

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRICIA DE ANDRADE NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO INORGÂNICO DOS EXTRATOS DE
CANABIDIOL EMPREGADOS PARA FINS TERAPÊUTICOS POR
ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE
ACOPLADO (ICP OES) E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A
DETERMINAÇÃO DE As, Cd e Pb POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO
ATÔMICA POR FORNO DE GRAFITE (GF AAS) NESSES EXTRATOS

CURITIBA

2018

PATRICIA DE ANDRADE NASCIMENTO

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO INORGÂNICO DOS EXTRATOS DE
CANABIDIOL EMPREGADOS PARA FINS TERAPÊUTICOS POR
ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE
ACOPLADO (ICP OES) E DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA A
DETERMINAÇÃO DE As, Cd e Pb POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO
ATÔMICA POR FORNO DE GRAFITE (GF AAS) NESSES EXTRATOS

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Química, pelo
Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de
Ciências Exatas, da Universidade Federal do
Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andrea Pinto de Oliveira

CURITIBA

2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

N244c

Nascimento, Patricia de Andrade

Caracterização do perfil químico inorgânico dos extratos de canabidiol empregados para fins terapêuticos por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e desenvolvimento de método para a determinação de As, Cd e Pb por espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (GF AAS) nesses extratos / Patricia de Andrade Nascimento. – Curitiba, 2018.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientador: Andrea Pinto de Oliveira .

1. Cannabis sativa. 2. Canabinóides. 3. Espectrometria de absorção atômica. 4. Arsênio. 5. Cádmio. 6. Chumbo. 7. Espectrometria de massa. I. Universidade Federal do Paraná. II. Oliveira, Andrea Pinto de. III. . IV. Título.

CDD: 633.53

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894


TERMO DE APROVAÇÃO


**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO INORGÂNICO DOS EXTRATOS DE
CANABIDIOL EMPREGADOS PARA FINS TERAPÊUTICOS POR ESPECTROMETRIA DE
EMIÇÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP OES) E
DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE As, Cd e Pb POR
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA POR FORNO DE GRAFITE (GF AAS)
NESSES EXTRATOS**

por

PATRICIA DE ANDRADE NASCIMENTO

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química,
pela Comissão Examinadora composta por:

Orientador: 
Prof.^a Dr.^a Andrea Pinto de Oliveira
Dep. de Química – UFPR


Prof. Dr. Eder José dos Santos
Centro de Tecnologia em Saúde e Meio Ambiente – TECPAR


Prof.^a Dr.^a Noemi Nagata
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 27 de julho de 2018.

*A Cristina, Paulo, João Paulo, José Augusto e Pedro
Que em amor sempre me incentivaram.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao autor e consumidor da minha vida, Deus. Que me proporcionou a chegada até aqui com pessoas tão maravilhosas, as quais serão descritas a seguir.

Agradeço à Professora Doutora Andrea Pinto de Oliveira pela orientação segura, pelo incentivo, pelo exemplo profissional e apoio durante a execução deste trabalho tão significativo para mim.

Agradeço aos professores: Noemi, Patricio, Marco Tadeu, Clarice, Antônio Mangrich, Denise, Lucia e a todos os professores que me auxiliaram na caminhada pelo saber, por todo conhecimento a mim ofertado, pela disposição em sempre me ajudar e pelo exemplo de bons professores.

Agradeço aos poucos e bons amigos que fiz na UFPR e que foram essenciais em cada passo dado. Tassya, Juliana, Estela, Mayara F., Mayara G., Magali, Paulo, Rita, Guilherme, Iohanna e Gabriela obrigada por terem feito essa etapa da minha vida tão leve e gostosa de viver.

Agradeço aos meus amigos de Volta Redonda e aos amigos que fiz em Curitiba por estarem sempre ao meu lado, tornando essa vida melhor.

Agradeço a Silvia, Camilla e Leandro por gentilmente me acolherem como parte da família.

Agradeço ao meu namorado Pedro, por todo apoio, todo incentivo e por sempre acreditar em mim. Seu amor e carinho me fortalecem a cada dia. Obrigada por fazer dos meus sonhos, os nossos sonhos. Sei que juntos iremos longe. Eu te amo.

Agradeço ao meu irmão João Paulo, que sempre me incentivou e se esforçou para me ajudar com tudo que eu precisasse. Obrigada por compartilhar essa vida comigo e me fazer forte. Te amo.

Agradeço aos meus pais Cristina e Paulo, por todo esforço que fizeram e ainda fazem para que eu possa estudar e me tornar uma boa profissional. Seus esforços, hoje, rendem novos frutos. Obrigada pelo amor e carinho ofertados a mim durante toda minha vida. Sou e serei eternamente grato por tudo que vocês dedicaram a mim. Eu tenho muito orgulho de ser filha de vocês e muita admiração pelos pais que tenho. Obrigada por tudo. Amo muito vocês!

Que Deus continue abençoando a vida de cada um de vocês.

*Porquanto é o SENHOR quem concede sabedoria,
E da sua boca procedem a inteligência e o discernimento.
Provérbios: 2.6*

RESUMO

A *Cannabis Sativa L.* (maconha) apresenta mais de 500 substâncias químicas, das quais aproximadamente 100 delas se classificam na categoria dos canabinóides, de acordo com o Instituto Nacional de Saúde. Entre as quais se encontra o tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC), o canabinóide mais conhecido e responsável pelos efeitos psicodélicos da maconha e o Canabidiol (CBD), outra espécie química que possui amplo espectro de ações com efeitos farmacológicos. Apesar dos inúmeros estudos relatados sobre as potencialidades medicinais do CBD e de sua interação com o THC não há na literatura, até o presente momento, trabalhos relacionados à análise elementar inorgânica desses extratos comumente utilizados para fins terapêuticos. Todavia, devido ao potencial efeito bioacumulador /fitorremediador da planta *Cannabis Sativa*, estudos que elucidam a composição química inorgânica nesses extratos utilizados como medicamentos e os seus efeitos ao organismo humano são de extrema importância. Neste contexto, esse trabalho caracterizou o perfil químico inorgânico dos extratos de CBD empregando a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, ICP OES, sendo as amostras previamente digeridas em meio ácido (HNO_3 65% v/v e H_2O_2 30% m/v) por forno de micro-ondas. Os constituintes inorgânicos encontrados em diferentes extratos de CBD foram: Ni ($3,0 \mu\text{g g}^{-1}$), Zn ($1,5 - 12,5 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu ($0,3 - 1,7 \mu\text{g g}^{-1}$), Mn ($0,5 - 10,0 \mu\text{g g}^{-1}$), Cr ($3,0 - 5,0 \mu\text{g g}^{-1}$), B ($2,0 - 23,0 \mu\text{g g}^{-1}$) e Ba ($0,3 - 0,7 \mu\text{g g}^{-1}$), todos abaixo dos limites máximos estabelecidos pela FDA e ANVISA. Este trabalho teve ainda como propósito o desenvolvimento e otimização de metodologias analíticas para a determinação de Pb, As e Cd empregando a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica por forno de grafite, GF AAS. O reagente hidróxido de tetrametilamônio (TMAH), foi empregado visando à obtenção de uma suspensão representativa dos extratos de CBD que fosse compatível com a técnica GF AAS. Variáveis referentes ao preparo de amostras e aos parâmetros instrumentais foram otimizadas a fim de se obter condições reacionais e de análise adequadas à quantificação desses elementos nos extratos de CBD. Limites de detecção na ordem de $1,36 \mu\text{g L}^{-1}$ para As, $0,23 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cd e $5,15 \mu\text{g L}^{-1}$ para Pb foram obtidos, e valores satisfatórios de exatidão e precisão, (80-120%) e RSD (< 7%), respectivamente foram alcançados para os analitos investigados. Os extratos de CBD analisados apresentaram teores de As, Cd e Pb abaixo dos limites máximos estabelecidos pelas agências reguladoras FDA e ANVISA, isto é, $1,5 \mu\text{g g}^{-1}$ para As, $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ para Cd e $0,5 - 1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ para Pb. Somente duas amostras apresentaram teor de As acima do LOQ $0,0009 \pm 5 \times 10^{-5}$ e $0,0006 \pm 8 \times 10^{-5} \mu\text{g g}^{-1}$. O método proposto se apresentou bastante robusto, com elevada precisão e exatidão alcançando os objetivos propostos.

Palavras-Chave: Extratos de Canabidiol. TMAH. GF AAS. Arsênio. Cádmiio. Chumbo. ICP OES.

ABSTRACT

Cannabis Sativa L. (marijuana) has more than 500 chemical substances, of which approximately 100 are classified as cannabinoids, according to the National Institute of Health. Among them are the tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), the cannabinoid most known and responsible for the psychedelic effects of cannabis, and Cannabidiol (CBD), another chemical species with a broad spectrum of actions with pharmacological effects. In spite of the numerous studies reported on the medicinal potential of CBD and its interaction with THC, there are no studies in the literature, until this moment, related to elemental inorganic analysis of these extracts commonly used for therapeutic purposes. However, due to the potential bioaccumulator / phytoremediate effect of the *Cannabis Sativa* plant, studies that elucidate the inorganic chemical composition in these extracts used as medicines and their effects on the human organism are of extreme importance. In this context, this work has characterized the inorganic chemical profile of CBD extracts using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). The samples were previously digested in acid medium (HNO_3 65% v/v and H_2O_2 30% m/v) by microwave oven. The inorganic constituents found in different CBD extracts were: Ni ($3.0 \mu\text{g g}^{-1}$), Zn (1.5 - $12.5 \mu\text{g g}^{-1}$), Cu (0.3 - $1.7 \mu\text{g g}^{-1}$), Mn (0.5 - $10.0 \mu\text{g g}^{-1}$), Cr (3.0 - $5.0 \mu\text{g g}^{-1}$), B, (0 - $23.0 \mu\text{g g}^{-1}$) and Ba (0.3 - $0.7 \mu\text{g g}^{-1}$), all below the maximum limits established by the FDA and ANVISA. The purpose of this work was the development and optimization of analytical methodologies for the determination of Pb, As and Cd using atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization by graphite furnace, GF AAS. The tetramethylammonium hydroxide reagent (TMAH) was used to obtain a representative suspension of the extracts of CBD that were compatible with the GF AAS technique. Variables related to sample preparation and instrumental parameters were optimized in order to obtain reaction and analysis conditions suitable for the quantification of these elements in CBD extracts. Detection limits in the order of $1.36 \mu\text{g L}^{-1}$ for As, $0.23 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cd and $5.15 \mu\text{g L}^{-1}$ for Pb were obtained, and satisfactory values of accuracy and precision (80-120 %) and RSD (<7%), respectively, were achieved for the investigated analytes. The extracts of CBD analyzed presented As, Cd and Pb levels below the maximum limits established by the regulatory agencies FDA and ANVISA, that is, $1.5 \mu\text{g g}^{-1}$ for As, $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ for Cd and $0, 5$ - $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$ for Pb. Only two samples had As content above LOQ $0.0009 \pm 5 \times 10^{-5}$ and $0.0006 \pm 8 \times 10^{-5} \mu\text{g g}^{-1}$. The proposed method was quite robust, with satisfactory precision and accuracy, reaching the proposed objectives.

Key Words: Cannabidiol Extracts. TMAH. GF AAS. Arsenic. Cadmium. Lead. ICP OES.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PLANTAS FLORIDAS DE C. SATIVA - MACHO À ESQUERDA E FÊMEA A DIREITA.....	19
FIGURA 2 - ESTRUTURA CRISTALINA DO CANABIDIOL (CBD).....	21
FIGURA 3 - ESQUEMA DO SISTEMA DE NEBULIZAÇÃO E DA TOCHA ONDE OCORRE A ATOMIZAÇÃO NO ICP OES.....	38
FIGURA 4 - ESQUEMA DO SISTEMA DE ATOMIZAÇÃO DA TÉCNICA AAS POR FORNO DE GRAFITE.....	40
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DO PROGRAMA DE AQUECIMENTO DA TÉCNICA DE GF AAS.....	41
FIGURA 6 - ESPECTRÔMETRO DE EMISSÃO ÓPTICA POR PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP OES) DUAL VIEW, MODELO OPTIMA 8300; PERKIN ELMER UTILIZADO PARA VARREDURA DOS ELEMENTOS QUÍMICOS INORGÂNICOS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE EXTRATO DE CBD.....	47
FIGURA 7 - ESPECTRÔMETRO DE ABSORÇÃO ATÔMICA POR FORNO DE GRAFITE (GF AAS), MODELO AA 6800F/6800G; SHIMADZU; UTILIZADO PARA O DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE As, Cd E Pb.....	48
FIGURA 8 - CURVAS DE TEMPERATURA DE PIRÓLISE (T_p) E TEMPERATURA DE ATOMIZAÇÃO (T_a) PARA Pb, As E Cd EM MEIO ÁCIDO (HNO_3 1% v/v). ANÁLISE DE 20 μL DE SOLUÇÃO PADRÃO DE CADA ANALITO E 5 μL DE MODIFICADOR QUÍMICO (Pd 5 μg – Mg 3 μg PARA Pb, Pd 2,5 μg PARA As E Cd).....	65
FIGURA 9 - SINAIS TRANSIENTES OBTIDOS PARA O Pb E PARA O As NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE T_p E T_a . SENDO O SINAL EM VERMELHO CORRESPONDENTE AO SINAL DO ANALITO E O SINAL EM AZUL AO BACKGROUND. ANÁLISE DE 20 μl DE SOLUÇÃO PADRÃO (20 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb E 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ As) E 5 μL DE SEUS RESPECTIVOS MODIFICADORES QUÍMICOS (Pd 5 μg – Mg 3 μg E Pd 2,5 μg).	66
FIGURA 10 - SINAIS TRANSIENTE OBTIDOS PARA Cd EM A) T_a MENORES QUE 1600°C; B) T_a MAIORES QUE 1600°C E C) NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE T_p E T_a . SENDO O SINAL EM VERMELHO CORRESPONDENTE AO SINAL DO ANALITO E O SINAL EM AZUL AO BACKGROUND. ANÁLISE DE 20 μl DE SOLUÇÃO PAD RÃO (15 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd) E 5 μL DE MODIFICADOR QUÍMICO (Pd 2,5 μg).	67

FIGURA 11 - SUSPENSÕES OBTIDAS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO, 2³. CONDIÇÕES AVALIADAS A) 0,2% m/v DE TMAH à 25 °C APÓS PREPARO IMEDIATO DA SUSPENSÃO; B) 0,2% m/v DE TMAH à 80°C DURANTE 5 E 10 MINUTOS DE EXTRAÇÃO; C) 5,0% m/v DE TMAH à 25°C APÓS O PREPARO IMEDIATO DA SUSPENSÃO E D) 5,0% m/v DE TMAH à 80°C DURANTE 5 E 10 MINUTOS DE EXTRAÇÃO.69

FIGURA 12 - GRÁFICO DE PARETO REFERENTE À OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DA AMOSTRA DE EXTRATO DE CBD, OBTIDO DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2³, PARA A QUANTIFICAÇÃO DE Pb POR GF AAS71

FIGURA 13 - DIAGRAMA PARA INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS DE SEGUNDA ORDEM APRESENTADOS PELO PLANEJAMENTO 2³. OS EFEITOS PRINCIPAIS SÃO CONTRASTES ENTRE ARESTAS OPOSTAS (A) E (B). O EFEITO DE INTERAÇÃO É O CONTRASTE ENTRE AS DUAS DIAGONAIS (C). OS VALORES NOS VÉRTICES DO QUADRADO SÃO AS RESPOSTAS MÉDIAS (RECUPERAÇÃO DE Pb).72

FIGURA 14 - CURVA ANALÍTICA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA Pb EM MEIO ÁCIDO (HNO₃ 1% v/v) E EM MEIO ALCALINO (TMAH 0,1% m/v). INTERVALO DE CALIBRAÇÃO 5,0 - 13,0 µg L⁻¹. MODIFICADOR QUÍMICO: Pd 5 µg – Mg 3 µg. VOLUME DE SOLUÇÃO PADRÃO: 20 µL E VOLUME DE MODIFICADOR QUÍMICO 5 µL75

FIGURA 15 - CURVA ANALÍTICA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA As EM MEIO ÁCIDO (HNO₃ 1% v/v) E EM MEIO ALCALINO (TMAH 0,1% m/v). INTERVALO DE CALIBRAÇÃO 2,0 - 10,0 µg L⁻¹. MODIFICADOR QUÍMICO: Pd 2,5 µg. VOLUME DE SOLUÇÃO PADRÃO: 20 µL E VOLUME DE MODIFICADOR QUÍMICO 5 µL76

FIGURA 16 - CURVA ANALÍTICA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA Cd EM MEIO ÁCIDO (HNO₃ 1% v/v) E EM MEIO ALCALINO (TMAH 0,1% m/v). INTERVALO DE CALIBRAÇÃO 2,0 - 6,0 µg L⁻¹. MODIFICADOR QUÍMICO: Pd 2,5 µg. VOLUME DE SOLUÇÃO PADRÃO : 20 µL E VOLUME DE MODIFICADOR QUÍMICO 5 µL77

FIGURA 17 - EXTRATOS DE CBD ANALISADAS PELO MÉTODO PROPOSTO POR GF AAS. EXTRATOS DE CBD A ESQUERDA DE ASPECTO LÍQUIDO E DA DIREITA DE ASPECTO PASTOSO81

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - LIMITES MÁXIMOS PARA ALGUNS ELEMENTOS QUÍMICOS INORGÂNICOS ESTABELECIDOS PELA ANVISA E FDA PARA MEDICAMENTOS ADMINISTRADOS POR VIA ORAL.....	25
TABELA 2 - DIFERENTES CONDIÇÕES REACIONAIS PARA A DIGESTÃO ÁCIDA DOS EXTRATOS DE CBD EM CHAPA DE AQUECIMENTO. MASSA DA AMOSTRA - 0,1500 g E TEMPERATURA DE 70°C.....	46
TABELA 3 - PROGRAMA DE AQUECIMENTO PARA A DIGESTÃO ÁCIDA EM FORNO MICRO-ONDAS DAS AMOSTRAS DE EXTRATOS DE CANABIDIOL. MASSA DA AMOSTRA - 0,3000 g.....	46
TABELA 4 - CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DO ICP OES PARA A DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS QUÍMICOS NOS EXTRATOS À BASE DE CBD.....	47
TABELA 5 - CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE Pb, As E Cd EM EXTRATOS DE CBD, POR GF AAS.....	48
TABELA 6 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA ELABORAÇÃO DA CURVA DE PIRÓLISE EM MEIO ÁCIDO (HNO ₃ 1% v/v). VOLUME DE INJEÇÃO DE 20 µL DE SOLUÇÃO PADRÃO (20 µg L ⁻¹ Pb, 15 µg L ⁻¹ As e 10 µg L ⁻¹ Cd) E 5 µL DE MODIFICADOR QUÍMICO.....	49
TABELA 7 - NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES DOS MODIFICADORES QUÍMICOS TESTADOS NA ANÁLISE DE Pb, As e Cd POR GF AAS PARA UM VOLUME FINAL DE 10 mL.....	50
TABELA 8 - VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS PELO PLANEJAMENTO FATORIAL (2 ³) COMPLETO ELABORADO A PARTIR DO SOFTWARE STATISTICA 7.0.....	52
TABELA 9 - MATRIZ REFERENTE AO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO, 2 ³ NA OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS NO PREPARO DE AMOSTRAS EM MEIO ALCALINO. MASSA DE AMOSTRA - 0,1000 g.....	52
TABELA 10 - NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO TESTADOS DE CADA ANALITO PARA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO PROPOSTO.....	56
TABELA 11 - TEORES DOS ELEMENTOS QUÍMICOS QUANTIFICADOS POR ICP OES EM DIFERENTES EXTRATOS DE CBD PREVIAMENTE DIGERIDOS EM FORNO DE MICRO-ONDAS. (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO, N=3).....	59

TABELA 12 - LIMITES MÁXIMOS PERMITIDOS PARA ELEMENTOS QUÍMICOS INORGÂNICOS EM MEDICAMENTOS PRECONIZADOS PELA ANVISA E FDA PARA MEDICAÇÃO POR VIA ORAL.....	61
TABELA 13 - COMPARAÇÃO ENTRE OS TEORES DE ELEMENTOS QUÍMICOS DETERMINADOS NESTE TRABALHO COM OUTROS ESTUDOS CIENTÍFICOS EM RELAÇÃO A PLANTA CANNABIS SATIVA.....	61
TABELA 14 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO ENCONTRADOS PARA OS EXTRATOS DE CBD (AMOSTRAS INDUSTRIAIS – PI 01 e PI 02) E VALORES DE RECUPERAÇÃO OBTIDOS PARA EXTRATOS DE CBD FORTIFICADOS COM 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ DE CADA ELEMENTO QUÍMICO QUANTIFICADO POR ICP OES. VALOR MÉDIO \pm O DESVIO PADRÃO, N=3.....	62
TABELA 15 - LIMITES DE DETERMINAÇÃO (LOD) E QUANTIFICAÇÃO (LOQ) CALCULADOS PARA OS ANALITOS DETERMINADOS POR ICP OES, SEGUNDO RESOLUÇÃO (Re 166/2017) DA ANVISA.....	63
TABELA 16 - PROGRAMA DE AQUECIMENTO DESENVOLVIDO NO GF AAS PARA A DETERMINAÇÃO DE Pb, As E Cd NAS SUSPENSÕES OBTIDAS DOS EXTRATOS DE CBD EM MEIO ALCALINO (TMAH 0,1% m/v).....	67
TABELA 17 - VALORES DE RECUPERAÇÃO PARA Pb EM DIFERENTES EXPERIMENTOS REALIZADOS DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^3 ANALISADOS POR GF AAS VISANDO A ESCOLHA DAS MELHORES CONDIÇÕES PARA O PREPARO DE AMOSTRAS DOS EXTRATOS DE CBD EM MEIO ALCALINO. (MASSA DA AMOSTRA FIXA – 0,1000g).....	70
TABELA 18 - VALORES DE RECUPERAÇÃO OBTIDOS PARA OS EXTRATOS DE CBD TRATADOS COM TMAH 0,1% m/v, DURANTE 15 MIN A TEMPERATURA DE 100°C POR GF AAS. INJETOU-SE 20 μL DE AMOSTRA E 5 μL DE MODIFICADOR QUÍMICO NA DETERMINAÇÃO DE Pb, As e Cd. N=2.....	74
TABELA 19 - LIMITES DE DETECÇÃO (LOD) E QUANTIFICAÇÃO (LOQ) CALCULADOS PARA O MÉTODO PROPOSTO PARA CADA ANALITO SEGUNDO RESOLUÇÃO RE n° 166 DA ANVISA E DE ACORDO COM WELZ.....	78
TABELA 20 - VALORES DE RECUPERAÇÃO OBTIDO PARA EXTRATO DE CBD SOLUBILIZADO EM MEIO DE TMAH 0,1% m/v. MÉDIA \pm O DESVIO PADRÃO, N=3.....	80
TABELA 21 - VALORES DE RSD (%) OBTIDOS A PARTIR DOS TEORES ENCONTRADOS PARA O TESTE DE RECUPERAÇÃO DETERMINADOS PARA OS TRÊS NÍVEIS DE CADA ANALITO.....	80

TABELA 22 - TEORES DOS ELEMENTOS QUÍMICOS (As, Cd E Pb)
QUANTIFICADOS POR GF AAS EM DIFERENTES EXTRATOS DE CBD
SOLUBILIZADOS EM MEIO DE TMAH 0,1% m/v. (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO, n=3)
.....82

LISTA DE SIGLAS

CBD – Canabidiol (Cannabidiol)

THC – Tetrahydrocannabinol (Tetrahydrocannabinol)

TMAH – Hidróxido de Tetrametilamônio (Tetramethylammonium Hydroxide)

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (National Health Surveillance Agency)

FDA – Administração de Comidas e Remédios (Food and Drug Administration)

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (European Food Safety Authority)

CFM – Conselho Federal de Medicina (Federal Council of Medicine)

D.O.U – Diário Oficial da União (Official Diary of the Union)

F AAS – Espectrometria de Absorção Atômica por Chama (Flame Atomic Absorption Spectroscopy)

ET/GF AAS – Espectrometria de Absorção Atômica por forno eletrotérmico / grafite (Electrothermal/Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy)

ICP OES – Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)

ICP-MS – Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)

RMN – Ressonância Magnética Nuclear (Nuclear Magnetic Resonance)

LOD – Limite de Detecção (Limit of Detection)

LOQ – Limite de Quantificação (Limit of Quantification)

RSD – Desvio Padrão Relativo (Relative Standard Deviation)

SBR – Relação Sinal-Ruído (Signal-Background Ratio)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS.....	19
2.2 PLANTA <i>CANNABIS SATIVA</i> : UM POTENCIAL BIOACUMULADOR	21
2.3 As, Cd E Pb E SEUS EFEITOS TÓXICOS AOS SERES VIVOS.....	24
2.4 EXTRATO DE CANABIDIOL COMO MEDICAMENTO NO BRASIL.....	29
2.4.1 Farmacopéia Brasileira.....	31
2.5 ESTRATÉGIAS DE PREPARO DE AMOSTRAS.....	32
2.6 TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS	37
2.6.1 Modificadores Químicos em GF AAS.....	41
3 OBJETIVOS	43
3.1 <i>Objetivo Geral</i>	43
3.2 Objetivos específicos	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 SOLUÇÕES, REAGENTES E AMOSTRAS	45
4.2 DIGESTÃO ÁCIDA.....	45
4.3 Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado – ICP OES.....	47
4.4 Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite - GF AAS	48
4.4.1 Avaliação dos Sinais transientes de absorbância dos Analitos	51
4.5 SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA POR TMAH.....	51
4.6 ESTUDO DOS FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO ANALÍTICO PROPOSTO POR GF AAS	54
4.6.1 Limites de detecção e quantificação	54
4.6.2 Curvas Analíticas de Calibração externa e Faixa da linearidade	55
4.6.3 Estudo de adição e recuperação.....	55

4.6.4 Precisão	56
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
5.1 PREPARO DE AMOSTRAS EM MEIO ÁCIDO ASSISTIDO POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS	57
5.2 DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS QUÍMICOS POR ICP OES	58
5.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE Pb, As E Cd POR GF AAS	63
5.3.1 Estudo dos Modificadores Químicos e de suas respectivas concentrações na quantificação de Pb, As e Cd em Extratos de CBD.....	63
5.3.2 Estudo dos Parâmetros Instrumentais do GF AAS na Quantificação de Pb, As e Cd nos Extratos de CBD	634
5.4 SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA POR TMAH.....	68
5.5 CURVAS ANALÍTICAS DE CALIBRAÇÃO EXTERNA.....	74
5.6 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	78
5.7 EXATIDÃO E PRECISÃO DO MÉTODO PROPOSTO POR GF AAS	79
5.8 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE EXTRATO DE CBD POR GF AAS.....	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS	83
PERSPECTIVAS.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXO 1.....	97
ANEXO 2.....	101

1 INTRODUÇÃO

A planta *Cannabis Sativa* é muito conhecida por seu potencial terapêutico, e também por ser um bioacumulador eficiente de elementos químicos do solo, podendo até mesmo ser utilizada para remediação destes. (ANGELOVA et al., 2004; SMALL, 2016). Tal fato, gera uma preocupação em relação aos produtos derivados desta planta que são ingeridos pelos seres humanos, seja através da alimentação, pela semente, manteigas e óleos, ou até mesmo pelo seu uso como medicamento, a partir do extrato de canabidiol (CBD).

A composição orgânica da planta *Cannabis Sativa* é bem discutida na literatura, centrando-se principalmente na caracterização e quantificação dos compostos tetrahydrocannabinol (THC), canabidiol (CBD), como também dos demais canabinóides presentes e seus efeitos na saúde humana. (BERGAMASCHI et al., 2011; DE SOUZA CRIPPA et al., 2004; HAZEKAMP et al., 2010; IZZO et al., 2009; JAEGER; BENET; BORNHEIM, 1996; KARNIOL et al., 1974; LORENZETTI; SOLOWIJ; YÜCEL, 2016; MECHOULAM; HANUŠ, 2002; PISANTI et al., 2017; RONG et al., 2017; S; MEAD; LL, 2017; ZUARDI et al., 2006). O THC é um dos canabinóides mais conhecidos da planta *Cannabis Sativa*, sendo considerado a principal substância responsável pelos efeitos psicoativos da planta. Estudos relatam que altos níveis de THC podem induzir a ansiedade, pânico e psicose, especialmente para usuários novos.(BURGDORF; KILMER; PACULA, 2011). O CBD é uma das principais substâncias químicas presente na planta *Cannabis Sativa* e desde a sua elucidação e estruturação, muito se tem estudado sobre seus efeitos terapêuticos. (KAPLAN et al., 2017). Em contrapartida, há poucos estudos realizados em relação a caracterização do perfil inorgânico desses extratos. (ABDUL et al., 2012; EBOH; THOMAS, 2005; KHAN, 2013).

As substâncias THC e CBD são a base do Sativex®, remédio produzido pela GW Pharmaceuticals® desde 2005, atualmente aprovado em 28 países como o Canadá, Estados Unidos, Dinamarca, Alemanha, Suécia entre outros. No Brasil o remédio foi aprovado somente em meados de 2017 com o nome de Mevatyl® também para o tratamento de espasmos originados pela esclerose múltipla, sendo classificado como tarja preta pela ANVISA e contraindicado para o tratamento de epilepsia por

conter uma quantidade significativa (aproximadamente 50%) de THC, que pode agravar as crises epiléticas. (CANCIAN, 2017; O GLOBO, 2017).

No Brasil os produtos à base de canabidiol (ricos em CBD e com baixos teores de THC) vêm sendo utilizados com autorização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desde 2014, como medicamentos para o tratamento de algumas patologias como: epilepsia refratária, Mal de Parkinson, Mal de Alzheimer, entre outras. Em efeito, a organização mundial da saúde (OMS) já reconhece o potencial terapêutico do canabidiol para uma vasta gama de doenças como: mal de Alzheimer, mal de Parkinson, esclerose múltipla, ansiedade, depressão, câncer, diabetes, inflamatórias entre outras. (ECDD, 2017)

Entretanto, devido ao potencial efeito bioacumulador referentes aos compostos inorgânicos presentes no solo pela planta *Cannabis Sativa*, faz-se necessária a realização de estudos a fim de se melhor entender a composição química desses produtos utilizados para fins terapêuticos, podendo desta forma caracterizá-los quanto ao seu caráter essencial ou tóxicos (Pb, As, Cd) ao organismo humano. Por não serem classificados como medicamentos em seus países de origem, os extratos a base de CBD, muitas vezes, não são submetidos a análise química, geralmente necessária no controle de qualidade de qualquer medicamento. E como se sabe, elementos como Pb, As e Cd, podem causar diversos danos à saúde humana sendo considerados como carcinogênicos pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC).

Eboh e Thomas (2005), Abdul et al. (2012) e Khan et al. (2013) propuseram a utilização da espectrometria de absorção atômica por chama (F AAS) para quantificação de elementos químicos (As, Cd, Cr, Fe, Ni, Pb, Hg, Mn, Zn, Cu, Fe, Na, Ca, Mg, K e P) presentes na *Cannabis Sativa*. Contudo a técnica utilizada apresenta uma sensibilidade moderada, em nível de detecção da ordem de mg L^{-1} . (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006). Observa-se que para atender os limites máximos preconizados para elementos inorgânicos por agências reguladoras, é preciso o uso empregar técnicas que apresentam melhores níveis de sensibilidade, alcançando detectabilidade em nível de $\mu\text{g L}^{-1}$.

Nesse contexto, esse trabalho apresenta como propósito à caracterização inorgânica de extratos a base de CBD, por meio do desenvolvimento de um método

analítico para quantificação de Pb, As e Cd empregando a técnica de espectrometria de absorção atômica por forno de grafite, GF AAS. Nesse estudo, foi empregado o reagente hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) a fim de se obter uma suspensão das amostras de estudo compatíveis com a técnica GF AAS. Para o desenvolvimento do método analítico, variáveis referentes ao preparo de amostras, bem como parâmetros instrumentais foram estudados a fim de se obter condições reacionais e de análise adequadas à quantificação dos elementos inorgânicos nos extratos de CBD. Nesse trabalho, as amostras de extratos de CBD também foram analisadas empregando a técnica de espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado, ICP OES possibilitando a caracterização inorgânica das amostras de uma forma mais completa, devido a característica multielementar dessa técnica. Sendo assim, foi possível traçar o perfil químico inorgânico dos extratos de CBD.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

A *Cannabis Sativa L.*, conhecida popularmente como maconha ou cânhamo, pertence à família *Canabaceae*. É uma planta herbácea de clima quente e úmido, originária da Índia. A planta apresenta talos com flores femininas e masculinas e pode atingir até 5 metros de altura dependendo da espécie. As espécies mais conhecidas são a *Cannabis Sativa Sativa* e a *Cannabis Sativa Indica*, que se distinguem principalmente pelo modo de crescimento, características morfológicas e quantidade de princípios ativos. (FARAG; KAYSER, 2016). A *Cannabis Sativa* é uma planta de ciclo anual, cuja espécie masculina difere da feminina por apresentar ramos mais finos, folhas em menor quantidade e mais longamente lanceoladas (o aspecto lembra o de uma lança; a folha é mais longa que larga e estreita-se em direção ao ápice), conforme apresentado na Figura 1. Nas plantas fêmeas encontra-se a maior porcentagem de compostos psicoativos (entre 10 a 20%). A concentração desses compostos está ligada a fatores genéticos e ambientais, porém, outras condições podem causar variações no conteúdo psicotrópico da planta. (MATOS et al., 2017; SMALL, 2016).

FIGURA 1 - PLANTAS FLORIDAS DE C. SATIVA - MACHO À ESQUERDA E FÊMEA A DIREITA.



FONTE: Ernest Small (2016)

Esta planta é conhecida pelo homem há milênios. Sua utilização passou por diferentes áreas na civilização, sendo empregada desde a produção de papel, fibras

e cordas, até para fins medicinais e recreativos (SINGH; MAMANIA; SHINDE, 2018; SMALL, 2016; ZERIHUN et al., 2015).

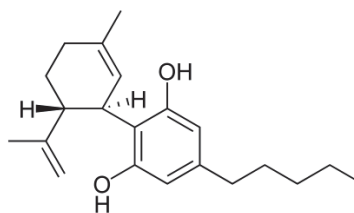
Os primeiros registros sobre o uso da *Cannabis Sativa* para fins medicinais são atribuídos ao imperador Chinês Chen Nung, que prescrevia o chá da planta para o tratamento de reumatismo, malária, constipação e outras doenças, há mais de 5000 anos. (LEGHISSA; HILDENBRAND; SCHUG, 2018).

Até o ano de 2017, mais de 500 substâncias químicas foram encontradas na *Cannabis Sativa*, das quais 100 foram classificadas como canabinóides. (LEGHISSA; HILDENBRAND; SCHUG, 2018). O termo canabinóide é genericamente utilizado para descrever substâncias que ativam os receptores de mesmo nome presentes nos sistemas nervoso e imunológico dos animais e seres humanos. (MNISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Dentre as substâncias classificadas como canabinóides, o tetrahydrocannabinol (THC) é o mais conhecido e o principal responsável pelos efeitos psicodélicos da planta. Já o Canabidiol (CBD) é considerado um canabinóide antipsicodélico bastante estudado por apresentar um grande espectro de ações com efeitos farmacológicos. (CORDEIRO PEDRAZZI et al., 2014; IZZO et al., 2009; LEGHISSA; HILDENBRAND; SCHUG, 2018; SINGH; MAMANIA; SHINDE, 2018; ZUARDI, 2008).

O CBD foi isolado pela primeira vez a partir da Marijuana mexicana por Roger Adams e através da Charas indiana (uma espécie de extrato da *Cannabis Sativa* produzido manualmente na Índia por meio das folhas da planta) por Alexander Todd (BURSTEIN, 2015). Surpreendentemente, por quase 25 anos nenhum novo trabalho foi relatado, e somente em 1963 o Departamento de Química Medicinal e Produtos Naturais, da Faculdade de Medicina da Universidade Hebraica de Jerusalém, isolou novamente o CBD e estabeleceu sua estrutura e estereoquímica relativa, na maior parte, com base em medições por ressonância magnética nuclear (RMN). Alguns anos mais tarde, a sua estereoquímica absoluta foi determinada pela conversão de CBD em ácido carboxílico de metano e sua estrutura cristalina (FIGURA 2) foi determinada por Jones et al. (1977). (MECHOULAM; GAONI, 1965).

FIGURA 2 - ESTRUTURA CRISTALINA DO CANABIDIOL (CBD).



FONTE: Mechoulam e Hanus (2002)

Após a elucidação de sua estrutura química, em 1963, os estudos iniciais do CBD demonstraram que ele não apresentava os efeitos psicóticos associados à maconha. (MECHOULAM; HANUŠ, 2002) Na década de 70, o número de publicações sobre o CBD atingiu o ápice, com investigações centrado-se principalmente na sua interação com o THC e também nos seus efeitos antiepiléptico e sedativo. Entretanto, as duas décadas seguintes apresentaram um menor nível de interesse pelo CBD e suas propriedades terapêuticas, devido à falta de resultados consistentes em relação as suas ações farmacológicas. Em contrapartida, atualmente um notável aumento de publicações científicas a respeito desse canabinóide, estimulado principalmente pela descoberta dos seus efeitos anti-inflamatório, anti-oxidativo e neuroprotetor vem sendo observado por meio de inúmeros estudos científicos reportados na literatura. Esses estudos têm sugerido uma vasta gama de possíveis efeitos terapêuticos do canabidiol em várias doenças como: Mal de Parkinson, Mal de Alzheimer, isquemia cerebral, diabetes, náuseas, câncer, artrite reumatóide, entre outras doenças inflamatórias. (KAPLAN et al., 2017; MECHOULAM; HANUŠ, 2002; PELZ et al., 2017; UPADHYA et al., 2018; ZHOU et al., 2018; ZUARDI, 2006).

2.2 PLANTA *CANNABIS SATIVA*: UM POTENCIAL BIOACUMULADOR

Sabe-se que as plantas possuem a capacidade de absorver elementos do solo, e dos particulados presentes na atmosfera que se depositam sobre a superfície de suas folhas (NDIOKWERE, 1984). A absorção de elementos potencialmente tóxicos pelas espécies vegetais gera grande interesse devido aos danos que esses elementos podem causar na planta e também por sua inserção na cadeia alimentar, influenciando diretamente na saúde do homem e dos animais (ZEINER; JURANOVIĆ CINDRIĆ, 2017).

A absorção dos metais pelas plantas, se dá principalmente a partir de suas raízes, na rizosfera. As raízes possuem como produto de sua excreção uma variedade

de ácidos orgânicos com baixo peso molecular, e algum deles são capazes de formar complexos solúveis e quelatos com íons metálicos, modificando assim, a ação e a mobilidade dos metais, que são facilmente transferidos para as plantas. (MACHADO, 2001; ZEINER; JURANOVIĆ CINDRIĆ, 2017).

A planta *Cannabis Sativa* é conhecida como um bioacumulador eficiente de elementos químicos do solo (ANGELOVA et al., 2004; SMALL, 2016), sendo muitas vezes empregada para fitorremediação destes. Em 2002, Loeser et al. registrou o acúmulo de zinco, cádmio e níquel em *Cannabis Sativa* cultivada para a remediação de solos contaminados. Para a determinação desses elementos, as plantas foram cortadas, secas e trituradas, e posteriormente as partes foram digeridas em meio ácido (contendo HNO_3 , H_2O_2 e HF) assistidas por radiação micro-ondas. As análises foram realizadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Os teores de Zn, Cd e Ni encontrados nas plantas cultivadas em solos contaminados foram cerca de 40 vezes maiores em relação aos teores encontrados nas plantas cultivadas no solo de referência (sem contaminação). Nesse estudo, a planta *Cannabis Sativa* foi considerada a menos adequada na remediação de solo, quando comparada com outras culturas, pois, a depender do elemento químico, bem como do pH do solo, a planta tem o seu crescimento inibido, mas ainda assim, a planta apresenta um efeito bioacumulador, sendo significativa para o processo de remediação do solo.

Já Piotrowska-Cyplik e Czarnecki (2003) observaram que a utilização da biomassa de *Cannabis Sativa* acarretou em uma redução de 20 vezes do teor de zinco, 30 vezes do teor de cobre e 10 vezes do teor de níquel do lodo de esgoto e solo analisados em comparação aos teores presentes antes da realização do experimento. Esse estudo ainda relata a absorção dos elementos químicos em diferentes partes da planta, sendo os maiores teores encontrados na raiz, seguida pelas folhas e em menor quantidade no caule. No método empregado as amostras foram digeridas em meio ácido contendo HNO_3 e HClO_4 e analisadas por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS).

Em 2004, Angelova et al. observou a bioacumulação de chumbo, cobre, zinco e cádmio em plantas *Cannabis Sativa* cultivadas em solos contaminados. Os teores de metais foram analisados em diferentes partes da planta. As amostras foram preparadas por decomposição por via seca e analisadas por ICP OES. Sendo os

maiores teores encontrados nas raízes, decrescendo até as sementes, dependendo da essencialidade do elemento (em relação à sua função no crescimento como nas funções vitais da planta). Os teores encontrados nas plantas, posteriormente a remediação do solo, foram de no mínimo 40% para o Cu e no máximo 70% para o Pb. Um fato importante desse estudo refere-se que a maconha foi considerada uma cultura com crescimento adequado para regiões poluídas industrialmente, possuindo a capacidade de remover quantidades consideráveis de elementos potencialmente tóxicos do solo através de seu sistema radicular.

Levando-se em consideração toda a problemática reportada com base nas informações da literatura, verifica-se a real necessidade de se caracterizar o perfil químico inorgânico dos extratos de CBD obtidos da planta *Cannabis Sativa*, que apresenta um notável perfil fitorremediador do solo. E, apesar dessa característica de resistência aos elementos químicos em geral dessa planta, muito pouco é discutido na literatura no que se refere à quantificação dos elementos inorgânicos tanto na planta como em seus produtos derivados. Alguns dos poucos trabalhos relatados são de Eboh e Thomas, Abdul et al. e Khan et al. que avaliaram a composição inorgânica da planta em diferentes países.

Eboh e Thomas (2005), determinaram os teores de As, Cd, Cr, Fe, Ni, Pb, Hg e Mn em folhas e sementes de *Cannabis Sativa* cultivadas no sul da Nigéria. As amostras foram digeridas em ácido e analisadas por F AAS. Somente para Mn o teor encontrado foi maior nas sementes, $102,5 \pm 0,32 \mu\text{g g}^{-1}$, em comparação a $28,0 \pm 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ presente nas folhas. Para os demais elementos, os teores encontrados nas folhas foram maiores que os encontrados nas sementes. Dessa maneira, as folhas foram consideradas mais prejudiciais para a saúde humana, que as sementes. Dentre os elementos determinados, somente o Ni ($10,40 \pm 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$ nas folhas e $6,80 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ nas sementes) excedeu o limite máximo preconizado pela organização mundial da saúde (OMS) em $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ em relação a massa seca.

Em 2012, Abdul et al. analisaram os teores dos elementos químicos; micronutrientes (Fe, Mn, Cu, Zn e Pb) e macronutrientes (Na, Ca, Mg, K e P) em oito plantas herbáceas, incluindo a *Cannabis Sativa*, cultivada no Paquistão, em solos não poluídos. As amostras de plantas foram digeridas em meio ácido contendo HNO_3 e HClO_4 , assistida por radiação micro-ondas. As análises foram realizadas por F AAS.

Os teores determinados de Zn ($2,25 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$), Cu ($26,6 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$), Fe ($135,20 \pm 0,12 \text{ mg L}^{-1}$) e Mn ($40,30 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$) foram comparados a outros trabalhos da literatura, visto que a OMS não havia estabelecido valores limites para esses elementos químicos em alimentos e produtos agrícolas quando o trabalho foi elaborado. Tais teores estavam de acordo com os valores determinados pelos trabalhos os quais foram contrastados. Para Pb ($0,30 \pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$) o teor encontrado estava abaixo do preconizado pela OMS, sendo as plantas estudadas classificadas como não prejudiciais à saúde humana pelos autores.

Khan et al. (2013), estudou os teores de alguns elementos inorgânicos (Pb, Ni, Cd e Cr) em oito amostras de plantas medicinais, incluindo *Cannabis Sativa* cultivadas em diferentes solos. As amostras (folhas das plantas) foram secas e adiante foram digeridas em meio ácido contendo HNO_3 e HClO_4 , por chapa de aquecimento, e posteriormente analisadas por F AAS. Os teores encontrados para os diferentes metais foram: Pb ($6,093$ e $6,663 \text{ mg Kg}^{-1}$), Ni ($3,263$ e $3,561 \text{ mg Kg}^{-1}$), Cd ($0,033$ e $0,066 \text{ mg Kg}^{-1}$) e Cr ($4,651$ e $4,176 \text{ mg Kg}^{-1}$). O Cr, foi o único elemento com teor um pouco elevado podendo ser tóxico aos seres humanos.

Apesar de serem poucos, há relatos sobre estudos visando a caracterização inorgânica da planta *Cannabis Sativa*, como discutido acima. Em contrapartida, não há estudos em relação à composição química inorgânica dos produtos derivados da planta como os extratos de CBD, matriz de estudo desse trabalho, ressaltando a relevância em promover um conhecimento químico dos produtos (medicamentos) a base de CBD, empregando para tal propósito, estratégias em química analítica que possibilite o conhecimento químico dessa matriz, bem como o monitoramento de As, Cd e Pb nesses produtos (medicamentos).

2.3 As, Cd E Pb E SEUS EFEITOS TÓXICOS AOS SERES VIVOS

As plantas medicinais são amplamente utilizadas como remédios caseiros para uma enorme variedade de doenças. Como medicamentos não sintéticos, são em geral, considerados seguros para a saúde humana. Entretanto, devido à absorção de elementos químicos do solo por meio de suas raízes, ou ainda dos elementos presentes no ar atmosférico (via deposição úmida ou seca) ou por contaminação durante a extração dos princípios ativos das plantas (processo de fabricação), o produto final (medicamento) pode conter quantidades elevadas de elementos

químicos inorgânicos, tanto os considerados essenciais, como também os tóxicos aos seres humanos. (ZEINER; JURANOVIĆ CINDRIĆ, 2017).

Elementos como, Pb, As e Cd são considerados tóxicos ao meio ambiente. Sendo classificados pela Food and Drug Administration (FDA) como classe 1, o que significa que não são necessários na composição química dos medicamentos produzidos nas indústrias farmacêuticas, pois não possuem nenhum benefício à saúde humana. Desta forma, tanto a ANVISA como a FDA regulamentam os valores máximos desses elementos e outros elementos químicos que podem estar presentes nos remédios e alimentos, como pode ser observado na Tabela 1.

TABELA 1 - LIMITES MÁXIMOS PARA ALGUNS ELEMENTOS QUÍMICOS INORGÂNICOS ESTABELECIDOS PELA ANVISA (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 5ª EDIÇÃO, 2010) E FDA (Q3D ELEMENTAL IMPURITIES, 2015) PARA MEDICAMENTOS ADMINISTRADOS POR VIA ORAL.

Elementos	FDA ($\mu\text{g g}^{-1}$)	ANVISA ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Pb	0,5	1,0
As	1,5	1,5
Cd	0,5	0,5
Ni	20	25
Zn	-	-
Se	15	-
Sb	120	-
Cu	-	250
Mn	-	250
Cr	1100	25
B	-	-
Ba	140	-

Os valores apresentados nesta tabela referente a FDA representam concentrações permitidas em microgramas por grama de impurezas elementares em medicamentos com doses diárias não superiores a 10 gramas por dia.

Os elementos As, Cd e Pb são amplamente conhecidos por suas aplicações industriais, no entanto, as investigações sobre seu papel nos sistemas biológicos e ambientais só começaram a ser melhor elucidadas no final do século XX. (ADRIANO, 2001). Isso se deve, em parte, ao desenvolvimento de métodos analíticos que vem possibilitando estudos dos elementos químicos em nível ultra-traços (ng kg^{-1}), como também, de estudos relacionados aos efeitos sinérgicos desses elementos, mesmo estando em baixas concentrações, nos sistemas biológicos. Além do que, o crescente

interesse pelos processos químicos ambientais, bem como o conhecimento químico acerca da composição das plantas seja por questões nutricionais, medicinais e/ou ambientais, tem alavancado muitos estudos científicos relacionados aos elementos inorgânicos. (GOYER, 1997).

Sabe-se que o aumento da atividade industrial, em todos os setores comerciais, leva a uma maior disseminação de elementos potencialmente tóxicos no ambiente, devido principalmente ao descarte incorreto dos produtos ou rejeitos que possuem esses elementos em suas formulações, de modo que uma parcela significativa da população está regularmente exposta aos contaminantes inorgânicos. (BARTH WAL; NAIR; KAKKAR, 2008).

O As é um metalóide que ocorre em diferentes formas inorgânicas e orgânicas, que são encontradas no ambiente de forma natural ou devido a atividade antropogênica. As principais aplicações deste elemento incluem a produção de semicondutores, pigmentos, fabricação de vidro e pesticidas. (DUKER; CARRANZA; HALE, 2005).

A mineralização natural e a atividade de micro-organismos potencializa a mobilização de arsênio no meio ambiente, mas a atividade humana tem exacerbado a contaminação desse metalóide no ambiente. Exemplos de atividades humanas que afetam negativamente o meio ambiente são: mineração, uso indiscriminado de fertilizantes, pesticidas, herbicidas, fabricação e derrame de produtos químicos. (DUKER; CARRANZA; HALE, 2005; MANDAL, B. K.; SUZUKI, 2002).

O As é um elemento cumulativo em tecidos vivos, ou seja, uma vez ingerido por qualquer organismo, quando eliminado, o processo ocorre muito lentamente. O teor de arsênio em uma planta depende quase que exclusivamente da quantidade deste elemento a que está exposta. (MANDAL, B. K.; SUZUKI, 2002).

As formas inorgânicas do As são consideradas mais tóxicas em comparação com as suas respectivas formas orgânicas. O arsênio inorgânico foi classificado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2004), no grupo 1, isto é, considerado carcinogênico para os seres humanos. A característica carcinogênica relacionada ao As, se deve ao fato de que esse elemento pode tanto induzir como potencializar o aparecimento do câncer de pele primário, bem como o surgimento de câncer de pulmão e bexiga urinária. (EFSA, 2009).

O As é transportado pelo sangue para diferentes órgãos do corpo e causa uma variedade de efeitos adversos para a saúde humana após exposições agudas e/ou crônicas, como alterações dérmicas (pigmentação, hiperkeratoses e ulceração), respiratórias, pulmonares, cardiovasculares, gastrointestinais, hematológicas, hepáticas, renais, neurológicas, de desenvolvimento, reprodutivas, imunológicas, efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (DUKER; CARRANZA; HALE, 2005; MANDAL, B. K.; SUZUKI, 2002).

Esse elemento químico é considerado tóxico para as plantas e está relacionado a restrições em seu crescimento. (CHATURVEDI; CHATURVEDI, 2006). Miteva e Merakchiyska (2002) e Stoeva e Bineva (2003), relataram em seus estudos que somente em altas concentrações (a partir de 50 mg Kg⁻¹ no solo) o As causa a redução da fotossíntese da planta. Isso ocorre, pois, concentrações elevadas de arsênio estão associadas a geração de espécies reativas de oxigênio, levando a um estresse oxidativo podendo ocasionar até mesmo a morte das plantas.

O Cd é um metal considerado contaminante ambiental, tanto por ocorrência natural quanto por fontes industriais e agrícolas. Os alimentos são as principais fontes de exposição ao cádmio para a população não fumante. Sua absorção após a ingestão desse elemento em humanos é relativamente baixa (3-5%), porém, o Cd é eficientemente retido no rim e no fígado apresentando uma meia-vida biológica muito longa, variando de 10 a 30 anos. Apresenta elevada toxicidade ao rim, onde se acumula com o passar do tempo, podendo causar disfunção renal. O Cd também pode causar desmineralização óssea, seja por dano ósseo de forma direta, seja indiretamente como resultado da disfunção renal. (EFSA, 2009)

A Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC, 1993) classificou o cádmio como um carcinogêneo humano (Grupo 1) com base em estudos ocupacionais. Dados mais recentes sobre a exposição humana foram estatisticamente associados ao aumento do risco de câncer de pulmão, endométrio, bexiga e mama.

O Cd é um metal não essencial que tem uma importância notável entre os metais tóxicos devido à sua mobilidade no sistema planta-solo e subsequente movimento através da cadeia alimentar. (JOSEPH, 2009). A exposição das plantas a concentrações elevadas de Cd causa alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. (OLIVEIRA et al., 2001; ANDRADE et al., 2005). Schutzendubel e Polle

(2002) relatam que um dos efeitos mais comuns da toxicidade do Cd em planta, é a redução de seu crescimento, devido a deficiência de minerais causada pela ocupação em ligações com alguns nutrientes essenciais ao desenvolvimento da planta. O Cd interfere também no processo fotossintético (PILON-SMITS et al., 2000; SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001), na respiração, na divisão celular e em outros importantes processos biológicos. Além de provocar alterações nos sistemas antioxidantes, estimulando o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e eventual morte celular. (SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001).

O Pb é encontrado no meio ambiente por ocorrência natural, como também, por fontes antropogênicas, sendo a fonte natural consideravelmente menor (JOHNSON, 1998). O Pb ocorre principalmente na forma inorgânica no ambiente. É um metal que possui propriedades físicas e químicas bastante distintas, tornando-se adequado para uma grande variedade de aplicações (CHENG; HU, 2010; GARCÍA-LESTÓN et al., 2010). O Pb está presente em muitas atividades industriais, tais como reparação de automóveis, fabricação e reciclagem de baterias, na construção de edifícios, entre outras. Dentre as principais fontes de emissão de Pb ao meio ambiente estão a mineração, fundição e fabricação de baterias e dispositivos eletrônicos (AHAMED; SIDDIQUI, 2007; JOHNSON, 1998).

A exposição humana ao Pb se dá principalmente por meio da ingestão de alimentos e água, sendo possível também sua contaminação pelo ar, poeira e solo. Dentre os alimentos, os cereais contribuem significativamente na contaminação do Pb em indivíduos adultos, enquanto que em crianças a contaminação pode ocorrer também por meio da exposição à poeira e solos contaminados. O chumbo é absorvido em maior proporção nas crianças que nos adultos, se acumula inicialmente nos tecidos moles e, ao longo do tempo, nos ossos. É excretado, principalmente, através da urina e das fezes e seus tempos de meia vida no sangue e nos ossos é de, aproximadamente, 30 dias e 10-30 anos, respectivamente. (EFSA, 2009)

Esse metal reage ou se complexa com muitas biomoléculas, afetando adversamente os sistemas reprodutivo, nervoso, gastrointestinal, imunológico, renal, cardiovascular, esquelético, muscular e hematopoiético, bem como os processos de desenvolvimento, sendo portanto considerado cancerígeno pela IARC em 1987. (JOHNSON, 1998).

O excesso deste metal causa vários sintomas de toxicidade em plantas, por exemplo: redução de crescimento, clorose e escurecimento do sistema radicular, inibe a fotossíntese, altera a nutrição mineral e o balanço hídrico, modifica o estado hormonal e afeta a estrutura e permeabilidade da membrana. A tolerância ao Pb está associada à capacidade das plantas de restringir o metal à parede celular, síntese de osmólitos e ativação do sistema antioxidante de defesa (ZEINER; JURANOVIĆ CINDRIĆ, 2017). Sharma e Dubey (2005) relataram que o Pb é um potencial poluente que facilmente se acumula nos solos e sedimentos e que, apesar de não ser um elemento essencial para as plantas, é facilmente absorvido e acumulado em diferentes partes destas.

Ao observar os efeitos do As, Cd e Pb nas plantas e principalmente nos seres humanos, comprova-se a necessidade de estudo da possível presença desses elementos químicos em produtos que são utilizados como medicamentos para doenças tão graves, como as doenças neurais. Por isso, visou-se nesse estudo, o desenvolvimento de métodos analíticos com boa precisão, exatidão e adequada sensibilidade na quantificação desses elementos em níveis traços.

2.4 EXTRATO DE CANABIDIOL COMO MEDICAMENTO NO BRASIL

No Brasil há grande resistência aos medicamentos à base de CBD, e somente a partir de 2014 a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) permitiu a sua importação, sendo até hoje proibida a sua fabricação em solos brasileiros. O Conselho Federal de Medicina (CFM) por meio da Resolução CFM Nº 2.113/2014 publicou no Diário Oficial da União (D.O.U) a aprovação quanto o uso compassivo do canabidiol para o tratamento de epilepsias em crianças e adolescentes que não respondem aos tratamentos convencionais. Apesar de relutar sobre o uso do CBD como medicamento, vale ressaltar que desde abril de 2014 a ANVISA já vem liberando pedidos considerados excepcionais, referente à importação de produtos (medicamentos) a base de Canabidiol para uso pessoal, visando o tratamento de doenças neurais. Desta forma, no ano de 2015, a ANVISA retirou o Canabidiol da lista de substâncias proibitivas vigentes no Brasil, incluindo-o no rol de substâncias controladas.

Ainda no corrente ano, a ANVISA autorizou também a compra excepcional do produto (medicamento) não só para pacientes com epilepsia, mas para outras

patologias clínicas, como dores crônicas em geral (dor que persiste além do período de reparação do tecido) ou ainda às doenças como: artrite, artrose, fibromialgia e Mal de Parkinson. (ANVISA, 2015).

Para adquirir todos esses produtos (medicamentos) é necessário atender as determinações da RDC 17/2015. Ou seja, é obrigatório que os produtos à base de Canabidiol, em associação com outros canabinóides, sejam requisitados, em caráter de excepcionalidade, por pessoa física, para uso próprio, mediante prescrição de um profissional legalmente habilitado para tratamento de saúde. (ANVISA, 2015)

No ano de 2016, a ANVISA aprovou uma resolução RDC 66/2016 onde autoriza a prescrição e importação de medicamentos à base de canabidiol (CBD) e tetrahydrocannabinol (THC) (componentes da *Cannabis*), sendo permitido sua utilização somente para pessoa física e exclusivamente para uso próprio no tratamento de saúde (fins medicinais). De 2014 até os dias de hoje, a ANVISA recebeu mais de 1.600 solicitações de importação de produtos (medicamentos) à base de Canabidiol.

Entretanto, apesar da notória evolução quanto à liberação desses produtos para fins medicinais pela ANVISA, pacientes que precisam dos produtos à base de CBD ainda enfrentam uma série de dificuldades quanto à sua aquisição. Devido a proibição da fabricação de produtos à base de CBD no Brasil, é necessário que os pacientes importem esses medicamentos, os quais geralmente apresentam um preço muito elevado para a maioria da população brasileira. Pois, além do valor do produto bruto, que varia de 89 a 329 dólares (HEMPMEDS, 2018), é necessário pagar a taxa de importação e lidar com a burocracia brasileira. Somado a isso, o fato de um frasco do medicamento à base de CBD não ser o suficiente para o período de 30 dias. O frasco com maior valor (329 dólares) contém em torno de 3800 mg de CBD, podendo ser ministradas doses de 2,5 a 25 mg de CBD por cada quilo do paciente por dia (25 mg/Kg/dia). Assim, por exemplo, para uma criança de 30 kg, que necessita de uma dose diária de 5 mg de CBD, seria necessário 4500 mg de CBD por mês (valor superior ao encontrado no frasco, com maior teor de CBD), o que indica a necessidade de no mínimo 2 frascos ao mês para suprir as necessidades desse paciente, elevando os custos de aquisição desses produtos. Por esses motivos, a alternativa encontrada pelas famílias brasileiras que necessitam dessas substâncias, é o cultivo da planta *Cannabis Sativa* em suas residências, e a extração 'homemade' do extrato contendo

CBD, o que é proibido no Brasil. Entretanto, a obtenção do óleo extraído da planta, pode ser facilmente encontrado, por meio de vídeos e tutoriais disseminados na internet, os quais as famílias brasileiras tomam como base.

Em relação a produção desses extratos no Brasil, novos avanços têm ocorrido, como por exemplo, em maio de 2017, a Justiça Federal da Paraíba, por meio de uma liminar, autorizou a Associação Brasileira de apoio ao Cannabis Esperança – ABRACE, em João Pessoa, que mantivesse o cultivo e a manipulação da planta *Cannabis* para fins exclusivamente medicinais, até que fosse pronunciada uma resposta definitiva da ANVISA. Desta forma, atualmente, a ABRACE atende em torno de 600 pacientes com problemas neurológicos em todo o Brasil. No entanto, mesmo com a fabricação desses produtos em solos brasileiros, o tratamento ainda acaba sendo proibitivo para a maioria das famílias brasileiras.

2.4.1 Farmacopéia Brasileira

A ocorrência de elementos químicos em medicamentos à base de tecido vegetal pode advir tanto de contaminações ambientais (solo, ar, água ou ar), quanto pela sua introdução durante o processo de fabricação industrial. O limite para contaminantes inorgânicos em medicamentos é definido por Agências Reguladoras e publicados por meio de compêndios, comumente conhecidos como Farmacopeias.

A farmacopeia brasileira preconiza dois métodos analíticos para a determinação de metais em medicamentos, conhecidos como: Ensaio Limite por Formação de Partículas Sólidas de Sulfetos ou a Determinação dos Elementos Químicos por Espectrometria Atômica. O ensaio limite consiste na formação de partículas sólidas (precipitados), utilizando nesse caso, sulfeto de hidrogênio (H_2S) ou tioacetamida (C_2H_5NS) como reagentes para a precipitação dos metais. As soluções dos medicamentos são tratadas com os reagentes C_2H_5NS ou H_2S , esses reagentes quando em contato com os analitos (presentes nos medicamentos) produzem precipitados coloridos (sulfetos metálicos) os quais são comparados visualmente com uma solução de referência (sulfeto do elemento que se deseja identificar), de concentração conhecida. Esse método fornece resultados semi-quantitativos apresentando baixa exatidão e sensibilidade, com detectabilidade na ordem $mg L^{-1}$ à $g L^{-1}$.

Já o método por espectrometria atômica possibilita quantificar com adequada exatidão o elemento inorgânico na amostra, em nível de detectabilidade na ordem de mg L^{-1} – ng L^{-1} . Em geral, elementos como As, Cd, Pb e Hg, devido à elevada toxicidade apresentam limites máximos permitidos pelas agências reguladoras menores que os demais elementos químicos, o que requer técnicas analíticas cada vez mais sensíveis, como as técnicas espectrométricas.

A 5ª edição da farmacopeia brasileira de 2010 permite ainda a utilização de diferentes métodos analíticos, como ICP OES e ICP- MS, além do preconizado em seu escopo, para a determinação de elementos potencialmente tóxicos em medicamentos. Para tal, os métodos desenvolvidos devem ser validados de acordo com o preconizado pela ANVISA.

2.5 ESTRATÉGIAS DE PREPARO DE AMOSTRAS

A etapa de preparo de amostra é considerada como uma das mais críticas dentro de um protocolo analítico. Segundo um estudo publicado em 2003 pela Analytical Methods Committee, N. 56, o preparo de amostras é a etapa responsável pelas maiores fontes de erros em análises químicas. Esta etapa envolve, desde a simples diluição, até a solubilização total ou parcial das amostras. E possui como objetivo a disponibilização das espécies de interesse para uma futura determinação analítica. (OLIVEIRA, 2003; KRUG; ROCHA, 2016).

Os métodos citados na literatura para a análise de metais em diferentes amostras possuem vantagens e desvantagens. Assim sendo, alguns fatores devem ser considerados, como: a técnica analítica empregada, a natureza da amostra, o analito e seu nível de concentração, o grau de exatidão e precisão requeridos, a disponibilidade de equipamentos, materiais e reagentes, e o custo da análise propriamente dita (LOBO, 2009; OLIVEIRA, 2003).

Os instrumentos analíticos mais utilizados para a quantificação dos elementos químicos inorgânicos são equipados em sua maioria com sistemas de introdução de amostras para solução líquida (F AAS / GF AAS, ICP OES, ICP-MS). Mesmo que sistemas de introdução de amostras no estado sólido estejam disponíveis para esses instrumentos, seu uso é menos recorrente. Assim sendo, se faz necessário a transformação da amostra sólida para uma solução. Geralmente as soluções das

amostras são obtidas por meio de estratégias de preparo de amostras, corriqueiramente em meio ácido, em condições de elevadas temperatura e pressão a fim de se degradar quase em sua totalidade a matéria orgânica, liberando para a solução o analito disponível para ser quantificado. (ZEINER; JURANOVIĆ CINDRIĆ, 2017).

Além disso, a remoção da matriz reduz as interferências nas medições subsequentes. Assim, a digestão eficaz da amostra é crucial para uma análise exata e precisa. Ácidos comumente oxidantes, tais como: ácido nítrico, ácido perclórico ou ainda mistura de ácidos são usados para este propósito. Estratégias de preparo de amostras, empregando radiação micro-ondas são muito utilizadas, devido principalmente à elevada eficiência de digestão associado ao reduzido tempo despendido na etapa de preparo. Usando misturas de reagentes, o poder oxidativo é aumentado, garantindo uma digestão mais rápida e completa. (JURANOVIĆ CINDRIĆ et al., 2012, 2013; ZEINER, BRUMAA, STEFFAN; 2010). Soluções contendo péroxido de hidrogênio (H_2O_2) e HNO_3 são comumente empregadas na digestão de diversos tipos de amostras. O peróxido de hidrogênio é uma fonte de oxigênio capaz de aumentar o poder oxidante do ácido nítrico. Madejón et al. (2007), Arceusz et al. (2010), Maghrabi et al. (2014) e Virgilio et al. (2016) são alguns exemplos de estudos científicos que utilizaram o HNO_3 juntamente com o H_2O_2 na digestão de plantas para a quantificação de seus constituintes inorgânicos.

Para amostras de plantas, normalmente, são determinados os teores totais dos elementos, sendo os procedimentos por via úmida os mais utilizados para decomposição de material vegetal. (NOGUEIRA, 2003). Na literatura científica é possível encontrar diversos estudos, que optam pela digestão em sistema fechado, com aquecimento pela radiação micro-ondas devido aos benefícios já mencionados neste trabalho. (ARCEUSZ; RADECKA; WESOLOWSKI, 2010; ARPADJAN et al., 2008; HAJAR; SULAIMAN; SAKINAH, 2014; RAŽIĆ; DOGO; SLAVKOVIĆ, 2006; VIRGILIO et al., 2016)

Apesar de convencional e amplamente utilizada em análises de rotina, a digestão ácida muitas vezes apresenta um procedimento de preparo moroso, exaustivo e às vezes dispendiosas. Nesse sentido, existe uma busca por procedimentos de preparo de amostras que envolvam manipulação mínima da amostra e menor tempo de preparo, reduzindo também possíveis perdas do analito e

contaminação da amostra. Nesse contexto, a solubilização alcalina da amostra se mostra bastante eficiente e viável no preparo de amostras e compatível com as técnicas de espectrométricas de determinação. Por exemplo a utilização do reagente hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) de fórmula molecular $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$, é comercializado na forma de uma solução alcalina (pH 13,4-14,7) à 25 % m/v em água ou metanol e 10% em m/v em água. (CAMPOS et al., 2018; NÓBREGA et al., 2006; ORESTE et al., 2013; SOUSA; CAMPOS; ORLANDO, 2015; VAN BEIK et al., 2017). O reagente é um líquido incolor com um forte odor de amina, completamente solúvel em água e estável à temperatura ambiente, capaz de complexar e estabilizar elementos voláteis (NÓBREGA et al., 2006). A eficiência na solubilização do analito está associada ao tipo de matriz, ao tipo e ao tamanho da partícula sólida, à concentração do solvente, à homogeneização e ao tempo de solubilização. (CALPRIETO, 2002). Os procedimentos de extração empregando TMAH envolvem, em geral, uma dissolução completa ou parcial da amostra. Nessas estratégias, geralmente é utilizado o aquecimento e/ou agitação com ultrassom a depender da matriz de estudo (NÓBREGA et al., 2006).

O TMAH vem sendo utilizado na etapa de preparo de amostras para diferentes matrizes. Nóbrega et al. (2006) apresentaram em sua revisão sobre preparo de amostras em meio alcalino, diferentes matrizes que foram estudadas a partir da solubilização com TMAH. Alguns exemplos de amostras tratadas com TMAH são: rim, fígado e pêlos de animais (MENDEN; PETERING, 1973), cabelo, folhas, arroz, farinha, mexilhão (UCHIDA et al., 1992), como também, diferentes tipos de tecidos animais (POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1998), entre outros.

Em 2014, Savio et al. estudaram o preparo de amostras para óleos vegetais, utilizando TMAH 15% m/v com aquecimento (90 °C) em banho maria. Elementos presentes em baixas concentrações, na ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$ (Cu, Ge, Mn, Mo, Ni, Sb, Sr, Ti e V) foram determinados em óleos de oliva, milho, amêndoa e girassol por ICP-MS. Os autores relataram que o carbono derivado da solubilização por TMAH dos óleos estudados, poderia se condensar nos cones e lentes do equipamento, gerando instabilidades no plasma, resultando em perda do poder de detecção da técnica, verificando a necessidade de otimização dos parâmetros instrumentais. Para contornar esse problema, utilizou-se a combinação de um nebulizador micro concêntrico e uma câmara de nebulização ciclônica defletida (responsável pela

seleção do tamanho das gotas, sendo as gotículas maiores e conseqüentemente mais pesadas descartadas) operando à temperatura ambiente (22 °C), e resfriada a -5 °C, e gás oxigênio como gás auxiliar, nas análises. Os demais parâmetros instrumentais como fluxo do gás de argônio, potência de radiofrequência e fluxo no sistema de introdução de amostra também foram otimizados. Os limites de detecção pelo método proposto (com TMAH) foram melhores em comparação ao método convencional (digestão ácido em micro-ondas). Por exemplo, para os elementos Cu e Sb obtiveram-se limites de detecção na ordem de 0,02 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,32 $\mu\text{g g}^{-1}$ pelo método proposto e limites de 3,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 20,7 $\mu\text{g g}^{-1}$ pelo método convencional. Além de apresentar boa precisão, boa exatidão e ser um método razoavelmente mais rápido, simples e menos dispendioso.

Já Oreste et al. (2013) e Aranha et al., 2016, relataram a utilização do TMAH como reagente no preparo de amostras de carne. Em ambos os trabalhos, as amostras foram solubilizadas em temperatura ambiente e analisadas por GF AAS. O uso do TMAH no preparo de suspensões de diversas amostras é altamente compatível com a técnica GF AAS, pois esta técnica realiza o tratamento térmico da amostra no interior do tubo de grafite (atomizador). Contudo, as condições instrumentais devem ser estudadas/otimizadas para cada analito levando-se em consideração a amostra/interferentes. Nesses trabalhos, a temperatura de pirólise e atomização foram otimizadas e os métodos desenvolvidos apresentaram boa exatidão e boa precisão, além de bons limites de detecção e quantificação. Devido à otimização dos parâmetros instrumentais associado à eficiência no preparo de amostras, não se observou efeitos de matriz no sinal do analito, podendo ser empregada uma curva analítica externa ao meio contendo a amostra. No estudo desenvolvido por Aranha et al. (2016) a curva analítica foi construída em meio de solução de HNO_3 . O que facilita significativamente as análises químicas, aumentando a frequência analítica do método e reduzido consumo de amostra.

Ghisi et al. (2011) solubilizaram biodiesel com TMAH para determinação de Cu e Fe presentes nessas amostras em banho maria (90 °C). Para a maioria das amostras, a maior concentração de TMAH avaliada (2,5% m/v) produziu uma suspensão clara e transparente, indicando uma possível solubilização completa da amostra. Para menores valores de concentração de TMAH, houve a formação de uma suspensão de aspecto turvo, indicando possivelmente que as amostras estavam

parcialmente solubilizadas nesse meio. No entanto, mesmo utilizando a maior concentração de TMAH, as soluções obtidas para o óleo de mamona, soja e o biodiesel obtido a partir de sementes de algodão, não foram límpidas, mas ao final foram suficientemente estáveis e homogêneas, permitindo suas medições por GF AAS. As maiores concentrações de analitos foram quantificadas nas amostras do biodiesel obtido a partir do nabo, sendo Fe $4940 \pm 650 \text{ ng g}^{-1}$ e Cu $182 \pm 11 \text{ ng g}^{-1}$. Para algumas amostras, suas concentrações estavam abaixo dos limites de quantificação. O método desenvolvido apresentou boa exatidão e precisão e pode ser utilizado para verificar a qualidade de diversos tipos de biodiesel, contribuindo com informações que serão úteis na prevenção da contaminação atmosférica devido a liberação desses contaminantes provenientes da queima do biodiesel.

Como observado, estudos demonstraram que o emprego da solubilização alcalina com TMAH promoveu uma redução no tempo de preparo de amostras, bem como propiciou mínima manipulação-supervisão pelo analista nessa etapa do método. O emprego do TMAH na maior parte dos estudos promoveu a formação de uma solução/suspensão de amostra estável em meio aquoso, favorecendo também estudos de especiação química devido principalmente por não alterar o estado de oxidação das espécies químicas inorgânicas, como relatado por (LÓPEZ-GARCÍA; BRICEÑO; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, 2011). Além do que, o preparo de amostras em meio alcalino com TMAH proporcionou satisfatória precisão e exatidão, além de bom desempenho instrumental.

Para a determinação por GF AAS, o preparo de amostra com TMAH apresenta ainda como vantagem, maior durabilidade do tubo de grafite, devido ao fato de que o TMAH não é agressivo ao tubo, o que geralmente não é observado em meio ácido. Ribeiro et al. (2000), verificou que o emprego do TMAH proporcionou um aumento no tempo de vida útil do tubo de grafite de 600 para 1000 queimas na determinação de Cd em amostras de cabelo. Levando-se em consideração que o tempo de vida útil de um tubo de grafite varia em torno de 600 – 700 queimas quando o preparo de amostras é realizado em meio ácido.

Porém, quando se emprega a solubilização alcalina, nesse caso o reagente TMAH, as condições instrumentais de análise precisam ser cuidadosamente otimizadas, a fim de se garantir que a porção não decomposta da matriz e portanto os

concomitantes presentes, não interfiram no sinal do analito, podendo essa interferência ser positiva (produzindo um “aumento” no sinal do analito) ou negativa (gerando uma “diminuição” no sinal do analito) (NÓBREGA et al., 2006; SOUSA; CAMPOS; ORLANDO, 2015). Além de que, o TMAH apresenta algumas peculiaridades como: forte odor, elevada viscosidade, e a dificuldade de purificação do reagente, fazendo com que se obtenha elevados valores para o branco analítico. (POZEBON; DRESSLER; CURTIUS, 1998; POZEBON; DRESSLER; KEMIECIKI, 2002). Apesar de ser amplamente empregado na solubilização de diferentes tipos de amostras, o mecanismo de ação do TMAH na solubilização da matéria orgânica/disponibilidade do analito, ainda é desconhecido (NÓBREGA et al., 2006)

2.6 TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS

Para atender às exigências cada vez mais expressivas em relação à qualidade e confiabilidade dos resultados analíticos obtidos, avanços tecnológicos quanto ao desenvolvimento na área de instrumentação analítica vêm sendo continuamente realizados. Equipamentos de elevada detectabilidade, ($\mu\text{g L}^{-1}$ - ng L^{-1}) tem permitido obter análises químicas de elevada sensibilidade, como também análise de especiação química em um curto intervalo de tempo, para uma variedade de amostras, incluindo, nesse caso a de plantas medicinais.

Técnicas analíticas de caráter multi-elementar, tais como a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), geram dados analíticos confiáveis em um tempo relativamente curto de análise (ZEINER; JURANOVIĆ CINDRIĆ, 2017). Além dessas técnicas, outras técnicas espectrométricas, de caráter mono-elementar são utilizadas para a determinação quantitativa dos elementos inorgânicos em espécimes de plantas, incluindo a espectrometria de absorção atômica por chama (F AAS) como também a espectrometria de absorção atômica por forno eletrotérmico / grafite (ET AAS / GF AAS) (ABDUL et al., 2012; EBOH; THOMAS, 2005; KHAN, 2013; ZEINER; JURANOVIĆ CINDRIĆ, 2017).

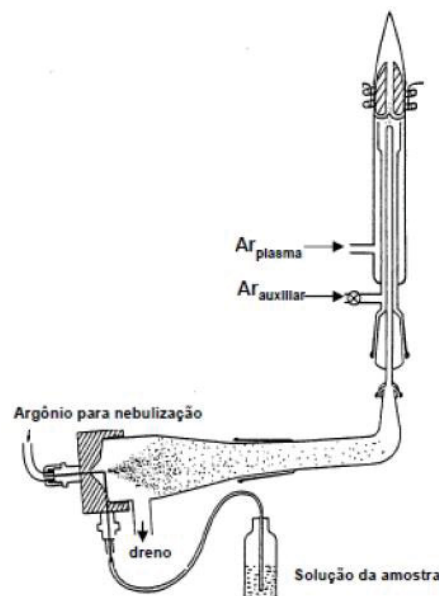
Neste trabalho empregaram-se as técnicas de ICP OES e GF AAS. Essas são baseadas na medida da intensidade da radiação eletromagnética emitida ou absorvida por átomos ou íons no estado gasoso quando expostos a uma fonte de energia. Cada elemento possui um espectro de absorção/emissão característico cujas

transições entre os diferentes níveis eletrônicos relacionam-se a comprimentos de onda que são específicos a cada átomo ou íon, permitindo sua identificação por técnicas espectrométricas de análise. (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006).

A técnica de ICP OES (do inglês - *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*) é fundamentada na detecção da radiação eletromagnética emitida por átomos neutros ou íons excitados nas regiões do espectro eletromagnético visível e ultravioleta, contemplando a faixa de 170 a 800 nm. O princípio fundamental da espectrometria de emissão atômica/iônica consiste na propriedade dos átomos e íons emitirem radiação eletromagnética quando submetidos a determinadas condições de variações de energia térmica (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006).

Nesse caso, a ionização dos elementos químicos ocorre em um plasma de argônio, formado dentro da tocha de quartzo que está localizada logo após o sistema de introdução de amostra, onde a temperatura de análise fica entre 5000 K a 10000 K, como pode ser observado na Figura 3.

FIGURA 3 - ESQUEMA DO SISTEMA DE NEBULIZAÇÃO E DA TOCHA ONDE OCORRE A ATOMIZAÇÃO NO ICP OES.



FONTE: Perkin Elmer (sem data)

Desta forma, a quantificação dos elementos químicos é possível devido ao ambiente químico/térmico gerado ser altamente favorável no processo de atomização/ionização da amostra. Ou seja, é capaz de transferir energia térmica suficiente para promover a excitação eletrônica da maioria dos elementos químicos presentes na tabela periódica. De um modo geral, a amostra é ingerida na forma

líquida, em seguida é transformada em um aerossol pelo sistema de nebulização que a transporta para o plasma. Os elétrons situados na camada de valência do átomo ou íon, ao retornarem ao estado eletrônico de menor energia, emitem radiação eletromagnética, que é então medida por um detector, sendo possível determinar a concentração do analito na amostra, tomando-se como base a lei de Lambert-Beer. (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006).

Vale mencionar ainda, que a técnica ICP OES permite realizar uma quantificação dos elementos químicos de forma simultânea, bem como permite obter curvas analíticas de calibração lineares considerando ampla faixa linear de calibração (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006). Essa técnica apresenta uma detectabilidade na ordem de mg L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$, a depender do analito. (SILVA; PERKINELMER, [sem data])

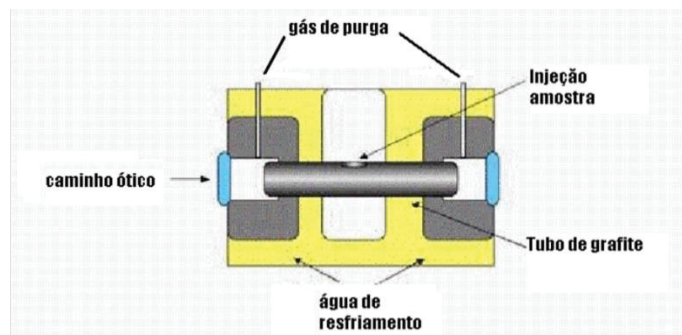
Diferentemente da técnica ICP OES, a espectrometria de absorção atômica (AAS - do Inglês *Atomic Absorption Spectrometry*) se baseia fundamentalmente na medida da absorção da intensidade de radiação eletromagnética, proveniente de uma fonte de radiação primária na mesma frequência do analito, (lâmpadas do tipo HCL - *Hollow Cathode Lamp* ou EDL - *Electrodeless Discharge Lamps*), por átomos gasosos no estado fundamental. A técnica utiliza esse fenômeno para a determinação quantitativa de elementos (metais, semi-metais e alguns não metais) em uma ampla variedade de amostras como: ambientais, biológicas, alimentícias, medicamento, tecnológicos, entre outras. (KRUG; NOBREGA; OLIVEIRA, 2007)

O AAS é uma técnica em sua essência monoelementar (apesar dos novos equipamentos serem capazes de realizar análises sequenciais), desse modo, apenas um elemento é quantificado por análise. Isso ocorre devido à radiação eletromagnética incidida no vapor atômico ser específica para cada elemento. (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2006; FERNANDES et al., 2003).

Para formação de átomos gasosos no estado fundamental são utilizados, comumente, dois tipos de atomizadores, o de chama e o forno de grafite aquecido de forma eletrotérmica. O F AAS é a técnica utilizada para análises elementares em níveis de mg L^{-1} , enquanto o GF AAS é capaz de determinar concentrações no nível de $\mu\text{g L}^{-1}$, podendo atingir níveis menores (ng L^{-1}), a depender das condições instrumentais. (KRUG; NOBREGA; OLIVEIRA, 2007).

Para a técnica GF AAS a absorção da radiação eletromagnética se dá por átomos livres no estado gasoso, no intervalo espectral 190 a 900 nm. Para gerar os átomos livres (processo de atomização) no estado gasoso, esse método emprega como atomizador um forno de grafite, o qual consiste em um tubo de grafite pirolítico aquecido eletricamente. O sistema é parcialmente fechado, o qual contribui para o aumento do tempo de residência dos átomos no caminho óptico, tornando a análise química muito sensível, possuindo uma detectabilidade na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ à ng L^{-1} (nível ultra-traços), como pode ser observado na Figura 4. (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2006; FERNANDES et al., 2003).

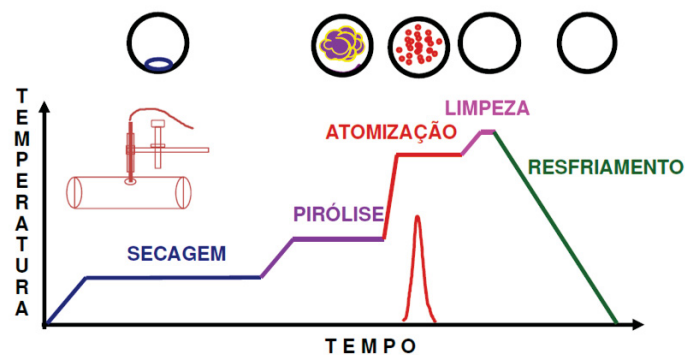
FIGURA 4 - ESQUEMA DO SISTEMA DE ATOMIZAÇÃO DA TÉCNICA AAS POR FORNO DE GRAFITE.



FONTE: Shimadzu (sem data)

A análise por GF AAS é feita a partir de um programa de aquecimento como observado na Figura 3. Um pequeno volume da solução de referência ou da amostra (geralmente 10 a 20 μl) é introduzido no interior de um tubo de grafite, que é, então, aquecido, de tal forma que o solvente da amostra seja evaporado (etapa de secagem). Em seguida o tubo é aquecido em temperaturas altas (400 a 1000 $^{\circ}\text{C}$) o suficiente para eliminação dos concomitantes da matriz, sem que haja a volatilização do analito (etapa de pirólise), a etapa posterior é onde ocorre a atomização do analito, com temperaturas adequada (1300 a 2400 $^{\circ}\text{C}$) para sua quantificação (etapa de atomização).

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DAS ETAPAS DO PROGRAMA DE AQUECIMENTO DA TÉCNICA DE GF AAS.



FONTE: Perkin Elmer (2009)

Durante a atomização (1 a 5 s) a nuvem atômica, produzida pelos átomos gasosos do analito, no interior do tubo absorve uma certa quantidade da radiação eletromagnética que está sendo incidida pela lâmpada de catodo oco, simultaneamente um sinal transiente, cuja área é proporcional à concentração do analito na amostra, é produzido. Finalmente, no estágio de limpeza, eleva-se a temperatura para que sejam eliminadas substâncias de difícil vaporização que não foram eliminadas nas etapas anteriores. (WELZ; SPERLING, 1999).

Para a eliminação de interferências espectrais, o GF AAS utiliza corretores de fundo, sendo os mais utilizados, a lâmpada de deutério e o corretor por efeito Zeeman. A lâmpada de deutério possibilita a correção de fundo na região de 190 a 360 nm. Já as interferências não espectrais, que podem ocorrer provenientes ao efeito de memória; perdas do analito seja por volatilidade e/ou associações desses com a matriz, podem ser corrigidas ou atenuadas, a depender do caso, pela utilização de fornos transversais, modificadores químicos, fornos de grafite equipados com plataforma de L'vov, como também pelo aumento na taxa de aquecimento do tubo de grafite durante a etapa de atomização. Sendo que a junção de todas essas estratégias analíticas conhecida como STPF – do inglês *Stabilized Temperature Platform Furnace*. (KRUG; NOBREGA; OLIVEIRA, 2007).

2.6.1 Modificadores Químicos em GF AAS

Os modificadores químicos têm grande influência nas análises realizadas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite. São compostos que são introduzidos no tubo de grafite juntamente com a amostra e reduzem

significativamente os efeitos de matriz (TSALEV, 1992). O modificador químico converte o analito em uma forma menos volátil, permitindo maiores temperaturas de pirólise (etapa na qual ocorre a eliminação da matriz sem vaporizar o elemento a ser analisado), separando o analito dos concomitantes (LEITE, 2010; MORENO et al., 2001).

Os modificadores podem ser introduzidos dentro do tubo de grafite antes de cada ciclo de leitura (modificadores convencionais) ou podem ser depositados termicamente formando uma camada na parede do tubo ou plataforma de grafite (modificadores permanentes), não sendo necessária à sua adição a cada ciclo de aquecimento (BORGES et al., 2014).

As principais substâncias utilizadas como modificadores químicos convencionais são: $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, ácido cítrico, entre outros. Dentre os modificadores convencionais, a mistura $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ficou conhecida como “modificador universal” (WELZ; SCHLEMMER; MUDAKAVI, 1992) devido ao fato de apresentar um bom desempenho para a grande maioria dos elementos químicos quantificados por GF AAS (BORGES et al., 2014; GIACOMELLI et al., 2002).

Nas determinações por GF AAS com utilização do TMAH como reagente na etapa de preparo de amostras, objeto de estudo do presente trabalho, deve-se ter precaução na seleção do modificador para que este seja compatível com o meio alcalino (NÓBREGA et al., 2006). Segundo Ribeiro et al., 2000, o uso de uma solução ácida de Pd pode resultar na formação de precipitado, exigindo programas específicos para o GF AAS.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar o perfil químico inorgânico de extratos de Canabidiol (CBD) obtidos a partir da planta Cannabis Sativa por ICP OES e estabelecer um método analítico para a determinação de As, Cd e Pb por GF AAS

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o teor total dos elementos inorgânicos que compõem a matriz (extrato de CBD) através de análises das amostras por ICP OES;
- Avaliar diferentes estratégias de preparo de amostras na determinação de elementos químicos inorgânicos nos extratos de CBD, por ICP OES;
- Avaliar o preparo de amostras em meio alcalino, empregando o reagente TMAH;
- Desenvolver um método analítico para a determinação do teor total dos elementos inorgânicos – Pb, As e Cd por GF AAS;
- Avaliar as figuras de mérito do método desenvolvido: seletividade, linearidade, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, repetitividade e reprodutibilidade.
- Aplicar a metodologia desenvolvida para analisar diferentes amostras de extrato de canabidiol, obtidas por meio de variados métodos de extração.

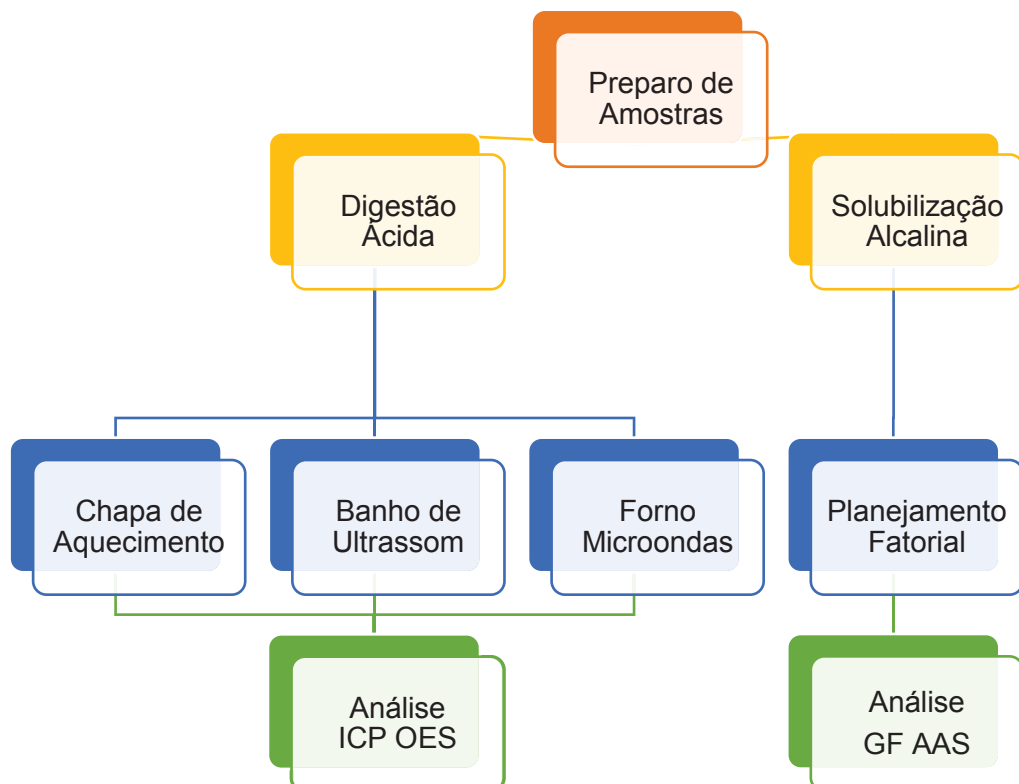
4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais utilizados (balões volumétricos, béqueres, pipetas, frascos de plástico, etc.) foram descontaminados antes de sua utilização. Para isso, foram deixados em banho de HNO₃ 10% (v/v) por 24 horas, no mínimo, e, em seguida, enxaguados com água ultrapura, pelo sistema Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, USA), ao menos 3 vezes.

Utilizou-se instrumentos de precisão como a balança analítica Bel, modelo M124Ai, com 4 dígitos após a virgula e pipetas LABMATE Pro LMP 100, 1000 e 10000.

Todas as amostras foram adquiridas por doações voluntárias de pessoas que realizam o tratamento com os extratos de CBD no Brasil. . As amostras de medicamentos à base de CBD foram estudadas sob alguns aspectos: (1) estabelecimento de uma estratégia de preparo das amostras para a determinação do teor total do(s) analito(s) por ICP OES, a fim de se obter uma varredura do perfil químico inorgânico das diferentes amostras de canabidiol que se tem disponível; (2) desenvolvimento de um método analítico para a quantificação de Pb, As e Cd nessas amostras por GF AAS.

FLUXOGRAMA 1. PREPARO DE AMOSTRA UTILIZADO PARA CADA VERTENTE ESPECTOMETRICA UTILIZADA.



4.1 SOLUÇÕES E REAGENTES

Soluções Padrão Analítica de 1000 mg L^{-1} em HNO_3 1% v/v, (Carlo Erba Analyticals) de cada analito (Pb, As, Cd, Se, Sb, V, Mn, Ba, Ni, Al, Zn, Fe, Cr, Co, Cu, Ag e B) foram empregadas no preparo das soluções padrão para a construção das curvas analíticas de calibração.

Para as digestões ácidas utilizou-se HNO_3 65% v/v (Carlo Erba Analyticals, grau P.A) e H_2O_2 30% m/v (Vetec de grau P. A). Todo ácido utilizado neste trabalho foi ultra purificado por destilação pelo destilador de ácido, modelo: Distillacid, marca Berghof Products®, com temperatura de operação de 10°C - 20°C abaixo do ponto de ebulição do ácido utilizado (sistema subboiling).

Para as solubilizações alcalinas utilizou-se o reagente TMAH 25% m/v em água (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Soluções de TMAH 0,1% m/v foram preparadas pela adição de 4,98 mL de água ultrapura à 20 μL da solução de TMAH 25% m/v.

4.2 DIGESTÃO ÁCIDA

A fim de se avaliar qual das digestões empregadas era a mais eficiente e menos morosa para se obter um preparo de amostras com alta eficiência de extração do analito aliado a uma elevada frequência analítica, alguns estudos foram realizados.

Com relação à etapa de tratamento de amostras para a determinação do teor total dos elementos inorgânicos, diferentes estratégias de preparo de amostras foram investigadas a fim de se promover a total decomposição das amostras contendo CBD em meio ácido utilizando os seguintes equipamentos: 1) Chapa de aquecimento, modelo 114, Ethiktechnology, à 70°C , e 2) Banho ultrassônico, modelo USC 1450, Unique, sem aquecimento e 3) Forno micro-ondas, Multiwave série 3000, Anton Paar.

Para a digestão em chapa de aquecimento e em banho ultrassônico, testou-se diferentes níveis de concentração de ácido nítrico (HNO_3) juntamente com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30% m/v, afim de se obter um extrato menos ácido em relação aos que geralmente são obtidos com o emprego de digestões com HNO_3 65% v/v. Diferentes tempos de digestão também foram avaliados nessa etapa. Para esses experimentos a massa de amostra utilizada foi em torno de 0,1500 g. Nas digestões em chapa de aquecimento (TABELA 2), a temperatura foi mantida relativamente constante à 70°C , com auxílio de um termômetro e a amostra foi pesada diretamente

no béquer. Ao final do procedimento de preparo de amostras, todas as soluções resultantes foram avolumadas para 10,0 mL com água ultrapura.

TABELA 2 - DIFERENTES CONDIÇÕES REACIONAIS PARA A DIGESTÃO ÁCIDA DOS EXTRATOS DE CBD EM CHAPA DE AQUECIMENTO. MASSA DA AMOSTRA - 0,1500 g E TEMPERATURA DE 70°C.

Condição	[HNO₃]_{inicial} v/v	[HNO₃]_{final}* v/v	Tempo em repouso com HNO₃ (min)	Volume H₂O₂ 30% m/m (mL)	Tempo de Aquecimento (min)
1	65%	35%	60	2	40
2	65%	26%	60	4	60
3	10%	2%	30	2	60
4	50%	10%	45	2	60
5	65%	13%	30	2	60

* Após o processo de digestão.

Para o preparo de amostras empregando banho ultrassônico foram testadas as mesmas condições reacionais, 1 a 5, como indicada na Tabela 2, em relação a concentração de HNO₃ e volume de H₂O₂ utilizados na chapa de aquecimento, com tempo de exposição de 30 e 60 minutos. As amostras foram preparadas diretamente no béquer.

O preparo de amostras em forno micro-ondas também foi avaliado para a matriz de estudo e, nesse caso, utilizou-se 4,0 mL HNO₃ 65% v/v, 2,0 mL de H₂O₂ 30% m/m e 4,0 mL de água ultrapura, obtendo-se ao final uma solução com acidez de 26% v/v. A massa de amostra utilizada foi em torno de 0,3000 g. O programa de aquecimento da digestão ácida assistida por radiação de micro-ondas foi otimizado a partir de programas de aquecimento descritos na literatura para matrizes correlatas, obtendo-se um programa adequado para a completa digestão das amostras de estudo, conforme apresentado na Tabela 3.

TABELA 3 - PROGRAMA DE AQUECIMENTO PARA A DIGESTÃO ÁCIDA EM FORNO MICRO-ONDAS DAS AMOSTRAS DE EXTRATOS DE CANABIDIOL. MASSA DA AMOSTRA - 0,3000 g.

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (min)	Permanência (min)
1	180	5	15
2	190	5	15
Refrigeração	25	-	20

4.3 Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado – ICP OES

Para se obter uma varredura dos elementos químicos inorgânicos presentes nas amostras utilizou-se o ICP OES dual view, modelo, OPTIMA 8300; marca, Perkin Elmer (FIGURA 6), locado no Departamento de Química da UTFPR Ecoville. Utilizou-se o equipamento em configuração modo axial para os micro elementos (As, Se, Sb, V, Mn, Ba, Cd, Ni, Pb, Al, Zn, Fe, Cr, Co, Cu, Ag e B). As condições instrumentais utilizadas estão descritas na Tabela 4.

FIGURA 6 - ESPECTRÔMETRO DE EMISSÃO ÓPTICA POR PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP OES) DUAL VIEW, MODELO OPTIMA 8300; PERKIN ELMER UTILIZADO PARA VARREDURA DOS ELEMENTOS QUÍMICOS INORGÂNICOS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE EXTRATO DE CBD.



FONTE: Perkin Elmer (sem data)

TABELA 4 - CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DO ICP OES PARA A DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS QUÍMICOS NOS EXTRATOS À BASE DE CBD.

Potência de Radiofrequência	1300 W
Vazão do gás do Plasma	8,0 L min ⁻¹
Vazão do gás auxiliar	0,2 L min ⁻¹
Vazão do gás no nebulizador	0,55 L min ⁻¹
Sistema de Nebulização	Meinhard / Câmara ciclônica
Replicatas	3
Vazão da bomba peristáltica	1,5 mL min ⁻¹
Elementos (λ/ nm)	B 249,6 (I) - Cd 228,8 (I) - Cu 327,4 (I) - Pb 220,3 (II) - Mn 257,6 (II) - Zn 206,2 (I) - As 188,9 (I) - V 290,8 (II) - Ni 231,6 (II) - Al 396,1 (I) - Fe 238,2 (II) - Co 230,7 (II) - Ag 328,0 (I) - Ba (I)233,5 - Cr (II) 267,7

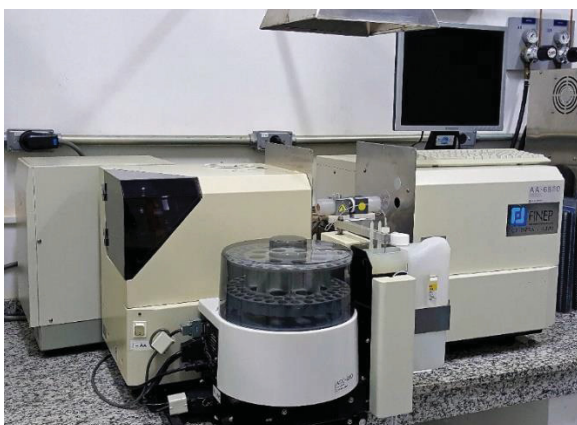
(I) linha de emissão atômica

(II) linha de emissão iônica

4.4 Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite - GF AAS

O equipamento GF AAS marca Shimadzu de caráter multiusuário, modelo AA 6800F/6800G, equipado com corretor de fundo lâmpada de Deutério e aquecimento longitudinal (FIGURA 7), locado no laboratório do Grupo de Química Analítica Ambiental foi utilizado para o desenvolvimento do método de análise química para Pb, As e Cd. As condições instrumentais para cada um dos elementos químicos estudados estão descritas na Tabela 5.

FIGURA 7 - ESPECTRÔMETRO DE ABSORÇÃO ATÔMICA POR FORNO DE GRAFITE (GF AAS), MODELO AA 6800F/6800G; SHIMADZU; UTILIZADO PARA O DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE As, Cd E Pb.



FONTE: PPGQ - UFPR (2017)

TABELA 5 - CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS PARA A DETERMINAÇÃO DE Pb, As E Cd EM EXTRATOS DE CBD, POR GF AAS.

CONDIÇÕES DO EQUIPAMENTO	Pb	As	Cd
Comprimento de onda / nm	283,3	193,7	228,8
Corrente da lâmpada / mA	20	12	8
Largura de fenda / nm	1,0	1,0	1,0
Corretor de Fundo Lâmpada de Deutério	ON	ON	ON
Modo de aquisição de Sinal	Absorbância Integrada	Absorbância Integrada	Absorbância Integrada
Modo de Calibração	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$	Concentração $\mu\text{g L}^{-1}$
Replicatas	3	3	3
Tubo de Grafite	heated pirolitic graphite	heated pirolitic graphite	heated pirolitic graphite
Modo de Aquecimento	atomizer – longitudinal	atomizer – longitudinal	atomizer – longitudinal

Para otimização do método de análise, utilizou-se HNO_3 1% v/v (ultrapuro) fortificado com concentrações conhecidas de cada um dos elementos químicos

analisados ($20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb, $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de As e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd). Em todas as análises no GF AAS injetou-se um volume de $20 \mu\text{L}$ de ácido fortificado e $5 \mu\text{L}$ de modificador químico, conforme esquematizado na Tabela 6.

Para avaliar o comportamento térmico do Pb, As e Cd foram construídas curvas de temperaturas de pirólise e atomização. O estudo das temperaturas de pirólise e atomização em espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GF AAS) é feito, geralmente de forma univariada. Em um primeiro momento fixa-se a temperatura de atomização e varia-se somente a temperatura de pirólise. Depois de encontrar a melhor temperatura de pirólise, esta é fixada, e a temperatura de atomização é estudada (LOBO, 2009). As temperaturas de atomização foram fixadas de acordo com as temperaturas sugeridas pelo fabricante do equipamento, e essas se encontram no programa de aquecimento padrão para cada elemento (condição *default*). As temperaturas de pirólise foram variadas de acordo com informações obtidas na literatura para matrizes correlatas.

As curvas de pirólise e de atomização foram obtidas para as seguintes soluções: $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb, $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de As e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd em meio de HNO_3 1% v/v na presença de modificadores químicos. Pois, elementos voláteis como o As, Cd e Pb, necessitam do uso de modificadores químicos para estabilizá-los termicamente em temperaturas acima de seus pontos de ebulição, permitindo satisfatória eliminação da maior parte da matriz (concomitantes inorgânicos), reduzindo assim as interferências, químicas e/ou espectrais, pois o tratamento da amostra é realizado no GF AAS. (WELZ; SPERLING, 1999). No caso deste trabalho, usou-se dois diferentes modificadores químicos, o modificador universal (Pd + Mg) e o modificador de Pd, a depender do analito. As curvas de pirólise na presença do modificador químico foram obtidas conforme demonstrado na Tabela 6.

TABELA 6 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS PARA ELABORAÇÃO DA CURVA DE PIRÓLISE EM MEIO ÁCIDO (HNO_3 1% v/v). VOLUME DE INJEÇÃO DE $20 \mu\text{L}$ DE SOLUÇÃO PADRÃO ($20 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb, $15 \mu\text{g L}^{-1}$ As e $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd) E $5 \mu\text{L}$ DE MODIFICADOR QUÍMICO.

Analito	Temperatura de Atomização Fixa (°C)	Varição na Temperatura de pirólise (°C)	Modificador
Pb	2000	600 - 1500	Pd (5 μg) – Mg (3 μg)
As	2200	900 – 1600	Pd (2,5 μg)
Cd	1350	500 – 950	Pd (2,5 μg)

As faixas de temperatura foram avaliadas de forma crescente em incrementos de 50 ou 100°C, a depender do analito em questão. Desta forma, fixou-se a temperatura de pirólise ótima encontrada e então passou a estudar a temperatura de atomização em intervalos crescentes de temperatura, com incrementos de 50 ou 100°, sempre baseado em temperaturas usuais reportadas na literatura. O tempo total do programa de aquecimento ficou em torno de 144 a 164 segundos, a depender do analito.

A partir de uma solução padrão de concentração 10 µg L⁻¹ de Pd(NO₃)₂ (Palladium Matrix Modifier, Sigma Aldrich) e de solução padrão de 10 µg L⁻¹ de Mg(NO₃)₂ (Magnesium Matrix Modifier, Sigma Aldrich), foram preparadas soluções de modificadores contendo Pd e Mg e somente Pd em diferentes níveis de concentração em meio de HNO₃ 1% v/v. Nesses estudos, foram levadas em consideração às características físico-químicas dos analitos, bem como a estabilidade térmica desses analitos em elevadas temperaturas, como reportado na literatura.

Para um volume final de 10,00 mL, os níveis de concentração das soluções de modificadores químicos foram elaborados de acordo com o esquematizado na Tabela 7.

TABELA 7 - NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS SOLUÇÕES DOS MODIFICADORES QUÍMICOS TESTADOS NA ANÁLISE DE Pb, As e Cd POR GF AAS PARA UM VOLUME FINAL DE 10 mL.

Modificador	10 µg L⁻¹ de Pd(NO₃)₂ (mL)	10 µg L⁻¹ de Mg(NO₃)₂ (mL)
Pd + Mg (5 – 3 µg),	1,0	0,6
Pd + Mg (7,5 – 4,5 µg)	1,5	0,9
Pd + Mg (2,5 – 1,5 µg)	0,5	0,3
Pd (7,5 µg)	1,0	-
Pd (5,0 µg)	1,5	-
Pd (2,5 µg)	0,5	-

Após o procedimento de otimização do programa de aquecimento de cada analito em meio ácido, HNO₃ 1% v/v, avaliou-se as condições ótimas encontradas para as suspensões dos extratos de CBD em meio de TMAH 0,1% m/v. Pois a ideia desse trabalho consiste em aplicar às condições otimizadas em meio ácido para os extratos em meio de TMAH, o que possivelmente permitirá a construção da curva analítica de calibração em meio de HNO₃ 1% v/v, tornando o método mais simples de

ser executado, além de não se utilizar o reagente TMAH. Os estudos foram realizados a partir de uma amostra (extrato de CBD) importada dos Estados Unidos. Essa amostra foi escolhida por apresentar um aspecto pastoso de difícil manipulação em relação às outras amostras cujo aspecto apresentava menor viscosidade e manipulação relativamente mais fácil. Para tal, o extrato de CBD foi fortificado no mesmo nível de concentração do analito em meio de HNO₃ 1% v/v e os valores de absorbâncias do analito em diferentes meios foram comparados.

4.4.1 Avaliação dos Sinais transientes de absorbância dos Analitos

Para a otimização do programa de aquecimento para cada analito, levou-se também em consideração os sinais transientes desses analitos, obtidos a partir das condições reacionais/instrumentais aplicadas. Nesse sentido, foi avaliado o perfil do sinal analítico, como também a razão sinal do analito:sinal de fundo, (*signal-background ratio*, *SBR*). (LOBO, 2009).

4.5 SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA POR TMAH

Assim como na digestão ácida em chapa de aquecimento, diferentes níveis de concentração de solução de TMAH 25% m/v foram testadas e diferentes tempos de solubilização foram avaliados. A fim de se melhor avaliar a significância dessas variáveis, bem como o efeito da interação entre as variáveis, empregou-se nesses estudos um planejamento fatorial completo (2³), onde as variáveis independentes estudadas foram: concentração de TMAH, tempo de solubilização e temperatura, obtendo um total de 8 experimentos realizados em duplicatas e em ordem aleatória. As variáveis foram avaliadas em dois níveis de variação, ou seja, empregando valores: menor (-) e maior (+) referente às variáveis estudadas, como apresentado na Tabela 8. A matriz referente ao planejamento fatorial 2³ está apresentada na Tabela 9

As concentrações de TMAH estudadas foram selecionadas a partir de experimentos preliminares realizados com a amostra (extrato de CBD), e a partir de informações da literatura, onde normalmente, níveis de concentração de TMAH em torno de 0,2 – 5% m/v são comumente empregados na solubilização de variados tipos de amostras, em especial, na solubilização de amostras que contém quantidades significativas de gorduras. Avaliou-se ainda a solubilização dos extratos de CBD a 25°C e a 80°C, pois apesar da solubilização das amostras ocorrer geralmente a

temperatura ambiente para diferentes tipos de amostras, conforme discutido na literatura, temperaturas mais elevadas podem ser úteis nessa etapa, reduzindo o tempo despendido e aumentando a eficiência de solubilização das amostras em meio alcalino. Visando um tempo de preparo de amostras rápido e eficiente, avaliou-se os tempos de 5 e 10 minutos, como indicado na Tabela 8.

TABELA 8 - VARIÁVEIS E NÍVEIS ESTUDADOS PELO PLANEJAMENTO FATORIAL (2³) COMPLETO ELABORADO A PARTIR DO SOFTWARE STATISTICA 7.0.

Variável	Nível	
	Mínimo (-1)	Máximo (+1)
[TMAH] % m/v	0,2	5,0
TEMPO (min)	5	10
TEMPERATURA (°C)	25	80

A concentração de TMAH bem como o tempo de solubilização considerados adequados para o tratamento de amostras foram obtidos a partir dos resultados das análises químicas realizadas por GF AAS em relação a variável resposta recuperação do analito (ver equação 1). A massa de amostra utilizada nos experimentos de solubilização alcalina foi de aproximadamente 0,1000 g.

TABELA 9 - MATRIZ REFERENTE AO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO, 2³ NA OTIMIZAÇÃO DAS VARIÁVEIS NO PREPARO DE AMOSTRAS EM MEIO ALCALINO. MASSA DE AMOSTRA - 0,1000 g.

Experimento*	Replicata	[TMAH] m/v	Tempo (min)	Temp. (°C)
7	1	0,20	10,0	80,0
1	1	0,20	5,0	25,0
9	2	0,20	5,0	25,0
5	1	0,20	5,0	80,0
3	1	0,20	10,0	25,0
11	2	0,20	10,0	25,0
16	2	5,00	10,0	80,0
4	1	5,00	10,0	25,0
8	1	5,00	10,0	80,0
14	2	5,00	5,0	80,0
12	2	5,00	10,0	25,0
15	2	0,20	10,0	80,0
6	1	5,00	5,0	80,0
2	1	5,00	5,0	25,0
10	2	5,00	5,0	25,0
13	2	2,00	5,0	80,0

* Experimentos executados em ordem aleatória

Os experimentos realizados a partir do planejamento fatorial seguiram as seguintes etapas:

- 1- Pesagem da amostra;
- 2- Hidratação da amostra com 4,98 mL de água ultrapura
- 3- Fortificação da amostra com o analito a ser investigado na concentração final de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb;
- 4- Homogeneização da amostra por vórtex;
- 5- Repouso de 2 minutos;
- 6- Adição da solução de TMAH em diferentes níveis de concentração estudados, e;
- 7- Aquecimento da suspensão resultante nas temperaturas e tempos avaliados.

Nesses experimentos as amostras foram pesadas diretamente em tubo falcon de 15 mL, e a suspensão resultante foi aquecida em banho maria, em chapa de aquecimento e avolumado para 5,0 mL.

A otimização da etapa de preparo de amostras foi realizada em relação ao Pb. A variável recuperação foi o parâmetro escolhido como o indicador das condições reacionais favoráveis ou não à quantificação exata e precisa do analito.

Em relação aos estudos de adição/recuperação para os analitos investigados (As, Cd e Pb), os valores de recuperação foram calculados a partir da razão do sinal do analito proveniente da suspensão da amostra em meio de TMAH ao sinal do analito em meio de HNO_3 1% v/v, ambos no mesmo nível de concentração, sistematicamente como detalhado a seguir:

1. Análise da solução contendo HNO_3 1% v/v;
2. Quantificação do sinal analítico dos analitos presentes na solução de HNO_3 1% v/v após fortificação dessa solução com $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb;
3. Análise da suspensão do extrato de CBD em meio de TMAH;
4. Quantificação da amostra fortificada com $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb.

Os cálculos de recuperação foram feitos conforme equação 1:

$$\%Recuperação = \frac{A_p - A}{P} \times 100 \quad (Eq. 1)$$

Onde:

A_p : corresponde a amostra tratada com solução de TMAH e fortificada com o analito em estudo,

A : amostra tratada com solução de TMAH sem adição do analito

P : corresponde à solução padrão do analito em meio de ácido HNO_3 1% v/v.

4.6 ESTUDO DAS FIGURAS DE MÉRITO DESEMPENHO DO MÉTODO ANALÍTICO PROPOSTO POR GF AAS

4.6.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ) foram determinados de acordo com a Resolução (Re 166) da ANVISA. Sendo calculado pelas equações 2 e 3 a seguir:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{b} \quad (Eq. 2) \quad e \quad LOQ = \frac{10 \sigma}{b} \quad (Eq. 3)$$

Sendo σ o desvio padrão de 10 leituras da solução do branco analítico e b a inclinação da reta da curva analítica de calibração.

Os limites de detecção e quantificação também foram calculados de acordo com o proposto por Welz especificamente para a técnica de absorção atômica por forno de grafite. (WELZ; SPERLING, 1999). Para esses cálculos utilizou-se as equações 4 e 5 abaixo:

$$LOD = \frac{S_{blank}}{b} t_{(f,\alpha)} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n}} \quad (Eq. 4) \quad e \quad LOQ = \frac{9 S_{blank}}{b} \quad (Eq. 5)$$

Sendo:

S_{blank} : o desvio padrão de 10 leituras do branco analítico;

b :: a inclinação da reta (Slope);

m : o número de medida da amostra (igual a 1);

n : o número de medidas da solução do branco analítico (10 leituras) e;

t: (*t student* para 95% do intervalo de confiança).

4.6.2 Curvas Analíticas de Calibração externa e Faixa da linearidade

Soluções Padrão dos elementos químicos são comumente utilizados para calibrar instrumentos e procedimentos analíticos quando não há efeitos de interferências dos componentes da matriz (concomitantes inorgânicos) no sinal do analito. Geralmente, uma série de soluções padrões contendo o analito em diferentes níveis de concentrações conhecidas são preparadas, para a construção de uma curva analítica de calibração. (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2006). No presente trabalho foram elaboradas curvas analíticas de calibração em meio de ácido nítrico, HNO₃ 1% v/v e em meio alcalino, TMAH 0,1% m/v.

Para as análises no ICP OES preparou-se curvas analíticas de calibração em intervalo de concentração no nível de concentração de 5 – 1000 µg L⁻¹ (para os micro elementos – As, Se, Sb, V, Mn, Ba, Cd, Ni, Pb, Al, Zn, Fe, Cr, Co, Cu, Ag e B). Todas as curvas foram preparadas em meio de ácido nítrico 1% v/v a partir da solução padrão de cada analito estudado em nível de concentração de 1000 mg L⁻¹.

Para as análises em GF AAS preparou-se curvas analíticas em intervalo de 5 – 13 µg L⁻¹ para Pb, 2,0 – 10,0 µg L⁻¹ para As e 2,0 – 6,0 µg L⁻¹ Cd todas em meio de HNO₃ 1% v/v.

Curvas analíticas de calibração no mesmo intervalo de concentração para Pb, As e Cd também foram construídas em meio alcalino, TMAH 0,1% m/v, a fim de se verificar a sensibilidade dessas curvas.

O intervalo de linearidade foi considerado aceitável quando valores do coeficiente de determinação (R²) foi maior que 0,99 de acordo com a Comunidade Europeia.

4.6.3 Estudo de adição e recuperação

Devido à falta de material certificado para as amostras extrato de CBD, testes de adição e recuperação foram realizados com o objetivo de se avaliar a exatidão dos métodos propostos em GF AAS. Desta forma, a recuperação do analito foi avaliada adicionando-se concentrações conhecidas de cada analito de estudo, na amostra, previamente a sua análise. Após deixar um tempo de contato entre o analito e a

amostra, em torno de 5 minutos, a amostra fortificada com o analito foi então submetida ao tratamento de amostras com TMAH e em seguida analisada por GF AAS. O critério de aceitação para a recuperação entre 80 e 120 % foi selecionado de acordo com os valores preconizados pela Comunidade Europeia diretiva 96/23/EC de 2002 e INMETRO diretiva DOQ-CGCRE-008 de 2016.

Após a elaboração das curvas analíticas de calibração, foram realizados testes de recuperação em três níveis de concentração da curva analítica (TABELA 10), visando a avaliação do efeito de matriz e seletividade do método proposto, conforme normativas do INMETRO. (INMETRO, 2016). Para isso, as amostras tratadas com TMAH 0,1% m/v foram fortificadas e quantificadas em relação as curvas analíticas de calibração construídas em meio de HNO₃ 1% v/v, e calculados de acordo com a equação 6.

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{[\text{amostra fortificada}] - [\text{amostra}]}{[\text{padrão na curva de calibração analítica}]} \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

TABELA 10 - NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO TESTADOS DE CADA ANALITO PARA AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO DO MÉTODO PROPOSTO.

Analito	Níveis de Concentração µg L ⁻¹		
	Baixo	Médio	Alto
As	2,0	5,0	8,0
Cd	2,0	4,0	6,0
Pb	5,0	9,0	13,0

4.6.4 Precisão

A precisão é medida sob condições de repetitividade ou sob condições de reprodutibilidade e expressa na forma de coeficiente de variação – (CV (%)) e/ou estimativa do desvio padrão relativo – RSD (%) (INMETRO, 2016). A precisão foi avaliada através da repetitividade dos experimentos de recuperação, de acordo com a equação 7 abaixo.

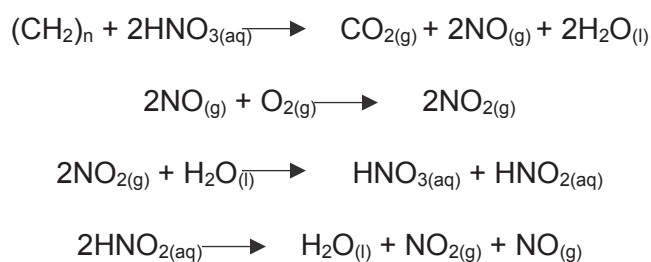
$$\% \text{ RSD} = \frac{S}{\bar{m}} \times 100 \quad (\text{Eq. 7})$$

Onde, S corresponde ao desvio padrão das leituras no nível de concentração estudado e \bar{m} à média dos resultados obtidos através das replicatas (n=3).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PREPARO DE AMOSTRAS EM MEIO ÁCIDO ASSISTIDO POR RADIAÇÃO MICRO-ONDAS

A digestão ácida assistida por radiação micro-ondas foi a que melhor apresentou eficiência de digestão da amostra (em relação a digestão em chapa de aquecimento e por ultrassom), levando a obtenção de resultados com maior exatidão e precisão quando comparado a outras formas de preparo de amostras, avaliadas nesse trabalho. As amostras de extrato de CBD digeridas pelo programa de aquecimento do forno de micro-ondas (Tabela 3), visualmente apresentaram-se límpidas e incolores quando comparados aos outros digeridos obtidos por chapa de aquecimento e banho ultrassônico. Como já é conhecido, o HNO₃ aumenta seu potencial de oxidação proporcionalmente ao aumento da temperatura, e sistemas fechados como a digestão por micro-ondas proporcionam temperaturas do meio reacional elevadas. Durante a oxidação dos compostos orgânicos da amostra pela ação do HNO₃ ocorre a formação do NO gasoso. Quando em sistema fechado, o NO liberado do meio reacional aquecido, reage com o O₂ presente na fase gasosa do frasco de reação, formando NO₂. O NO₂ é reabsorvido na solução regenerando o HNO₃, ocorrendo de forma cíclica todo o processo de mineralização, conforme equação abaixo:



Outro fator que contribuiu para que a digestão assistida por micro-ondas apresentasse o melhor resultado, foi a utilização de H₂O₂ juntamente com o HNO₃. O H₂O₂ é utilizado como agente oxidante auxiliar por ser uma fonte adicional de oxigênio. O HNO₂ formado do desproporcionamento do NO₂ é oxidado a HNO₃ na presença do H₂O₂, aumentando o poder oxidante do meio reacional. (KRUG, 2008).

O sistema em refluxo, que ocorre no processo de mineralização da amostra, no interior dos tubos de teflon empregados possibilita uma decomposição mais completa da amostra, obtendo baixos teores de carbono residual (RCC). (BARELA et

al., 2017). Baixos valores de RCC são desejáveis, frente a técnica de análise utilizada - o ICP OES – pois pequenas quantidades de compostos orgânicos no plasma podem aumentar as eficiências de nebulização e transporte de aerossóis, aumentando o sinal analítico em comparação à soluções isentas de qualquer teor de carbono na amostra, como as soluções padrão. Além do que, a presença de uma pequena fração de carbono melhora também a eficiência de ionização de elementos químicos de alta energia ionizante por reações de transferência de carga de carbono, em contrapartida, quantidades elevadas de carbono podem se depositar na superfície da tocha, ou ainda, obstruir o sistema de nebulização (sistema de introdução de amostras) , acarretando na instabilidade do plasma e resultando em perda de poder de detecção da técnica. (SAVIO et al., 2014).

5.2 DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS QUÍMICOS POR ICP OES

As amostras previamente decompostas em meio ácido assistida por radiação micro-ondas, foram analisadas por ICP OES visando a avaliação do perfil químico inorgânico das amostras em estudo. Nesses estudos, curvas analíticas de calibração foram construídas em meio de HNO₃ 1% v/v (Anexo 1).

As curvas analíticas de calibração apresentaram coeficientes de determinação (R^2) satisfatórios. O R^2 indica a fração da variação observada em y que é explicada pela relação linear. Quanto mais próximo R^2 está da unidade, melhor o modelo linear explica as variações de y em função de x. Assim sendo, as curvas obtidas apresentam bons modelos lineares que explicam as variações em y.

A partir dos resultados obtidos na análise dos extratos de CBD realizada por ICP OES foi possível avaliar a presença de alguns metais como Ni, Zn, Cu, Mn, Cr, B e Ba, apresentados na Tabela 11. As amostras analisadas foram nomeadas de acordo com a forma de produção desses extratos, desta forma as amostras de extrato de CBD produzidas por indústrias que produzem suplementos alimentares a partir da Cannabis ou associações de apoio à Cannabis Medicinal foram nomeadas de (PI), e os extratos de CBD produzidos de forma artesanal, nomeadas de (PA).

TABELA 11 - TEORES DOS ELEMENTOS QUÍMICOS QUANTIFICADOS POR ICP OES EM DIFERENTES EXTRATOS DE CBD PREVIAMENTE DIGERIDOS EM FORNO DE MICRO-ONDAS. (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO, N=3).

	PI 01 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	PI 02 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	PA 01 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	PA 02 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	PA 03 ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Ni	3,22 ± 0,56	2,50 ± 0,39	3,52 ± 0,15	2,84 ± 0,27	2,71 ± 0,48
Zn	1,74 ± 0,50	1,52 ± 0,29	13,56 ± 2,26	13,84 ± 0,24	1,84 ± 0,21
Cu	1,50 ± 0,31	0,35 ± 0,06	2,00 ± 0,15	2,06 ± 0,22	0,39 ± 0,11
Mn	0,60 ± 0,12	2,22 ± 0,27	9,44 ± 1,35	9,66 ± 0,40	0,56 ± 0,09
Cr	4,68 ± 0,81	3,85 ± 0,67	5,11 ± 0,12	5,29 ± 0,85	3,74 ± 0,78
B	2,60 ± 0,76	2,01 ± 0,18	23,13 ± 2,56	23,75 ± 1,77	2,65 ± 0,28
Ba	0,30 ± 0,05	0,35 ± 0,05	0,70 ± 0,20	0,70 ± 0,07	0,28 ± 0,14

Os elementos As, V, Pb, Al, Cd e Co não foram quantificados, pois estavam em concentrações abaixo do primeiro nível de concentração das curvas analíticas de calibração desses analitos, isto é $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$. Desta forma, para avaliar o teor dos elementos As, Cd e Pb a técnica GF AAS foi empregada, por apresentar maior detectabilidade ($\mu\text{g L}^{-1} - \text{ng L}^{-1}$) em relação ao ICP OES ($\text{mg L}^{-1} - \mu\text{g L}^{-1}$).

Os demais elementos estudados (Se, Sb, Fe e Ag) não foram quantificados devido à falta de linearidade das curvas analíticas de calibração, sendo necessário a otimização das condições de trabalho no ICP OES.

A partir da tabela acima, é possível observar que as amostras PI 01 e 02 apresentam menores teores de Zn e B. Essas amostras são produzidas por indústrias e associações que provavelmente apresentam maior cuidado em relação à obtenção desses produtos. Segundo os fabricantes dessas amostras há um cuidadoso processo desde a plantação da Cannabis Sativa até a extração do óleo de CBD. Segundo o fabricante) desses extratos, para o cultivo da planta não é utilizado fertilizantes químicos, pesticidas e herbicidas sendo o óleo de CBD extraído a partir do CO_2 supercrítico (HEMPMEDS, 2018), onde controlando-se as pressões e temperaturas, os compostos presentes na planta são separados e coletados em diferentes câmaras acopladas ao recipiente de extração, sendo possível obter os extratos de CBD com elevado grau de pureza. Outra forma de extração do CBD emprega-se a glicerina, e, nesse caso, de modo geral as folhas previamente secas da planta são mergulhadas

em glicerina e submetidas ondas ultrassônicas a fim de acelerar o processo de extração do princípio ativo.

A PA 03 também apresentou baixos teores de metais, sendo semelhantes as amostras industriais, porém não há informações do tipo de extração, da espécie da planta utilizada e do cultivo. Já as amostras artesanais PA 01 e 02 apresentaram teores elevados para Zn, B e Mn em comparação aos outros extratos de CBD. Vale ressaltar que, a espécie da *Cannabis Sativa* utilizada para produção do CBD e o solo o qual é cultivada, é tão importante quanto a extração realizada, não sendo possível nesse estudo afirmar quais fatores são mais relevantes e que explicam os teores encontrados para os elementos químicos estudados. Um fator que pode explicar a presença de elevadas concentrações dos elementos Zn, B e Mn nas amostras artesanais refere-se à essencialidade desses elementos nas plantas geralmente estando em concentrações relativamente alta (Zn de 10 – 120 mg kg⁻¹, B de 10 – 80 mg kg⁻¹ e Mn de 90 – 200 mg kg⁻¹) para os microelementos. O zinco é um ativador enzimático e sua carência provoca uma redução do crescimento vegetal. Já o boro atua no metabolismo de carboidratos e transportes de açúcares através de membranas, na formação da parede celular, divisão celular, como também no movimento da seiva. Contribui para a maior força e resistência de todos os tecidos vegetais e no desenvolvimento das folhas e dos brotos. O manganês controla reações de oxi-redução essenciais à fotossíntese e síntese de clorofila. (BONNER; VARNER, 2012). O Cu e o Ni, apesar de serem micronutrientes essenciais, se encontram geralmente em baixas concentrações (Cu de 10 – 25 mg kg⁻¹ e Ni 0,05 – 10 mg kg⁻¹). O Cu possui papel importante na fotossíntese, respiração, redução e fixação de nitrogênio e sua carência altera a tonalidade das folhas, tornando-as verde-azuladas. Já o Níquel atua no crescimento, metabolismo, envelhecimento e absorção de ferro pelas plantas, tem papel importante na resistência das plantas às doenças, aumenta a atividade da urease foliar, impedindo assim a acumulação dos teores tóxicos de uréia, sendo que sua deficiência pode levar à morte das folhas. (ESALQ, 2015; AGROLINK, 2016)

Os demais elementos, Ba e Cr, não são considerados essenciais, assim sendo, devem ser encontrados em baixas concentrações (menores que a dos micronutrientes), pois podem levar a redução de crescimento foliar e radicular e morte das plantas. (CASTILHOS; GUADAGNIN, 2012; MERLINO, 2013).

Mesmo apresentando concentrações diferentes entre si, os teores determinados para os elementos químicos presentes nos produtos à base de CBD estão todos dentro dos limites máximos permitidos pelos órgãos reguladores como a ANVISA e o FDA, preconizados para medicação via oral, como podem ser verificados na Tabela 12.

TABELA 12 - LIMITES MÁXIMOS PERMITIDOS PARA ELEMENTOS QUÍMICOS INORGÂNICOS EM MEDICAMENTOS PRECONIZADOS PELA ANVISA E FDA PARA MEDICAÇÃO POR VIA ORAL.

Elementos	FDA ($\mu\text{g g}^{-1}$)	ANVISA ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Esse Trabalho ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Ni	20	25	2,50 – 3,63
Zn	-	-	1,52 – 13,84
Cu	-	250	0,35 – 2,06
Mn	-	250	0,56 – 9,66
Cr	1100	25	3,74 – 5,29
B	-	-	2,01 – 23,75
Ba	140	-	0,28 – 0,70

Os valores encontrados nesse trabalho foram comparados com outros trabalhos na literatura referentes à determinação de elementos químicos em plantas da espécie *Cannabis*, como apresentado na Tabela 12.

TABELA 13 - COMPARAÇÃO ENTRE OS TEORES DE ELEMENTOS QUÍMICOS DETERMINADOS NESTE TRABALHO COM OUTROS ESTUDOS CIENTÍFICOS EM RELAÇÃO A PLANTA *CANNABIS SATIVA*.

	Folhas e Sementes ($\mu\text{g g}^{-1}$)^a	Folhas ($\mu\text{g g}^{-1}$)^b	Folhas (mg L^{-1})^c	Semente ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)^d	Este Trabalho ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Ni	10,40 – 6,80	3,26 – 3,56	-	0,36 – 1,36	2,5 – 3,63
Zn	-	-	2,25	46,0 – 72,0	1,52 – 13,84
Cu	-	-	26,6	9,0 – 12,0	0,35 – 2,06
Mn	28,0 – 102,50	-	40,30	78,0 – 102,0	0,56 – 9,66
Cr	17,41 – 15,20	4,65 – 4,18	-	-	3,74 – 5,29
B	-	-	-	11,0 – 14,0	2,01 – 23,75
Ba	-	-	-	-	0,28 – 0,70

Notas: trabalhos desenvolvidos por a)(EBOH; THOMAS, 2005); b) (KHAN, 2013); c)(ABDUL et al., 2012) e d) (KORKMAZ et al., 2010) para plantas da espécie *Cannabis Sativa*.

De um modo geral, os resultados obtidos para os extratos à base de CBD, apresentaram menores concentrações dos elementos químicos quando comparados a outros trabalhos que avaliaram a presença desses elementos na planta *Cannabis Sativa*, por ser uma matriz correlata. Já em comparação com a semente de maconha (semente de cânhamo), os valores obtidos para os elementos químicos neste trabalho foram maiores, o que está de acordo com o estudo realizado em 2003 por Angelova et al., que analisou os elementos em diferentes partes ao longo da planta, afirmando que os metais são distribuídos em ordem decrescente em nível de concentração a partir da raiz para os caules, folhas e sementes.

Com intuito de avaliar a exatidão do método empregado, foram realizados testes de adição e recuperação acrescentando-se $150 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada um dos elementos químicos a ser quantificado nos extratos de CBD (amostra utilizada nesse experimento - PI 01). Para os elementos (Cr e Mn) os quais as amostras apresentaram diferenças significativas entre os teores encontrados, observou-se um elevado valor do desvio padrão (TABELA 14). Contudo, em todos os experimentos realizados, foram obtidos valores de recuperação entre 80 – 120%, em acordo com o que é preconizado pela Comunidade Europeia e INMETRO (TABELA 14).

TABELA 14 - VALORES DE CONCENTRAÇÃO ENCONTRADOS PARA OS EXTRATOS DE CBD (AMOSTRA INDUSTRIAL – PI 01) E VALORES DE RECUPERAÇÃO OBTIDOS PARA EXTRATOS DE CBD FORTIFICADOS COM $150 \mu\text{g L}^{-1}$ DE CADA ELEMENTO QUÍMICO QUANTIFICADO POR ICP OES. VALOR MÉDIO \pm O DESVIO PADRÃO, N=3.

Analito	Teor encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Adição $150 \mu\text{g L}^{-1}$	Rec (%)
Ni	89,52 \pm 10,35	218,88 \pm 1,18	86 \pm 8
Zn	46,08 \pm 10,26	191,16 \pm 2,89	97 \pm 5
Cu	19,69 \pm 14,13	171,53 \pm 22,37	101 \pm 5
Mn	68,99 \pm 47,65	221,92 \pm 31,70	102 \pm 11
Cr	161,80 \pm 4,16	288,52 \pm 10,76	85 \pm 10
B	52,42 \pm 15,50	180,93 \pm 16,35	86 \pm 7
Ba	10,68 \pm 3,08	164,76 \pm 5,42	103 \pm 6

Os limites de detecção e quantificação foram calculados a partir das equações 2 e 3 (seção 4.6.1, página 54) para todos os elementos investigados, e são relatados na Tabela 15.

TABELA 15 - LIMITES DE DETERMINAÇÃO (LOD) E QUANTIFICAÇÃO (LOQ) CALCULADOS PARA OS ANALITOS DETERMINADOS POR ICP OES, SEGUNDO RESOLUÇÃO (Re 166/2017) DA ANVISA.

Elementos	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Ni	0,14	0,47
Zn	0,10	0,34
Cu	0,04	0,13
Mn	0,04	0,12
Cr	0,12	0,39
B	0,27	0,90
Ba	0,06	0,19

5.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE Pb, As E Cd POR GF AAS

5.3.1 Estudo dos Modificadores Químicos e de suas respectivas concentrações na quantificação de Pb, As e Cd em Extratos de CBD

Avaliou-se nesse trabalho diferentes níveis de concentração do modificador universal de Pd-Mg e também do modificador contendo somente Pd, como descrito nos materiais e métodos (seção 4.4, página 48). Esses modificadores foram testados por apresentarem bons resultados na literatura para os elementos analisados. Ribeiro et al. (2000), obtiveram bons valores de recuperação para As e Cd (100% e 93% respectivamente) utilizando a solubilização alcalina com TMAH na análise de amostras de cabelo. Welz e Sperling (1999) afirmam que o modificador Pd-Mg traz os melhores resultados para a determinação do Pb e que o nitrato de paládio é capaz de estabilizar tanto o arsênio inorgânico como o arsênio orgânico, gerando resultados com satisfatória exatidão e precisão nas análises por GF AAS. Em relação ao Cd, Bulska, Liebert e Hulanicki (1998), relataram um acréscimo na sensibilidade e na estabilização da temperatura quando utilizaram paládio como modificador químico.

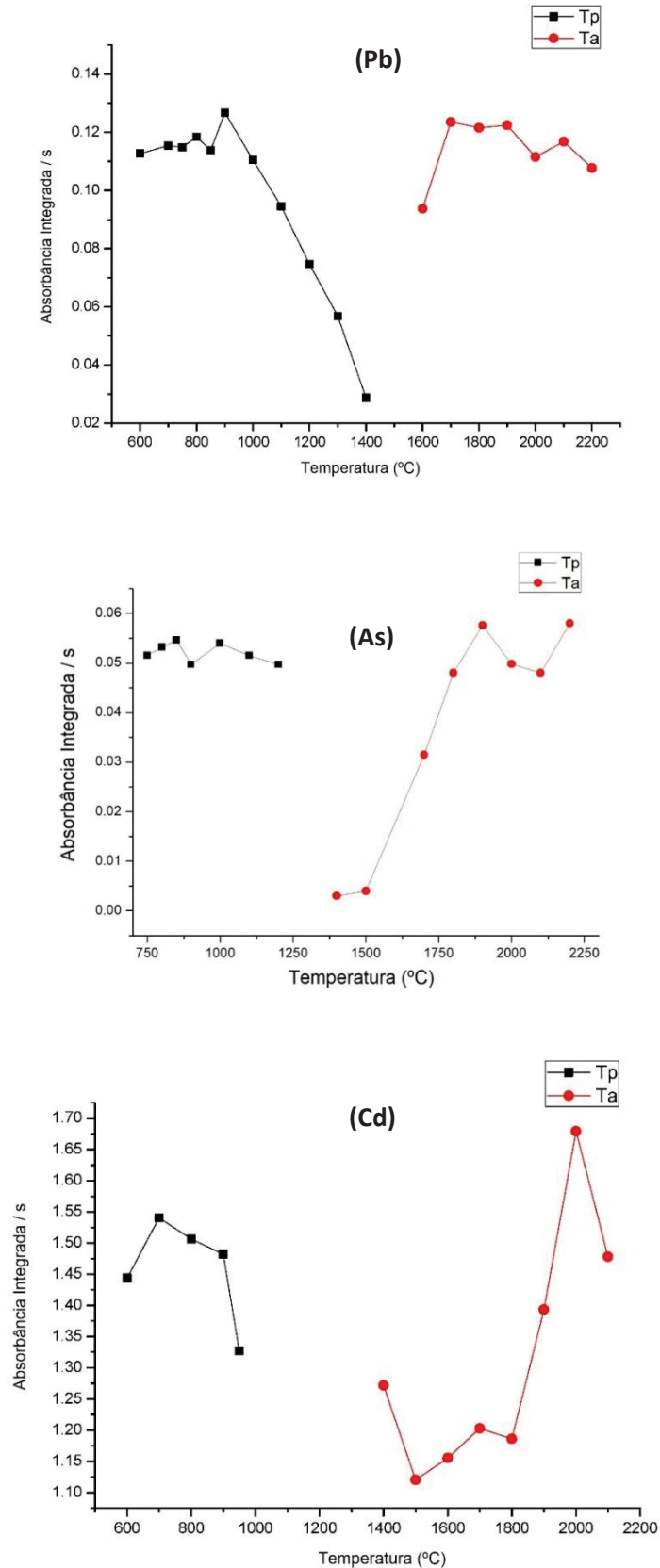
Para os elementos As e Cd o modificador químico contendo Pd- 2,5 μg foi o que proporcionou menores sinais de fundo obtendo-se sinais transientes bem resolvidos. Ou seja, a razão sinal do analito e sinal de fundo (background) estavam bem distinguidos, apresentando satisfatória simetria de pico para o sinal do analito como também uma boa relação do parâmetro SBR. Já para o Pb, o modificador químico universal contendo Pd 5 μg – Mg 3 μg foi o que proporcionou as melhores condições de análise, levando em consideração os parâmetros relatados para As e Cd.

O uso de uma solução de Pd em meio ácido (HNO_3 1% v/v) (modificador químico) não ocasionou a formação de precipitado quando as amostras foram tratadas com TMAH estiveram em contato com a solução do modificador de Pd preparadas em meio ácido, como relatado por Ribeiro et al. (2000). Tal fato se deve que nesse estudo a baixa concentração do reagente utilizado (TMAH 0,1% m/v) aliado à otimização do programa de aquecimento para cada analito estudado por GF AAS, proporcionando a obtenção de suspensões homogêneas e representativas

5.3.2 Estudo dos Parâmetros Instrumentais do GF AAS na Quantificação de Pb, As e Cd nos Extratos de CBD

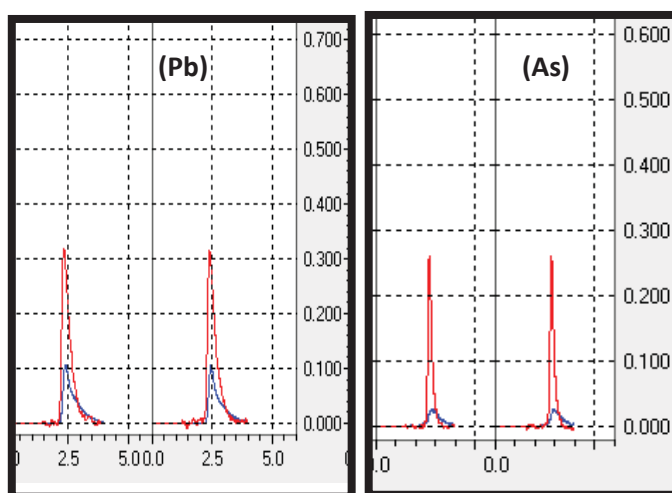
Curvas de pirólise e atomização foram estudadas para Pb, As e Cd na presença de seus respectivos modificadores, e estão reportadas na Figura 8. Nesses estudos, a fim de se encontrar temperaturas ótimas de pirólise e atomização para cada analito empregou-se solução padrão do analito em nível de concentração: $20 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb; $10 \mu\text{g L}^{-1}$ As e $15 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd em meio ácido HNO_3 1% v/v. Nessa etapa do estudo diferentes níveis de concentração foram empregados, de acordo com a sensibilidade do GF AAS para cada analito. Assim sendo, para se obter o sinal analítico em que se consiga visualizar o seu perfil, quanto a simetria do pico obtido, como também a relação sinal do analito:sinal de fundo (background) níveis de concentração relativamente elevados foram empregados. Isto possibilita avaliar os sinais transientes, indicativo que tanto o processo de decomposição térmica da matriz (concomitantes inorgânicos) como a etapa de atomização estão adequados, para a quantificação do analito, como pode ser observado na Figura 8.

FIGURA 8 - CURVAS DE TEMPERATURA DE PIRÓLISE (T_p) E TEMPERATURA DE ATOMIZAÇÃO (T_a) PARA Pb, As E Cd EM MEIO ÁCIDO (HNO_3 1% v/v). ANÁLISE DE 20 μL DE SOLUÇÃO PADRÃO DE CADA ANALITO E 5 μL DE MODIFICADOR QUÍMICO (Pd 5 μg – Mg 3 μg PARA Pb, Pd 2,5 μg PARA As E Cd).



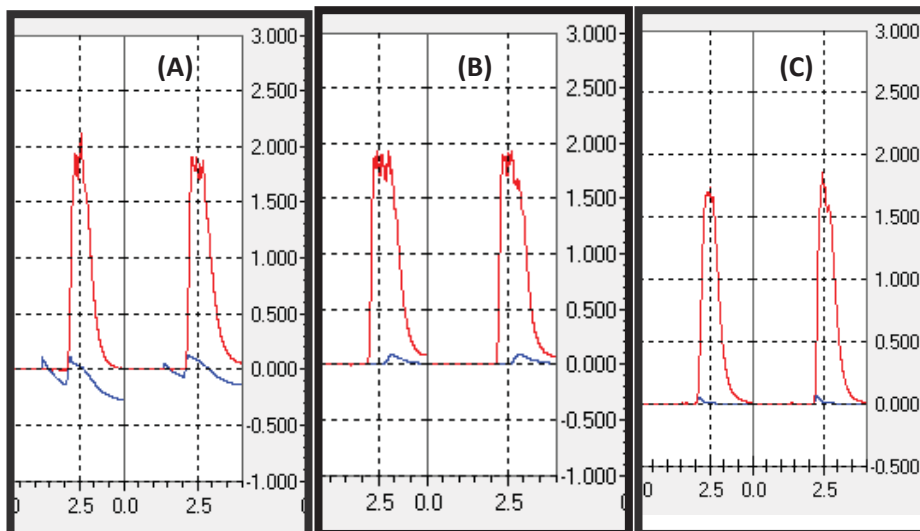
O Chumbo e o Arsênio apresentaram os maiores valores de absorvância quando a temperatura de pirólise foi fixada em 900°C e 850°C e a temperatura de atomização em 1700°C e 2200°C, respectivamente. As condições ótimas encontradas para os maiores valores de absorvância, foram também as que apresentaram um melhor sinal transiente (FIGURA 9), sendo esses bem definidos e simétricos e com boa relação sinal/ruído.

FIGURA 9 - SINAIS TRANSIENTES OBTIDOS PARA O Pb E PARA O As NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE T_p E T_a . SENDO O SINAL EM VERMELHO CORRESPONDENTE AO SINAL DO ANALITO E O SINAL EM AZUL AO BACKGROUND. ANÁLISE DE 20 μL DE SOLUÇÃO PADRÃO (20 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb E 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ As) E 5 μL DE SEUS RESPECTIVOS MODIFICADORES QUÍMICOS (Pd 5 μg – Mg 3 μg E Pd 2,5 μg).



Em contrapartida, para o Cádmiio, os melhores sinais transientes não foram obtidos para os maiores valores de absorvância encontrados quando no estudo das temperaturas de pirólise e atomização. Em temperaturas de atomização maiores que 1600°C, o sinal transiente do analito não retornava a linha de base, obtendo-se elevados valores de absorvância, visto que o valor para a absorvância é calculado pela integração da área do pico. Já para valores menores que 1600°C, ocorria a dupla atomização do analito, caracterizada por múltiplos picos obtido nos sinais transientes. O anômalo comportamento em relação ao sinal do background, para estas temperaturas, se deve, possivelmente, aos precursores que são formados e liberados mais rapidamente. Diante disso, as temperaturas de pirólise e atomização que apresentaram valores satisfatórios de absorvância obtendo-se também uma boa relação sinal do analito:sinal de fundo foram, T_p de 700°C e T_a 1600°C. Os sinais transientes obtidos para o Cd podem ser observados na Figura 10 abaixo.

FIGURA 10 - SINAIS TRANSIENTE OBTIDOS PARA Cd EM A) T_a MENORES QUE 1600°C; B) T_a MAIORES QUE 1600°C E C) NAS CONDIÇÕES ÓTIMAS DE T_p E T_a . SENDO O SINAL EM VERMELHO CORRESPONDENTE AO SINAL DO ANALITO E O SINAL EM AZUL AO BACKGROUND. ANÁLISE DE 20 μ l DE SOLUÇÃO PADRÃO (15 μ g L⁻¹ Cd) E 5 μ l DE MODIFICADOR QUÍMICO (Pd 2,5 μ g).



Após encontradas as condições ótimas de temperatura de pirólise e de atomização em meio ácido, foram necessários ainda pequenos ajustes na temperatura e rampa de secagem do programa de aquecimento para as amostras solubilizadas em meio alcalino. O TMAH é um reagente mais viscoso, em relação ao meio aquoso para qual o equipamento possui uma rampa padrão (default) de aquecimento. Devido à diferença de viscosidade das soluções em questão, observou-se que na etapa de secagem a amostra em meio de TMAH 0,1% m/v era expelida para fora do tubo de grafite, acarretando em baixa precisão das medidas analíticas como também problemas na exatidão dessas medidas, estando em torno de 50%. Assim sendo, foi necessária uma avaliação da etapa de secagem, visando um aquecimento da amostra de forma mais suave, a fim de se evitar que a amostra fosse expelida pelo orifício do tubo de grafite.

Dessa forma, o programa de aquecimento desenvolvido no GF AAS para os elementos químicos estudados nesse trabalho, pode ser observado na Tabela 16. O programa de aquecimento em forma de gráfico pode ser observado no Anexo 2 para melhor visualização/compreensão do método analítico desenvolvido.

TABELA 16 - PROGRAMA DE AQUECIMENTO DESENVOLVIDO NO GF AAS PARA A DETERMINAÇÃO DE Pb, As E Cd NAS SUSPENSÕES OBTIDAS DOS EXTRATOS DE CBD EM MEIO ALCALINO (TMAH 0,1% m/v).

Etapa	Temperatura (°C)			Tempo (Seg)			Modo de Aquecimento	Fluxo de Ar (L min ⁻¹)
	Pb	As	Cd	Pb	As	Cd		
Secagem	120	50	50	100	50	20	Rampa	0,1
	200	120	120	20	70	90	Rampa	1,0
	-	200	200		20	20	Rampa	1,0
Pré pirólise	700	700	550	10	10	10	Rampa	1,0
Pirólise	900	850	700	10	10	3	Permanência (Hold)	1,0
Atomização	1700	2200	1600	2	2	2	Permanência (Hold)	0,0
Limpeza	2500	2500	2500	2	2	3	Permanência (Hold)	1,0

Na etapa de atomização o fluxo de argônio é interrompido para que não haja a dispersão/expulsão do vapor atômico do analito, que acarretaria em baixa precisão e exatidão dos valores obtidos, devido a diluição da nuvem atômica. Como já mencionado a etapa de atomização é responsável pela formação do vapor atômico do analito uma vez que somente ele deverá estar presente no interior do tubo de grafite após as etapas anteriores terem sido bem otimizadas.

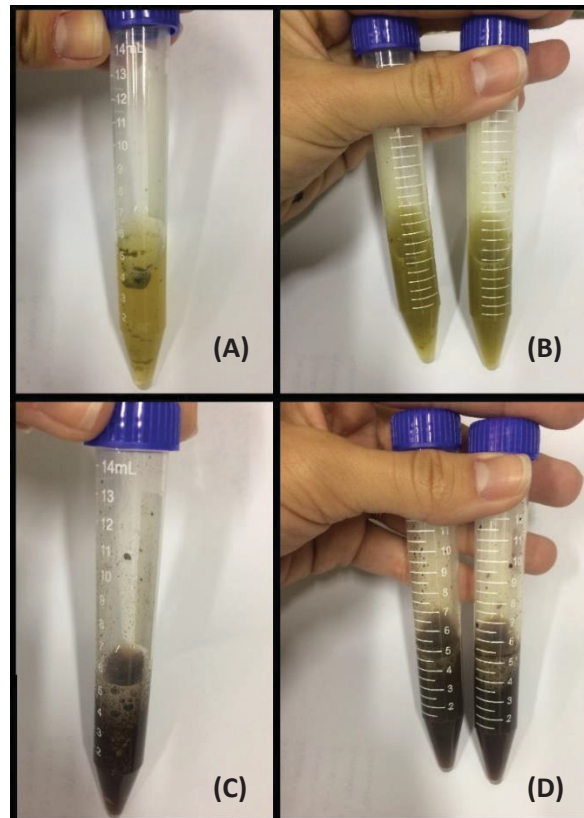
5.4 SOLUBILIZAÇÃO ALCALINA POR TMAH

A solubilização alcalina é particularmente atrativa porque as amostras são facilmente preparadas e geralmente não exigem agressivos tratamentos químicos, o que torna as amostras menos suscetíveis à contaminação reduzindo a probabilidade de se perder o analito seja pelo processo de adsorção ou mesmo volatilização (ARANHA et al., 2016).

Todos os experimentos gerados pelo planejamento fatorial completo, 2³ foram analisados nas condições instrumentais ótimas encontradas para análise de Pb em meio ácido, pela técnica de GF AAS. Para a quantificação de As e Cd, o objetivo foi manter o mesmo preparo de amostras a fim de se facilitar a quantificação desses analitos nos extratos de CBD, mantendo um único preparo de amostras para a

quantificação de Pb, As e Cd, elevando a frequência analítica do método proposto e deixando-o relativamente mais simples para as análises. Desta forma, a massa de amostra pesada em todos os procedimentos foi de aproximadamente 0,1000 g. As diferentes condições reacionais para a solubilização dos extratos de CBD apresentaram características visuais bem divergentes como pode ser observado na Figura 11.

FIGURA 11 - SUSPENSÕES OBTIDAS A PARTIR DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO, 2^3 . CONDIÇÕES AVALIADAS A) 0,2% m/v DE TMAH à 25 °C APÓS PREPARO IMEDIATO DA SUSPENSÃO; B) 0,2% m/v DE TMAH à 80°C DURANTE 5 E 10 MINUTOS DE EXTRAÇÃO; C) 5,0% m/v DE TMAH à 25°C APÓS O PREPARO IMEDIATO DA SUSPENSÃO E D) 5,0% m/v DE TMAH à 80°C DURANTE 5 E 10 MINUTOS DE EXTRAÇÃO.



Pode-se observar de forma visual, que as amostras tratadas com maior concentração de TMAH apresentaram maior solubilidade, obtendo uma suspensão dessas amostras mais homogênea. Porém, apesar do aspecto semelhante das solubilizações que foram realizadas à temperatura de 80°C em diferentes tempos de extração (5 e 10 minutos), essas, apresentaram diferenças em relação aos valores de recuperação do analito, o que pode ser observado na Tabela 17.

A aplicabilidade da estratégia de preparo de amostras utilizada nos extratos de CBD foi avaliada por meio dos valores de recuperação obtidos em relação à solução padrão de cada elemento: Pb, As e Cd em meio ácido (HNO₃ 1 % v/v). Os níveis de concentração de cada analito eram sempre de mesmo valor, na solução padrão como na suspensão analisada. A figura de mérito recuperação foi utilizada no desenvolvimento do método, pois é um indicador direto da eficiência da estratégia de preparo de amostra em meio alcalino, como também avalia a etapa de determinação que foi previamente otimizada para cada analito estudado nos extratos de CBD.

TABELA 17 - VALORES DE RECUPERAÇÃO PARA Pb EM DIFERENTES EXPERIMENTOS REALIZADOS DE ACORDO COM O PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2³ ANALISADOS POR GF AAS VISANDO A ESCOLHA DAS MELHORES CONDIÇÕES PARA O PREPARO DE AMOSTRAS DOS EXTRATOS DE CBD EM MEIO ALCALINO. (MASSA DA AMOSTRA FIXA – 0,1000g).

Experimento	Replicata	[TMAH] m/v	Tempo (min)	Temp. (°C)	Rec (%)
1	1	0,2	5	25	44
2	1	5,0	5	25	74
3	1	0,2	10	25	51
4	1	5,0	10	25	74
5	1	0,2	5	80	68
6	1	5,0	5	80	89
7	1	0,2	10	80	90
8	1	5,0	10	80	83
9	2	0,2	5	25	61
10	2	5,0	5	25	70
11	2	0,2	10	25	49
12	2	5,0	10	25	73
13	2	0,2	5	80	84
14	2	5,0	5	80	76
15	2	0,2	10	80	105
16	2	5,0	10	80	79

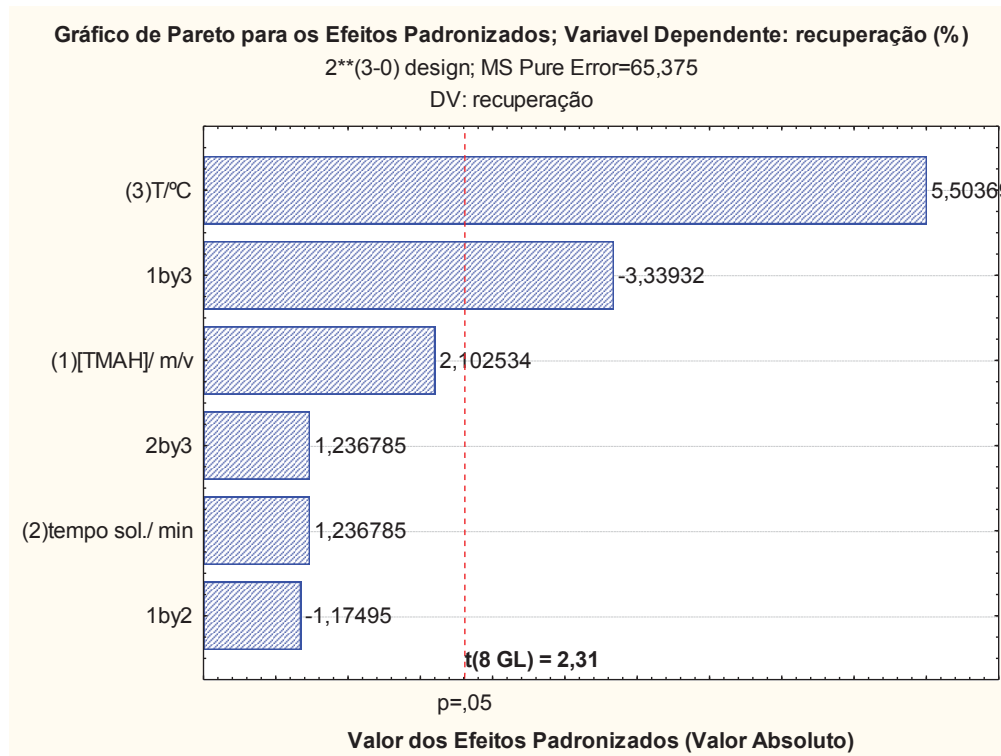
* Todos os ensaios foram realizados no mesmo dia, utilizou-se as mesmas soluções e os mesmos equipamentos.

Os experimentos 7 e 15 (duplicatas), que continham a menor concentração de TMAH 0,2% m/v e um aquecimento mais longo (tempo de 10 min), à temperatura de 80°C, apresentaram os melhores valores de porcentagem de recuperação (90 - 104% para o Pb).

A partir dos resultados obtidos quanto aos valores de recuperação em diferentes condições reacionais avaliadas de preparo de amostra, pode-se construir um gráfico de pareto (FIGURA 12). Nesse gráfico é apresentado os efeitos padronizados de todas as variáveis estudadas e também se as interações entre essas

variáveis são favoráveis ou não na eficiência de extração do analito. Os estudos estatísticos foram realizados para um nível de confiança de 95%.

FIGURA 12 - GRÁFICO DE PARETO REFERENTE À OTIMIZAÇÃO DO PREPARO DA AMOSTRA DE EXTRATO DE CBD, OBTIDO DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2^3 , PARA A QUANTIFICAÇÃO DE Pb POR GF AAS.

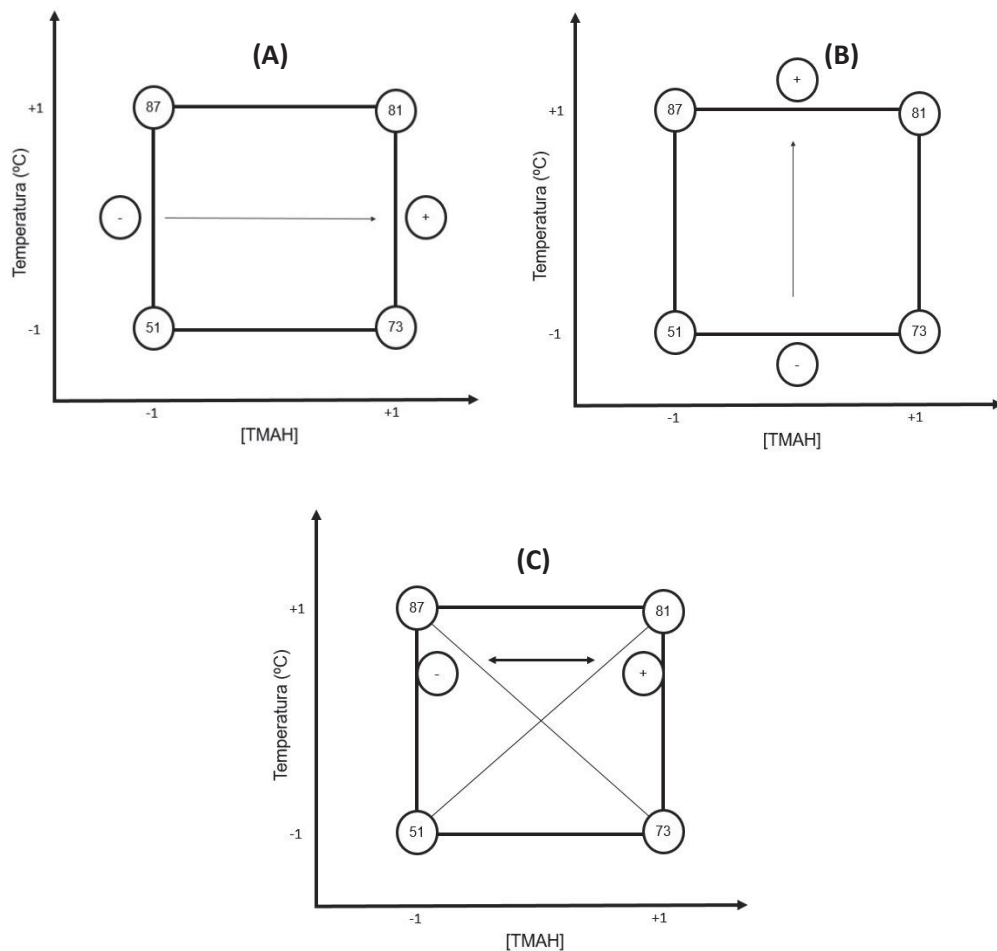


Na análise do gráfico de pareto o fator temperatura é o que exerce maior influência no preparo da amostra, apresentando um valor de efeito padronizado positivo. Isso indica que uma maior eficiência de extração do analito em solução ocorre de acordo com maior valor de temperatura empregado no processo de solubilização da amostra, nesse caso ($T \cong 80 \text{ }^\circ\text{C}$). Entretanto a grande magnitude desse efeito padronizado positivo obtido se deve ao intervalo de temperatura estudado ser relativamente grande, isto é, $T \cong 25 \text{ }^\circ\text{C} - 80 \text{ }^\circ\text{C}$. Contudo, não foi necessário fazer um refinamento do intervalo estudado pois como já é conhecido na literatura, geralmente maiores valores de temperatura associados a diferentes concentrações de TMAH, são mais eficientes na promoção da solubilização de diversos tipos de amostras, entre elas, amostras correlatas ao do presente estudo.(G. L. SILVA et al., 1999; GHISI et al., 2011; NÓBREGA et al., 2006; SAVIO et al., 2014). Através dos valores de recuperação e da análise visual é possível perceber que a temperatura apresenta significativa influência no preparo de amostras.

O grafito de pareto não apresentou nenhum efeito significativo de terceira ordem e somente um efeito significativo de segunda ordem, sendo esse a interação entre a variável concentração de TMAH, e a variável temperatura. A interação entre essas variáveis apresentou efeito negativo, indicando que a condição ótima que promove a melhor extração dos analitos é o efeito simultâneo de elevados valores de temperatura associado à baixos valores de concentração de TMAH.

Como o efeito de interação é significativo, os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente. Para tal, foi necessário traçar um diagrama contendo as respostas médias (valores de recuperação) em todas as combinações dos níveis das variáveis (FIGURA 13). (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

FIGURA 13 - DIAGRAMA PARA INTERPRETAÇÃO GEOMÉTRICA DOS EFEITOS DE SEGUNDA ORDEM APRESENTADOS PELO PLANEJAMENTO 2^3 . OS EFEITOS PRINCIPAIS SÃO CONTRASTES ENTRE ARESTAS OPOSTAS (A) E (B). O EFEITO DE INTERAÇÃO É O CONTRASTE ENTRE AS DUAS DIAGONAIS (C). OS VALORES NOS VÉRTICES DO QUADRADO SÃO AS RESPOSTAS MÉDIAS (RECUPERAÇÃO DE Pb).



Examinando o diagrama de interpretação geométrica, pode-se concluir que:

- Elevando a temperatura eleva-se a eficiência de extração do analito (Pb), mas esse efeito é muito mais significativo quando baixa concentração de TMAH é empregada. (Eficiência de recuperação de Pb 49% para 86%);

Todas as análises apontam para baixas concentrações do reagente alcalino. Em efeito, baixas concentrações de TMAH podem apresentar melhores resultados, pois este reagente apresenta um teor de carbono considerável (visto sua fórmula - $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$), podendo causar interferências nas análises por GF AAS, como também elevar os valores de absorvância para o branco analítico. As interferências químicas na fase condensada ainda não são perfeitamente compreendidas, mas sabe-se que pode ocorrer a formação de carbetos e/ou compostos intermediários que podem levar a uma atomização incompleta do analito ou mudanças na sua cinética de volatilização. (KRUG; NOBREGA; OLIVEIRA, 2007). Assim sendo, foi necessário encontrar uma condição de compromisso entre a solubilização efetiva dos extratos de CBD e baixos teores de TMAH, como pode ser verificado no planejamento fatorial empregado.

Apesar do mecanismo de ação do TMAH na solubilização da matéria orgânica/disponibilidade do analito, ainda ser desconhecido, alguns estudos como o de Aranha et al. (2016), Ghisi et al. (2011) e Nóbrega et al. (2006) relatam que o emprego de baixas concentrações da solução de TMAH é suficiente para a obtenção de suspensões homogêneas e representativas em diferentes tipos de amostras.

Os resultados obtidos a partir de um estudo conjunto do planejamento fatorial, da análise do gráfico de pareto como também da interpretação geométrica das variáveis estudadas, foram essenciais para nortear a escolha das condições reacionais que possibilitaram uma eficiência de extração do analito em torno de 80-100%. Desta forma, foi realizado um pequeno ajuste nos valores das variáveis significativas no preparo de amostras. Sendo assim, pode-se verificar que empregando concentração de TMAH menor que 0,2 % m/v juntamente com a temperatura de extração em torno de 100 °C obteve-se uma condição reacional de preparo de amostras bastante adequada e compatível com a técnica GF AAS. Após a realização desses experimentos, observou-se que as amostras tratadas com TMAH 0,1 % m/v, e temperatura de 100 °C apresentavam os melhores valores de recuperação de Pb, compreendendo o limite estabelecido pelo INMETRO de 80 a

120%. Esse preparo de amostras também foi aplicado para a determinação de As e Cd nos extratos de CBD por GF AAS, e estão apresentados na Tabela 18.

O planejamento fatorial, como já dito anteriormente, foi elaborado para o Pb. Para esse analito a variável tempo não foi significativa, porém ao avaliar a recuperação do preparo de amostra em meio alcalino para os demais analitos, As e Cd, observou-se que um tempo maior de extração era necessário. Após a realização de alguns experimentos em diferentes temperaturas, observou-se que o tempo de extração de 15 minutos apresentou os melhores valores de recuperação para ambos os analitos. Assim sendo, o preparo de amostras que contempla a solubilização da amostra com TMAH 0,1 % m/v em temperatura de 100 °C durante 15 minutos foi utilizado para extração dos analitos nos extratos de CBD.

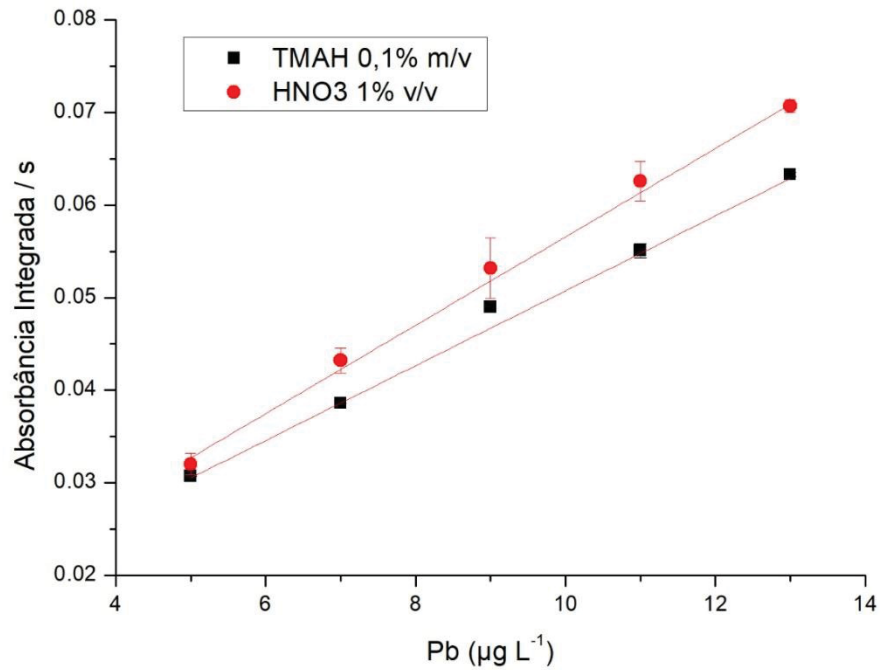
TABELA 18 - VALORES DE RECUPERAÇÃO OBTIDOS PARA OS EXTRATOS DE CBD TRATADOS COM TMAH 0,1% m/v, DURANTE 15 MIN A TEMPERATURA DE 100°C POR GF AAS. INJETOU-SE 20 µL DE AMOSTRA E 5 µL DE MODIFICADOR QUÍMICO NA DETERMINAÇÃO DE Pb, As e Cd. N=2.

Analito	Nível de fortificação (µg L ⁻¹)	Extrato de CBD (µg L ⁻¹)	Extrato de CBD fortificado (µg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Pb	20	-	21,68 ± 2,19	109 ± 11
As	10	4,26	13,58 ± 0,61	93 ± 4
Cd	15	-	13,88 ± 0,17	92 ± 1

5.5 CURVAS ANALÍTICAS DE CALIBRAÇÃO EXTERNA

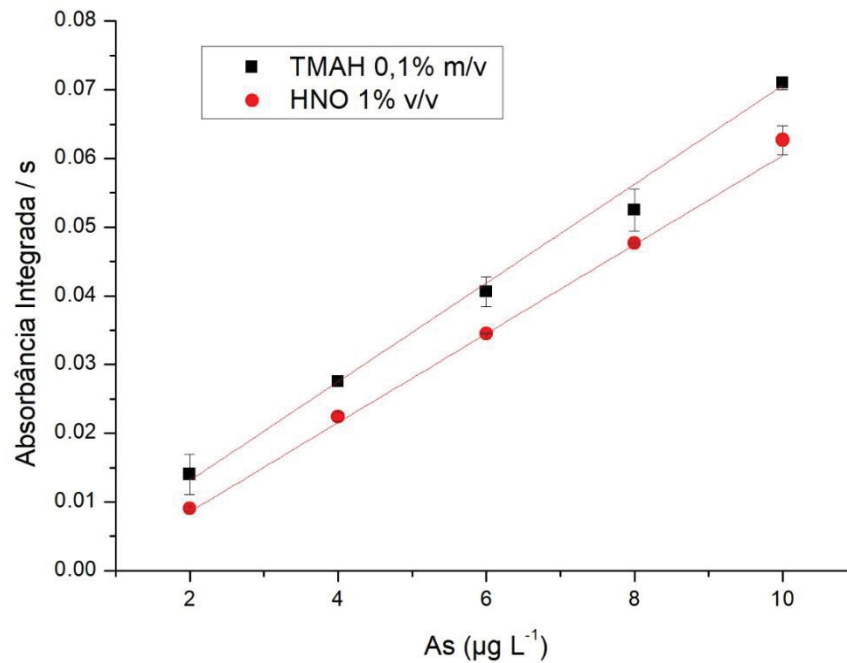
Após as condições instrumentais de análise, bem como o método proposto para o tratamento de amostras se mostrarem adequados ao propósito de pesquisa, curvas de calibração analítica foram construídas para quantificação de Pb, As e Cd nos extratos de CBD. Em todas as soluções de análise (soluções padrão, branco de reagente e amostras) houve a adição do modificador químico de forma a garantir um meio reacional semelhante entre as soluções analisadas. As curvas de calibração analítica em meio ácido e em meio alcalino, bem como suas respectivas equações matemáticas podem ser observadas nas Figuras 14, 15 e 16.

FIGURA 14 - CURVA ANALÍTICA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA Pb EM MEIO ÁCIDO (HNO₃ 1% v/v) E EM MEIO ALCALINO (TMAH 0,1% m/v). INTERVALO DE CALIBRAÇÃO 5,0 - 13,0 µg L⁻¹. MODIFICADOR QUÍMICO: Pd 5 µg – Mg 3 µg. VOLUME DE SOLUÇÃO PADRÃO: 20 µL E VOLUME DE MODIFICADOR QUÍMICO 5 µL.



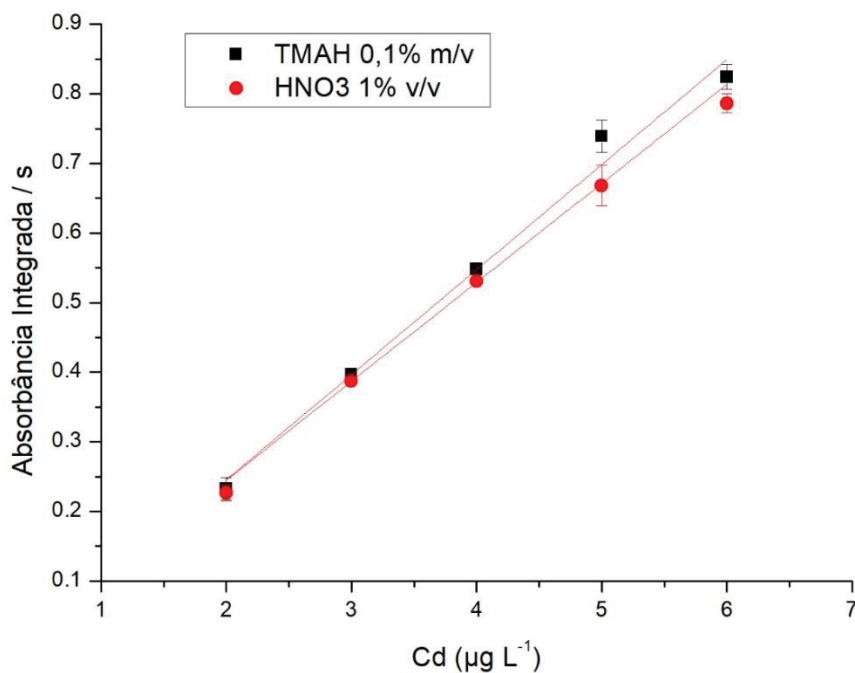
Equation	y = a + b*x		
Adj. R-Square	0.99714	0.99794	
		Value	Standard Error
TMAH 0,1% m/v	Intercept	0.01028	7.57192E-4
TMAH 0,1% m/v	Slope	0.00405	1.08217E-4
HNO3 1% v/v	Intercept	0.00881	0.00117
HNO3 1% v/v	Slope	0.00478	1.08386E-4

FIGURA 15 - CURVA ANALÍTICA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA As EM MEIO ÁCIDO (HNO₃ 1% v/v) E EM MEIO ALCALINO (TMAH 0,1% m/v). INTERVALO DE CALIBRAÇÃO 2,0 - 10,0 µg L⁻¹. MODIFICADOR QUÍMICO: Pd 2,5 µg. VOLUME DE SOLUÇÃO PADRÃO: 20 µL E VOLUME DE MODIFICADOR QUÍMICO 5 µL.



Equation	y = a + b*x		
Adj. R-Square	0.99877	0.99934	
		Value	Standard Error
TMAH 0,1% m/v	Intercept	-0.00128	5.25689E-4
TMAH 0,1% m/v	Slope	0.00719	1.2595E-4
HNO 1% v/v	Intercept	-0.00442	5.01275E-4
HNO 1% v/v	Slope	0.00649	8.34432E-5

FIGURA 16 - CURVA ANALÍTICA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA Cd EM MEIO ÁCIDO (HNO₃ 1% v/v) E EM MEIO ALCALINO (TMAH 0,1% m/v). INTERVALO DE CALIBRAÇÃO 2,0 - 6,0 µg L⁻¹. MODIFICADOR QUÍMICO: Pd 2,5 µg. VOLUME DE SOLUÇÃO PADRÃO : 20 µL E VOLUME DE MODIFICADOR QUÍMICO 5 µL.



Equation	y = a + b*x		
Adj. R-Square	0.99706	0.99548	
		Value	Standard Error
TMAH 0,1% m/v	Intercept	-0.05614	0.01295
TMAH 0,1% m/v	Slope	0.1509	0.0041
HNO3 1% v/v	Intercept	-0.03979	0.01786
HNO3 1% v/v	Slope	0.14222	0.00479

As curvas analíticas de calibração construídas em meio ácido e em meio alcalino apresentaram sensibilidade semelhantes para todos os elementos estudados. Um fator muito relevante do método proposto e que indica que esse método apresenta satisfatória seletividade para os analitos estudados frente à matriz de análise. Ou seja, apesar do uso de TMAH no preparo de amostras, esse reagente não foi necessário ser empregado quando no preparo da curva analítica de calibração. É claro que o emprego de uma curva analítica externa só foi possível devido a uma cuidadosa otimização da temperatura de pirólise, onde provavelmente a maior parte dos

concomitantes foram eliminados, restando apenas o analito a ser quantificado na etapa de atomização. E isto se deve ao estudo das condições instrumentais empregadas como também o estudo do modificador químico empregado, e seu nível de concentração adequado, possibilitando um eficiente tratamento térmico da matriz, como também adequada condição de atomização de cada analito.

Isto é desejável, visto que métodos analíticos que apresentam certa simplicidade de execução e alta frequência analítica, são geralmente empregados em laboratórios de análise de rotina.

5.6 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método foram calculados (TABELA 19) de acordo com a resolução RE nº 166 da ANVISA e de acordo com o sugerido por Welz e Sperling (1999), a partir das equações 2, 3, 4 e 5 (seção 4.6.1, página 54). O LOD e o LOQ do método para Cd e Pb foram determinados a partir da amostra industrial (extrato de CBD) importada dos Estados Unidos – PI 01. Essa amostra foi escolhida por apresentar um aspecto pastoso de difícil manipulação em relação às outras amostras e por não conterem teores de Cd e Pb que estejam acima do LOD do método. Para o As os limites foram calculados a partir do branco de reagente (TMAH 0,1% m/v aquecido a 100 °C em banho maria por 15 minutos), pois essa amostra contém As acima do LOD do método proposto, não sendo considerado efetivamente um branco analítico.

TABELA 19 - LIMITES DE DETECÇÃO (LOD) E QUANTIFICAÇÃO (LOQ) CALCULADOS PARA O MÉTODO PROPOSTO PARA CADA ANALITO SEGUNDO RESOLUÇÃO RE nº 166 DA ANVISA E DE ACORDO COM WELZ.

Elemento	LOD ANVISA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ANVISA ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD WELZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ WELZ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Pb	1,81	5,15	1,30	4,94
As	0,45	1,35	0,32	1,22
Cd	0,07	0,23	0,05	0,21

O LOD e o LOQ também foram calculados como sugerido por Welz por se tratar de cálculos específicos para a técnica utilizada nesse trabalho (GF AAS). Os cálculos realizados apresentam nível de confiança de 95% para os limites de detecção e quantificação.

Pode-se observar que quanto mais sensível o método desenvolvido, menores as diferenças existentes entre os valores obtidos de acordo com a ANVISA e o Welz. Os valores semelhantes corroboram os limites encontrados para o método proposto de quantificação de Pb, As e Cd nos extratos de CBD, solubilizados por TMAH 0,1% m/v.

Vale ressaltar que o limite de detecção instrumental é o limite de detecção considerando uma matriz totalmente isenta de interferentes químicos. Já o limite de detecção do método é uma medida mais exata, pois leva em consideração o método de preparo de amostras empregado aliado às condições instrumentais utilizadas na etapa de determinação. A regra usada por espectroscopistas é que em geral o limite de detecção do método pode ser cerca de duas a cinco vezes maior do que o limite de detecção instrumental. (THOMSEN; SCHATZLEIN; MERCURO, 2003).

Neste trabalho, o limite de detecção do método foi cerca de 2 vezes maior que o limite de detecção instrumental, tanto para os valores calculados de acordo com a Anvisa (0,80 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Pb, 0,40 $\mu\text{g L}^{-1}$ para As) como para os valores calculados de acordo com Welz (0,64 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Pb, 0,31 $\mu\text{g L}^{-1}$ para As). Para Cd, o limite de detecção foi 7 e 5 vezes maior, devido ao limite instrumental consideravelmente baixo (0,01 $\mu\text{g L}^{-1}$). Um fator que contribuiu para que o limite de detecção do método fosse maior, foi a utilização do TMAH. O hidróxido de tetrametilamônio é um reagente alcalino (pH 13,4-14,7) com a fórmula química $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ mais complexas que dos ácidos que geralmente são utilizados para digestão de amostra, podendo produzir altos valores de brancos (NÓBREGA et al., 2006). A não decomposição total da matéria orgânica, visto que uma suspensão era obtida com o preparo de amostras proposto, é outro fator que influencia em valores maiores do limite de detecção do método.

5.7 EXATIDÃO E PRECISÃO DO MÉTODO PROPOSTO POR GF AAS

Como descrito anteriormente, testes de recuperação foram realizados em três níveis de concentração para cada analito em relação ao intervalo da curva analítica de calibração, para isso, utilizou-se a equação 6 (seção 4.6.3, página 56). Os resultados podem ser observados na tabela 20.

TABELA 20 - VALORES DE RECUPERAÇÃO OBTIDO PARA EXTRATO DE CBD SOLUBILIZADO EM MEIO DE TMAH 0,1% m/v. MÉDIA \pm O DESVIO PADRÃO, N=3. SENDO VE = VALOR ESPERADO PELA FORTIFICAÇÃO OU DILUIÇÃO DA AMOSTRAS E VD= VALOR DETERMINADO APÓS A FORTIFICAÇÃO OU DILUIÇÃO DA AMOSTRA.

Analito	Amostra	Teor	VE	VD	VE	VD	VE	VD
		($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)
As	PI 01 – 1	3,81	2,24	1,80	5,43	4,95	8,66	8,27
	PI 01 – 2	3,97	1,98	1,92	4,85	4,94	8,22	8,43
	PI 01 – 3	3,60	1,80	1,70	5,24	5,82	8,52	8,36
		REC (%)	91 \pm 11		101 \pm 10		99 \pm 4	
Cd	PI 01 – 1	0,68	2,68	2,63	4,68	4,93	6,68	6,56
	PI 01 – 2	0,64	2,64	2,46	4,64	5,17	6,64	6,49
	PI 01 – 3	0,62	2,62	2,34	4,62	4,99	6,62	6,70
		REC (%)	94 \pm 5		108,19 \pm 3		99 \pm 2	
Pb	PI 01 – 1	-	5,00	4,92	9,00	8,48	13,00	13,39
	PI 01 – 2	-	5,00	4,46	9,00	9,28	13,00	12,21
	PI 01 – 3	-	5,00	4,15	9,00	8,61	13,00	12,76
		REC (%)	90 \pm 8		98 \pm 5		98 \pm 5	

Os valores de recuperação se encontram dentro do estabelecido pela Comunidade Europeia estando em torno de 80 – 120 %.

A precisão foi avaliada através da repetitividade dos experimentos de recuperação, de acordo com a equação 7. Os valores de RSD obtido para cada amostra se encontram abaixo de 7% (TABELA 21) indicando boa precisão do método proposto.

TABELA 21 - VALORES DE RSD (%) OBTIDOS A PARTIR DOS TEORES ENCONTRADOS PARA O TESTE DE RECUPERAÇÃO DETERMINADOS PARA OS TRÊS NÍVEIS DE CADA ANALITO.

Analito	Amostra	RSD (%)	RSD (%)	RSD (%)
		\cong ($2 \mu\text{g L}^{-1}$)	\cong ($5 \mu\text{g L}^{-1}$)	\cong ($9 \mu\text{g L}^{-1}$)
As	PI 01 – 1	3,53	1,79	0,71
	PI 01 – 2	5,38	2,05	1,23
	PI 01 – 3	2,55	1,54	0,95
		\cong ($2 \mu\text{g L}^{-1}$)	\cong ($4 \mu\text{g L}^{-1}$)	\cong ($6 \mu\text{g L}^{-1}$)
Cd	PI 01 – 1	0,71	0,80	0,71
	PI 01 – 2	5,34	1,92	1,21
	PI 01 – 3	4,27		1,72
		\cong ($5 \mu\text{g L}^{-1}$)	\cong ($9 \mu\text{g L}^{-1}$)	\cong ($13 \mu\text{g L}^{-1}$)
Pb	PI 01 – 1	3,66	3,48	3,22
	PI 01 – 2	6,23	0,95	3,26
	PI 01 – 3	2,25	6,80	3,34

5.8 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE EXTRATO DE CBD POR GF AAS

As amostras de extrato de CBD foram analisadas a fim de se avaliar a presença, bem como o teor dos elementos químicos considerados não essenciais como: Pb, As e Cd. Na análise por ICP OES, as amostras foram nomeadas de acordo com a sua forma de produção, sendo mantidas as nomenclaturas citadas anteriormente. Desta forma, extratos de CBD nomeados de (PI) foram produzidos por indústrias de suplementos alimentares obtidos a partir da planta *Cannabis Sativa* ou de associações de apoio a Cannabis Medicinal, e os extratos de CBD produzidos de forma artesanal, nomeados de (PA).

Para melhor compreensão, as amostras foram divididas em dois grupos, sendo eles, amostras pastosas e amostras líquidas (FIGURA 17).

FIGURA 17 - EXTRATOS DE CBD ANALISADAS PELO MÉTODO PROPOSTO POR GF AAS. EXTRATOS DE CBD A ESQUERDA DE ASPECTO LÍQUIDO E DA DIREITA DE ASPECTO PASTOSO.



A maior parte das amostras foram preparadas em triplicatas com exceção das amostras PI 09, PI 10, PI 11 e PI 12 que foram preparadas em duplicatas por estarem em pequena quantidade. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 22.

TABELA 22 - TEORES DOS ELEMENTOS QUÍMICOS (As, Cd E Pb) QUANTIFICADOS POR GF AAS EM DIFERENTES EXTRATOS DE CBD SOLUBILIZADOS EM MEIO DE TMAH 0,1% m/v. (MÉDIA ± DESVIO PADRÃO, n=3).

Amostras	As ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	As ($\mu\text{g g}^{-1}$)*	Cd ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g Kg}^{-1}$)
PI 01	0,90 ± 0,06	0,0009 ± 5x10 ⁻⁵	< LOQ	< LOQ
PI 02	< LOQ		< LOQ	< LOQ
PA 04	< LOQ		< LOQ	< LOQ
PA 05	< LOQ		< LOQ	< LOQ
PA 06	< LOQ		< LOQ	< LOQ
PA 07	< LOQ		< LOQ	< LOQ
PA 08	< LOQ		< LOQ	< LOQ
PA 09	< LOQ		< LOQ	< LOQ
PA 10	0,60 ± 0,08	0,0006 ± 8x10 ⁻⁵	< LOQ	< LOQ
PA 11	< LOQ		< LOQ	< LOQ
PA 12	< LOQ		< LOQ	< LOQ

* unidade das agências reguladoras ANVISA e FDA

LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$) – Pb = 1,29 x 10⁻³, Cd = 5,75 x 10⁻⁵ e 3,38 x 10⁻⁴

Somente as amostras PI 01 e PA 10 apresentaram teor de arsênio acima do limite de quantificação. Esses valores foram comparados aos limites máximos preconizados pelas agências reguladoras (FDA e ANVISA) e se encontram dentro do aceitável para medicação por via oral que corresponde a 1,5 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Os teores determinados nesse estudo foram comparados a outros trabalhos da literatura que avaliaram o teor de As, Cd e Pb nas plantas *Cannabis Sativa*. Os teores encontrados nos extratos de CBD utilizados para fins terapêuticos são menores que os teores encontrados nas folhas e sementes da planta para As, Cd e Pb de acordo com o reportado por Eboh e Thomas (2005), onde nas folhas o teor foi de 13,60, 4,40 e 1,58 $\mu\text{g g}^{-1}$ e nas sementes de 7,48, 2,40 e 0,42 $\mu\text{g g}^{-1}$ de As, Cd e Pb respectivamente. Khan et al. (2013) determinou os teores de Cd e Pb também em plantas da espécie *Cannabis Sativa* sendo um teor médio de Cd 3,41 $\mu\text{g g}^{-1}$ e de Pb 6,37 $\mu\text{g g}^{-1}$. Assim sendo, os resultados obtidos demonstram que, em relação a composição inorgânica, os extratos de CBD não oferecem risco à saúde das pessoas que os utilizam para o tratamento de diversas doenças.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos por ICP OES foram satisfatórios para os elementos quantificados, com exceção do Ba e Cr. Os demais elementos quantificados apresentam funções nutricionais importantes para as plantas e também para os seres humanos desde que estejam dentro dos limites estabelecidos pelas agências reguladoras, o que pode ser verificado nos produtos à base de CBD.

A solubilização alcalina, empregando o reagente TMAH se mostrou uma interessante estratégia de preparo de amostras para a extração de espécies inorgânicas em amostras de óleos e produtos (medicamentos) à base de CBD. Este preparo foi possível devido a utilização do planejamento fatorial, que norteou os experimentos de acordo com os efeitos de cada variável e das interações entre elas, obtendo-se assim, uma condição de compromisso entre temperatura, concentração de TMAH e extração do analito.

Os resultados obtidos para as figuras de mérito avaliadas: LOD; LOQ, exatidão e precisão para os métodos analíticos de quantificação de Pb, As e Cd por GF AAS foram considerados satisfatórios, apresentando valores de exatidão em torno de 80 à 120 %, boa linearidade, baixos valores de LOD e LOQ e valores de RSD satisfatórios. Além do que o método desenvolvido por GF AAS apresentou adequada seletividade sendo possível empregar uma curva analítica de calibração externa facilitando a execução do método sem a necessidade de consumo de amostras ou mesmo do reagente TMAH. Isto só foi possível devido a uma cuidadosa otimização dos parâmetros instrumentais, Temperatura de Pirólise e de Atomização de cada analito.

As amostras preparadas por meio da solubilização alcalina e analisadas por GF AAS, apresentaram teores seguros de Pb, As e Cd, não ocasionando riscos à saúde humana. Como ainda hoje não há nenhum estudo relacionado ao tema desse trabalho, conclui-se que o presente trabalho se mostrou promissor para um melhor conhecimento do perfil químico inorgânico desses novos fármacos, permitindo um monitoramento dos elementos químicos não essenciais, Pb, As e Cd.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas de estudo nas amostras extratos de CBD, sugere-se:

- Realizar uma varredura também por ICP-MS desses extratos para uma elucidação completa dos elementos que a compõe em nível $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} ;
- Analisar os extratos de CBD por ICP-MS para certificação dos teores de As encontrados pelo método proposto, bem como avaliar a possível presença de Pb e Cd nesses extratos;
- Avaliar o desempenho do ICP-MS quando utilizado o TMAH na etapa de preparo de amostras juntamente com radiação assistida por micro-ondas;
- Realizar estudos de bioacessibilidade para a avaliação da fração biodisponível dos elementos químicos essenciais como: Mn, Zn, Cu, entre outros. Esses estudos serão conduzidos em parceria com a profa. Solange Cadore, o qual dispõe de toda infraestrutura necessária para o seu desenvolvimento.

Visa-se a utilização do ICP-MS por ser a técnica com maior sensibilidade disponível no mercado até o presente momento, sendo capaz de quantificar elementos em concentrações ng L^{-1} (ppt)

REFERÊNCIAS

- ABDUL, G.; SAEED, S.; ALI, Z.; AHMADA, I.; ISHTIAQ, M. Heavy metals and nutritional composition of some selected herbal plants of Soon Valley, Khushab, Punjab, Pakistan. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 76, p. 14064–14068, 2012.
- ADRIANO, D.C. Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. 2ª Edição. Springer, New York, 2001.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopéia Brasileira. V. 1, 5ª Edição, Brasília, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf> acesso em: 16 de Julho de 2018.
- AGROLINK. **Nutrientes**. Disponível em : <https://www.agrolink.com.br/fertilizantes/nutrientes_361443.html> acesso em: 16 de julho de 2018.
- AHAMED, M.; SIDDIQUI, M. K. J. Environmental lead toxicity and nutritional factors. **Clinical Nutrition**, v. 26, n. 4, p. 400–408, 2007.
- ANDRADE, S. A. L. de; JORGE, R. A.; SILVEIRA, A. P. D. da. Cadmium effect on the association of jackbean (*Canavalia ensiformis*) and arbuscular mycorrhizal fungi. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 4, p. 389-394, 2005.
- ANGELOVA, V. IVANOVA, R.; DELIBALTOVA, V.; IVANOV, K. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). **Industrial Crops and Products**, v. 19, n. 3, p. 197–205, 2004.
- ARANHA, T.; OLIVEIRA, A.; QUEIROZ, H.; CADORE, S. A fast alkaline treatment for cadmium determination in meat samples. **Food Control**, v. 59, p. 447–453, 2016.
- ARCEUSZ, A.; RADECKA, I.; WESOLOWSKI, M. Identification of diversity in elements content in medicinal plants belonging to different plant families. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 52–58, 2010.
- ARPAJAN, S.; ÇELIK, G.; TAŞKESEN, S.; GUÇER, Ş. Arsenic, cadmium and lead in medicinal herbs and their fractionation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2871–2875, 2008.

BARELA, P. S.; SILVA, N.A.; PEREIRA, J.S.F.; MARQUES, J.C.; RODRIGUES, L.F.; MORAES, D.P. Microwave-assisted digestion using diluted nitric acid for further trace elements determination in biodiesel by SF-ICP-MS. **Fuel**, v. 204, p. 85–90, 2017.

BARTHWAL, J.; NAIR, S.; KAKKAR, P. Heavy metal accumulation in medicinal plants collected from environmentally different sites. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 21, n. 4, p. 319–324, 2008.

BERGAMASCHI, M. M. et al. Cannabidiol reduces the anxiety induced by simulated public speaking in treatment-naïve social phobia patients. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 6, p. 1219–1226, 2011.

BORGES, A. R.; BECKER, E.M.; DESSUY, M.B.; VALE, M.G.R.; WELZ, B. Investigation of chemical modifiers for the determination of lead in fertilizers and limestone using graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction and slurry sampling. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 92, p. 1–8, 2014.

BULSKA, E.; LIEBERT-ILKOWSKA, K.; HULANICKI, A. Optimization of electrochemical deposition of noble metals for permanent modification in graphite furnace atomic absorption spectrometry¹. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 53, n. 6–8, p. 1057–1062, 1998.

BURGDORF, J. R.; KILMER, B.; PACULA, R. L. Heterogeneity in the composition of marijuana seized in California. **Drug and Alcohol Dependence**, v. 117, n. 1, p. 59–61, 2011.

BURSTEIN, S. Cannabidiol (CBD) and its analogs: A review of their effects on inflammation. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 7, p. 1377–1385, 2015.

CHATUVERDI, I. Aspects os arsenic concentrations and forms on growth and arsenic uptake and accumulation by indian mustard (brassica juncea L.) genotypes. **Journal of Central European Agriculture**, v. 7, n. 1, 2006.

CAL-PRIETO, M. Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990 to 2000. **Talanta**, v. 56, n. 1, p. 1–51, 2002.

CAMPOS, N. S.; OLIVEIRA, M.A.L.; IZUMI, M.S.; SOUSA, R.A. Alkaline solubilization

of chicken tissues monitored by raman spectroscopy followed by Pb determination by GF AAS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 2, p. 353–362, 2018.

CANCIAN, N. Remédio à base maconha custará até R\$ 2.800 e deve chegar neste ano. Disponível em: <<https://www1.folha.uol.com.br/equilibrioesaude/2017/07/1901105-remedio-a-base-maconha-custara-ate-r-2800-e-deve-chegar-neste-ano.shtml>> Acesso em: 16 de julho de 2018.

CASTILHOS, D.; GUADAGNIN, C. Acúmulo de cromo e seus efeitos na fixação biológica de nitrogênio e absorção de nutrientes em soja. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 7, n. 2, p. 121–124, 2012.

CHATURVEDI, I.; CHATURVEDI, I. Effects of Arsenic Concentrations and Forms on Growth and Arsenic Uptake and Accumulation By Indian Mustard (Brassica Juncea L .) Genotypes. **Journal Central European Agriculture**, v. 7, n. 1, p. 31–40, 2006.

CHENG, H.; HU, Y. Lead (Pb) isotopic fingerprinting and its applications in lead pollution studies in China: A review. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 5, p. 1134–1146, 2010.

CORDEIRO PEDRAZZI, J. F.; PEREIRA, A.C.; GOMES, F.V.; DEL BEL, E. Perfil antipsicótico do canabidiol. **Medicina (Brazil)**, v. 47, n. 2, p. 112–119, 2014.

DE SOUZA CRIPPA, J. A. et al. Effects of Cannabidiol (CBD) on Regional Cerebral Blood Flow. **Neuropsychopharmacology**, v. 29, n. 2, p. 417–426, 2004.

DUKER, A. A.; CARRANZA, E. J. M.; HALE, M. Arsenic geochemistry and health. **Environment International**, v. 31, n. 5, p. 631–641, 2005.

EBOH, L. O.; THOMAS, B. E. **Analysis of Heavy Metal Content in Cannabis Leaf and Seed Cultivated in Southern Part Of Nigeria**, 2005.

Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ). Plant Nutrition 3: Micronutrients and Metals. Disponível em : <http://www.esalq.usp.br/lepse/imgs/conteudo_thumb/Plant-Nutrition-III-Micronutrients.pdf> acesso em: 16 de julho de 2018.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Arsenic in Food. EFSA Journal, 2009. Disponível em:

<<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2009.1351>> Acesso em: 16 de julho de 2018.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on lead in Food. *EFSA Journal*, 2010. Disponível em: <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2010.1570>> Acesso em: 16 de julho de 2018.

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on Cadmium in Food. *EFSA Journal*, 2009. Disponível em: <<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2009.980>> Acesso em: 16 de julho de 2018.

FARAG, S.; KAYSER, O. The Cannabis Plant: Botanical Aspects. Handbook of Cannabis and related Pathologies : Biology, Pharmacology, Diagnosis, and Treatment. 2016.

Food and Drug Administration (FDA). Q3D Elemental Impurities. U.S. Department of Health and Human Services. 2015. Disponível em: <<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm371025.pdf>> Acesso em: 16 de Julho de 2018.

SILVA, R. G. L.; WILLIE, S.N.; STURGEON, R.E.; SANTELLI, R.E.; SELLA, S.M. Alkaline solubilization of biological materials for trace element analysis by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst*, v. 124, n. 12, p. 1843–1846, 1999.

GARCÍA-LESTÓN, J.; MÉNDEZ, J.; PÁSARO, E.; LAFFON, B. Genotoxic effects of lead: An updated review. *Environment International*, v. 36, n. 6, p. 623–636, 2010.

GHISI, M.; CHAVES, E.S.; QUADROS, D.P.C.; MARQUES, E.P.; CURTIUS, A.J.; MARQUES, A.L.B. Simple method for the determination of Cu and Fe by electrothermal atomic absorption spectrometry in biodiesel treated with tetramethylammonium hydroxide. *Microchemical Journal*, v. 98, n. 1, p. 62–65, 2011.

GIACOMELLI, M.B.O.; LIMA, M.C.; STUPP, V.; JUNIOR, R.M.C.; SILVA, J.B.B; BARRERA, P.B. Determination of As , Cd , Pb and Se in DORM-1 dogfish muscle reference material using alkaline solubilization and electrothermal atomic absorption spectrometry with Ir q Rh as permanent modifiers or Pd q Mg in solution.

Spectrochimica Acta. v. 57, n. April, p. 2151–2157, 2002.

GOYER, R. A. Toxic and Essential Metal Interactions. **Annual Review of Nutrition**, v. 17, n. 1, p. 37–50, 1997.

HAJAR, E. W. I.; SULAIMAN, A. Z. BIN; SAKINAH, A. M. M. Assessment of Heavy Metals Tolerance in Leaves, Stems and Flowers of Stevia Rebaudiana Plant. **Procedia Environmental Sciences**, v. 20, p. 386–393, 2014.

HAZEKAMP, A.; FISCHEDICK, J.T.; DIEZ, M.L.; LUBBE, A; RUHAAK, R.L. Chemistry of Cannabis. Leiden University, Leiden, The Netherlands, 2010.

INMETRO - Coordenação Geral de Acreditação. ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS. DOQ-CGCRE-008. Disponível em : < http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf: Acesso em: 16 de Julho de 2018.

Internacional Agency for Research on Cancer (IARC). Lead [7439-92-1] and Lead Compound, Inorganic. IARC Monographs, v. 23, n. 7, 1987.

Internacional Agency for Research on Cancer (IARC). Cadmium and cadmium compounds. Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. IARC Monograph on Evaluation of Carcinogenesis Risks in Human, p. 41–117, 1993.

Internacional Agency for Research on Cancer (IARC). Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. IARC Monograph on Evaluation of Carcinogenesis Risks in Human v. 84, p. 1-477, 2004.

IZZO, A. A.; BORRELI, F.; CAPASSO, R.; DI MARZO, V.; MECHOULAM, R. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 30, n. 10, p. 515–527, 2009.

JAEGER, W.; BENET, L. Z.; BORNHEIM, L. M. Inhibition of cyclosporine and tetrahydrocannabinol metabolism by cannabidiol in mouse and human microsomes. **Xenobiotica**, v. 26, n. 3, p. 275–284, 1996.

JOHNSON, F. M. The genetic effects of environmental lead. **Mutation research**, v. 410, n. 2, p. 123–140, 1998.

JOSEPH, P. Mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 238, n. 3, p. 272–279, 2009.

JURANOVIĆ CINDRIĆ, I.; ZEINER, M.; KRPETIC, M.; STINGEDER, G. ICP-AES determination of minor and major elements in Cornelian cherry (*Cornus mas* L.) after microwave assisted digestion. **Microchemical Journal**, v. 105, p. 72–76, 2012.

JURANOVIĆ CINDRIĆ, I.; ZEINER, M.; GLAMUZINA, E.; STINGEDER, G. Elemental characterisation of the medical herbs *Salvia officinalis* L. and *Teucrium montanum* L. grown in Croatia. **Microchemical Journal**, v. 107, p. 185–189, 2013.

KAPLAN, E. H.; OFFERMANN, E.A.; SIEVERS, J.W.; COMI, A.M. Cannabidiol Treatment for Refractory Seizures in Sturge-Weber Syndrome. **Pediatric Neurology**, v. 71, p. 18–23, 2017.

KARNIOL, I. G.; SHIRAKAWA, I.; KASINSKI, N.; PFEFERMAN, A.; CARLINI, E.A. Cannabidiol interferes with the effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol in man. **European Journal of Pharmacology**, v. 28, n. 1, p. 172–177, 1974.

KHAN, Z.I. et al. Toxic and some essential metals in medicinal plants used in herbal medicines: A case study in Pakistan. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 21, p. 1389–1395, 2013.

KORKMAZ, K.; KARA, S.M.; OZKUTLU, F.; GUL, V. Monitoring of heavy metals and selected micronutrients in hempseeds from North-western Turkey. **African Journal of Agricultural Research**, v. 5, n. 6, p. 463–467, 2010.

KRUG, F.J.; NÓBREGA, J.A.; OLIVEIRA, P.V. Espectrometria de Absorção Atômica, Parte 2: Atomização eletrotérmica em forno de grafite. 2007.

LEGHISSA, A.; HILDENBRAND, Z. L.; SCHUG, K. A. A review of methods for the chemical characterization of cannabis natural products. **Journal of Separation Science**, v. 41, n. 1, p. 398–415, 2018.

LEITE, A. J. B. **Emprego de modificadores químicos permanentes para a determinação de cádmio e chumbo em amostras de água**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, 2010.

LOBO, F. A. **Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de Cd, Cu, Ni e Pb em biodiesel por espectrometria de absorção atômica em forno de**

grafite. Tese de Doutorado. UNESP, Araraquara, 2009.

LÓPEZ-GARCÍA, I.; BRICEÑO, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Non-chromatographic screening procedure for arsenic speciation analysis in fish-based baby foods by using electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, n. 1, p. 11–17, 2011.

LORENZETTI, V.; SOLOWIJ, N.; YÜCEL, M. The role of cannabinoids in neuroanatomic alterations in cannabis users. **Biological Psychiatry**, v. 79, n. 7, p. e17–e31, 2016.

LOSER, C.; ZEHNSDORF, A.; FUSSY, M.; STARK, H. Conditioning of Heavy Metal-Polluted River Sediment by Cannabis sativa L. **International Journal of Phytoremediation**. v.4, n. 1, p. 27–45, 2002.

MADEJÓN, P.; LEPP, N.W. Arsenic in soils and plants of woodland regenerated on an arsenic-contaminated substrate: A sustainable natural remediation. **Sci. Tot. Environ.** v. 379, p. 256–262, 2007

MAGHRABI, I. A. Determination of some mineral and heavy metals in Saudi Arabia popular herbal drugs using modern techniques, **Afr. J. Pharm. Pharmacol.** v. 8, p. 1000-1005, 2014.

MANDAL, B. K.; SUZUKI, K. T. Arsenic round the world: a review. **Talanta**, v. 58, p. 201, 2002.

MATOS, R. L. A.; SPINOLA, L.A; BARBOZA, L.L.; GARCIA, D.R.; FRANÇA, T.C.C.; AFFONSO, R.S. O uso do canabidiol no tratamento da epilepsia. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 786–814, 2017.

MECHOULAM, R.; GAONI, Y. Hashish—IV. The Isolation and Structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. **Tetrahedron**, v. 21, n. 5, p. 1223–1229, 1965.

MECHOULAM, R.; HANUŠ, L. Cannabidiol: An overview of some chemical and pharmacological aspects. Part I: Chemical aspects. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 121, n. 1–2, p. 35–43, 2002.

MURTHY, L.; MENDEN, E.; ELLER, P.M.; PETERING, H.G. Atomic Absorption Determination of zinc, copper, cadmium, and lead in tissues solubilized by aqueous

tetramethylammonium hydroxide. **Analytical Biochemistry**. v. 372, n. 53, p. 365–372, 1973.

MERLINO, L. C. S. **Disponibilidade de bário para plantas de sorgo cultivadas em solo contaminado com o elemento**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2013.

Ministério da Saúde, MS. Substâncias da maconha. Disponível em: <<http://www.saude.ms.gov.br/2015/01/27/substancias-da-maconha/>> Acesso em: 16 de Julho de 2018.

MITEVA, E.; MERAKCHIYSKA, M. Response of chloroplasts and photosynthetic mechanism of bean plants to excess arsenic in soil. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**. v. 8, p. 151–156, 2002.

MORENO, R. G. M.; OLIVEIRA, E.; OLIVEIRA, P.V.; PEDROTTI, J.J. UMA CÉLULA ELETROQUÍMICA DE FLUXO PARA MODIFICAÇÃO PERMANENTE DE TUBO DE GRAFITE EMPREGADO EM ABSORÇÃO ATÔMICA. **Química Nova**. v. 24, n. 3, p. 404–407, 2001.

FARIA, L.A; KARP, F.H.S. Selênio: um elemento essencial ao homem e aos animais e benéfico às plantas. **Horticultura brasileira**, v. 149, n. 12, p. 17–22, 2015.

NDIOKWERE, C. L. A Study of Heavy Metal Pollution from Motor Vehicle Emissions and Its Effect on Roadside Soil, Vegetation and Crops in Nigeria. **Environmental Pollution**. v. 7, p. 35–42, 1984.

NETO, B.; SCARMINIO, I.; BRUNS, R. Como fazer experimentos: Pesquisas e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria. 4ª Edição. Campinas, São Paulo, Editora Unicamp. 2010.

NÓBREGA, J. A.; SANTOS, M.C.; DE SOUSA, R.A.; CADORE, S.; BARNES, R.M.; TATRO, M. Sample preparation in alkaline media. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 61, n. 5, p. 465–495, 2006.

NOGUEIRA, A. R. DE A. Preparo de amostras. **VIII Encontro Nacional sobre métodos de laboratório Embrapa**, p. 20, 2003.

O GLOBO. Primeiro remédio à base de cannabis é registrado no Brasil. Disponível em: <<https://oglobo.globo.com/sociedade/saude/primeiro-remedio-base-de-cannabis-registrado-no-brasil-20780882#ixzz5LQ5l8Ao2>> Acesso em: 16 de julho de 2018

OLIVEIRA, E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 174–182, 2003.

OLIVEIRA, J. A.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M. A.; JORDÃO, C. P. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de salvinia e aguapé. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 13, n. 3, p. 329-341, 2001.

ORESTE, E. Q.; DE OLIVEIRA, R.M.; NUNES, A.M.; VIEIRA, M.A.; RIBEIRO, A.S. Sample preparation methods for determination of Cd, Pb and Sn in meat samples by GFAAS: use of acid digestion associated with a cold finger apparatus versus solubilization methods. **Analytical Methods**, v. 5, n. 6, p. 1590, 2013.

PELZ, M. C.; SCHOOLCRAFT, K.D.; LARSON, C.; SPRING, M.G.; LOPEZ, H.H. Assessing the role of serotonergic receptors in cannabidiol's anticonvulsant efficacy. **Epilepsy and Behavior**, v. 73, p. 111–118, 2017.

PILON-SMITS, E.A.H.; ZHU, Y.L.; SEARS, T.; TERRY, N. Overexpression of glutathione reductase in Brassica juncea: effects on cadmium accumulation and tolerance. **Physiologia Plantarum**, v.110, p.455-460, 2000.

PIOTROWSKA-CYPLIK, A.; CZARNECKI, Z. Phytoextraction of heavy metals by hemp during anaerobic sewage sludge management in the non-industrial sites. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 12, n. 6, p. 779–784, 2003.

PISANTI, S. et al. Cannabidiol: State of the art and new challenges for therapeutic applications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 175, p. 133–150, 2017.

POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; CURTIUS, A. J. Determination of trace elements in biological materials by ETV-ICP-MS after dissolution or slurry formation with tetramethylammonium hydroxide. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 13, n. 10, p. 1101–1105, 1998.

POZEBON, D.; DRESSLER, V. L.; KEMIECIKI, G. A.; MARTINS, P. Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation. **Analytica Chimica Acta**. v. 470, p. 195–204, 2002.

RAŽIĆ, S. S.; DOGO, S. M.; SLAVKOVIĆ, L. J. Multivariate characterization of herbal drugs and rhizosphere soil samples according to their metallic content. **Microchemical Journal**, v. 84, n. 1–2, p. 93–101, 2006.

RIBEIRO, A. S.; CURTIUS, A. J.; POZEBON, D. Determination of As, Cd, Ni and Pb in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide. **Microchemical Journal**, v. 64, n. 1, p. 105–110, 2000.

RONG, C. et al. Cannabidiol in medical marijuana: Research vistas and potential opportunities. **Pharmacological Research**, v. 121, p. 213–218, 2017.

SHARMA, P. ; DUBEY, R.S. Lead toxicity in plants. Toxic Metals in Plants. **Brazilian Journal Plant Physiol.** v.17, n. 1, p. 35-52, 2005.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1351-1365, 2002.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; SCHWANZ, P.; TEICHMANN, T.; GROSS, K.; LANGENFELD- HEYSER, R.; GODBOLD, D. L.; POLLE, A. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**, v. 127, p. 887-898, 2001.

S, U.; MEAD, A.; LL, J. D. M. Epilepsy & Behavior The legal status of cannabis (marijuana) and cannabidiol (CBD) under. **Epilepsy & Behavior**, v. 70, p. 288–291, 2017.

STOEVA, N.; BINEVA, T. Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in As- contaminated soil. **Bulg. J. Plant Phphysiol.** v. 29, n. 1-2, p. 87-95, 2003.

SAVIO, M. et al. Multielemental analysis in vegetable edible oils by inductively coupled plasma mass spectrometry after solubilisation with tetramethylammonium hydroxide. **Food Chemistry**, v. 159, p. 433–438, 2014.

SINGH, M.; MAMANIA, D.; SHINDE, V. The scope of hemp (Cannabis sativa L.) use in historical conservation in india. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 17, n. 2, p. 314–321, 2018.

SMALL, E. **Cannabis: A Complete Guide**. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2016.

SOUSA, R. A. DE.; CAMPOS, N. DA S.; ORLANDO, R. **Preparação de amostras para Análise Elementar**. Apostila de Apoio. Instituto de Ciências Exatas. Universidade Federal de Juiz de Fora.

THE EUROPEAN COMMUNITIES. implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, COMMISSION DECISION of 12 August 2002. Disponível em : < http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf: Acesso em: 16 de Julho de 2018.

THOMSEN, V.; SCHATZLEIN, D.; MERCURO, D. Limits of Detection in Spectroscopy. **Pure and Applied Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 112–114, 2003.

TSALEV, D. L.; SLAVEYKOVA, V.I. Chemical Modification in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. Organization and Classification of Data by Multivariate Methods. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 7, p. 147–153, 1992.

UCHIDA, T.; ISOYAMA, H.; YAMADA, K.; OGUCHI, K.; NAKAGAWA, G. Determination of twelve elements in botanical samples with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after leaching with tetramethylammonium hydroxide and ethylenediaminetetraacetic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 256, n. 2, p. 277–284, 1992.

UPADHYA, D.; CASTRO, O.W.; UPADHYA, R.; SHETTY, A.K. Prospects of Cannabidiol for Easing Status Epilepticus-Induced Epileptogenesis and Related Comorbidities. **Molecular Neurobiology**; v. 55, n. 8, p. 6956 - 6964, 2018.

VAN BEIK, J.; KOSERA, V.S.; DE MARANHÃO, T.A.; CHAVES, E.S. Alkaline solubilization and ultrasound assisted extraction for Cr and Pb determination in leather by atomic absorption spectrometry. **Anal. Methods**, v. 9, n. 22, p. 3284–3289, 2017.

VIRGILIO, A.; AMAIS, R.S.; SCHIAVO, D.; GOMES, J.A.; NÓBREGA, N.; NÓBREGA, J.A. Elemental Analysis of Phytotherapeutic Products by Inductively Coupled Plasma – Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Letters**, v. 50, n. 5 , p. 842 - 852, 2017.

WELZ, B.; SCHLEMMER, G.; MUDAKAVI, J. R. Palladium Nitrate-Magnesium Nitrate Modifier for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Part 5.* Performance for

the Determination of 21 Elements. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 7, n. 3, p. 1257–1271, 1992.

WELZ, B.; SPERLING, M. Atomic Absorption Spectrometry. 3ª Edição, Alemanha. Editora WILEY-VCH, 1999.

World Health Organization, (WHO). Expert Committee on Drug Dependence. 39th, November 2017. Disponível em : < http://www.who.int/medicines/access/controlled-substances/5.2_CBD.pdf> Acesso em: 16 de Julho de 2018.

ZEINER, M.; JURANOVIĆ CINDRIĆ, I. Review-trace determination of potentially toxic elements in (medicinal) plant materials. **Analytical Methods**, v. 9, n. 10, p. 1550 - 1574, 2017.

ZEINER, M.; BURMAA, D.; STEFFAN, I. Optimization of microwave assisted digestion of synchysite ore prior to ICP-AES determination of rare earth elements. **Int. Rev. Chem. Eng.**, v.2, p. 251–255, 2002

ZERIHUN, A.; CHANDRAVANSI, B.S.; DEBEBE, A.; MEHARI, B. Levels of selected metals in leaves of Cannabis sativa L. cultivated in Ethiopia. **SpringerPlus**, v. 4, n. 359, p. 1 - 10, 2015.

ZHOU, Y.; WANG, S.; LOU, H.; FAN, P. Chemical constituents of hemp (Cannabis sativa L.) seed with potential anti-neuroinflammatory activity. **Phytochemistry Letters**, v. 23, n. November 2017, p. 57–61, 2018.

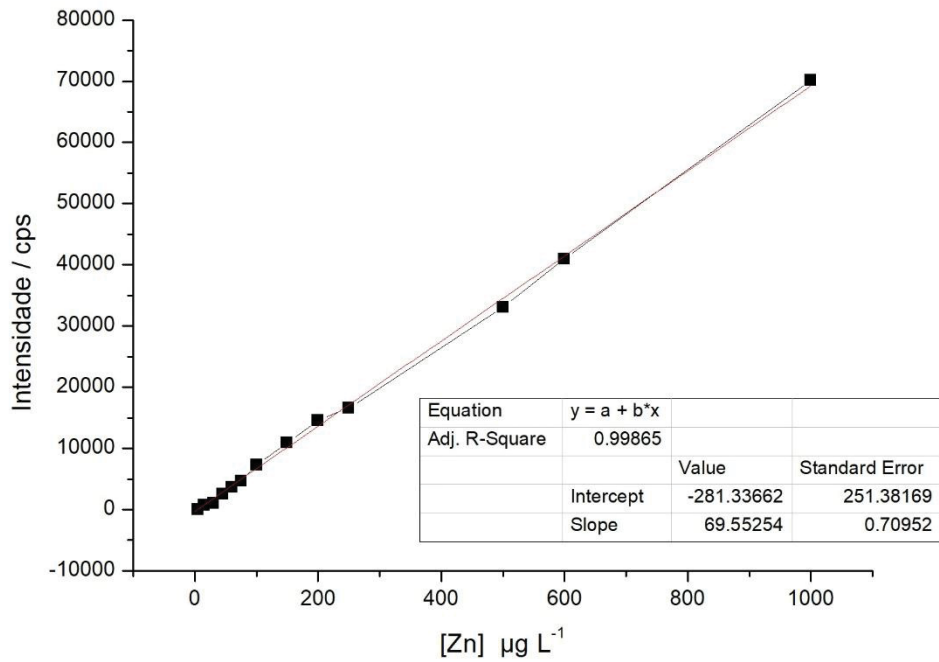
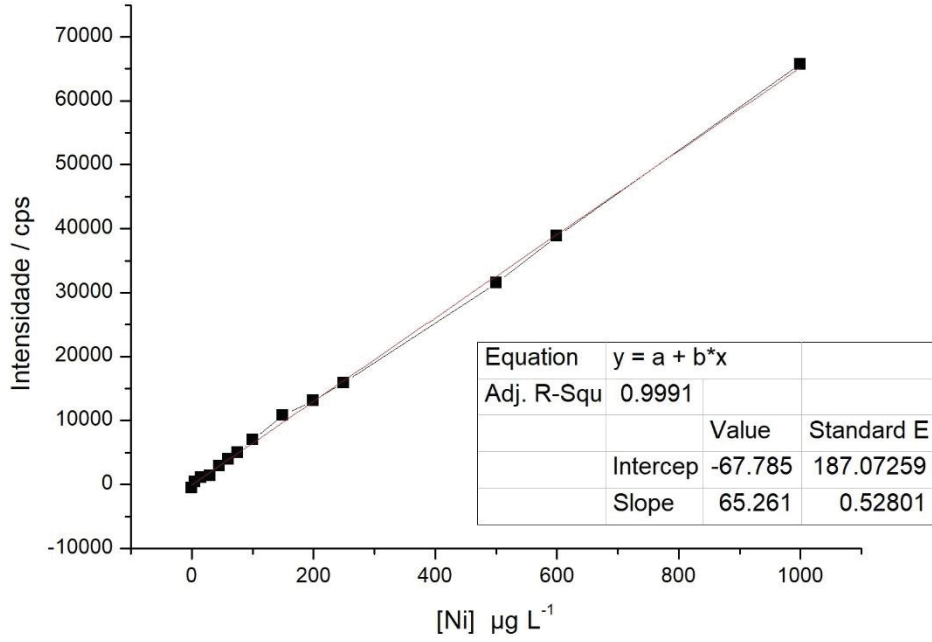
ZUARDI, A.W.; CRIPPA, J.A.S.; HALLAK, J.E.C.; MOREIRA, F.A.; GUIMARÃES, F.S. Constituent, As an Antipsychotic Drug. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 39, n. 4, p. 421–429, 2006.

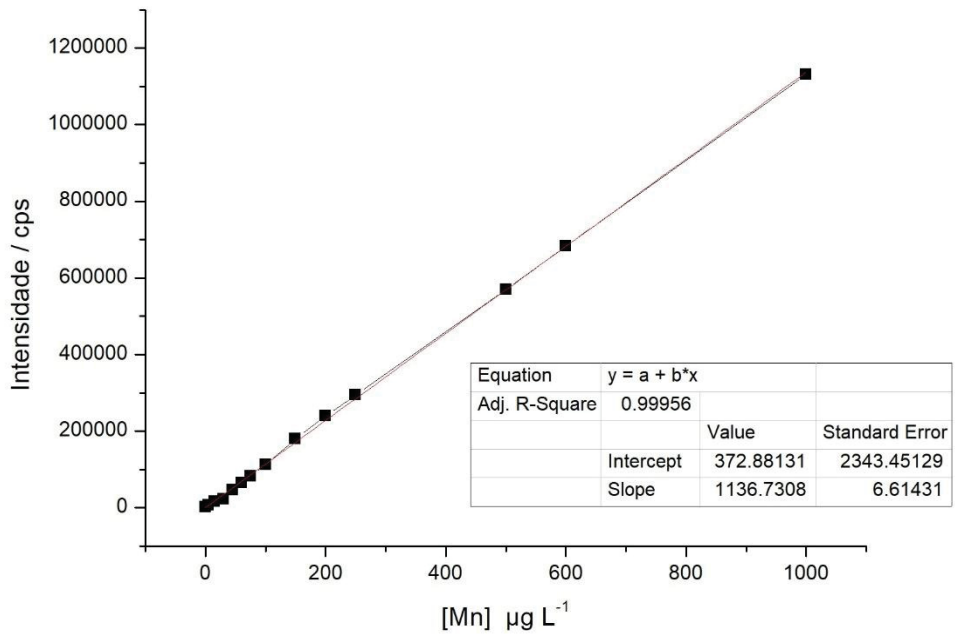
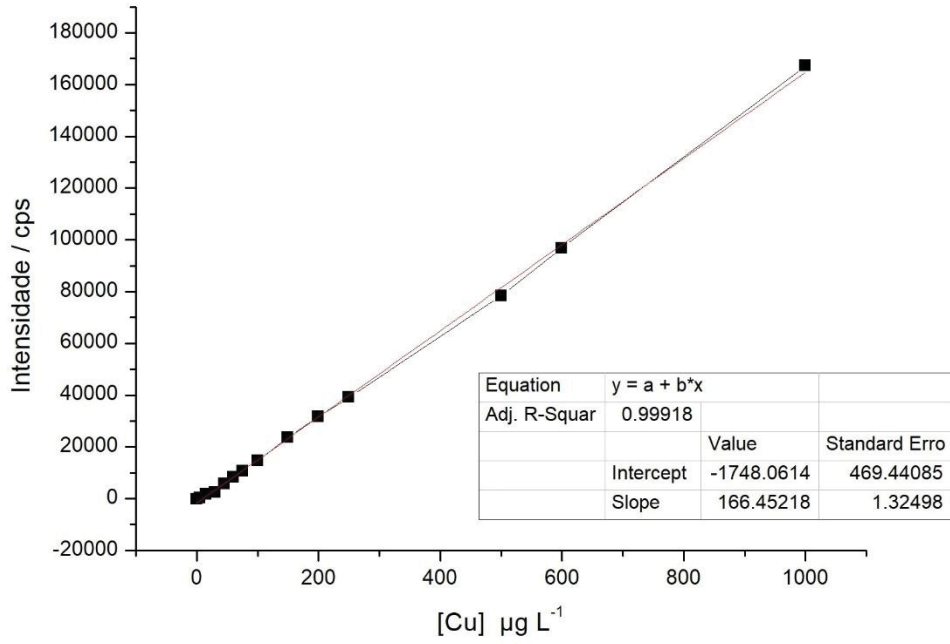
ZUARDI, A. W. History of cannabis as a medicine : a review História da cannabis como medicamento : uma revisão. **Revista Brasil Psiquiatria**, v. 28, n. 2, p. 153–157, 2006.

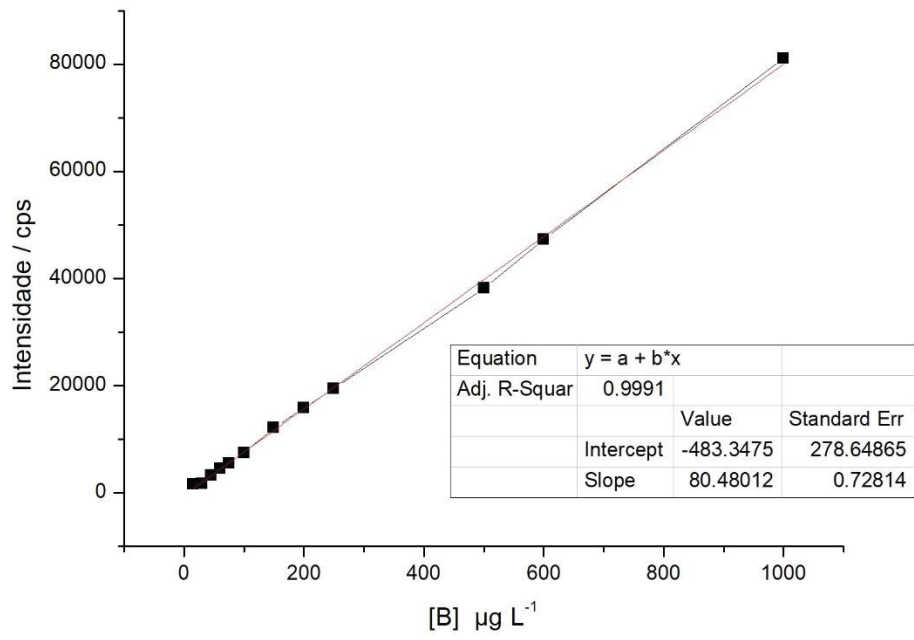
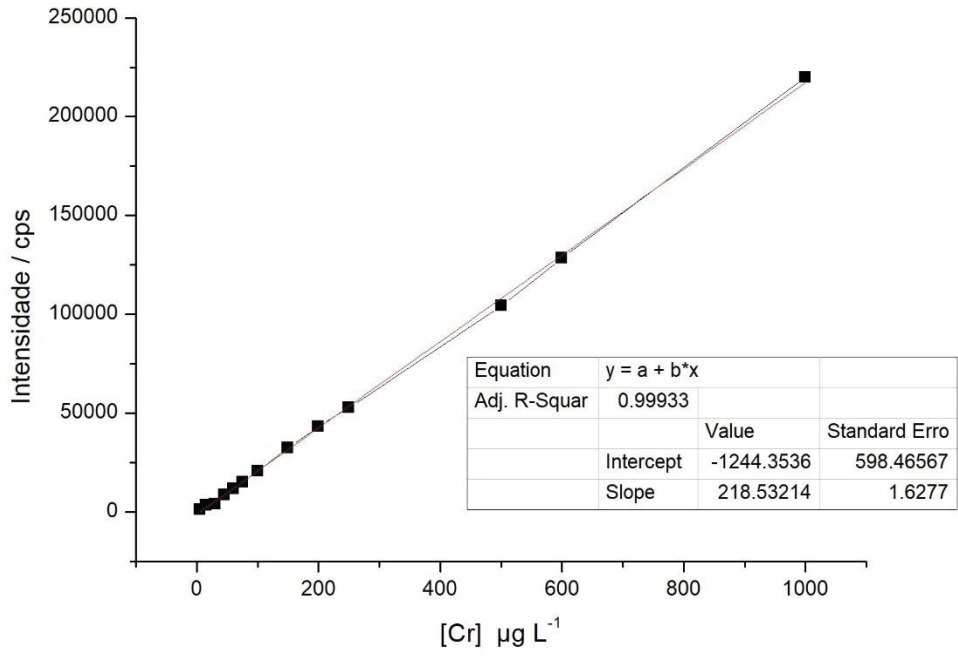
ZUARDI, A. W. Cannabidiol: from an inactive cannabinoid to a drug with wide spectrum of action Canabidiol : de um canabinóide inativo a uma droga com amplo espectro de ação. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 30, n. 3, p. 271–280, 2008.

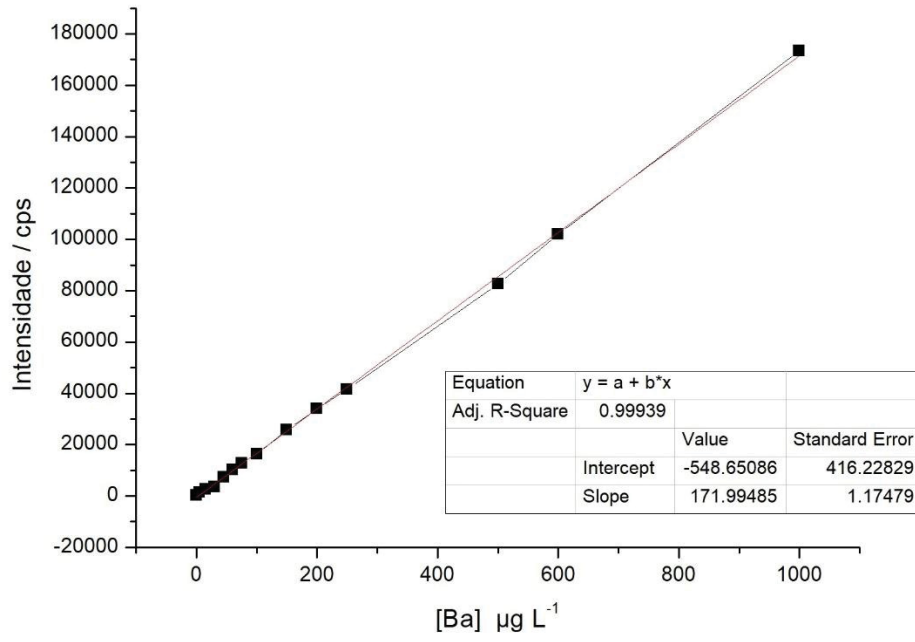
ANEXO 1

(Curvas de Calibração Analítica por ICP OES)





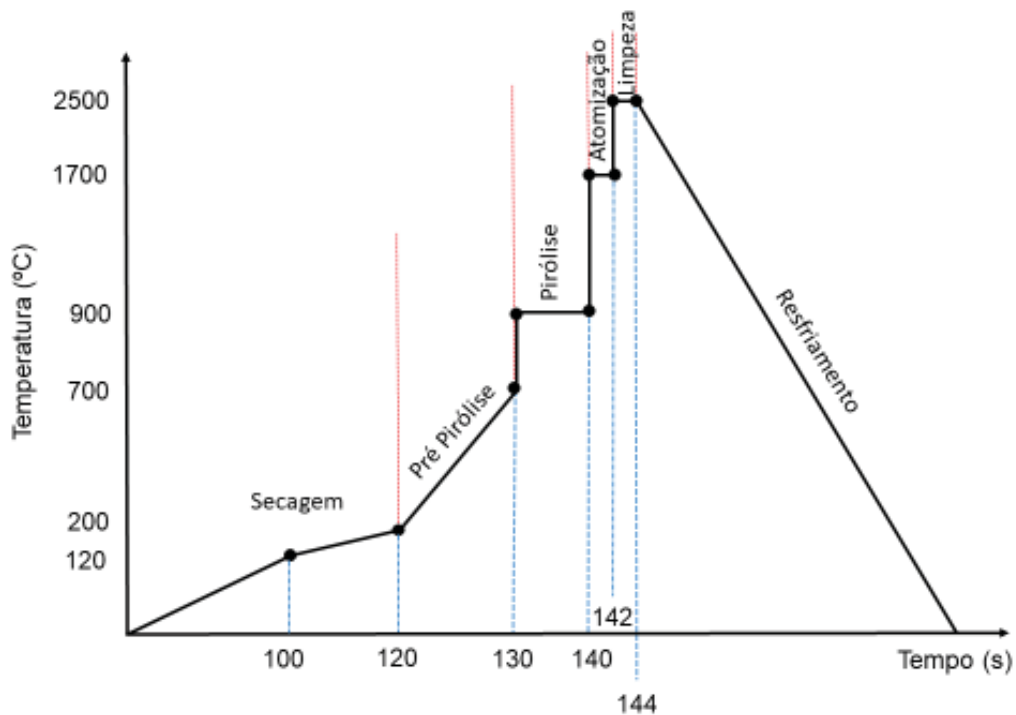




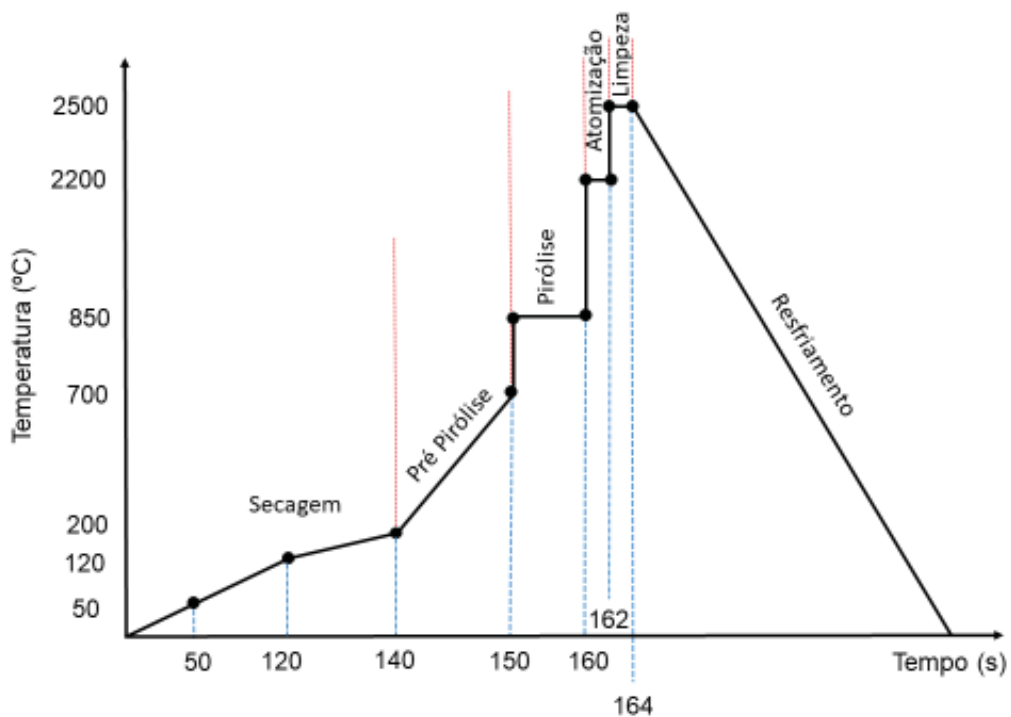
ANEXO 2

(Programas de Aquecimento desenvolvidos no GF AAS)

PROGRAMA DE AQUECIMENTO DESENVOLVIDO NO GF AAS PARA A DETERMINAÇÃO DE Pb NAS SUSPENSÕES OBTIDAS DOS EXTRATOS DE CBD EM MEIO ALCALINO (TMAH 0,1% m/v).



PROGRAMA DE AQUECIMENTO DESENVOLVIDO NO GF AAS PARA A DETERMINAÇÃO DE As NAS SUSPENSÕES OBTIDAS DOS EXTRATOS DE CBD EM MEIO ALCALINO (TMAH 0,1% m/v).



PROGRAMA DE AQUECIMENTO DESENVOLVIDO NO GF AAS PARA A DETERMINAÇÃO DE Cd NAS SUSPENSÕES OBTIDAS DOS EXTRATOS DE CBD EM MEIO ALCALINO (TMAH 0,1% m/v).

