



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
CURSO DE FARMÁCIA

SAUL RUAN FELICIANO RODRIGUES

DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE NITRATO EM
DROGAS VEGETAIS COMERCIALIZADAS PARA USO EM CHÁS

FORTALEZA

2015

SAUL RUAN FELICIANO RODRIGUES

**DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE NITRATO EM
DROGAS VEGETAIS COMERCIALIZADAS PARA USO EM CHÁS**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Farmacêutico (a).

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Janete Eliza Soares de Lima.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- R616d Rodrigues, Saul Ruan Feliciano.
 Determinação dos teores de nitrato em drogas vegetais comercializadas para uso em chás./ Saul Ruan Feliciano Rodrigues. – 2015.
 31 f.: il. color.
- Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Departamento de Farmácia, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2015.
 Orientação: Profa. Dra. Janete Eliza Soares de Lima.
1. Plantas Medicinais. 2. Bebidas. 3. Espectrofotometria. 4. Metemoglobinemia. I. Título.

CDD 615.32

SAUL RUAN FELICIANO RODRIGUES

**DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE NITRATO EM
DROGAS VEGETAIS COMERCIALIZADAS PARA USO EM CHÁS**

Monografia apresentada ao Curso de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Farmacêutico (a).

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Janete Eliza de Sá Soares (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Teresa Maria de Jesus Ponte Carvalho

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ma. Gabrieli da Penha Bezerra

Universidade Federal do Ceará

Aos que me amam e aos que me amaram com coragem.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por poder amar mais a cada dia.

A Mainha e Papai, porque eles são loucos por mim, e eu mais ainda por eles. Porque eu nunca vou conseguir entender o tamanho desse amor, então só posso agradecer por ele existir e por poder me emocionar sempre que escuto uma música que eu sei que eles gostam muito e ficam felizes quando escutam. “Eu sou o caso deles, sou eu que esquento a vida deles, no fundo, no fundo, coloco os velhos no mundo, boto na realidade, mostro a eternidade, senão eles pensavam que tudo era divino maravilhoso.” (Galvão&Moreira, 1974). Amo vocês de uma forma que nem sei.

A minha irmã Sâmia (Samita, amor da minha vida)! Eu passei muito tempo olhando pra essa página e só conseguia imaginar que quero meus filhos conversando muito com a tia deles, aprendendo a ouvir o que ela fala. Que eu tenho que dizer a eles que a tia deles é uma das pessoas que o pai deles mais ama na vida. Quero agradecer por ter me dado a melhor notícia da minha vida até então. Quando eu soube que ia ser tio, verdadeiramente achei que meu peito ia explodir de felicidade. Te amo muito, Samita, cara de cabrita!

A minhas avós, por serem mulheres admiráveis. Por me ajudarem a entender o que amor de vó significa. Muito obrigado Mamãe, loira gata mais linda da minha vida e vovó, morena mais gata desse mundo todo. Amo muito vocês.

À minha para sempre amada tia Maria “de Zamô”, que era só amor e determinação, que era a personificação da palavra família, que era minha titia que me ligava aos gritos no telefone, que me fazia gargalhar de felicidade só de estar perto dela. Muito obrigado por ter feito parte da minha vida! Te amo!

À minha tia Vandilma, minha coisinha linda de olhinhos apertados. Por ser essa tia linda e amada sempre com um abraço pronto pra esse sobrinho lindo que ela tem. Te amo!

Ao meu eterno vô Gumerindo, por desde pequeno me olhar com um olhar de amor e confiança. Por ter amado minha família de forma única.

A todos os meus primos queridos, em especial Laura e Luana, por estarem sempre por perto transmitindo esse amorzinho gostosinho que só elas tem.

À Edionara, por ser mais que minha companheira, por ter um laço fraternal de vida que nos faz ser mais que simplesmente amigos. O que já vivemos não cabe no lattes. Te amo!

Ao Rômulo Roberto, por ser o amigo mais cavalheiro e educado que eu tenho e por me permitir viver muitas coisas ao seu lado. Te amo!

Ao Diego, por ter me permitido sentir um sentimento de irmandade mais que especial. Por ter que aceitado em sua vida pra realmente fazer parte dela. Te amo muito, nunca saia de perto de mim.

Ao Victor, por ser uma das pessoas mais lindas e iluminadas desse mundo, de coração limpo e tranquilo. Te amo muito, amigo! Muito obrigado por tudo que já vivemos juntos, que nossa amizade dure mais 100 anos.

À Cinthia, por ser minha gatinha loira do tempo da catequese. Se a gente imaginasse tudo que a gente viveria depois daquilo tudo, nós teríamos começado a viver antes. Te amo!

À Simone, por ser minha “amada amiga”, por ser minha de verdade, de alguma forma. Juntos, temos os melhores planos, um dia, traçaremos um plano e dominaremos a humanidade. Te amo muito, nêga!

À Tamery, Gustavo, Priscila, Lucélia, Amanda, Denise, Ítalo, Wanderson, Pierre, Denis, Jan, Sofia, Karla, por sermos, mesmo que muitas vezes de longe, amigos na fé. Por desejarmos, sempre, uns aos outros muito amor e sucesso. Amo todos vocês. Muito Obrigado!

À Gionanna, por ser minha amiga linda e por ter embarcado junto comigo em várias jornadas desde o início. Te amo! Muito obrigado!

Ao Joaquim, meu amigo de mil anos, que mesmo morando longe, nunca estivemos longe um do outro. Te amo muito, amigo!

Ao Claytinho lindo, o João Paulo lindo, a Flávia linda, a Isabelle linda e Júnior Andrade lindo, ao Rangel lindo por estarem nas mais incríveis aventuras dessas noites alencarinhas. É nós, galera! Amo vocês!

A minha turma da faculdade, nada teria sido igual sem vocês. De fato, a melhor turma de todas! Em especial a Diego (de novo), Virgínia, Lívia, Danilo, Richard, Ravena, Larissa, Luri, Fabrício, muito obrigado por tudo que vivemos juntos durante esses anos de UFC.

Aos meus amigos do “Lizi da Dislexia”, Bia, Jota, Diego (mais uma vez), Lizi, Victor, Mariana, Elizama e Manel. Como eu sempre digo: “galera, é nós aqui”. Amo vocês.

À Vérica e Jani por fazerem parte de toda essa história, ao Deivim por ter me dado um pedaço delas e também ter sido parte de tudo. Muito obrigado! Amo vocês.

Aos meus queridos e para sempre amados companheiros e amigos do Centro Acadêmico Rodolfo Teófilo, lugar que me formou para além da Universidade. Muito obrigado ao universo por ter feito parte dessa história. Muito obrigado a todos: Raony, Diego (Aff, tá em tudo), Mariana, Pedro, Davi, Thyago, Alessandra, Virna, Yuri, Fábio, Bruno, Levi, Camila e todos os outros membros que fizeram parte desses tempos de ouro. Amo vocês.

Aos meus companheiros e amigos do Movimento Estudantil de Farmácia, por tudo que me trouxeram de bom e todas as lições de vida que me deram. Em especial à Jéssica Hora, coisa pra eu amar demais, Ruth Rodrigues, , priminha linda, Fernando Henrique, que é só amor e aos membros do CAF-SE, em especial, Laura, galega linda da minha via e Emily, nêga do meu

coração, à galera do CAF-UFPR, Anica, Muka, Dag, Jhenni, Lu, Priscylla, Leozinho, Letícia, e a todos os outros que o MEF me fez amar.

Aos meus amigos “trigo”, pois o joio não passará: Joana, Jade e Matheus, por serem lindos por dentro e por fora e por me permitirem fazer parte da história de cada um . Amo vocês.

À professora Janete, por acima de tudo me passar uma energia boa e limpa. Por sempre me cobrar as coisas em um tom de ensinamento muito amoroso. Me pergunto até hoje como não nos encontramos antes. Muito obrigado!

À professora Teresa, por sempre estar disposta a ajudar e sempre estar preocupada com o bem estar de todos. Pessoa realmente admirável! Foi um prazer conhecê-la mais de perto. Muito obrigado!

Ao meu companheiro de bancada, Paulo George, pela sua dedicação e apoio durante todo esse processo de aprendizado no laboratório e por me suportar até quando eu chegava pra trabalhar sem paciência. Muito Obrigado por tudo!

À Mestre Gabrieli Bezerra, por aceitar fazer parte da banca de avaliação do meu trabalho. Por ser alguém a contribuir com muita competência com o trabalho desenvolvido, fazendo jus à profissão farmacêutica. Muito obrigado!

À professora Nirla, por ser um exemplo de sabedoria e por saber dizer as palavras certas nas horas certas. Muito Obrigado!

À professora Juvênia, por ser uma pessoa incrivelmente amável! Por me fazer acreditar, por várias vezes, que uma relação aluno/professor pode ser construída com muito amor e carinho! Muito obrigado!

Ao professor everardo, por ser um homem de alma limpa e cheio de amor pra dar. Muito obrigado por cada abraço nos corredores da Universidade!

A las chicas de la Universidad Nacional de La Plata: Janet, Luz, Lau, Fer, Mar y Victoria por mostrarme un mundo aparte de lo que he vivido, por darme el amor de una manera hermosa, gracias por todo, ustedes son parte de uno de los mejores momentos de mi vida. Las quiero mucho. Muchas Gracias!

A los chicos de La Pensión de Tita: Nico, Ezequiel, Joaquín, Angelo, Leo, Nahuel, Joly, Simon, Franco e Salvador. Pasamos los momentos más magicos de toda la America del Sur. Los quiero mucho. Muchas Gracias!

A todos que trocaram comigo, via gestos ou palavras, um pouco de luz e harmonia. Muitíssimo obrigado a todos!

“A esperança nunca será silenciada.”

Harvey Milk

RESUMO

O nitrato inorgânico pode estar presente naturalmente em alimentos, em especial, os de origem vegetal, captado, armazenado ou produzido pela planta para o uso em sua economia celular. No entanto, o nitrato inorgânico apresenta efeitos nocivos relacionados à sua redução, no próprio alimento ou após sua ingestão, a nitrito, e este, por sua vez, é o agente nitrosante, que reagindo com as aminas presentes do alimento, formará os compostos N-nitrosos, agentes carcinógenos. Considera-se também a formação de metemoglobina, a partir da oxidação do ferro do núcleo da heme por parte do nitrito, impedindo o transporte de oxigênio até as células do organismo. A metemoglobinemia assume uma importância para a população infantil de menos de 3 anos de idade, uma vez que nesta faixa etária tanto a sua hemoglobina é mais propensa a oxidações, quanto sua reversão é comprometida, levando a criança à hipóxia citotóxica. O interesse pela quantificação de nitrato em alimentos, portanto, pode permitir inferir sobre os riscos e benefícios de sua ingestão. A metodologia espectrofométrica empregada foi adaptada de CATALDO (1975), que se baseia na nitrificação do ácido salicílico pelo íon nitrato em meio ácido, gerando um composto chamado ácido 2-hidróxi-5-nitrobenzóico, que assume coloração característica amarela em meio alcalino, e foi validada nos parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e limite de quantificação. As amostras foram de drogas vegetais de uso em infusões caseiras, popularmente conhecidas como chás e comercializadas como produtos industrializados. O método mostrou-se linear (R^2) = 0,9994, preciso, quando utilizadas as concentrações mais baixa (10 µg/mL), intermediária (120 µg/mL) e mais alta (300 µg/mL), apresentando desvio padrão relativo 8,8%; 1,58% e 0,7%, respectivamente, para valores intraensaio e 17,9%; 4,25% e 4,04%, respectivamente, para valores interensaio, e exato, quando utilizadas as mesmas concentrações do teste de precisão, apresentando valores de exatidão 81,3%; 98,54% e 95,43%, respectivamente, para valores interensaio e 84,3%; 98,19% e 100,79%, respectivamente, para valores intraensaio. Os valores de concentração de nitrato encontrados nas amostras de chás industrializados de camomila, boldo do Chile, capim-cidreira, erva-doce e funcho (falsa erva-doce) de três marcas diferentes variaram de 52 a 203ppm. Estima-se que os resultados contribuirão para um maior conhecimento dos níveis de nitrato destes alimentos.

Palavras-Chave: Nitrato; Alimentos; Chás; Espectrofotometria.

ABSTRACT

The inorganic nitrate may be present naturally in foods, especially those of vegetable origin, captured, stored or produced by the plant for use in a mobile economy. However, the inorganic nitrate has adverse effects related to a reduction in food itself or after intake, to nitrite and this, in turn, is the nitrosating agent which reacts with the food amines present, form the compounds N -nitrous, carcinogens. It is also considered to methemoglobin formation from the oxidation of the heme iron core nitrite, preventing transport of oxygen to body cells. Methemoglobinemia is of importance for the child population of less than 3 years old, as this age group both your hemoglobin is more prone to oxidation, as its reversal is compromised, leading the child to cytotoxic hypoxia. The spectrophotometric method employed was adapted Cataldo (1975), which is based on nitrification of salicylic acid by nitrate ions in an acid medium, creating a compound called 2-hydroxy-5-nitrobenzoic acid, and was validated in linearity parameters, accuracy, accuracy and limit of quantification..Samples were vegetable drug use in homemade infusions, popularly known as teas. The method was linear ($R^2 = 0.9994$), accurate, when used to lower concentrations (10 ug / ml), intermediate (120 ug / ml) and higher (300 mg / ml), with standard deviation 8.8%; 1.58% and 0.7% respectively for intra-assay values and 17.9%; 4.25% and 4.04%, respectively, for interassay values, and accurate, when used in the same concentrations accuracy test, with 81.3% accuracy values; 98.54% and 95.43%, respectively to 84.3% and interassay values; 98.19% to 100.79% respectively for intra-assay values. The nitrate concentration values found in the samples of processed teas of chamomile, boldo Chile, lemongrass, fennel and false fennel of three different brands ranged from 52 to 203ppm. It is estimated that the results will contribute to a better understanding of nitrate levels of these foods.

Key words: Nitrate; Food; Spectrophotometry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 DESENHO DO ESTUDO	18
3.2 DESCRIÇÃO DO MÉTODO	19
3.3 REAGENTES E SOLUÇÕES	19
3.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES	19
3.5 EQUIPAMENTOS	19
3.6 AMOSTRAS	19
3.7 CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	20
3.8 VALIDAÇÃO	20
3.8.1 Linearidade	21
3.8.2 Precisão.....	21
3.8.3 Exatidão	22
3.8.4 Limite de Quantificação	22
3.9 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE UMIDADE E IMPUREZAS MACROSCÓPICAS DAS AMOSTRAS	23
3.10 PROCEDIMENTO DE ANÁLISE	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	25
4.1 VALIDAÇÃO.....	25
4.1.1 Linearidade	25
4.1.2 Precisão e Exatidão.....	26
4.1.3 Limite de Quantificação	27
4.2 DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE UMIDADE E IMPUREZAS MACROSCÓPICAS DAS AMOSTRAS	29
4.3 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE NITRATO NAS AMOS	29
5 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS	32

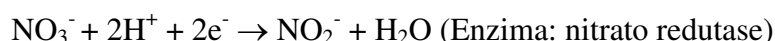
1 INTRODUÇÃO

O ser humano é, diariamente, exposto à presença de íons nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) através da ingestão de alimentos, água e em terapias com medicamentos que possuem a presença de tais íons. Geralmente, suas quantidades são pequenas, não apresentando efeito prejudicial à saúde humana e animal (MAYNARD, 1972). Porém, alguns alimentos possuem alto teor de nitrato, o que diminui sua qualidade nutricional devido aos compostos nocivos formados a partir de sua ingestão.

Algumas plantas acumulam NO_3^- em suas raízes e na parte aérea quando a absorção desse nutriente excede as necessidades metabólicas dessa (MAYNARD, 1976, a). De uma forma geral, o nitrogênio é o nutriente mais exigido pelas plantas, em alguns casos, superado pelo potássio. A absorção de nitrogênio pela planta se dá por diferentes formas, a principal delas, a mineral, através da absorção de NH_4^+ e NO_3^- . (FAQUIN, 2004)

Após absorver o nitrato, a planta deve convertê-lo em amônio para que possa ocorrer a assimilação do nitrogênio, para isso, as plantas desenvolveram um complexo enzimático que consegue reduzir nitrato a amônio em duas etapas (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Na primeira etapa para a conversão, o nitrato é reduzido a nitrito por meio da ação da enzima nitrato redutase, no citosol, com gasto de NADH e NADPH, a reação segue abaixo:



Na segunda e última etapa, o nitrito é reduzido a amônio por meio da ação da enzima nitrito redutase no cloroplasto. Essa redução é considerada um processo fotossintético em células fotossintéticas, pois consome poder redutor de forma direta do fluxo fotoquímico de elétrons, por meio da ferredoxina. Em tecidos aclorofilados ou quando no escuro, o poder redutor é gerado pela oxidação de carboidratos na via glicolítica e na respiração aeróbia. A reação de redução segue abaixo:



O íon nitrato deve estar diluído em água para que a planta o absorva, porém nem sempre as condições do solo são favoráveis para que ocorra essa absorção, em consequência disso, as plantas desenvolveram um mecanismo de armazenamento de substâncias necessárias para sobreviver. Em condições ambientais favoráveis, a planta absorve nitrato em quantidades

superiores as de sua capacidade de processamento, com isso, a plantas pode obter uma reserva para uma posterior utilização. (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Segundo Santamaria (2006), em geral, o teor de nitrato em diferentes partes de uma planta é (em ordem decrescente) pecíolo; folha; caule; raiz; inflorescência; tubérculo; lâmpada; frutas e semente.

Considerando os mais variados usos de plantas, estas podem ser utilizadas como matérias primas para a produção de medicamentos e, também, em práticas populares e tradicionais, como remédios caseiros e comunitários, a denominada medicina tradicional. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que grande parte da população dos países em desenvolvimento é dependente da medicina tradicional para sua atenção primária, e que 80% dessa população se utiliza de práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações obtidas a partir dessas (BRASIL, 2006).

Segundo Lucca *et al.* (2010), há um crescente aumento do consumo de plantas medicinais em todo o mundo. Isso se deve a vários fatores, como o elevado custo dos medicamentos industrializados, seus efeitos indesejáveis e um modismo, já que por diversas vezes, produtos de origem vegetal são vistos como milagrosos e isentos de efeitos colaterais. (MARREIRO; TEIXEIRA; SOUZA, 2010). Plantas medicinais são comumente utilizadas como chás, pois é um modo mais simples para o consumo da população, podem ser encontradas em feiras, ervanarias, mercados e farmácias.

A grande procura por plantas medicinais frente à baixa oferta faz com que esses produtos tenham sua qualidade comprometida, pois muitos dos produtores não têm informações suficientes acerca dos processos adequados para obtenção da matéria prima. (ZARONI, 2004). É importante destacar que a maioria dos chás comercializados no país estão registrados no Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAPA) como alimentos e não como medicamentos no Ministério da Saúde, dessa forma, não são submetidos às normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o que leva a uma fiscalização deficitária, pois não leva em consideração as propriedades terapêuticas desses produtos.

A RDC nº 27 / 2010 fixa a identidade e as características mínimas de qualidade dos chás e inclui esses produtos na lista de alimentos isentos da obrigatoriedade de registro sanitário. (BRASIL, 2010, a). A RDC nº 48/2004, que estabelece normas para o registro de fitoterápicos no Brasil, permite o registro como fitoterápico apenas para derivados de droga vegetal, produto da extração da matéria-prima vegetal. Com isso, drogas vegetais não são consideradas medicamentos. (BRASIL, 2010, b).

Os principais riscos associados à ingestão de alimentos de origem vegetal com altas concentrações de nitrato e nitrito são: a conversão de Fe^{2+} , presente na porção heme da hemoglobina, a Fe^{3+} , caracterizando a formação de meta-hemoglobina a partir da hemoglobina, gerando metemoglobinemia. Essa conversão impossibilita o transporte de oxigênio pelas hemácias e, conseqüentemente, sua difusão pelo organismo, causando anoxia e, conseqüentemente, podendo causar a morte. (FAQUIN, 2004). Outro risco associado à ingestão de alimentos de origem vegetal com altas concentrações de nitrato é a redução de NO_3^- a NO_2^- , devido ao fato de o NO_2^- reagir com aminas secundárias provenientes da dieta, formando compostos conhecidos como nitrosaminas, que são potentes carcinógenos, além de apresentarem ação teratogênica e mutagênica (MÍDIO; MARTINS, 2000).

Dados do Instituto Nacional do Câncer apontam que o elevado consumo de alimentos contendo nitrato ou a ingestão de água com elevados níveis desse íon tem relação com a incidência de câncer de estômago (INCA, 2011). No Brasil, a concentração de nitrato para consumo humano não deve exceder 10mg/L segundo o Conselho Nacional de Meio Ambiente (Brasil 1986) e o Ministério da Saúde (Brasil, 2001)

Os dados disponíveis no Brasil relacionados à exposição a nitrosaminas através de alimentos são escassos e ou incompletos (LAVALLOIS, 2000). Nos países em desenvolvimento e, em especial, na América Latina, não há uma legislação definida referente a nitrosaminas.

Frente a esses riscos, o comitê Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization (FAO/WHO) estabeleceu uma ingestão diária aceitável (IDA) de 0-0,07mg.Kg⁻¹ de peso corpóreo para nitrito e de 0-3, 7 mg Kg⁻¹ de peso corpóreo para nitrato (WHO, 2003).

A definição de IDA toma como base a quantidade de uma substância expressa em mg.Kg⁻¹ de peso corpóreo, que pode ser ingerida diariamente na alimentação, durante toda a vida, sem danos à saúde humana. Os valores da IDA são estabelecidos com base em informações toxicológicas disponíveis na época da avaliação e através de ensaios toxicológicos, a partir dos quais se estabelece um nível de dose sem efeito adverso observável (NOEL). Obtém-se o valor da IDA pela divisão do próprio valor por um fator arbitrário, que procura considerar a diferença de sensibilidade entre a espécie humana e espécies animais; a heterogeneidade da população humana e a possibilidade de sinergismo entre substâncias químicas (WHO, 1996).

A fim de melhor usufruir dos benefícios e minimizar os riscos relacionados a ingestão desses alimentos, comunidades científicas como a Europeia, a Americana e a Asiática se empenham na estimativa dos teores de nitrato inorgânico dos alimentos. No Brasil,

No Brasil, a avaliação da composição dos alimentos é um foco constante de interesse científico, o projeto TACO (Tabela Brasileira de Composição de Alimentos) que tem como objetivo gerar dados sobre a composição dos principais alimentos consumidos no Brasil, não enfoca a presença de possíveis agentes tóxicos como nitrato (TACO, 2011).

Com base no que foi citado, pode-se verificar a extrema importância de monitorar os níveis de nitrato em vegetais, a fim de assegurar que a população tenha segurança na ingestão desses. Para tanto, este estudo se propõe a padronizar a metodologia para quantificar os níveis de nitrato em drogas vegetais com propriedades medicinais, utilizadas como infusões caseiras e comercializadas como chás, pois muitas dessas plantas são utilizadas pela população como terapias alternativas ou por uso tradicional, podendo causar, de acordo com o teor de nitrato inorgânico, riscos à saúde humana, em especial, a gestantes e seus fetos ou embriões; lactentes e lactentes.

O presente estudo tomou como base um trabalho desenvolvido por Cataldo *et al.* (1975) e adaptado por Beretta *et al.* (2012) e o método foi padronizado e revalidado nas nossas condições de trabalho disponíveis no Laboratório de Pesquisa em Toxicologia da Universidade Federal do Ceará, apresentando precisão e exatidão adequadas, de acordo com a RDC nº 899 de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003).

O projeto vem contribuir também para a linha pesquisa em agentes tóxicos presentes em alimentos já estudada pelo Setor de Toxicologia/UFC, como os realizados por Silva (2012), Linhares Junior (2012), entre outros.

2 OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Determinar os teores de nitrato naturalmente presentes em drogas vegetais comercializadas para uso em chás;

2.2. Objetivos específicos

Padronizar método de determinação dos teores de nitratos naturalmente presentes em drogas vegetais comercializadas para uso em chás;

Determinar os teores de nitrato naturalmente presentes em drogas vegetais comercializadas para uso em chás;

Correlacionar os valores dos teores de nitratos naturalmente presente em drogas vegetais comercializadas para uso em chás com os marcos regulatórios vigentes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

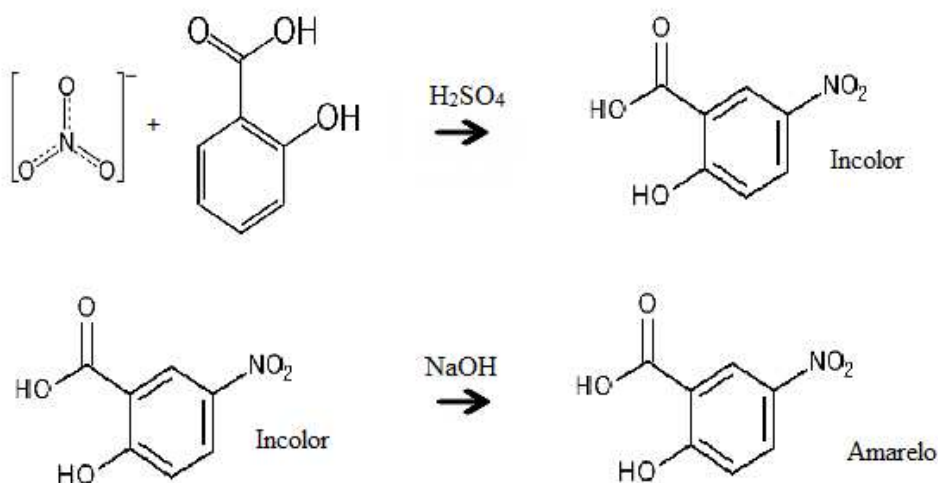
3.1. Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo analítico, quantitativo. As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Toxicologia do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará. O estudo foi realizado no período de agosto de 2014 a abril de 2015.

3.2. Descrição do método

Estudos de quantificação de níveis de nitrato (NO_3^-) em materiais vegetais foram descritos por Cataldo *et al.* (1975). A técnica empregada no estudo baseia-se na formação do ácido 2-hidroxi-5-nitrobenzóico ($\text{C}_7\text{H}_5\text{NO}_5$) resultante da reação de nitrificação do ácido salicílico ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$). A reação ocorre em meio ácido, porém, somente ao alcalinizar o meio, pode-se observar a geração de uma coloração amarela resultante da presença desse composto em meio alcalino (Após a adição de NaOH) **Figura 1**. A absorbância do cromóforo é diretamente proporcional a concentração de nitrato presente na amostra e pode ser quantificada a um comprimento de onda de 410 nm por espectrofotometria.

Figura 1. Reação de nitratação do ácido salicílico.



Fonte: Laboratório de Pesquisa em Toxicologia

3.3. Reagentes e soluções

Os seguintes reagentes foram utilizados no preparo das soluções a serem utilizadas nos experimentos: nitrato de potássio P.A. (NUCLEAR); hidróxido de sódio P.A. (VETEC); ácido sulfúrico P.A. (VETEC) e ácido salicílico P.A./A.C.S (REAGEN).

3.4. Preparo das Soluções

As soluções preparadas a partir desses reagentes foram: hidróxido de sódio 3,8 M; nitrato de potássio 0,01M e ácido salicílico 5% em ácido sulfúrico concentrado.

A solução de hidróxido de sódio foi preparada pesando-se 76,0g de hidróxido de sódio e dissolvendo-o em 500mL de água deionizada, em balão volumétrico de 500mL.

A solução-padrão de nitrato foi preparada pesando-se 0,1011g de nitrato de potássio e dissolvendo-o em 100mL de água deionizada, em balão volumétrico de 100mL.

A solução de ácido salicílico foi preparada pesando-se 5,0g de ácido salicílico e dissolvendo-o em 100mL de ácido sulfúrico concentrado, em balão volumétrico de 100mL.

3.5. Equipamentos

A pesagem dos reagentes sólidos foi realizada em balança analítica de precisão RK[®]-200. A água deionizada utilizada no preparo das soluções foi tratada em sistema MilliQ - ELGA[®]. No preparo das soluções, essas foram submetidas a banho ultrassom QUIMIS[®] modelo Q335D para que os reagentes tivessem uma melhor dissolução no solvente. No preparo das soluções extrativas, as amostras foram colocadas em banho-maria Edulab[®] e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro Thermo scientific[®] modelo Genesys 10S UV-Vis.

3.6. Amostras

As amostras analisadas foram extratos de drogas vegetais comercializadas como chás na cidade de Fortaleza no Estado do Ceará. Os ensaios foram realizados em amostras de *Matricaria recutita* (Camomila); *Peumus boldus* Molina (Boldo do Chile); *Cymbopogon citratus* Stapf (Capim-Cidreira/Capim Santo); *Pimpinella anisum* L.(Erva-Doce) e *Foeniculum vulgare* Mill (Falsa Erva-doce), plantas comercializadas como chás de três marcas diferentes. Neste estudo, as marcas desses produtos foram denominadas: A; B e C.

Somente uma das marcas (marca A) utiliza *Foeniculum vulgare* Mill como Erva Doce. O método empregado para análise foi o proposto por CATALDO *et al.* (1975) baseado na complexação do ácido salicílico pelo íon nitrato e adaptado por Beretta *et al.* (2012).

3.7. Curva de calibração

Na etapa de construção da curva de calibração, inicialmente, foi preparada uma solução-estoque de Nitrato de Potássio (KNO_3) de molaridade 0,1M da seguinte maneira: foi pesado 1,0g do padrão de Nitrato de Potássio, esse foi solubilizado em água deionizada em balão volumétrico de 100mL resultando em uma solução 0,1M.

A partir da solução de 0,1M de KNO_3 obtida, foram realizadas sete diluições para a obtenção das soluções de trabalho nas concentrações de 10; 30; 60; 120; 180; 240 e 300 $\mu\text{g/mL}$ em água deionizada. Após preparadas as soluções de trabalho, a 100 μg de cada, foram adicionados 0,4mL de ácido salicílico 5% em ácido sulfúrico e, após 20 minutos, adicionou-se 5,0mL de hidróxido de sódio. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Thermo scientific® modelo Genesys 10S UV-Vis. Para a obtenção da curva média, foram feitas seis curvas em triplicata.

Foi realizado um branco para cada corrida analítica, a fim de zerar o equipamento, constituído de 0,1 mL de água deionizada, 0,4 mL de ácido salicílico 5% em ácido sulfúrico concentrado e 5 mL de hidróxido de sódio 3,8M.

O gráfico da curva de calibração foi feito por regressão linear obtida entre as concentrações e a média das leituras de absorbância das soluções padrão, utilizando o software Microsoft Office Excel 2010®.

3.8. Validação

A fim de garantir que o método utilizado na análise é apropriado para a sua finalidade e fornece dados confiáveis, é necessário que esse passe por um processo de validação. A validação garante, por meio de estudos experimentais, que o método analítico em questão, quando realizado em condições específicas, é apropriado para a finalidade pretendida e fornece confiabilidade em seus dados. (BRASIL, 2003)

Os seguintes parâmetros foram analisados: linearidade; exatidão; precisão e limite de quantificação.

3.8.1. Linearidade

A fim de verificar a capacidade da metodologia analítica fornecer resultados diretamente proporcionais aos valores das concentrações de nitrato nas amostras, dentro de um intervalo especificado, faz-se necessário o teste de verificação de linearidade do método. Para tal, foram preparadas sete soluções de concentrações distintas de nitrato de potássio distribuídas da seguinte forma: 10; 30; 60; 120; 180; 240 e 300 µg/mL.

O critério mínimo de aceitação do coeficiente de correlação (R) deve ser = 0,99. (BRASIL, 2003)

3.8.2. Precisão

A precisão tem por objetivo a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. (BRASIL, 2003)

A precisão foi avaliada quanto a sua repetibilidade ou precisão intraensaio; a precisão intermediária ou precisão interensaio e reprodutibilidade.

Para a avaliação da precisão do método analítico utilizado, utilizaram-se as medidas de absorbância das concentrações: 10 µg/mL (menor concentração); 120 µg/mL (concentração intermediária) e 300 µg/mL (maior concentração), em seis determinações de absorbância para cada concentração. Para a determinação da precisão interensaio, as medições foram realizadas nas mesmas condições, porém em dias distintos.

A precisão deve ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%). Os valores resultantes não devem ser superiores a 15%, com exceção do limite inferior de quantificação (LIQ), para esse, os valores não devem ser superiores a 20% (vinte por cento), segundo a fórmula a seguir, onde DP é referente ao desvio padrão e CMD à concentração média determinada (BRASIL, 2003):

$$CV\% = \frac{DP}{CMD} \times 100$$

3.8.3. Exatidão

Entende-se por exatidão de um método analítico, a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. (BRASIL, 2003).

Para a avaliação da exatidão do método analítico utilizado, utilizaram-se as medidas de absorbância das concentrações: 10 µg/mL (menor concentração); 120 µg/mL (concentração intermediária) e 300 µg/mL (maior concentração), em seis determinações de absorbância para cada concentração. Para a determinação da exatidão interensaio, as medições foram realizadas nas mesmas condições, porém em dias distintos.

A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

3.8.4. Limite de quantificação e detecção

O limite de quantificação (LQ) é dado pela menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003) ou experimentalmente definido como a menor concentração quantificada com precisão e exatidão igual ou inferior a 20 %. (BRASIL, 2012)

Tal parâmetro pode ser expresso, respectivamente, pelas equações abaixo:

$$\text{Limite de Quantificação} = \frac{\text{Desvio padrão dos coeficientes lineares} \times 10}{\text{Média dos coeficientes angulares}}$$

3.9. Determinação dos teores de umidade e impurezas macroscópicas das amostras

A presença de água em drogas vegetais, em excesso, propicia desenvolvimento de microrganismos, insetos e reações de hidrólise, com consequente deterioração dos constituintes presentes na droga. Os limites estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira para tal determinação encontram-se entre 8 e 14%. Foi realizada a técnica de perda por dessecação ou teor de umidade por metodologia gravimétrica, preconizada pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição, que visa determinar a quantidade de substância volátil de qualquer natureza eliminada nas condições especificadas na monografia (Farmacopéia Brasileira 5ªEd).

Os testes de amostragem tem por objetivo determinar a quantidade de material estranho presente na droga vegetal, seja ela de origem animal, mineral ou vegetal (muitas vezes, outra parte do mesmo vegetal). O método foi realizado como preconiza a Farmacopéia Brasileira (Farmacopéia Brasileira 5ªEd).

3.10. Procedimento de análise

Os extratos vegetais foram obtidos a partir da proporção de 1,0 g de material seco para 100mL de água deionizada, a 45 °C, em banho maria, por 60 minutos, com agitação a cada 15 minutos. Após decorrido esse tempo, os extratos foram filtrados e recolhidos para análise. As extrações foram feitas em triplicata.

Em uma etapa anterior à análise, a adição de 5,0g de carvão ativado visa adsorver os pigmentos presentes no extrato a fim de eliminar interferentes na análise, deixando o extrato incolor.

Posterior à etapa de despigmentação do extrato por adsorção ao carvão ativado, foi iniciada a etapa de quantificação do íon nitrato nos extratos.

A 100µL do extrato, foi adicionado o volume de 0,4 mL de ácido salicílico 5% em ácido sulfúrico concentrado. Após 20 minutos, tempo necessário para que a reação se complete, foram adicionados 5 mL de hidróxido de sódio 3,8M para a obtenção de uma coloração amarela. As amostras foram lidas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 410nm. A leitura do branco, a fim de eliminar a diferença de absorbância gerada por esse, foi realizada com água deionizada em vez da amostra.

Os valores de absorvâncias obtidos foram confrontadas com a curva de calibração. O cálculo da concentração de nitrato nas amostras foi baseado na equação da reta gerada após construída a curva.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Validação

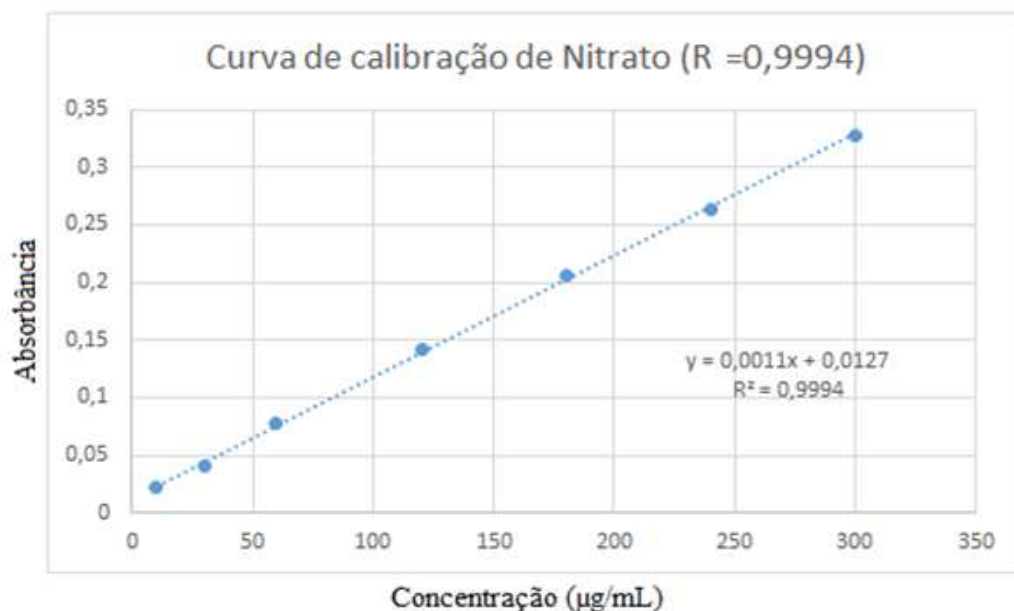
4.1.1. Linearidade

A fim de quantificar os níveis de nitrato nas amostras, uma curva de calibração desse íon foi construída utilizando-se de sete soluções de trabalhos nas concentrações 10, 30, 60, 120, 180, 240 e 300 $\mu\text{g/mL}$, feitas a partir de diluições de uma solução padrão de nitrato de potássio 0,01M, utilizando espectrofotometria por absorção no UV. A média das curvas de calibração é apresentada no **Gráfico 1**.

A curva média de calibração apresenta coeficiente de correlação (R) igual a 0,9994, coeficiente linear (a) igual 0,0011 e coeficiente angular (b) igual a 0,0127.

O valor do coeficiente de correlação (0,9994) demonstra que há linearidade no método entre as concentrações de nitrato de 10 a 300 $\mu\text{g/mL}$, dessa forma, os valores de absorbância encontrados nas leituras das amostras são diretamente proporcionais à concentração de nitrato presente nessas.

Gráfico 1- Curva de calibração de Nitrato (R=0,9993)



4.1.2. Precisão e Exatidão

Os resultados obtidos após os testes de precisão e exatidão estão apresentados na **Tabela 1**, os testes foram realizados de acordo com a metodologia pré-determinada e com base na RDC nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA.

Com relação à precisão, esta pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%, com exceção do limite inferior quantitativo, para esse se admite valores menores ou iguais a 20%.(BRASIL, 2003)

Considerando a exatidão sua expressão pode ser pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, como também pode ser expressa como o erro padrão relativo e não deve exceder 15%, com exceção do limite de quantificação, para esse se admite desvios menores ou iguais a 20% (BRASIL, 2003).

Tabela 1- Valores de precisão e exatidão intra e interensaio do método de quantificação de nitrato por espectrofotometria.

Concentração	Interensaio		Intraensaio	
	Precisão (CV%)	Exatidão (%)	Precisão (CV%)	Exatidão (%)
10 ug/mL	17,90	81,3	8,80	84,3
120 ug/mL	4,25	98,54	1,88	98,19
300 ug/mL	4,04	95,43	0,70	100,79

De acordo com os dados de precisão e exatidão obtidos, o método apresentou precisão e exatidão comprovadas dentro dos limites especificados segundo a RDC 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA.

4.1.3. Limite de quantificação

É definido como limite de quantificação, a menor concentração quantificada com precisão e exatidão igual ou inferior a 20% para o limite inferior de quantificação (BRASIL, 2012). O limite de quantificação foi obtido de forma experimental, dessa forma, foi considerado o valor de menor concentração.

As curvas de calibração construídas a partir das concentrações padrão para a determinação do limite de quantificação do método utilizado está demonstrado nos **Gráficos 2, 3 e 4**.

Gráfico 2. Curva construída a partir das quantidades padrão de nitrato para determinação do limite de quantificação (Curva 1)

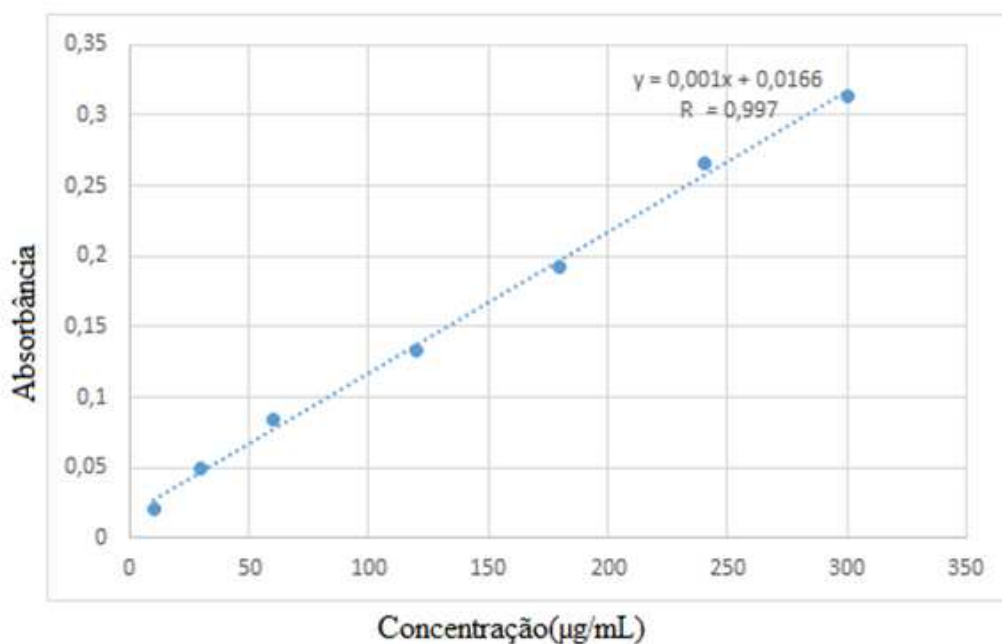


Gráfico 3. Curva construída a partir das quantidades padrão de nitrato para determinação do limite de quantificação (Curva 2)

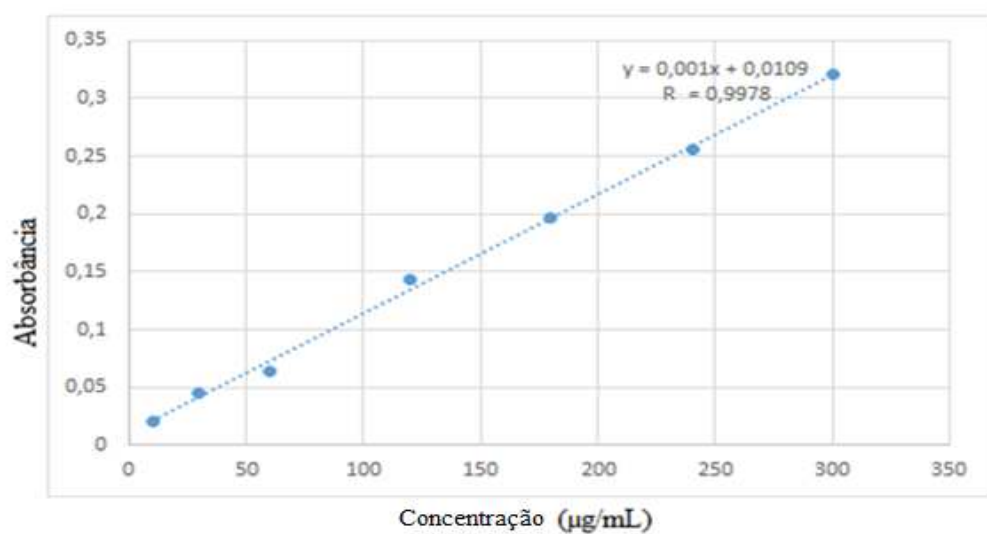
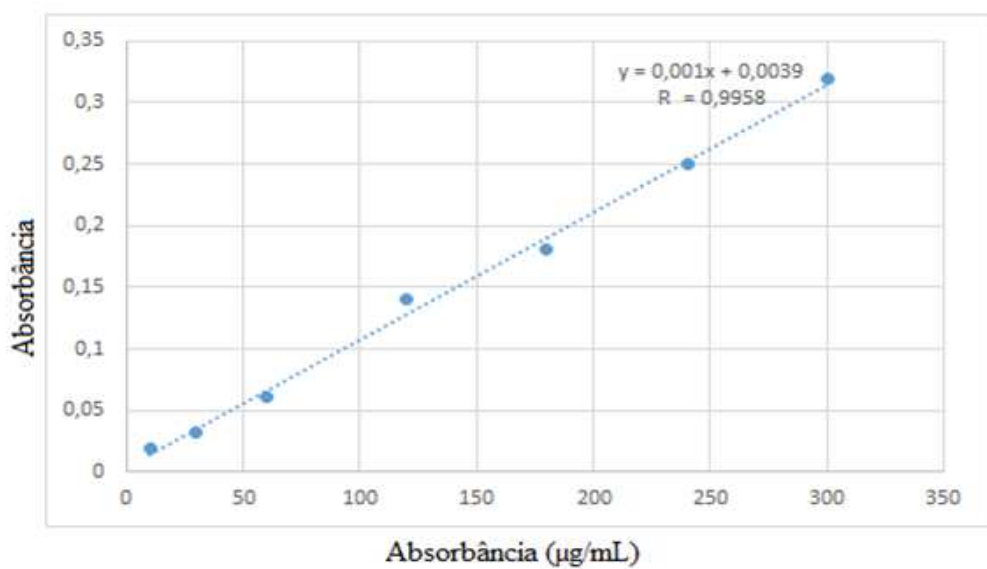


Gráfico 4. Curva construída a partir das quantidades padrão de nitrato para determinação do limite de quantificação (Curva 3)



O limite de quantificação para o método ficou estabelecido como 10 µg/mL, com valores de precisão (DP%) 0,011% e exatidão (EPR%) 15,46%, demonstrando que o método quantifica adequadamente essa concentração de forma exata e precisa.

4.2. Determinação dos teores de umidade e impurezas macroscópicas das amostras

Na análise para a verificação de matéria estranha nas amostras, todas elas encontraram-se dentro do limite especificado pela Farmacopéia Brasileira (2010), de 2%. Na análise do teor de umidade das amostras, todas elas encontraram-se dentro do limite especificado na Farmacopeia Brasileira (2010), de até 14%. Para os valores de umidade, as amostras variaram de 0,13% a 5,88%.

4.3. Quantificação dos níveis de nitrato nas amostras

Os resultados das análises realizadas podem ser vistos na **Tabela 2**. Nota-se que os valores variam de 120-203ppm para a erva-doce; 102-151 para o boldo-do-chile; 117-209 para a camomila e 52-223 para o capim cidreira.

Tabela 2 – Concentração de NO_3^- (ppm) em extratos vegetais de plantas comercializadas como chás.

Vegetal	Média das concentrações de NO_3^- ppm		
	<i>Marca Comercial</i>		
	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
Erva-Doce	203	120	176
Boldo-do-Chile	151	102	128
Camomila	209	117	171
Capim-Cidreira	141	52	223

Os principais fatores associados as variações encontradas nos valores de concentração de nitrato nas amostras são de origem ambiental como clima, composição do solo, pH, incidência de luz solar, quantidade de nitrogênio disponível em quantidade e proporção e também fatores genéticos intrínsecos de cada espécie vegetal (CARDENAS-NAVARRO, 1999).

Tendo como base os valores de ingestão diária aceitável (IDA) para nitrato de no máximo $3,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ de peso corpóreo, estabelecidos pela Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization (FAO/WHO), é possível observar que um adulto saudável, com peso corpóreo por volta de 60kg, pode ingerir até 222mg de nitrato por dia sem riscos relativos à saúde, quantidade referente a pouco mais de 1L de chá por dia, de acordo com a maior concentração encontrada nos estudos, de 203ppm. Porém em algumas amostras (Erva-doce marca A e Erva-doce marca C), o teste foi realizado com metade do peso do conteúdo destinado a uma dose de chá, para que todas as amostras fossem preparadas da mesma forma. Dessa maneira, deve-se lembrar que essas amostras contem o dobro da concentração de nitrato revelada nos ensaios analíticos por dose de chá. Logo, para esses, pouco mais de 500mL de chá por dia já alcança uma quantidade próxima a da ingestão diária aceitável.

Deve-se levar em consideração que existem diversas outras fontes alimentares de nitrato comumente consumidas diariamente pela população. Dessa forma, deve-se tomar maior cuidado com relação a ingestão desses produtos, principalmente quando por crianças.

5 CONCLUSÃO

O método analítico demonstrou-se apropriado para a finalidade pretendida, pois de acordo com os dados obtidos, mostrou-se um método linear, preciso e exato, com valores adequados e dentro das especificações para esses parâmetros.

A faixa de trabalho e o limite de quantificação utilizados no estudo mostraram-se adequados para a quantificação de nitrato nas amostras.

Os níveis de nitrato em vegetais foram determinados pelo método validado e apresentaram uma grande variação nos valores de concentração tanto na mesma espécie vegetal como em espécies diferentes.

Os valores encontrados de nitrato quando comparados aos valores de ingestão diária aceitável para esse íon segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization mostram um risco potencial à saúde de parte da população que utiliza frequentemente esses produtos.

Esses fatos são de extrema importância, visto que, atualmente, na literatura, não são encontrados dados referentes à quantidade de nitrato presente em amostras vegetais comercializadas como chás, servindo, esses dados, como contribuição para o conhecimento dos níveis de nitrato em produtos alimentícios como vegetais utilizados no preparo de chás.

REFERÊNCIAS

BERETTA, A., CASANOVA O., MONZA J., PERDOMO, C. Eliminación del color del extracto para determinar nitrato en muestras secas de lechuga. **Agrociencia Uruguay** vol.16 no.1 Montevideo jun. 2012

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos; **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 mai. 2012.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 45, de 28 de dezembro de 2010 – Esclarecimentos sobre a regulamentação de chás. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 dez. 2010. (a)

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 27 de 6 de agosto de 2010 – Dispõe sobre as categorias de alimentos e embalagens isentos e com obrigatoriedade de registro sanitário.. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 6 ago. 2010. (b)

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 20, 18 de junho de 1986. **Diário Oficial**, República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 30 jul. 1986.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Portaria nº 1469 de 29 de dezembro de 2000. Brasília: **Fundação Nacional de Saúde**, 2001. 32p

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: **Ministério da Saúde, 2006. 60 p.** – (Série B. Textos Básicos de Saúde)

CARDENAS-NAVARRO, R., ADAMOWICZ S.; ROBIN, P. Nitrate accumulation in plants: a role for water. **Journal of Experimental Botany**, v.50, n.334, 1999

CATALDO, D. A.; HAROON, M.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. *Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid.* **Communications in Soil Science and Plant Analysis**. USA, v. 6, pp 71-80, 1975.

FAQUIN, V.; ANDRADE, A. T. Nutrição mineral e diagnose do estado nutricional de hortaliças. **Lavras: UFLA/FAEPE**, 2004. 88 p.

HANEKAMP, J.; BAST, A.; KWAKMAN, J. *Of Reductionism and the Pendulum Swing: Connecting Toxicology and Human Health*. **Dose-Response**, 10(2), pp155-176, 2012.

INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER). Câncer no estomago. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/estomago/prevencao>
Acesso em: 02/06/2011

LAVALLOIS, P.; AYOTTE, P.; VAN MANEEN, J.M.S.; DESROSIERS, T.; GINGRAS, S.; DALLINGA, J.W.; WERMEER, I.T.M.; ZEE, J.; POIRIER, G. Excretion of volatile nitrosamines in a rural population in relations to food and drinking water consumption. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, p. 1013-1019, 2000.

LINHARES JUNIOR, GILBERTO FERREIRA. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Cromatográfica para determinação de BISFENOL A em simulantes de alimentos de ensaios de migração**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Co-Orientador: Janete Eliza de Sá Soares.

MARREIRO, A. S. N.; TEIXEIRA, P. R. S.; SOUZA, R. P. Análise dos tipos de materiais estranhos encontrados em sachês de chá comercializados na cidade de Teresina – **PI, Revista ACTA Tecnológica - Revista Científica**, v. 5, n. 1, jan./jun. 2010.

MAYNARD, D.N.; BARKER, A.V. Nitrate content of vegetable crops. **HortScience**, v. 7, n. 3, p. 224-226, 1972.

MAYNARD, D.N.; BARKER, A.V.; MINOTTI, P.L.; PECK, N.H. Nitrate accumulation in vegetables. **Advances in Agronomy**, v. 28, p. 71- 118, 1976.

MÍDIO, A. F.; MARTINS, D. I. Toxicologia de Alimentos. **São Paulo: Livraria Varela**, 2000.

SANTAMARIA, P. *Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation*. **J. Sci. Food Agric**. 86, pp 10–17, 2006.

SILVA, ALINE BERNARDINO DA. **Determinação de nitrato em vegetais**. Monografia de Conclusão de Curso de Farmácia. FFOE/UFC, 2013.

TACO - TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS / NEPA – UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl. - Campinas: NEPAUNICAMP, 2011.

TAIZ, L. R., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal. 4º Edição**, Editora Artmed, Porto Alegre, 2009, p. 316-331.

WHO. Food Additives Series nº 35. **Toxicological Evaluation of Certain Food Additives**. Forty-Forth Report of the Joint FAO/WHO Comeettee on Food Additives, Geneva, 1996.

WHO. Food Additives Series nº 50. **Safety Evaluation of Certain Food Additives**. Fifty-ninth Report of the Joint FAO/WHO Comeettee on Food Additives, Geneva, 2003.

ZARONI, M. Pontarolo, R.; Abrahão, W.S.M.; Fávero, M.L.D; Correa Júnior, C.; Stremel, D.P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, jan-jun. 2004