ***Plantas medicinais***. Viçosa, MG.: Editora UFV: Universidade Federal de Viçosa, 2000.

McLAFFERTY, F. W.; STANFFER, D. B. Registry of Mass Spectral Data, v. 1 - 2. Wiley-Interscience, New York, 1989.

MATTOS, C. B. **Papel da dieta na pressão arterial de pacientes com Diabetes Melito tipo 2**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS.

MEDEIROS, E. VON S. S. de. **Flora do Parque Estadual do Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil - Família Piperaceae**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ.

MENDES, L.P.M.1; MACIEL, K.M.; VIEIRA, A.B.R.; MENDONÇA, L.C.V.; SILVA, R.M.F.; ROLIM NETO, P.J.; BARBOSA, W.L.R.; VIEIRA, J.M.S. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. ***Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada***, v. 32(1), p. 121-125, 2011.

MENEZES, R. F. ***História de medicamentos, reações adversas e vigilância sanitária à farmacovigilância***: O pioneirismo do centro de vigilância sanitária do Estado de São Paulo, SP, 2005.

MERIAN E. Metals and their compounds in the environment: Occurrence, analysis, and biological relevance. ***VCH. Publisher***, 1991.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2006. In: AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, Brasil.

MIZRAHI, M. E. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro: a face oculta da história do Brasil**. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ.

MONTEIRO, D.; GUIMARÃES, E. F. Flora do Parque Nacional do Itatiaia – Brasil: Peperomia (Piperaceae). ***Rodriguésia***, v. 59 (1), p. 161-195, 2008.

MORANDIM-GIANETTI, A. A.; PIN, A. R.;PIETRO, N. A. S.; OLIVEIRA, H. C.; MENDES-GIANNINI, M. J. S.; ALECIO, A. C.; KATO, M. J.; OLIVEIRA, J. E.; FURLAN, M. Composition and antifungal activity against *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans* of essential oils from leaves of *Piper* and *Peperomia* species. ***Journal of Medicinal Plants Research***, v. 4(17), p. 1810-1814, 2010.

MORAES, S. P.; CHAVES, F. R.; BANCI, S.; ROVER, P. A.; GEORGETTI, F.; NETO, J. A. R. Zinco e Cromo na cicatrização de feridas em ratos normais e diabéticos. ***Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões***, v. 27(5), p. 394, 2000.

MOREIRA, H.S.; SAIKI, M.; VASCONCELLOS, M. B. A. Análise por ativação com nêutrons de fitoterápicos obtidos de plantas medicinais. ***International Nuclear Atlantic Conference***, Santos, SP, Brazil, September 30 to October 5, 2007.

MOREIRA, S. R. D. **Determinação de ^{210}Pb em águas minerais da cidade de Águas da Prata**. 1993. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, SP.

MUNHOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; ARRAZOLA, S; CALLAPA, J. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach: Part III. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Altenos Indians. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 71, p. 123-131, 2000.

MUTEE, A. F.; SALHIMI, S. M.; YAM. M. F.; LIM. C. P.; ABDULLAH, G. Z.; AMEER, O. Z.; ABDULKARIM, M. F.; ASMAWI, M.Z. *In vivo* Anti-inflamatory and *in vitro* Antioxidant activities of *Peperomia pellucida.* ***International Journal of Pharmacology***, v. 6(5), p. 686-690, 2010.

NAGHETINI, C. C. **Caracterização Físico-Química e Atividade Antifúngica dos Óleos Essenciais de Cúrcuma**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, MG.

NAIDU, G. R. K.; DENSCHALAG, H. O.; MAUERHOFER, E.; PORTE, N.; BALAJI, T. Determination of macro, micro nutrient and trace element concentrations in Indian medicinal and vegetable leaves using instrumental neutron activation analysis. ***Applied Radiation and Isotopes***, v. 50, p. 947-953, 1999.

NAVARRO, L. B. **Variabilidade de fenilpropanóides, lignanas tetraidrofurânicas e aristolactamas** em *Piper solmsianum* C. DC. 2009. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química da Universidade de São Paulo, SP.

NOGUEIRA, J. H.; GONÇALEZ, E.; GALLETI, S. R.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O.; FELÍCIO, J. D. *Ageratum conyzoides* essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. ***International Journal of Food Microbiology***, v. 137, p. 55-60, 2010.

OLIVEIRA, H. **Radioatividade natural em solos do município de Piracicaba**. 1988. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, SP.

OLIVEIRA, J. **Determinação de Ra-226 e Ra-228 em águas minerais da região de Águas da Prata**. 1993. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, SP.

OLUJOHUNGBE, A., FIELDS, P.A., SANDFORD, A.F. Heavy metal intoxication from homeopathic and herbal remedies. ***Postgraduate Medical Journal***, v. 70, p. 764–769, 1994.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. D.; PRASSAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C.; BOLL, P. M.; Phytochemistry of the genus *Piper.* ***Phytochemistry***, v. 46, p. 597-673, 1997.

PASTER, N.; BULLERMAN, L.B. Mould spoilage and mycotoxins formation in grains as controlled by physical means. ***Journal of Food and Microbiology***. 7: 257-65, 1988.

PEREIRA, R. M. **Determinação de constituintes inorgânicos em amostras de ervas e raízes medicinais por espectrometria de absorção atômica com chama**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, MG.

RAGASA, C. Y.; DUMATO, M.; RIDEOUT, J. A. Antifungal compounds from *Peperomia pellucida.* ***Chemical Research Communications***, v. 7, p. 54-61, 1998.

RAY, J. G.; GEORGE, J. Zn in Tolerant Roadside Plants in Relation to the Metal in the Soils in South India. ***Journal of Agricultural and Environmental Science***, v. 9(5), p. 548-559, 2010.

REIGADA, J. B.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Acilresorcinóis com potencial fungitóxico de *Peperomia alata*. 28ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005.

REIMANN, C.; CARITAT, P. de. 1998. Chemical Elements in the Environment. In: ***Geological Magazine***, v. 137, p. 596, 2000.

RIBEIRO, F. C. A. **Manejo agrícola e teores de radionuclídeos naturais em vegetais cultivados no Rio de Janeiro**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Radioproteção e Dosimetria, RJ.

RITTER, A. C. **Potencial toxigênico de *Aspergillus flavus* testado em diferentes meios e condições**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

RODRIGUES, E. S., SARGENTINI, E. C. P.; SARGENTINI JUNIOR, E. Determinação de antioxidantes e teor de metais em chá de capim santo por diferentes métodos de extração. In: 3º Congresso Norte Nordeste de Química, 2009, São Luís, MA. 1º Encontro Norte Nordeste de Ensino de Química, 2009.

RUIZ, A. H.; PAVON, J. Flora peruvianae et chilensis prodomus. (1974). In: FERREIRA, D. M. **Flora do Parque Estadual do Itatiaia – Brasil:** *Peperomia* **Ruiz & Pav. (Piperaceae).** 2007. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ

SAIDELLES, A. P. F.; KIRCHNER, R. M.; SANTOS, N. R. Z.; FLORES, E. M. M.; BARTZ, F. R. Análise de metais em amostras comerciais de erva-mate do sul do Brasil. ***Alimentos e Nutrição***, v. 21, n. 2, p. 259-265, 2010.

SALAZAR, K. J. M.; PAREDES, G. E. D.; LLUNCOR, L. R.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Chromenes of polyketide origin from *Peperomia villipetiola*. ***Phytochemistry***, v. 66, p. 573-579, 2005.

SCHEIBEL, V. **Determinação das Doses Efetivas por Ingestão de Farinhas de Cereais através da Espectrometria de Raios Gama**. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

SEERAM, N. P.; LEWIS, A. W.; JACOBS, H.; NAIR, M. G.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F. Proctoriones A-C: 2-Acylcyclohexane-1,3-dione derivatives from *Peperomia proctorii*. ***Journal of Natural Products***, v. 63, p. 399-402, 2000.

SILVA, D.M.H. & BASTOS, C.N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. ***Fitopatologia Brasileira***, v. 32, p. 143-145, 2007.

SILVA, I. M. **A etnobotânica e a medicina popular em mercados na cidade de Rio de Janeiro**. 2008. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ.

SILVA, J. J. R. F.;WILLIAMS, R. J. P. The biological chemistry of the elements – The inorganic chemistry of life. Oxford.: Clarendon Press, 1993.

SILVA, M. H. L.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. The essential oils of *Peperomia pellucida* Kunth and *P. circinnata* Link var. *circinnata*. ***Flavour and Fragrance Journal***, v. 14, p. 312-314, 1999.

SILVA, M. L. S.; VITTI, G. C.; TREVIZAM, A. R. Concentração de metais pesados em grãos de plantas cultivadas em solo com diferentes níveis de contaminação. ***Pesquisa Agropecuária Brasileira***, v. 42, p. 527-535. 2007.

SILVA, P. S. C. **Determinação de Radionuclídeos Pertencentes às Séries Naturais de Decaimento do U-238 e Th-232 nos Fosfatos de Arquipélago de Abrolhos (BA)**. 1998. Dissertação (Mestrado) - Instituto Astronômico e Geofísico Universidade de São Paulo, SP.

SILVEIRA, I. M. M. **O Conhecimento popular sobre o papel curador das plantas e a sua educação na escola**. 2005. Monografia (Especialização em Gestão Educacional) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

SILVEIRA, L. M. DA S.; OLEA, R. S. G.; AMARANTE JÚNIOR, O. P. DE.; MARIZ, S. R. Extração de minerais em planta de uso medicinal através da infusão e digestão por micro-ondas. ***Revista Brasileira de Farmacognosia***, v. 90(2), p. 144-147, 2009.

SINGH, Y.N. Kava – an overview. ***Journal of. Ethnopharmacology***, v. 37, p. 13-45, 1992.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. ***Principles of Instrumental Analysis,* 5th edition**. Saunders College Publishing, EUA. 0-03-002078-6, 1998.

SOUSA, P. J. C.; BARROS, C. A. L.; ROCHA, J. C. S.; LIRA, D. S.; MONTEIRO, G. M.; MAIA, J. G. S. Avaliação toxicológica do óleo essencial de *Piper aduncum* L. ***Revista Brasileira de Farmacognosia***, v. 18(2), p. 217-221, 2008.

SOUZA, A. P. F.; MARTINS, B. N.; LIMA, M. C. H. P.; VELOZO, L. S. M.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Óleo essencial de folhas, de caules e de raízes de *Peperomia pellucida* Kunth (Piperaceae). 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, Ceará, 2009.

SOUZA, E. L,; LIMA, E. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUSA, C. P. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. ***Brazilian Archives of Biology and Technology***, v. 48, p. 245-250, 2005.

SU, X.; LI, N.; NING, M. M.; ZHOU, C.H.; YANG, Q. R.; WANG, M.W. Bioactive compounds from *Peperomia pellucida*. ***Journal of Natural Products***, v. 69, p. 247-250, 2006.

SUSSA, F. V.; SILVA, P. S. C.; DAMATTO, S. R.; FÁVARO, D. I. T.; MAZZILLI, B. P. Radioactive and stable element's concentration in medicinal plants from Brazil. ***Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry***, v. 281, p. 165-170, 2009.

TAKERA, R.; PONTES, A. N. L.; FERREIRA, A. D. M.; CASTRO, S. R.; LUGO, Y. O.; MOREIRA, A. R.; CORRÊA, G. M.; GUIMARÃES, A. C. Teor de óleo essencial em plantas da Região Amazônica. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, Ceará, 2009.

TANAKA, T.; ASAI, F.; IINUMA, M. Phenolic compounds from *Peperomia obtusifolia*. ***Phytochemistry***, v. 49, p. 229-232, 1998.

TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos**: ocorrência e detecção. Campinas: Núcleo de Microbiologia do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), p. 82, 2001.

THUNUS, L.; LEJEUNE, R. In: SEILER, H. G. SIGEL, A.; SIGEL, H. ***Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry***, p. 33. Marcel Dekker, New York, 1994.

TUBINO, P; ALVES, E. A Medicina no Antigo Egito, 2009.

VAZ, S. M. **Análise de extratos de plantas medicinais pelo método de ativação com nêutrons**. 1995. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, SP.

VEIGA, M. A. M. S.; SILVA, A. A.; NASCIMENTO, A. N.; BARREIROS, A. L. B. S.; YOSHIDA, M. Avaliação da distribuição de metais em folhas de *Copaifera multijuga* por extração sequencial e detecção por ICP-MS. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 2007.

VELOSO, L. S. M.; FERREIRA, M. J. P.; SANTOS, M. I. S.; MOREIRA, D. L.; EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A. C. Unusual chromenes from *Peperomia blanda.* ***Phytochemistry***, v. 67, p. 492-496, 2006.

VIEIRA, L. D. **Análise multielementar da mucosa gástrica de roedores tratados com *Alchornea glandulosa*, *Davilla elliptica* e *Davilla nitida* pela técnica de fluorescência de raios-X por reflexão total**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP.

VULCANO, I. R. C.; SILVEIRA, J. N.; ALVAREZ-LEITE, E. M. Teores de chumbo e cádmio em chás comercializados na região metropolitana de Belo Horizonte. ***Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 44(3), 2008.

WANKE, S.; SAMAIN, M.S.; VANDERSCHAEVA, L.; MATHIEU, G.; GOETGHEBEUR, P.; NEINHUIS, C. Phylogeny of the genus Peperomia (Piperaceae) inferred from the trnk/matk region (cpDNA). ***Plant Biology***, v. 8, p. 93-102, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Trace Elements in Human Nutrition and Health, Genova, 1996.

XU, S.; LI, N.; NING, M. M.; ZHOU, C. H.; YANG, Q. R.; WANG, M. H. Bioactive compounds from *Peperomia pellucida*. ***Journal of Natural Products***, v. 69, p. 247-250, 2006.

YAMASHITA, C. I. **Estudos sobre os constituintes inorgânicos presentes em diferentes espécies da planta medicinal do gênero *Casearia* coletadas em regiões distintas da Mata Atlântica, SP**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, SP.

ZHANG, G. L.; LI, N.; WANG, Y. H.; ZHENG, Y. T.; ZHANG, Z.; WANG, M. W. Bioactive lignans from *Peperomia heyneana*. ***Journal of Natural Products***, v. 70, p. 662-664, 2007.