

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

BRUNA DE FÁTIMA PEREIRA SCHMITE

ESTUDO DA PRESENÇA E DA FRAÇÃO BIOACESSÍVEL DE ELEMENTOS
TRAÇO EM AMOSTRAS DE CHÁ-MATE EMPREGANDO ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA

PONTA GROSSA

2018

BRUNA DE FÁTIMA PEREIRA SCHMITE

ESTUDO DA PRESENÇA E DA FRAÇÃO BIOACESSÍVEL DE ELEMENTOS
TRAÇO EM AMOSTRAS DE CHÁ-MATE EMPREGANDO ESPECTROMETRIA DE
ABSORÇÃO ATÔMICA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Egéa dos Anjos.

PONTA GROSSA

2018

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

S335 Schmite, Bruna de Fátima Pereira
 Estudo da presença e da fração
 bioacessível de elementos traço em
 amostras de chá-mate empregando
 espectrometria de absorção atômica/ Bruna
 de Fátima Pereira Schmite. Ponta Grossa,
 2018.
 88f.

 Dissertação (Mestrado em Química
 Aplicada - Área de Concentração: Química),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Orientadora: Prof^a Dr^a Vanessa Egéa dos
 Anjos.

 1.Chá-mate. 2.Infusões.
 3.Bioacessibilidade e biodisponibilidade.
 I.Anjos, Vanessa Egéa dos. II.
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Mestrado em Química Aplicada. III. T.

CDD: 543.08

TERMO DE APROVAÇÃO

BRUNA DE FÁTIMA PEREIRA SCHMITE

**“ESTUDO DA PRESENÇA E DA FRAÇÃO BIOACESSÍVEL DE
ELEMENTOS TRAÇO EM AMOSTRAS DE CHÁ-MATE
EMPREGANDO ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:

Vanessa Egéa dos Anjos
Profa. Dra. Vanessa Egéa dos Anjos
UEPG/PR

Patrícia Los Weinert
Profa. Dra. Patrícia Los Weinert
UEPG/PR

Danielle C. Schnitzler
Profa. Dra. Danielle Caroline Schnitzler
UTFPR/PR

Ponta Grossa, 26 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus por ter me permitido mais essa conquista;

Ao meu esposo Fagner, que sempre esteve ao meu lado, por seu amor, carinho, respeito e compreensão em todos os momentos da minha vida, sempre com uma palavra de incentivo, não me deixando desanimar diante de algum obstáculo;

À meus pais Francisco e Rosilda, dois guerreiros, a quem devo tudo o que sou;

À minha orientadora Profa. Dra. Vanessa Egéa dos Anjos, pela paciência, pelo carinho e ensinamentos durante todos os momentos do trabalho;

À Profa. Dra. Patrícia Los pelo carinho e pela contribuição ao trabalho;

A toda turma de mestrado 2016, em especial às minhas amigas Karine Cunha, Karine Costa, Dani, Flávia e Liziane;

À Alessandra Bitobrovec pela amizade, pela ajuda com os experimentos e pelos momentos de descontração no laboratório;

Ao nosso grupo de pesquisa LEQQA;

À Camila KuleK de Andrade por toda ajuda inicial;

À UEPG;

À CAPES;

Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram a chegar ao fim dessa caminhada.

RESUMO

O chá-mate é uma bebida muito consumida nos estados do Sul do Brasil, não só devido ao seu sabor e aroma, mas também por suas propriedades terapêuticas. Tais propriedades estão associadas à presença de diversos constituintes químicos em sua composição, como polifenóis, flavonoides, vitaminas e minerais. Esses minerais podem ser essenciais ao organismo humano, ou altamente tóxicos, dependendo da forma e concentração. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivos determinar as concentrações totais de Cd, Cu, Pb e Al em chá-mate comercial, bem como o conteúdo desses elementos em infusões preparadas à temperatura ambiente (frio) e a quente. As concentrações de fenólicos em infusões também foram determinadas utilizando o método Folin-Ciocalteu. Além disso, avaliar as frações bioacessíveis desses elementos e, ainda verificar se a adição de alguns ingredientes às infusões (canela, limão, mel e açúcar) pode influenciar na biodisponibilidade do alumínio. As quantificações foram realizadas por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite e em chama. Para os teores totais a abertura de amostra, por via úmida (otimizada por planejamento fatorial) apresentou os melhores resultados, em relação a via seca. As concentrações totais para as quatro marcas estudadas variaram: Cd ($0,08$ à $0,320 \mu\text{g g}^{-1}$); Pb ($0,36$ à $0,44 \mu\text{g g}^{-1}$); Cu ($10,3$ à $12 \mu\text{g g}^{-1}$) e Al (347 à $526 \mu\text{g g}^{-1}$). Para as infusões os teores superiores de Al e Cd foram encontrados nas infusões a quente, enquanto que para o Cu e o Pb os maiores teores foram nas infusões a frio. Com isso, a ordem de extração nas infusões tanto a quente quanto a frio foi $\text{Cd} > \text{Pb} > \text{Al} > \text{Cu}$. Com relação aos teores de fenólicos, as maiores concentrações foram obtidas nas infusões a quente variando de 13 a 17 mg g^{-1} . Nos estudos de bioacessibilidade *in vitro* empregando o método de simulação gástrica (PBET) os elementos Cd e Cu foram os metais mais bioacessíveis, enquanto o Al foi encontrado em forma relativamente inerte (baixa bioacessibilidade). Verificou-se também que o consumo diário de 100 mL da bebida, por um adulto, não ultrapassa os limites de ingestão diária desses metais recomendável pela Organização Mundial da Saúde. Por fim, verificou-se que a adição de ingredientes às bebidas, como o açúcar e mel podem diminuir os teores biodisponíveis de Al.

Palavras-Chave: Chá-mate, infusões, bioacessibilidade e biodisponibilidade.

ABSTRACT

Yerba mate tea is a widely consumed drink in the southern states of Brazil, not only because of its flavor and aroma, but also due to its therapeutic properties. Such properties are associated with the presence of several chemical constituents in its composition, such as polyphenols, flavonoids, vitamins and minerals. These minerals may be essential to the human body, or highly toxic, depending on their form and concentration. In this sense, this study aimed to determine the total concentrations of Cd, Cu, Pb and Al in commercial mate tea, as well as the content of these elements in infusions prepared at room temperature (cold) and hot; to determine phenolic concentrations in infusions using the Folin-Ciocalteu method; to evaluate the bioaccessible fractions of these elements and to verify whether the addition of some ingredients to the infusions (cinnamon, lemon, honey and sugar) may influence the bioavailability of aluminium. The quantifications were performed using atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization in graphite and flame furnace. For total content analyses, the wet route (optimized by factorial planning) showed the best results when compared to the dry route. The total concentrations for the four brands studied varied: Cd (0.08 to 0.320 $\mu\text{g g}^{-1}$); Pb (0.36 to 0.44 $\mu\text{g g}^{-1}$); Cu (10.3 to 12 $\mu\text{g g}^{-1}$) and Al (347 to 526 $\mu\text{g g}^{-1}$). Regarding infusions, the highest contents of Al and Cd were found in the hot infusions, while cold infusion presented the highest levels of Cu and Pb. Thus, the order of extraction in hot and cold infusions was Cd > Pb > Al > Cu. With respect to the phenolic contents, the highest concentrations were obtained in the hot infusions ranging from 13 to 17 mg g⁻¹. In the in vitro bioaccessibility studies using the gastric simulation method (PBET) the Cd and Cu elements were the most bioaccessible metals, while Al was found in relatively inert (low bioaccessibility) form. It was also found that the daily consumption of 100 ml of the drink by an adult does not exceed the limits of daily intake of these metals recommended by the World Health Organization. It was also verified that the addition of ingredients such as sugar and honey to these beverages may decrease the bioavailable levels of Al.

Key words: Tea mate, infusions, bioaccessibility and bioavailability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do Processo de Beneficiamento da Erva-mate.....	24
Figura 2. Exemplos de estruturas de compostos fenólicos encontradas em chás... 26	
Figura 3. Fotografias das etapas de amostragem conduzida por quarteamento de quatro amostras de chá-mate de um mesmo fabricante.....	29
Figura 4. Esquema das etapas do procedimento de abertura de amostra por via seca do produto comercial de chá-mate para posterior determinação dos metais por espectrometria atômica.....	30
Figura 5. Etapas do procedimento de abertura de amostra por via úmida do produto comercial de chá-mate para posterior determinação dos metais por espectrometria atômica.	311
Figura 6. Esquema do modo de preparo das infusões a quente e a frio.....	33
Figura 7. Imagens das adições de ingredientes (A) Infusões a Quente e (B) Infusões a Frio.....	34
Figura 8. Reação de oxirredução entre o ácido gálico e o íon molibdato (VI) (um dos componentes do reagente de Folin-Ciocalteu).....	35
Figura 9. Esquema representativo dos ensaios de bioacessibilidade realizados nas amostras de chá da erva-mate.	377
Figura 10. Curvas analíticas representativas da determinação dos íons metálicos em amostras de chá-mate utilizando o GF AAS e FAAS. (A) Cd^{2+} empregando GF AAS; (B) Cu^{2+} empregando GF AAS; (C) Pb^{2+} empregando GF AAS; (D) Al^{3+} empregando FAAS.	40
Figura 11. Concentrações de Cd e Cu determinadas por GF AAS em chá-mate comercial após procedimento de abertura da amostra por via seca (■) e úmida (■)	477
Figura 12. Gráfico de Pareto obtido a partir do programa Statistic, para as Múltiplas Respostas.....	51
Figura 13. Concentrações de Cd determinados nas infusões a quente e a frio para as amostras de chá-mate estudadas (A). Porcentagem de extração de Cd para cada amostra em relação ao teor de Cd presente na amostra comercial (B).....	59

Figura 14. Concentrações de Pb determinados nas infusões a quente e a frio para as amostras de chá-mate estudadas (A). Porcentagem de extração de Pb para cada amostra em relação ao teor de Pb presente na amostra comercial (B).....	61
Figura 15. Concentrações de Cu determinados nas infusões a quente e a frio para as amostras de chá-mate estudadas (A). Porcentagem de extração de Cu para cada amostra em relação ao teor de Cu presente na amostra comercial (B).....	62
Figura 16. Concentrações de Al determinados nas infusões a quente e a frio para as amostras de chá-mate estudadas (A). Porcentagem de extração de Al para cada amostra em relação ao teor de Al presente na amostra comercial (B)	64
Figura 17. Fração bioacessível dos metais nas infusões a frio em relação ao teor presente nas infusões. Marcas A (■), Marca B (■), Marca C (■) e Marca D (■)	68
Figura 18. Fração bioacessível do Al nas infusões a frio (A) e a quente (B) após adição de limão, canela, mel e açúcar no preparo da bebida.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores e níveis, avaliados na otimização da etapa de abertura de amostra de chá-mate comercial por via-úmida, através de planejamento fatorial 2^2 com ponto central.	32
Tabela 2. Condições de atomização e faixa de trabalho para os metais determinados na erva-mate e nas infusões da erva-mate.....	32
Tabela 3. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) instrumentais obtidos para os elementos Cd, Cu, Pb determinados por GF AAS e o Al determinado por FAAS	41
Tabela 4. Teores totais dos íons de Cd e Cu, obtidos após abertura da amostra comercial de chá-mate por via seca e determinação por GF AAS. (n = 3).	42
Tabela 5. Matriz do planejamento fatorial 2^2 com ponto central para o tratamento da amostra de erva-mate comercial por via úmida e teores totais de Cd e Cu encontrados por GFAAS e FAAS, respectivamente.	444
Tabela 6. Resultados obtidos da análise estatística ANOVA dos resultados obtidos para os valores de efeito principal e de interação do planejamento fatorial conduzido na otimização de abertura de amostra por via úmida para determinação de Cd por GF AAS em amostras comerciais de chá-mate.	455
Tabela 7. Resultados obtidos da análise estatística ANOVA para os valores de efeito principal e de interação do planejamento fatorial conduzido na otimização de abertura de amostra por via úmida para determinação de Cd por GF AAS em amostras comerciais de chá-mate.	466
Tabela 8. Matriz do planejamento fatorial 2^2 para o tratamento da amostra de chá-mate comercial por via úmida e teores totais de Pb e Al encontrados por GF AAS e FAAS (respostas).	499
Tabela 9. Matriz do planejamento fatorial 2^2 para digestão da Marca A, avaliada pela (CEM) liberadas do chá-mate (n=2).....	50
Tabela 10. Resultados obtidos da análise estatística ANOVA para os valores de efeito principal e de interação do planejamento fatorial para as Respostas Múltiplas.	51
Tabela 11. Teor médio das concentrações totais das espécies metálicas em amostras comerciais de chá-mate obtidas com abertura de amostra por via úmida em fraco fechado e determinação por GF AAS (n=10). Aplicação do Teste Newman-	

Keuls para verificar se as amostras diferem entre si nas concentrações dos metais.	53
Tabela 12. Teores totais de compostos fenólicos (mg de ácido gálico por g de chá) presentes nas infusões a quente e a frio nas amostras de chá-mate estudadas ...	555
Tabela 13. Valores médios das concentrações para íons metálicos determinados em infusões a quente e a frio de chá-mate de diferentes marcas (n=3).	58
Tabela 14. Teste de recuperação das espécies metálicas presentes nas infusões a quente de chá-mate (n = 3).	666
Tabela 15. Frações bioacessíveis dos metais, Cd, Pb, Cu e Al, nas infusões a quente e a frio para as amostras avaliadas.	677
Tabela 16. Estimativa da ingestão humana de Cd, Pb, Cu e Al (µg por kg de peso corpóreo) para um adulto que consome chá-mate preparado por infusão a quente com frequência.	70

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivos Específicos	12
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1. Determinação de espécies metálicas em matrizes alimentares	16
3.2. Biodisponibilidade de espécies metálicas em alimentos	18
3.3. Erva-Mate e Chá-Mate	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Técnicas Limpas	27
4.2. Reagentes	27
4.3. Equipamentos	28
4.4. Amostras comerciais de chá-mate e amostragem	28
4.5. Determinação do teor de umidade das amostras comerciais	29
4.6. Determinação dos teores totais de íons metálicos em amostras de chá-mate comercial	29
4.6.1. Abertura de amostra por via seca	30
Fonte: A autora	30
4.6.2. Abertura de amostra por via-úmida em recipiente fechado	31
4.6.3. Determinação dos teores de Cd, Cu, Pb e Al por Espectrometria Atômica	32
4.7. Preparo de infusões de chá-mate para determinação do teor de metais, fenólicos e ensaios de bioacessibilidade	33
4.7.1 Preparo de infusões das diferentes marcas comerciais de chá-mate	33
4.7.2 Preparo de infusões de chá-mate com adição de ingredientes	34
4.9. Determinação dos teores totais de compostos fenólicos por espectroscopia de absorção molecular na região ultra-violeta e visível	35
4.10. Avaliação da bioacessibilidade de Cd, Pb, Cu e Al em infusões a quente e a frio utilizando digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> (PBET)	36
4.11. Avaliação da fração bioacessível de Al infusões a quente e fria de chá-mate enriquecidas com ingredientes utilizando digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> (PBET)	37

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1. Determinação das espécies metálicas em chá-mate por Espectrometria de Absorção Atômica	39
5.2. Avaliação dos procedimentos de abertura de amostra para determinação dos teores totais de metais por Espectrometria Atômica	42
5.2.1. Pré-tratamento por via seca e determinação de Cu e Cd	42
5.2.2 Pré-tratamento por via úmida e determinação de Cu e Cd por Espectrometria Atômica	43
5.2.3. Comparação entre os procedimentos de pré-tratamento de amostra de chá-mate	47
5.2.4 Otimização através de planejamento fatorial 2 ² das condições de decomposição da amostra de chá-mate por via úmida em frasco fechado para os metais Pb e Al	48
5.2.5 Respostas Múltiplas para padronização da melhor condição experimental para abertura de amostra por via úmida em frasco fechado para os metais Cd, Pb, Cu e Al	49
5.3. Determinação de umidade e concentração total de Al, Cd, Cu, e Pb em amostras comerciais de chá-mate	52
5.4. Concentração de compostos fenólicos nas infusões preparadas com amostras de chá-mate.....	55
5.5. Concentrações de Cd, Pb, Cu e Al nas infusões a quente e a frio preparadas com amostras comerciais de chá-mate	57
5.6. Avaliação da bioacessibilidade de Cd, Pb, Cu e Al nas bebidas preparadas com chá-mate comercial	66
5.7. Bioacessibilidade do Al nas bebidas preparadas por infusões com adição de canela, limão, açúcar e mel.....	71
6. CONCLUSÕES	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	76

1. INTRODUÇÃO

Alimentos e bebidas são uma das principais fontes de espécies metálicas para os seres humanos. Esses elementos químicos são uma classe de compostos de amplo interesse, pois podem apresentar diversas funções biológicas essenciais à manutenção da vida ou podem apresentar efeitos tóxicos dependendo da sua forma e espécie (especificação química) e da sua concentração (HE et al., 2016; PEREIRA, et al., 2016).

Espécies metálicas tais como Ca, Fe, Cu, Mn, estão envolvidos em diversas funções biológicas como cofatores de enzimas, no equilíbrio osmótico nas interfaces de membranas biológicas, na biossinalização, como constituintes de biomoléculas, entre outros (GUPTA e GUPTA, 2014; TOGNON, 2012). Contudo, a deficiência ou o excesso desses elementos podem causar distúrbio do sistema biológico.

Outros elementos como Pb, Cd, Hg, As, Al, não apresentam nenhuma função biológica conhecida e podem apresentar toxicidade ao organismo.

A presença dessas espécies metálicas nos alimentos e bebidas pode ser decorrente da própria química dos alimentos de origem vegetal ou animal ou provenientes de processos de contaminação ambiental tais como mineração, emprego de agrotóxicos, entre outros; e industrial. Independente da sua origem, os metais presentes nos alimentos e bebidas podem entrar na cadeia alimentar exercendo caráter nutricional ou tóxico (PYTLAKOWSKA et al., 2012).

Por isso, é importante estudar a presença de espécies metálicas em alimentos e bebidas para garantir a segurança alimentar, visto que a presença desses elementos, essenciais ou tóxicos, é um fator que não é levado em conta no controle de qualidade de produto e é de extrema importância para a saúde humana.

Normalmente, o controle de qualidade, as legislações e avaliações sobre segurança alimentar são baseados em teores totais. No entanto, para avaliar a essencialidade ou a toxicidade desses elementos é necessário avaliar a sua disponibilidade, ou seja, a capacidade do nutriente ou contaminante ser absorvido pelo organismo humano (BOSSO e ENZWEILER, 2008). Porém, a concentração total não está relacionada com a disponibilidade biológica de um determinado elemento.

Uma das formas de avaliar essa disponibilidade biológica é através de ensaios com cobaias. No entanto, devido a diversos fatores, como ética (utilização de

animais como cobaias), custo, complexidade de análise e tempo, os ensaios de bioacessibilidade vêm ganhando destaque. Os ensaios de bioacessibilidade são procedimentos de digestão gastrointestinal *in vitro*, que empregam soluções artificiais bioquímicas que simulam o sistema gastrointestinal do organismo humano, especificamente a digestão no estômago e duodeno. Portanto, bioacessibilidade refere-se à liberação de compostos da matriz alimentar no suco digestivo e intestinal do sistema de digestão. Esse parâmetro indica a quantidade máxima que um composto poderá ser absorvido pelo intestino humano após digestão.

Vários trabalhos na literatura descrevem resultados da bioacessibilidade de espécies metálicas em diferentes alimentos, contudo poucos trabalhos envolvem infusões de ervas ou chá.

Entre as bebidas amplamente consumidas no Brasil, especificamente na região Sul, estão: o chimarrão, o tererê e o chá-mate, provenientes de infusões da erva-mate. Através do beneficiamento industrial da erva-mate podem-se obter dois tipos de produtos comerciais a erva verde, obtida dos ramos, e o chá-mate, das folhas tostadas, da planta (TORMEN, 1995).

A erva-mate (*Illex Paraguariensis*) é popularmente conhecida devido às suas propriedades benéficas e estimulantes. Porém, alguns estudos indicam que essa erva pode conter elevados teores de alumínio, que é um elemento não essencial e relacionado com doenças degenerativas como Alzheimer e Mal de Parkinson.

Alguns trabalhos descrevem a presença de espécies metálicas em chá-mate, porém ainda não existem estudos que avaliam a bioacessibilidade dos íons metálicos nessas amostras. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo principal avaliar a presença de metais traço como o Pb, Cd, Cu e Al no produto comercial brasileiro, na bebida preparada na forma de infusão. Além disso, tem-se como meta a estimativa da bioacessibilidade *in vitro* desses elementos e a avaliação da influência da adição de ingredientes nas bebidas como açúcar, canela mel e limão.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral foi avaliar a presença e a bioacessibilidade de espécies metálicas tais como cobre, chumbo, cádmio e alumínio em bebidas preparadas com chá-mate, para estimar o potencial nutricional ou tóxico para a população.

2.1. Objetivos Específicos

- Implantar protocolo analítico para determinação de Cu, Al, Pb e Cd em produto comercial de chá-mate empregando Espectrometria de Absorção Atômica após procedimento de abertura de amostra;
- Determinar a concentração total dos íons de Cu, Al, Pb e Cd em marcas diferentes de chá-mate;
- Determinar a concentração dos íons metálicos Cu, Al, Pb e Cd e compostos fenólicos em bebidas de chá-mate preparadas na forma de infusão (quente e fria) de diferentes marcas;
- Avaliação da bioacessibilidade (digestão gastrointestinal *in vitro*) utilizando o método PBET (physiologically based extraction test) dos íons metálicos (Cu, Al, Pb e Cd) em infusões preparadas com o produto comercial (chá-mate);
- Avaliar a influência na bioacessibilidade de espécies metálicas da adição de ingredientes tais como açúcar refinado, canela, limão e mel no preparo de bebidas de chá-mate.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os minerais estão presentes em todos os tecidos e fluídos do corpo humano. Assim como a água e as proteínas, são de extrema importância para um funcionamento adequado do organismo, pois participam de atividades metabólicas essenciais à manutenção da vida (GUPTA e GUPTA, 2014).

Esses minerais podem ser classificados como macronutrientes e como micronutrientes dependendo das quantidades diárias necessárias para o funcionamento do organismo. Os elementos sódio, potássio, cálcio e magnésio são exemplo de macronutrientes. Enquanto que ferro, zinco e cobre são micronutrientes. Porém, dependendo da sua concentração e forma, os elementos que agem como nutrientes também podem apresentar efeitos tóxicos. Como por exemplo, o cobre, é um componente de diversas enzimas envolvidas na produção de energia celular, formação de tecidos e produção de melanina. A deficiência de cobre não é muito comum, no entanto a falta dele pode ocasionar anemia, baixa pigmentação da pele, deficiência no crescimento e no sistema imunológico, aumentando a susceptibilidade a infecções (FIORINI, 2008; GUPTA e GUPTA, 2014). Já a intoxicação aguda por cobre pode levar a distúrbios gastrointestinais caracterizados por dor abdominal, náuseas, diarreia e vômito (FRAGA, 2005).

Apesar da grande importância desses elementos para saúde humana, o organismo não é capaz de fabricá-los, sendo necessária a ingestão de alimentos e bebidas que forneçam esses nutrientes (FIORINI, 2008).

Nos alimentos, principalmente os naturais, as espécies metálicas apresentam-se na forma de íons livres, na forma de complexos inorgânicos e complexos orgânicos, e apenas uma pequena parte pode ser utilizada pelo organismo. Esses elementos podem ser encontrados em uma variedade de alimentos, o cálcio, por exemplo, está presente no leite e derivados, o cobre, em carnes, frutos do mar, sementes e oleaginosas, o ferro, no espinafre, aspargo, salsa, batatas, lentilhas, etc.

No entanto, além das espécies essenciais, os alimentos e as bebidas podem conter elementos que não apresentam função biológica conhecida e, mesmo em baixas concentrações podem apresentar algum dano ao organismo. Pode-se citar o chumbo, cádmio, arsênio, mercúrio, alumínio, entre outros (HABAN et al, 2008). E, portanto, podem apresentar efeitos tóxicos ao organismo, mesmo presentes em baixas concentrações.

Quando a exposição ao chumbo é crônica, efeitos como aumento na pressão arterial, danos nos rins, abortos espontâneos, degeneração no sistema nervoso e danos cerebrais, podem ser observados (BOSSO e ENZWEILER, 2008; CHERFI, ABDOUN e GACI, 2014). A absorção do chumbo pelo organismo humano pode ocorrer no estômago ou no duodeno, em condições favoráveis. O metal deve estar solúvel ou complexado com outros elementos como carboidratos e sais orgânicos para ser transportado e entrar na corrente sanguínea, onde permanece por pouco tempo, pois tende a se acumular nos ossos (BOSSO e ENZWEILER, 2008).

O Al é outro íon metálico que não apresenta função biológica conhecida e vários estudos estão sendo realizados sobre seu envolvimento em doenças como encefalopatia, Alzheimer e o Parkinson (CAMPOS et al., 2014).

O Cd também é um elemento tóxico, e uma exposição prolongada pode acarretar doenças pulmonares crônicas, disfunção renal, e possível câncer de pulmão (PEREIRA, et al, 2016).

Há ainda elementos, como o cromo, que pode apresentar-se sob duas formas de oxidação, sendo uma delas essencial e outra tóxica. O Cr(III) atua em processos biológicos como ativador de enzimas e na estabilização das proteínas e ácidos nucleicos, além de potencializar o papel da insulina, que é responsável por captar a glicose no sangue levando-a para dentro da célula. Enquanto que o Cr(VI) é altamente tóxico, devido ao seu alto potencial de oxidação, além de carcinogênico (DOBROWOLSKI, PAWLOWSKA-KAPUSTA e DOBRZYNSKA, 2012).

Na literatura podem ser encontrados estudos que avaliam a presença de espécies metálicas, essenciais ou tóxicas, em diferentes matrizes inclusive nos chás.

Pytlakowska et al. (2012), faz a determinação de 12 minerais e (Al, B, Ba, Fe, Zn, Mn, Mg, K, Na, P, Cu, Sr e Ca) em ervas e suas infusões consumidas para fins médicos na Polônia, como camomila, menta, melissa, sálvia, urtiga, tília e erva de São João. Para a determinação da concentração total foi utilizado o pré-tratamento das amostras via digestão a seco e digestão úmida, em condições otimizadas. As concentrações de elementos em ervas e suas infusões foram determinadas por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente – do inglês Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). O resultado das concentrações totais de elementos em folhas de ervas mostra que todas as ervas contêm a maioria dos elementos, exceto K e P, na faixa de $\mu\text{g g}^{-1}$. Além disso, os resultados mostraram que as concentrações dos elementos variaram

amplamente. Com base nos resultados experimentais para as eficiências de extração, os elementos das infusões de ervas foram classificados em três grupos específicos: altamente extraível (> 55%) incluindo K; moderadamente extraível (20-55%) incluindo Mg, Na, P, B, Zn e Cu e pouco extraível (<20%) incluindo Al, Fe, Mn, Ba, Ca.

Vulcano e Colaboradores (2008) avaliaram os níveis de chumbo e cádmio, em amostras de chás de camomila e chá-mate, industrializados e não-industrializados, na região metropolitana de Belo Horizonte. A análise se deu na planta digerida e nas infusões dos chás. Os níveis de Pb e Cd foram determinados por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. Os teores médios dos metais encontrados nas amostras de infusões de camomila e chá-mate estavam abaixo dos valores estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária ($0,2 \text{ mg L}^{-1}$) e as concentrações nas amostras digeridas de camomila mantiveram-se na faixa normalmente descrita pela literatura ($0,15 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ para Cd e de $0,42 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de Pb) e chá-mate ($0,53 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ de Pb). Já os níveis de Cd na planta-digerida de erva-mate ($2,59 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$) estavam acima dessa faixa. Não houve diferença significativa entre os níveis de Cd e Pb nas infusões, dos chás industrializados e não industrializados, em ambas as plantas estudadas. As concentrações dos metais nas plantas-digeridas industrializadas, tanto de camomila quanto de erva-mate, apresentam-se superiores àquelas encontradas nas plantas não industrializadas.

O efeito provocado, pela ingestão de alimentos com espécies metálicas pelos humanos irá depender da quantidade, e forma química que o metal está presente na matriz de interesse e da sua ação (VERSANTVOORT et al., 2005; BOSSO e ENZWEILER, 2008).

Por isso, é fundamental conhecer as fontes de absorção dessas espécies, sendo uma questão de segurança alimentar conhecer a composição nutricional e de contaminantes dos alimentos, especialmente àqueles amplamente consumidos por crianças e idosos.

Contudo, ainda não existem métodos analíticos oficiais que podem ser aplicados a qualquer tipo de alimento e bebidas. Portanto, nos dias atuais ainda são observados estudos que mostram o desenvolvimento de metodologias analíticas empregadas na determinação total desses elementos nos mais diversos tipos de alimentos.

3.1. Determinação de espécies metálicas em matrizes alimentares

A referência oficial que estabelece métodos para as determinações de espécies metálicas em matrizes alimentares é a Association of Official Analytical Chemists (AOAC), que normalmente utiliza a Espectrometria Atômica, na qual o analito é atomizado por meio de uma chama (Espectrometria de Absorção Atômica em Chama – do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS)), de um forno (Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite – do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GF AAS)), ou um plasma ICP OES (AOAC, 2006; HARRIS, 2012; VOGEL, 2002).

Além da escolha de uma técnica de determinação adequada para as espécies metálicas, o tratamento da amostra também é fundamental. Uma forma de tratamento de amostra consiste em destruir a matriz orgânica e facilitar a determinação do analito de interesse (PELLERANO et al., 2012).

Existem vários procedimentos de preparo de amostras que envolvem os processos de digestão descritos na literatura, entre eles, a decomposição por via seca e a decomposição ou digestão por via úmida (SOUZA e CAMPOS, 2015).

Parreira (2012) utilizou a decomposição por via seca para determinação dos metais alumínio, cádmio, chumbo, cobre, cromo, arsênio e selênio em diferentes tipos de chá da planta *Camellia sinensis*, comercializados em Portugal, provenientes de agricultura tradicional e biológica. A preparação de amostras foi realizada utilizando temperaturas elevadas (450°C) em mufla durante oito horas, seguidas pela digestão ácida com ácido nítrico e peróxido de hidrogênio. As amostras foram analisadas por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite e de Geração de Hidretos. As concentrações obtidas para os metais de interesse ficaram entre 0,2 e 20 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Já Ramos et. al., 2017, avaliou as concentrações dos metais Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na e Zn em folhas e chás de *Cecropia*, planta medicinal da Amazônia, obtidos da Embrapa Amazônia Oriental. As amostras foram digeridas por micro-ondas com HNO_3 e H_2O_2 e analisadas por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado. Os resultados revelaram que ocorreu uma reduzida transferência dos metais da matéria seca para os chás, e que os teores de minerais não excederam os limites máximos toleráveis pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Na decomposição por via seca ocorre a fusão de compostos inorgânicos em altas temperaturas, normalmente realizadas em fornos do tipo mufla. O resíduo inorgânico restante, denominado de cinzas, é constituído de óxidos, silicatos, fosfatos dos analitos e são solúveis em ácidos (SOUZA e CAMPOS, 2015). Esse tipo de digestão, normalmente é descrita como procedimento padrão em diversos documentos oficiais para alimentos. Contudo, é conhecido algumas desvantagens desse tipo de procedimento como, por exemplo, o tempo necessário é elevado e podem haver perdas do analito por volatilização (SOUZA e CAMPOS, 2015).

Já a digestão por via úmida consiste na decomposição de compostos orgânicos e inorgânicos em seus elementos constituintes, utilizando ácidos minerais como ácido nítrico (HNO_3), ácido perclórico (HClO_4), ácido sulfúrico (H_2SO_4) e oxidantes como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além de uma combinação entre eles.

Os ácidos atuam na decomposição da fração orgânica da matriz da amostra e possuem alto potencial de oxidação. O HNO_3 é o ácido mais utilizado, devido a facilidade de encontrá-lo com alta pureza e também por gerar produtos de reação solúveis em meio aquoso (SOUZA e CAMPOS, 2015).

Como mencionado acima também podem ser utilizadas misturas de oxidantes sendo que uma mistura bastante empregada é HNO_3 e H_2O_2 , devido ao caráter oxidante do peróxido de hidrogênio. Com isso há um aumento na eficiência da digestão, e essa mistura pode gerar água como produto da decomposição, o que facilita o descarte dos resíduos (SOUZA e CAMPOS, 2015).

Existem diversos tipos de procedimentos descritos na literatura com diferentes condições e agentes oxidantes. Dessa forma, normalmente é necessário realizar experimentos de otimização para encontrar uma condição experimental ideal para a matriz e espécie de interesse. Porém, se o processo de digestão úmida for realizado em recipientes abertos e sem controle de temperatura, problemas como perda do analito ou a contaminação da solução podem ocorrer. A desvantagem pode ser a necessidade do uso de grande quantidade de reagentes, aumentando a possibilidade de contaminação da amostra. A grande vantagem desse tipo de abertura de amostra em relação a digestão via seca é a minimização do tempo necessário na digestão, utilização de temperaturas mais baixas, assim como, a possibilidade de miniaturização.

A eficiência dos procedimentos de abertura de amostra é importante para determinação das concentrações totais dos metais em alimentos, especialmente

aqueles que se encontram na forma sólida, no entanto, o conteúdo total de uma espécie metálica não revela realmente seu valor nutricional ou tóxico, pois nem todo elemento presente na matriz de um alimento/bebida é liberado para absorção no organismo durante o processo de digestão humana. Nesse sentido, é necessário conhecer a forma que o elemento se encontra na matriz e estimar a forma que está diretamente relacionada com o processo de absorção e possíveis efeitos, sejam tóxicos ou nutricionais (TOGNON, 2012; BRANDON et al., 2006).

Para entender a real absorção dos nutrientes ou dos contaminantes pelo organismo é necessário avaliar a biodisponibilidade dos mesmos, ou estimar essa absorção através dos ensaios de bioacessibilidade.

3.2. Biodisponibilidade de espécies metálicas em alimentos

Para se estimar o efeito da presença de espécies metálicas em alimentos, é necessário avaliar a sua disponibilidade biológica. Para isso, é necessário lembrar como ocorre o processo de absorção humana via digestão.

A digestão de maneira geral é o processamento de substâncias resultantes da degradação de partículas e moléculas absorvidas pelo organismo.

O processo da digestão química inicia-se na boca, pela ação de enzimas da saliva, onde a enzima principal é a amilase. Esta enzima catalisa a hidrólise de polissacarídeos como amido e glicogênio. No estômago as glândulas presentes nas paredes desse órgão fazem a síntese e a secreção de enzimas digestivas, como a pepsina, que degradam as proteínas em peptídeos, em pH ácido (1-3). Neste local, o bolo alimentar permanece de 2 a 4 horas. Em seguida, a partir dos movimentos peristálticos estomacais o bolo alimentar é encaminhado para o intestino delgado (SISTEMA DIGESTIVO).

No intestino delgado são lançadas as secreções do fígado (Bile) e do pâncreas (Suco pancreático). A Bile é produzida no fígado e armazenada na vesícula biliar, que através de um canal é lançada no duodeno (intestino delgado) e não contém enzimas digestivas. Possui sais biliares (glicolato e taurocolato de sódio) que emulsionam as gorduras, facilitando a ação das enzimas pancreáticas sobre os lipídeos.

Por fim, o suco pancreático, que chega no duodeno, é altamente rico em bicarbonato, que tem por finalidade neutralizar a acidez do bolo alimentar e garantir

a ação das enzimas pancreáticas em pH levemente alcalino e neutro. Essas enzimas atuarão na digestão de proteínas, carboidratos e lipídeos.

No intestino grosso, o material que não foi digerido, forma as fezes, que são acumuladas no reto e, posteriormente, empurradas por movimentos musculares ou peristálticos para fora do ânus.

Concluídas as etapas da digestão, os nutrientes que chegam à circulação sanguínea são distribuídos às células e estão disponíveis para serem utilizados pelo organismo.

A disponibilidade biológica ou biodisponibilidade pode ser definida como a fração de nutrientes ou agentes tóxicos provenientes de alimentos ou bebidas que ao ser digerido atinge a corrente sanguínea e é responsável por algum tipo de ação no organismo, seja efeitos nutricionais ou tóxicos, provocados pela ingestão desses elementos (PEREIRA, et al., 2016; BOSSO e ENZWEILER, 2008). A biodisponibilidade de um elemento é controlada pela forma que o metal se encontra na matriz, ou seja, sua especiação química (BATLEY, APTE e STAUBER, 2004).

A biodisponibilidade de espécies metálicas em alimentos, normalmente, é avaliada em testes *in vivo*, onde uma dose dos alimentos a serem testados são administradas, em cobaias (ratos, coelhos), e a fração bioacessível desses metais é analisada a partir de amostras biológicas (pelos, unhas, sangue), após a dieta (TOGNON, 2012).

No entanto, por questões éticas, laboratórios com estruturas adequadas e bem equipados, equipes especializadas acabam tornando essa prática inviável, além de um alto custo e maior tempo para obtenção dos resultados. Por isso métodos alternativos, como os ensaios *in vitro*, simples e eficazes vêm sendo amplamente estudados para substituir os ensaios *in vivo* (BOSSO e ENZWEILER, 2008; OOMEN et al., 2002).

Assim a bioacessibilidade a partir de análises químicas *in vitro* são uma maneira de avaliar a biodisponibilidade de um elemento. Desta forma, a bioacessibilidade é a fração solúvel do composto ou elemento, que é liberado da sua matriz no trato gastrointestinal, e está disponível para a absorção pelo epitélio intestinal (PEREIRA, et al., 2016).

Os testes *in vitro* fazem uma simulação do que ocorre no processo de digestão humana gastrointestinal, utilizando soluções artificiais que mimetizam o meio dos compartimentos digestivos (estômago e duodeno), no entanto na ausência de micro-

organismos (INTAWONGSE e DEAN, 2006). Desta forma, estima-se a fração bioacessível de uma espécie química através de um procedimento de extração e determinação do metal, no final do processo através de uma técnica instrumental.

Existem dois métodos de digestão gastrointestinal *in vitro* mais empregados que são (i) o método de extração seletiva (SBET – sample bioaccessibility extraction), que simula as condições gástricas, usando como suco gástrico uma solução de pH baixo (HCl), sem levar em consideração o compartimento do duodeno; (ii) o método de simulação gástrica (PBET – physiologically based extraction test), que leva em consideração tanto a digestão no estômago quanto a digestão no intestino. No SBET, utiliza-se apenas glicina, aminoácido mais simples produzido pelo corpo humano, e ácido clorídrico. A glicina tem fórmula química $C_2H_5NO_2$ e tem a função de atuar na produção da Bile, que irá degradar gordura. Já o ácido clorídrico proporciona um pH ótimo para a digestão protéica.

No método PBET, utiliza-se uma alíquota da amostra na qual é adicionada uma solução gástrica, preparada com enzimas, tais como pepsina em ácido clorídrico, e esta solução é mantida em incubação durante horas, em temperatura de 37°C e com agitação. Essas condições simulam a ação do estômago com movimentos peristálticos, pH baixo e temperatura similar a do corpo humano. Já as enzimas, pepsina, lipase gástrica e amilase gástrica, auxiliam na quebra de proteínas e dissolução das amostras (INTAWONGSE E DEAN, 2006). Para a simulação do trato intestinal utiliza-se o suco intestinal constituído por enzimas tais como a pancreatina, tripsina, entre outras, além de sais biliares e bicarbonato de sódio. Nesta etapa ocorre a quebra de proteínas, polissacarídeos e gorduras, fazendo com que as espécies metálicas fiquem solúveis e suscetíveis à absorção (INTAWONGSE e DEAN, 2006; RUBY et al., 1999).

Além desses, outro método que vêm sendo aplicado é o método de bioacessibilidade unificado (UBM - unified bioaccessibility method), desenvolvido pelo Grupo de Pesquisa de Bioacessibilidade da Europa (BARGE - Bioaccessibility Research Group of Europe). Esse método é similar ao método PBET, ou seja, possui as etapas gástrica e intestinal, diferindo em alguns pontos, como tempo de incubação e reagentes para ajustes de pH, etc. No entanto, apresenta uma primeira etapa diferente, que é a digestão na boca. Nessa etapa, a uma alíquota da amostra é adicionada um fluído salivar, contendo a enzima amilase que é responsável por

catalisar a hidrólise de polissacarídeos como o amido, glicogênio e seus derivados (TOKALIOGLU et al., 2014).

As enzimas que atuam na digestão em fase intestinal e gástrica, desses métodos, são formadas por longas cadeias de aminoácidos que sofrem um enovelamento formando as estruturas tridimensionais, que favorecem a interação com os substratos. Essas enzimas são conhecidas como catalisadores biológicos que possuem a capacidade de aumentar a velocidade das reações bioquímicas, tornando-as mais rápidas, sendo bastante específicas. Nesse caso as enzimas digestivas reduzem os alimentos (substratos) em componentes menores que são mais facilmente absorvidos pelo organismo (LEHNINGER et al., 1995).

Já os sais biliares são compostos por glicolato e taurocolato de sódio, eles são potentes detergentes que preparam os triglicerídeos da dieta para a hidrólise pela enzima pancreática através da sua ação emulsificante, formando as micelas que facilitam a absorção desses compostos (MCDONALD et al., 2010).

Os estudos de biodisponibilidade, utilizando ensaios *in vitro* vêm crescendo nos últimos anos. BERMEJO et al (2006), compararam a bioacessibilidade de Fe e Zn em duas amostras de leite utilizados para alimentar recém-nascidos – o leite materno e o leite de vaca em várias diluições. O tratamento envolveu duas etapas enzimáticas (1) pepsina em pH 5 e (2) pancreatina em pH neutro. As determinações dos elementos foram realizadas por FAAS e os resultados foram comparados aos obtidos pela digestão gástrica em pH 2, para um adulto. Em seus resultados notaram que não houve diferença na disponibilidade de Fe entre os leites estudados, no entanto para o Zn a disponibilidade no leite materno foi maior que a no leite de vaca. STELMACH et al. (2014), por exemplo, avaliaram a bioacessibilidade dos metais Ca, Mg, Mn e Fe, por espectrometria de absorção atômica com chama, em infusões de café, através de digestão gastrointestinal *in vitro* com soluções de suco estomacal e intestinal. O Mg foi o elemento mais bioacessível 62%, seguido do Fe (43%), Ca (42%) e Mn (27%). YANG e LIN (2016) fizeram a avaliação da bioacessibilidade do alumínio em diferentes chás da *Camellia Sinensis*, utilizando a digestão gastrointestinal. Em seus resultados a bioacessibilidade do metal foi alta na etapa gástrica (>90%) e baixa na etapa duodenal (<5%).

No entanto, estes dados ainda são escassos para matrizes alimentares, principalmente em bebidas. Por isso, torna-se interessante o estudo da bioacessibilidade de elementos metálicos, presentes em bebidas como os chás que

são amplamente consumidos pela população mundial, e desta forma contribuir para a segurança e a saúde da população (INTAWONGSE e DEAN, 2006).

3.3. Erva-Mate e Chá-Mate

O chá é uma bebida preparada exclusivamente da *Camellia sinensis* planta originária da China. A *Camellia sinensis* produz quatro tipos de chás, que são o branco, verde, oolong e preto, sendo que a diferença entre eles está na forma de processamento e oxidação das folhas (BRAIBANTE et al., 2014). Porém, muitas infusões preparadas a partir de plantas popularmente são chamadas de chás, pois a forma de preparo é similar da *Camellia sinensis* (BRAIBANTE et al., 2014). O costume brasileiro é de ingerir diversos tipos de chá, pois podem possuir inúmeros efeitos medicinais.

Uma planta que é bastante utilizada e consumida no Brasil especialmente na região Sul é a erva mate.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é uma árvore da família das Aquifoliaceae, originária da região subtropical da América do Sul, presente no sul do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai (HECK e MEJIA, 2009, BRACESCO et al., 2011).

A erva-mate apresenta várias classes de constituintes químicos, entre eles, polifenóis, xantinas, flavonoides e vitaminas. Esses compostos podem ser os responsáveis por ações terapêuticas citadas na literatura tais como propriedades antioxidantes, vasodilatadoras, redução de lipídeos, efeitos mutagênicos e antimutagênicos, redução no teor de glicose no organismo e redução de peso (BASTOS et al., 2007; DE MEJIA, 2009; FILIP et al., 2010).

Segundo dados da literatura também foram detectados na erva-mate, espécies metálicas, essenciais como Cu, K, Ca, Mn e tóxicos como Pb, Al, Cd (STAGG e MILLIN, D.J., 1975; HEINRICHS e MALAVOLTA, 2001; ZHANG, ZHOU e HUANG, 2006). Esses metais podem fazer parte da composição mineral da planta, oriundas da contaminação dos solos e águas pelo uso de fertilizantes, pesticidas, emissões veiculares, mineração, resíduos urbanos e industriais. Independente da sua origem, os metais são acumulados nas plantas e desta forma podem entrar na cadeia alimentar (PYTLAKOWSKA et al, 2012).

Existem vários estudos na literatura que relatam a determinação das concentrações totais de alguns metais na erva-mate. Como exemplo, SAIDELLES et

al. (2010) realizaram a determinação das concentrações de metais essenciais e tóxicos na composição da erva mate comercializada e consumida nos estados do Sul do Brasil, utilizando ICP OES. Os valores encontrados nesse estudo para Cd variou entre $0,35 \mu\text{g g}^{-1}$ e $1,21 \mu\text{g g}^{-1}$; para Cu entre $8,38 \mu\text{g g}^{-1}$ e $12,72 \mu\text{g g}^{-1}$; para Al variou de $3249,4 \mu\text{g g}^{-1}$ a $5232,8 \mu\text{g g}^{-1}$; e no caso do Pb as concentrações ficaram abaixo do limite de detecção $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$.

MAIOCCHI et al. (2015) estudaram a composição e o valor nutricional das plantas, “dumosa” (*Illex Dumosa*) e erva-mate (*Illex Paraguariensis*). A determinação realizada por ICP OES indicou que pelo menos 26 elementos ocorrem tanto na dumosa, quanta na erva-mate. Na dumosa, a concentração de cobre foi de $15,4 \text{ mg kg}^{-1}$, alumínio foi 296 mg kg^{-1} e chumbo $0,83 \text{ mg kg}^{-1}$, enquanto que na erva-mate as concentrações foram $8,7 \text{ mg kg}^{-1}$, 643 mg kg^{-1} e $2,9 \text{ mg kg}^{-1}$ para Cu, Al e Pb, respectivamente.

Algumas legislações estabelecem um limite aceitável de alguns metais: A Organização Mundial da Saúde (OMS) trás limites para os alimentos em geral, mas não especifica quais os tipos de alimentos. Por exemplo, para o cádmio traz um limite de $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$, para o chumbo até $10,0 \mu\text{g g}^{-1}$ e $20,0 \mu\text{g g}^{-1}$ para o cobre (PARREIRA, 2012). Já a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece um limite para chás, erva-mate e outros vegetais utilizados para infusões: cádmio $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$, chumbo $0,6 \mu\text{g g}^{-1}$, cobre $0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ e para o alumínio $1,0 \mu\text{g g}^{-1}$ (BRASIL, 2013).

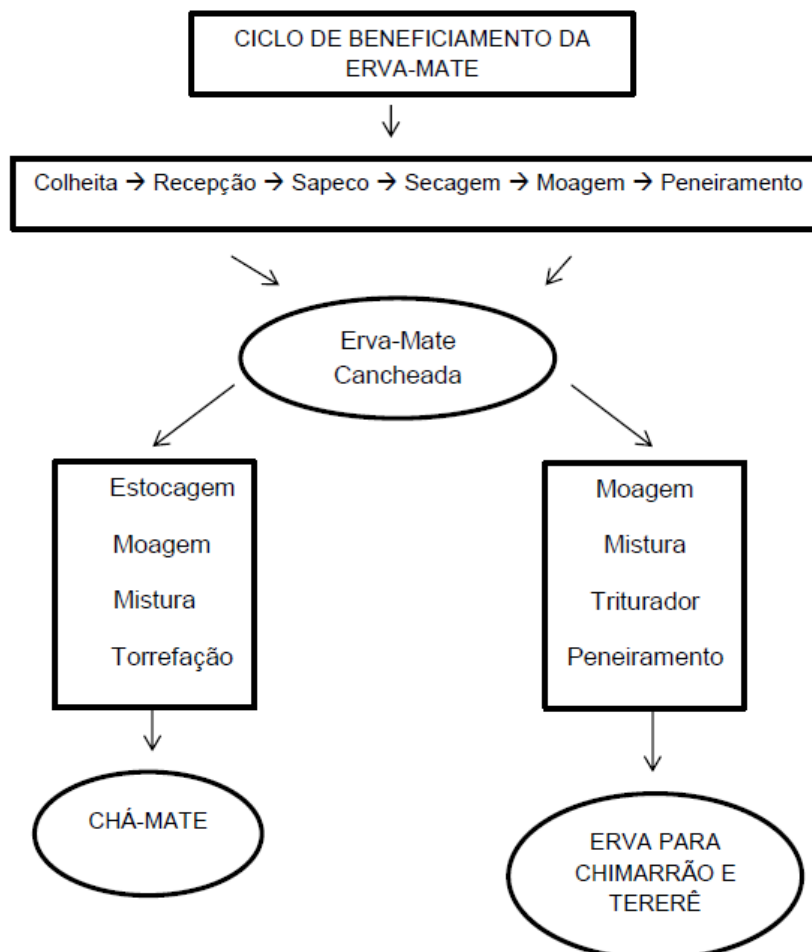
Os trabalhos e as legislações, apresentados acima, baseiam seus estudos nas concentrações totais e como visto anteriormente as concentrações totais não revelam o real teor de metal que estará disponível para ser absorvido pelo organismo e assim ser capaz de provocar algum efeito, seja ele nutricional ou tóxico.

Existem poucos estudos que avaliam essa absorção utilizando ensaios de bioacessibilidade e biodisponibilidade de elementos em matrizes como os chás. Por isso, faz-se necessário o estudo dessa bebida, muito consumida no Brasil, em especial o chá da erva-mate um produto de ampla produção, comercialização e consumo nos estados do Sul do Brasil.

A partir do beneficiamento da erva-mate, podem ser preparadas bebidas chamadas de “chimarrão”, “tererê” e o “chá-mate”.

Na Figura 1 são mostradas as etapas de beneficiamento da erva-mate que envolve a produção da erva-mate cancheada (erva *in natura*, seca e triturada), chá mate queimado (torrado) e da erva-mate para chimarrão e tererê.

Figura 1. Esquema do Processo de Beneficiamento da Erva-mate



Fonte: Adaptado de Junior A. M. 2005.

Na etapa do sapeco as folhas de erva-mate colhidas passam por um processo de deterioração natural associado a ação de enzimas, que catalisam reações de oxidação de fenólicos, causando mudança na cor das folhas.

Como o sapeco não é suficiente para retirar toda a umidade da erva, é necessário o processo de secagem, onde as temperaturas variam entre 80-110°C, dependendo de cada procedimento. Essa etapa garante a estabilidade da erva.

Em seguida, a erva é triturada e peneirada até chegar no produto denominado de erva-mate cancheada. Na próxima etapa a erva-mate cancheada, passa por

novas operações até a obtenção do produto final, que pode ser a erva-mate utilizada para preparar o chimarrão e tererê e o chá-mate.

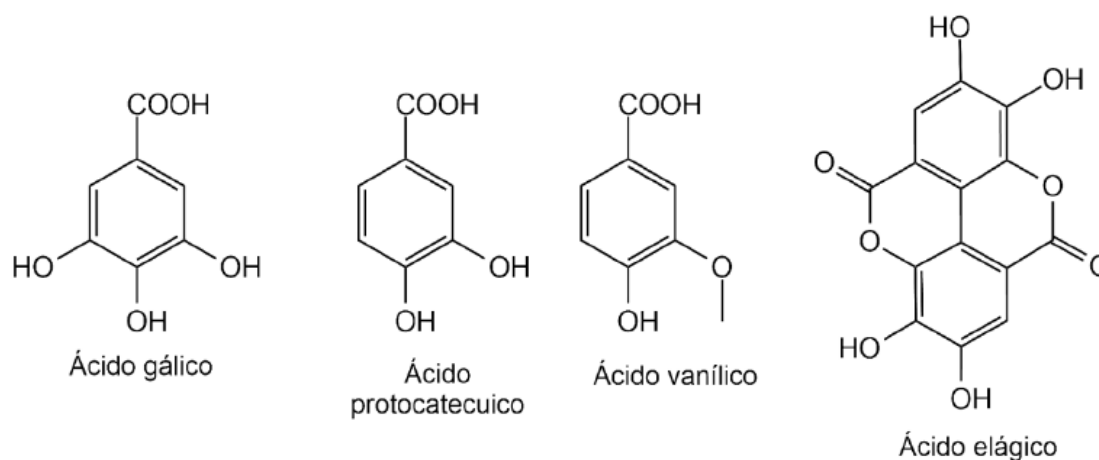
Para a erva-mate utilizada em chimarrão e tererê, a erva cancheada é moída, misturada, peneirada, embalada e comercializada de imediato, garantindo assim a coloração verde tão apreciada pela maioria do mercado.

No caso do chá-mate a erva cancheada passa por um período de armazenamento de no mínimo de seis meses para transformação do produto que adquire coloração amarela, seguido de uma moagem e mistura para obtenção da granulometria desejada. Por fim, a erva é tostada passando por um sistema de forno com fogo indireto, para então dar origem ao chá-mate tostado.

Assim como a erva-mate o consumo regular do chá-mate está associado a efeitos benéficos a saúde humana como diminuição do colesterol, ajuda na proteção do fígado, estimulante do sistema nervoso central, diurético, antioxidante, entre vários outros (BASTOS et al., 2007; DE MEJIA, 2009; FILIP et al., 2010). Essas propriedades podem estar associadas a numerosos fitoquímicos ativos que foram identificados no chá-mate como compostos fenólicos (catequinas e flavonoides) que correspondem de 20 a 30% da composição dos chás, alcalóides (cafeína, teobromina, teofilina, etc), óleos voláteis, polissacarídeos, aminoácidos, lipídeos, vitaminas, minerais, dentre outros (HECK e DE MEJIA, 2009; RODRIGUES V. C, 2015).

Os compostos fenólicos presentes nos chás se caracterizam, quimicamente, por possuírem diversas hidroxilas (-OH) diretamente ligadas a um anel aromático, como mostra a Figura 2. (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997). Estes compostos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, funcionando como sequestradores de radicais livres e até mesmo como quelante de metais. Com isso, os produtos formados pela reação destes compostos com os radicais livres são relativamente estáveis, devido à ressonância com o anel aromático, apresentada por estas substâncias (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

Figura 2. Exemplos de estruturas de compostos fenólicos encontradas em chás.



Fonte: HACKE, 2017.

Desta forma, torna-se interessante avaliar o conteúdo de compostos fenólicos presentes no chá-mate, para verificar se a presença desses compostos irá influenciar nas concentrações das espécies metálicas em bebidas preparadas por infusões. Isto porque estes compostos podem complexar com metais e desta forma carregar essas espécies para as infusões (CAMPOS et al., 2014).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Técnicas Limpas

Para evitar ou minimizar as contaminações, procedimentos de técnicas limpas foram adotados, visto que o trabalho envolveu determinações de metais traço (CAMPOS, BENDO e VIEL, 2002; DE ANDRADE et al., 2014).

Desta forma, todos os objetos foram manipulados com luvas e o local de preparo e manipulação das amostras foi limpo com detergente neutro, álcool e com solução 0,1 mol L⁻¹ de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O EDTA age como complexante de espécies metálicas que podem estar presentes nas bancadas e desta forma pode acabar contaminando as amostras e os reagentes.

Os materiais utilizados durante todas as etapas foram previamente lavados com detergente neutro e enxaguados exaustivamente com água corrente. Posteriormente os materiais foram mantidos em banho de HNO₃ 5% (v/v) por 24 horas. Concluída esta etapa, os materiais foram retirados do banho e lavados por 5 vezes com água ultrapura (U.S. EPA, 1999). Para a secagem, estes foram deixados em bandejas descontaminadas e cobertos com papéis. Por fim, guardados em sacos plásticos.

4.2. Reagentes

Neste trabalho todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou ultrapuros.

No preparo de todas as soluções foi utilizada água ultrapura, do tipo Milli-Q (Millipore - Gehaka). Para as etapas de pré-tratamento das amostras de erva-mate (digestão via úmida e via seca) foram utilizados, ácido nítrico (Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich).

Na determinação de fenólicos totais, o padrão de ácido gálico e o reagente de Folin-Ciocalteau foram adquiridos da Sigma-Aldrich e o carbonato de sódio foi adquirido da Merck®.

No preparo das soluções gástrica e intestinal foram utilizados pepsina de mucosa gástrica de suínos (≥ 250 unidades/mg), pancreatina de pâncreas de suínos (adequado para a cultura de células, 4 $\times$ especificações USP), sais biliares e ácido clorídrico sendo todos esses reagentes adquiridos da Sigma-Aldrich, e o bicarbonato de sódio da Biotec.

Para obtenção da curva analítica, as soluções padrões dos íons metálicos em estudo, Cu^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} e Pb^{2+} , foram preparadas a partir dos padrões iniciais de 1000 mg L^{-1} (SpecSol).

4.3. Equipamentos

Os equipamentos de grande porte utilizados no trabalho estão situados no Laboratório Multiusuários (C-LABMU). Os equipamentos menores estão localizados no Laboratório de Pesquisa L-27 da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), sendo eles: balança analítica (Shimadzu AU220), lavadora ultrassônica (Unique, modelo USC-2800A, 40 kHz), placa de aquecimento (SPLabor), estufa (Nova Técnica, modelo NT 511), incubadora Shaker (SPLabor, modelo SP222), pHmetro (Metrohm, modelo 827 pH Lab) e uma ultracentrífuga (Hitachi – Himac CR21GII) também foram utilizados no preparo das amostras.

As determinações de íons metálicos foram conduzidas em um Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama (FAAS) (Varian, Spectra 220). O fluxo dos gases, óxido nitroso, acetileno e ar foram $6,0$, $12,5$ e 8 L min^{-1} , respectivamente. O outro equipamento foi um Espectrômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS) (Varian, AA 240Z), equipado com corretor Zeeman para correção de fundo e um auto-amostrador PSD 120. O argônio foi empregado como gás inerte com vazão de $0,3 \text{ L min}^{-1}$. Os tubos de grafite empregados na determinação dos metais traço foram os pirolíticos e as lâmpadas foram de cátodo oco (Varian).

As absorbâncias das amostras, para determinação de fenólicos totais, foram registradas em um espectrofotômetro de placas Biotek $\mu\text{Quant}^{\circledR}$ (Synergy H1 Hybrid Reader).

4.4. Amostras comerciais de chá-mate e amostragem.

As amostras de chá da erva-mate utilizadas nesse trabalho foram adquiridas nos supermercados da cidade de Ponta Grossa, PR, sendo que para cada marca de chá foram compradas quatro amostras de diferentes lotes. As marcas de chá-mate adquiridas são produzidas em diferentes regiões do Paraná e Rio Grande do Sul. As marcas foram denominadas com letras diferentes, para as quatro amostras avaliadas.

As marcas estudadas e o seu local de origem são: Marca A – Almirante Tamandaré - PR; Marca B – Fernandes Pinheiro-PR; Marca C – Nova Candelária – RS e Marca D - Guarapuava - PR.

Para cada marca foi realizada uma amostragem separada. Os saquinhos de cada um dos produtos comerciais (04) de uma mesma marca foram abertos e misturados. Dessa amostra composta, em seguida foi realizado um quarteamento, para obter homogeneidade da amostra. A Figura 3 mostra fotografias do processo de amostragem das amostras a serem utilizadas nas análises.

Figura 3. Fotografias das etapas de amostragem conduzida por quarteamento de quatro amostras de chá-mate de um mesmo fabricante.



Fonte: A autora.

4.5. Determinação do teor de umidade das amostras comerciais

Para a determinação do teor de umidade das amostras de chá-mate, após quarteamento estas foram previamente pesadas em béqueres, aproximadamente 1,50 g (média obtida para a massa correspondente a cada saquinho, $n=10$) e em seguida colocadas em estufa a 40°C por 20 minutos. Este procedimento seguiu-se até obtenção de massa constante. Após resfriamento em dessecador, a massa das amostras foi determinada e realizou-se o cálculo de umidade.

4.6. Determinação dos teores totais de íons metálicos em amostras de chá-mate comercial.

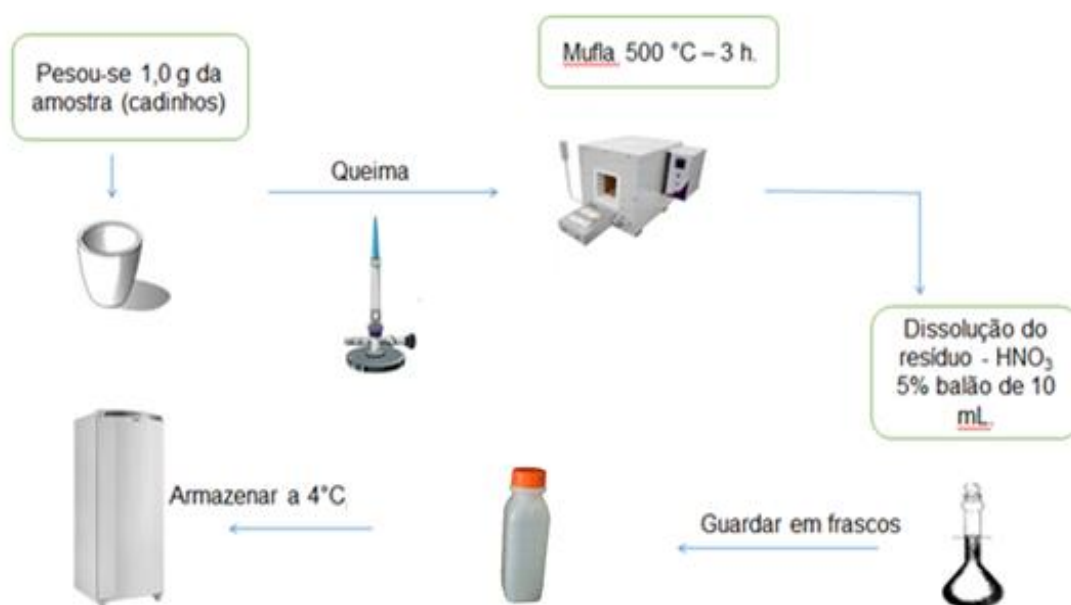
Para a determinação dos teores totais de Cd, Pb, Cu e Al, inicialmente realizou-se um processo de abertura da amostra (por via seca ou via-úmida) e posterior determinação por espectrometria de absorção atômica. As condições de decomposição das amostras por via-úmida foram otimizadas por planejamento fatorial.

4.6.1. Abertura de amostra por via seca.

Para esse estudo foi utilizado a amostra da Marca A de chá-mate comercial. A massa de 1,0 g da amostra foi transferida para um cadinho de porcelana e mantido em contato com uma chama (bico de Bunsen) até obtenção de cinzas. Em seguida, o cadinho foi transferido para uma mufla para calcinação por 3 horas à 500°C. Após arrefecimento, colocou-se HNO_3 concentrado para dissolução do material calcinado e transferiu-se a solução para um balão de 10 mL, e o seu volume foi completado com água ultrapura. Os ensaios foram realizados em triplicata (PARREIRA, 2012).

As soluções foram guardadas em frascos de polietileno, previamente descontaminados e armazenadas em geladeira em uma temperatura de aproximadamente 6°C para posterior análise por GFAAS e FAAS. Para melhor visualização a Figura 4, mostra as etapas da digestão por via seca.

Figura 4. Esquema das etapas do procedimento de abertura de amostra por via seca do produto comercial de chá-mate para posterior determinação dos metais por espectrometria atômica.

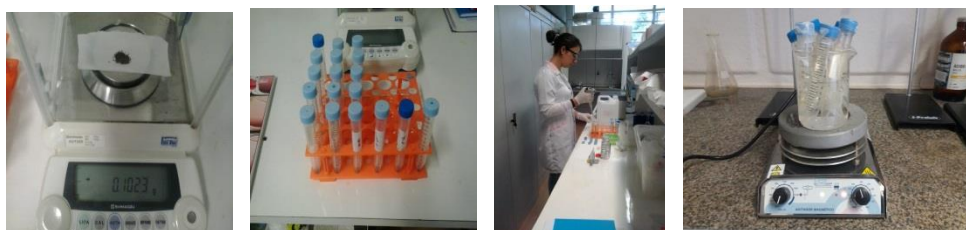


Fonte: A autora

4.6.2. Abertura de amostra por via-úmida em recipiente fechado

Pesou-se cerca de 0,100 gramas da amostra de chá-mate e esta foi transferida para tubos plásticos de fundo cônico. Após adição de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio, os recipientes foram fechados e colocados em banho-maria em ebulição por uma hora, dentro da capela. Após esse tempo os frascos foram abertos, para eliminação dos gases e resfriamento. As amostras digeridas foram transferidas para balões de 10 mL e avolumadas com água ultrapura (RIBEIRO et al., 2016). Em seguida, foram guardadas em frascos de polietileno, previamente descontaminados e, armazenadas em geladeira numa temperatura de aproximadamente 6°C para posterior análise. A Figura 5 mostra as etapas realizadas para o procedimento de abertura de amostra por via úmida.

Figura 5. Etapas do procedimento de abertura de amostra por via úmida do produto comercial de chá-mate para posterior determinação dos metais por espectrometria atômica.



Fonte: A autora.

Para otimizar esse procedimento, foi realizado um planejamento fatorial do tipo 2^2 com ponto central. Os fatores avaliados foram os volumes dos agentes oxidantes em dois níveis. Os ensaios foram realizados em duplicata, com exceção do ponto central que foi realizado em triplicata. Na Tabela 1 encontra-se a matriz do planejamento fatorial utilizado para encontrar a melhor condição experimental para a resposta (concentração das espécies metálicas). Os volumes utilizados dos reagentes HNO_3 (65%) e H_2O_2 (30%) foram baseados na literatura (DA COSTA et al. 2009). Para o tratamento estatístico utilizou-se o programa Statistic (Statsoft software, version 13.0, 2014).

Tabela 1. Fatores e níveis, avaliados na otimização da etapa de abertura de amostra de chá-mate comercial por via-úmida, através de planejamento fatorial 2^2 com ponto central.

Níveis	HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)
Superior (+)	3,00	0,75
Inferior (-)	1,00	0,25
Ponto Central (0)	2,00	0,50

Fonte: A autora

4.6.3. Determinação dos teores de Cd, Cu, Pb e Al por Espectrometria Atômica.

As condições de atomização e as faixas da curva analítica dos elementos determinados estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Condições de atomização e faixa de trabalho para os metais determinados na erva-mate e nas infusões da erva-mate.

Equipamento	Metal	Curva analítica *	Chama	T Pirólise (°C)	T Atomização (°C)	I (mA)	λ (nm)
FAAS	Al **	0,5 – 20,0	Acetileno/Óxido Nitroso	-	-	25	309,3
	Cu	0,1 - 0,9	Ar/ Acetileno	-	-	4	324,8
	Cu	2,0 – 20,0	-	800	1600	4	324,8
GFAAS	Cd	0,2 – 1,0	-	250	1800	4	228,8
	Pb	0,2 – 10,0	-	400	1000	10	283,3

* FAAS (mg L⁻¹) e GFAAS (µg L⁻¹)

** Uso de KCl 1,0 mol L⁻¹ para construção da curva analítica e para análise das amostras

As quantificações dos metais Cd, Cu, Pb e Al em todas as etapas foram realizadas através do método de calibração externa. A faixa de concentração da curva analítica utilizada nas quantificações dos metais foi escolhida de acordo com os teores dos metais normalmente encontrados nos chás. No entanto, para o Cd nas determinações das frações bioacessíveis foi utilizado o método de adição de padrão para minimizar as interferências da matriz nas medidas.

4.7. Preparo de infusões de chá-mate para determinação do teor de metais, fenólicos e ensaios de bioacessibilidade.

4.7.1 Preparo de infusões das diferentes marcas comerciais de chá-mate

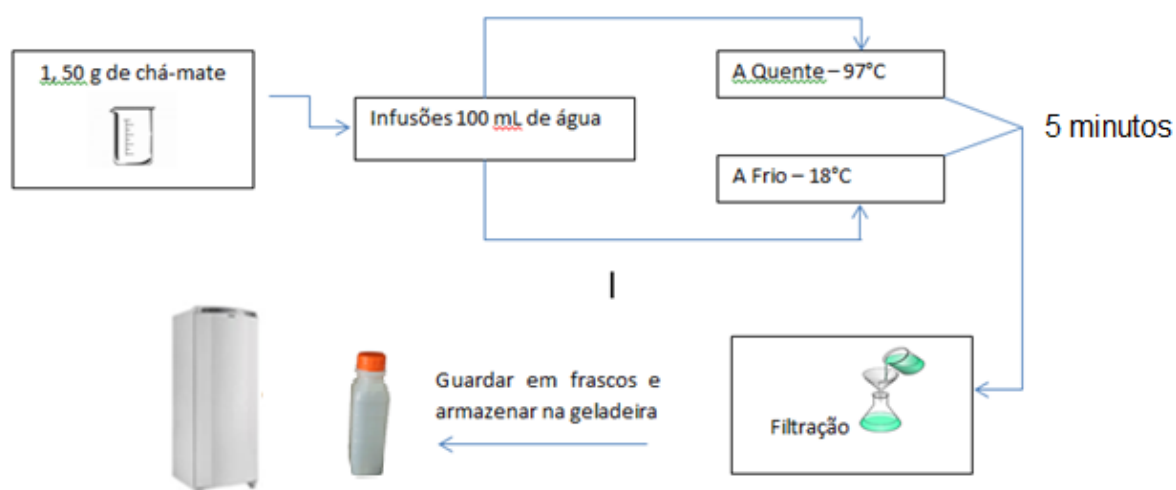
A forma de preparo foi similar a condição normalmente consumida pela população em geral. A Figura 6 mostra um esquema do modo de preparo das bebidas por infusões a quente e a frio.

No preparo da infusão a quente, cerca de 1,50 g da amostra quarteada e seca foi utilizada, massa que corresponde a média ($n=10$) do conteúdo de um saquinho. Para tal, foram aquecidos 100 mL de água ultrapura até ebulição, aproximadamente 97°C, e transferida para um béquer contendo a massa de chá-mate. A infusão foi preparada com o contato durante 5 minutos.

O procedimento de infusão a frio foi similar, no entanto a temperatura ambiente da água no momento de preparo era de 18°C. Por ser uma temperatura bastante inferior a outra forma de infusão, foi utilizado o termo a frio.

Após o preparo, as soluções obtidas foram filtradas em papel de filtro e mantidas em refrigeração até análise dos metais, da fração bioacessível e dos compostos fenólicos.

Figura 6. Esquema do modo de preparo das infusões a quente e a frio



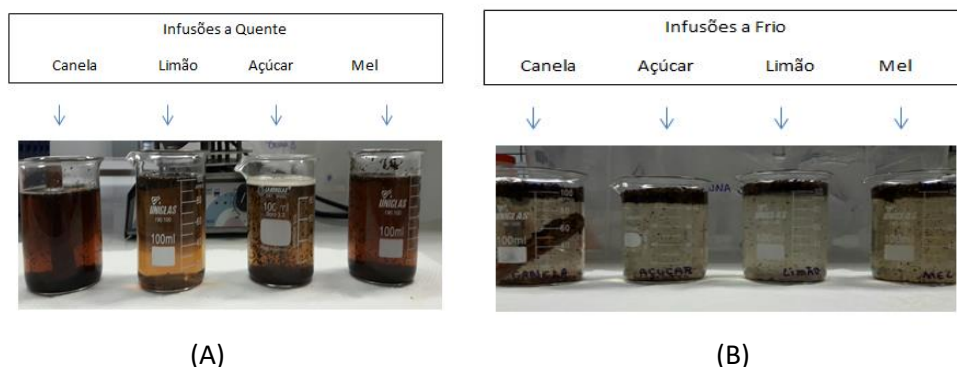
Fonte: A autora.

4.7.2 Preparo de infusões de chá-mate com adição de ingredientes.

Normalmente, as bebidas preparadas com chá-mate são consumidas com adição de outros ingredientes. Como a forma de preparo utilizada no trabalho tentava simular a condição normalmente consumida pela população em geral, foram adicionados nas infusões separadamente açúcar refinado, mel, canela em pau e suco de limão.

O preparo das infusões a quente e a frio, seguiu o mesmo procedimento descrito anteriormente. No entanto, foram realizadas adições de quatro ingredientes de maneira individual um em cada infusão, como mostra a Figura 7A e 7B. Os ingredientes foram adicionados em 100 mL de cada uma das infusões. Os ingredientes adicionados foram a canela em pau (massa de 1,89 a 4,85 g), açúcar branco refinado (0,400 g), mel natural (0,883 g) e suco de limão Taiti (5,0 mL). Foram obtidas um total de 8 infusões (4 quentes com ingredientes e 4 frias com ingredientes).

Figura 7. Imagens das adições de ingredientes (A) Infusões a Quente e (B) Infusões a Frio.



4.8. Determinação de Cd, Pb, Cu e Al em bebidas preparadas com chá-mate por espectrometria atômica

A determinação das espécies metálicas nas bebidas preparadas por infusões a quente e a frio, foi realizada de forma direta tanto por GF AAS, quanto por FAAS.

Para as determinações dos elementos Cd, Pb, e Cu por GF AAS utilizou-se 1,5 mL de amostra. Na determinação do Al por FAAS, utilizou-se 10 mL de amostra.

O método de calibração das curvas analíticas, para as duas técnicas, foi o de calibração externa. As medidas foram realizadas nas quatro marcas estudadas em duplicata.

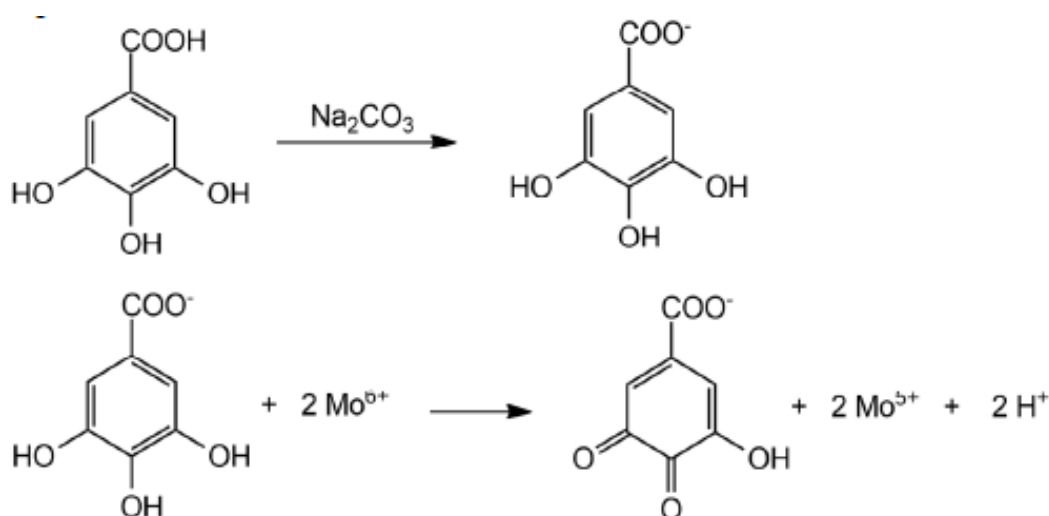
4.9. Determinação dos teores totais de compostos fenólicos por espectroscopia de absorção molecular na região ultra-violeta e visível

Para a determinação do teor de compostos fenólicos totais para as amostras de chá da erva-mate utilizou-se o método modificado de Folin-Ciocalteu como descrito por Singleton et al. (1999).

Em uma placa de ELISA de 96 cavidades foram adicionados 5 µL das amostras de infusão a quente e fria de chá-mate, 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e 100 µL de solução aquosa de Na₂CO₃ 7,5% (m/v). A placa foi incubada a 45°C por 15 minutos em estufa.

A determinação dos teores totais de compostos fenólicos nas amostras de chá da erva-mate comercial foi realizada por meio de espectroscopia de absorção molecular na região do UV-VIS em um espectrofotômetro de placas Biotek µQuant® (Synergy H1 Hybrid Reader). Para tal, foi empregando o reagente de Folin-Ciocalteu, o qual consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico e possui coloração amarela no complexo Na₂MoO₄·2H₂O (Figura 8). Este método é baseado na oxidação do composto fenólico em meio alcalino (SHAHIDI; ZHONG, 2015), com a concomitante redução do íon complexo de coloração amarela [Mo^{VI}O₄]²⁻ ao complexo de coloração azul [(P^VMo^VW₁₁O₄)]⁴⁻, o qual apresenta absorção na faixa entre 620 e 740 nm (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

Figura 8. Reação de oxirredução entre o ácido gálico e o íon molibdato (VI) (um dos componentes do reagente de Folin-Ciocalteu).



Fonte: Adaptado de Oliveira e colaboradores (2009).

Após esta etapa, foi calculado o teor de compostos fenólicos totais para as amostras a partir da curva de calibração de ácido gálico e o resultado foi expresso em mg de ácido gálico (A.G) por g^{-1} de planta. As análises foram realizadas em triplicata.

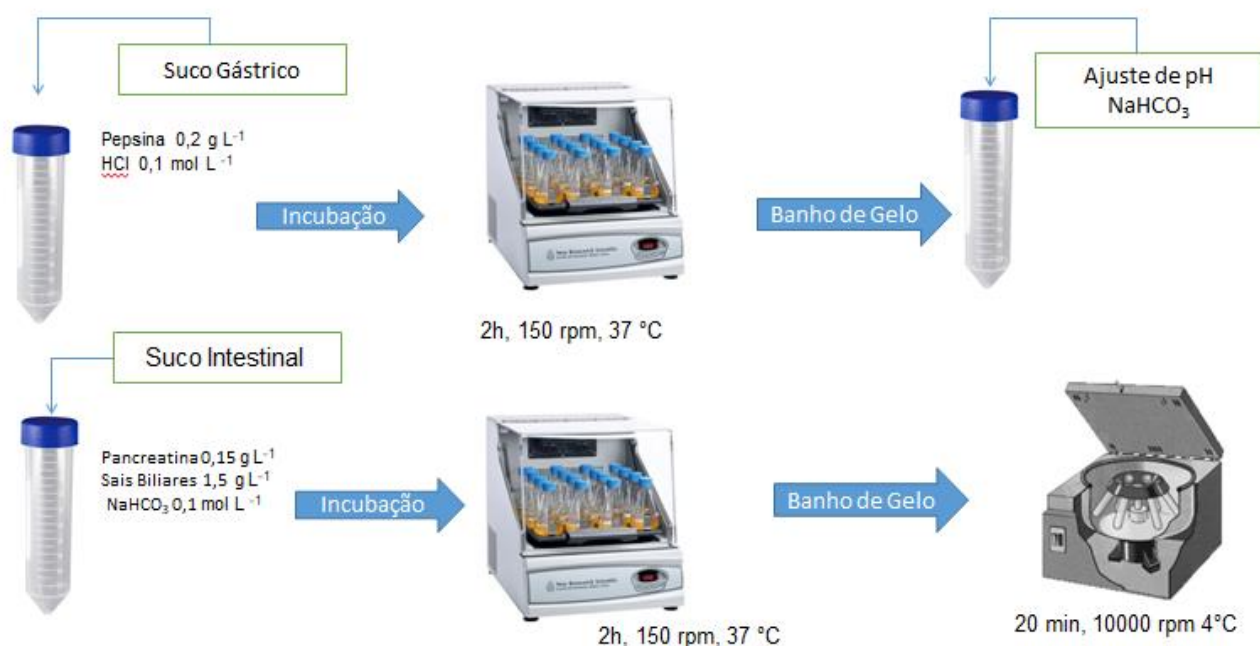
Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0, e as médias dos grupos foram comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls e $p < 0,05$ considerado significativo.

4.10. Avaliação da bioacessibilidade de Cd, Pb, Cu e Al em infusões a quente e a frio utilizando digestão gastrointestinal *in vitro* (PBET)

Para os ensaios de bioacessibilidade foram utilizados 20 mL das infusões a frio e a quente de chá-mate (infusão a quente e infusão a frio, com e sem ingredientes). Em seguida a amostra foi incubada à 37°C , 100 rpm, por 2h com 2,5 mL de suco gástrico. Para o preparo do suco gástrico foi utilizado $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de pepsina dissolvida em $\text{HCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Após esse período, as amostras foram retiradas da incubação e colocadas em banho de gelo e neutralizadas com $\text{NaHCO}_3 \text{ } 1,5 \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente, as soluções foram incubadas com suco intestinal com uma concentração final em solução de $0,15 \text{ g L}^{-1}$ de pancreatina, $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de sais de biles e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaHCO_3 . Ao final, as amostras foram retiradas da incubação e colocadas em banho de gelo para posterior centrifugação (4°C , 10000 rpm, por 15 min.) O procedimento está demonstrado de forma esquemática na Figura 9. A fração dissolvida foi utilizada na determinação dos metais Cu, Cd, e Pb por GF AAS e Al por FAAS (ADAPTADO de STELMACH et al, 2014).

Para a determinação das espécies metálicas Cd e Pb por GF AAS, foi necessário a adição de $\text{HNO}_3 \text{ } 0,6 \text{ mol L}^{-1}$, em 1,5 mL da amostra, a fim de minimizar possíveis interferências nas medidas. Além disso, para o Cd foi realizada curva de adição de padrão devido as interferências da matriz nas análises desse elemento.

Figura 9. Esquema representativo dos ensaios de bioacessibilidade realizados nas amostras de chá da erva-mate.



Fonte: Adaptada de Domínguez-González et al., 2010.

O procedimento foi implantado em trabalhos prévios do grupo de pesquisa (DE ANDRADE, 2018). No entanto, foi realizado um teste de exatidão do método por teste de recuperação dos analitos na matriz de interesse, em triplicata.

Inicialmente, as amostras de chá-mate foram analisadas por AAS e os metais de interesse (Cd, Cu, Pb e Al) foram quantificados. Posteriormente, as bebidas de chá-mate, preparadas por infusão a quente, foram enriquecidas com os íons metálicos em diferentes concentrações: $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd, $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb, $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu e $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Al, para realização das medidas por AAS.

4.11. Avaliação da fração bioacessível de Al infusões a quente e fria de chá-mate enriquecidas com ingredientes utilizando digestão gastrointestinal *in vitro* (PBET)

Para as determinações de alumínio, por FAAS, nas bebidas enriquecidas com açúcar e mel foi realizada uma diluição de 10 vezes para evitar interferências nas medidas, devido a complexidade dessas matrizes. Para isso utilizou-se 1 mL da amostra e água ultrapura para completar o balão de 10 mL até o menisco.

Nas bebidas enriquecidas com limão e canela a determinação foi direta, utilizando 10 mL de cada amostra.

Para controle, foi realizada as determinações de Al no Branco (água e ingrediente - canela, mel, açúcar, limão), tanto nas infusões a frio, quanto nas infusões a quente.

Afim, de evitar interferências de ionização, foi adicionado em todas as amostras, inclusive nos brancos KCl 1 mol L^{-1} .

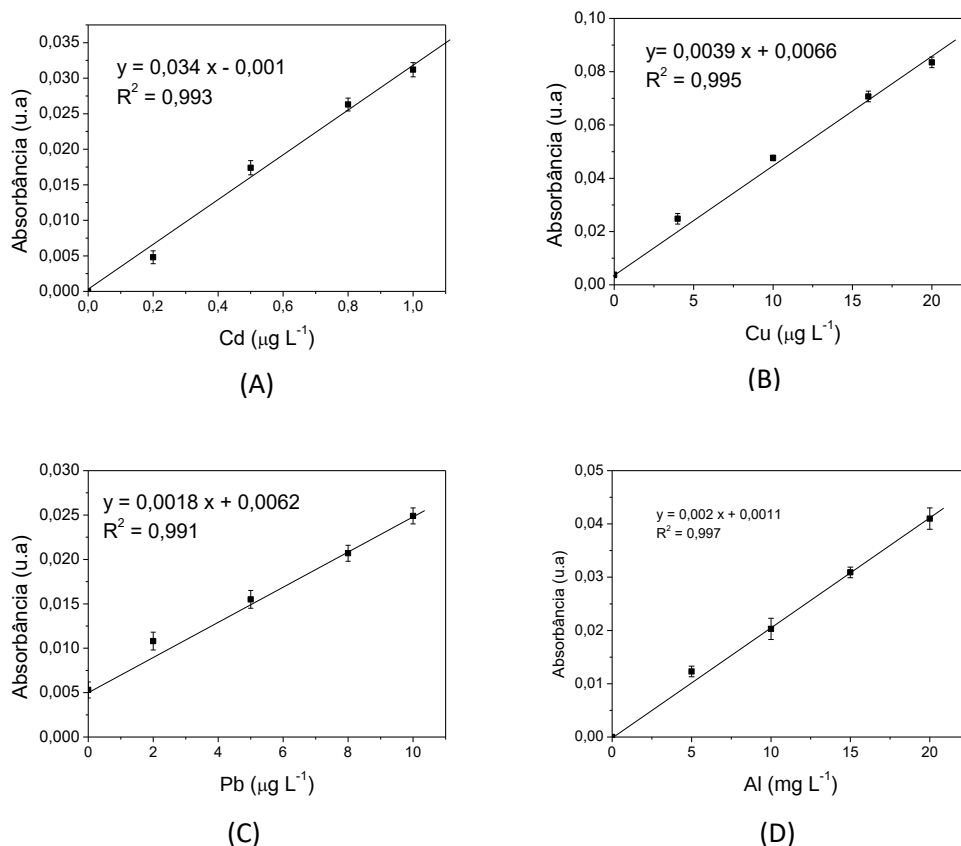
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Determinação das espécies metálicas em chá-mate por Espectrometria de Absorção Atômica

Neste trabalho, as determinações dos elementos Cd, Cu e Pb foram realizadas por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GF AAS) e Al por espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS). A escolha pela Espectrometria de Absorção Atômica nas determinações se devem as suas características de seletividade, elevada sensibilidade, alta precisão e exatidão e baixo custo relativamente alcançado nas medidas, quando comparado a outros métodos como o ICP OES (HARRIS D. C., 2012). A escolha da GF AAS para os metais Cd, Cu e Pb foi baseada nas concentrações dessas espécies normalmente encontradas nos chás, na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. Já para o Al optou-se por trabalhar com a FAAS, devido as altas concentrações geralmente encontradas na erva-mate desse elemento (BRAGANÇA et. al., 2011; CAMPOS et al., 2014).

As quantificações foram realizadas através do método de calibração externa, que consiste em obter o sinal da resposta, neste caso a absorbância, em função da concentração conhecida do analito. Este método é utilizado para calibrar instrumentos e procedimentos quando não há interferência de componentes da matriz na solução do analito. Nesse trabalho, era esperado que não houvesse processos de interferências, pois as amostras *in natura* foram tratadas previamente (digestão via-úmida), e foram realizadas infusões a quente e a frio que minimizaram a possibilidade de interferência química. Para os quatro elementos estudados, foi realizada uma curva analítica representativa empregando GF AAS e FASS, como mostra a Figura 10. As condições de análise foram utilizadas conforme indicação do fabricante do equipamento e descritas na Tabela 2.

Figura 10. Curvas analíticas representativas da determinação dos íons metálicos em amostras de chá-mate utilizando o GF AAS e FAAS. (A) Cd^{2+} empregando GF AAS; (B) Cu^{2+} empregando GF AAS; (C) Pb^{2+} empregando GF AAS; (D) Al^{3+} empregando FAAS.



Fonte: A autora.

A Figura 10 mostra que para todos os elementos o sinal analítico das medidas foi diretamente proporcional com a concentração dos analitos obtidos. Conforme esperado, a concentração dos íons aumentou proporcionalmente com o sinal de absorbância. Observando as quatro figuras acima, nota-se que as curvas analíticas obtidas, apresentaram coeficiente de correlação (R^2) superior a 0,99 indicando uma adequada relação entre absorbância e concentração do padrão ($r > 0,99$) (AOAC, 2002).

Como os elementos estudados se encontram em níveis traço, foi necessário conhecer a concentração do analito que pode ser detectado ou quantificado pelo método proposto. Os limites de detecção - do inglês Limit of Detection (LOD) e limite de quantificação - Limit of Quantification (LOQ) foram determinados seguindo as recomendações da International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC-2000) a partir das equações (1) e (2).

$$LOD = \frac{3 \times s}{S} \quad \text{Equação (1);}$$

$$LOQ = \frac{10 \times s}{S} \quad \text{Equação (2);}$$

Nas equações 1 e 2, o termo “s” representa a estimativa de desvio padrão das medidas de controle analítico (branco) e “S” representa a inclinação (slope) da curva analítica para a espécie de interesse.

Nesse trabalho, foram realizadas 10 medidas do branco, que consistiu em soluções com todos os reagentes, ácido nítrico, peróxido, água ultrapura, etc., utilizados em cada etapa, exceto a matriz de interesse, chá-mate. Na Tabela 3 encontram-se os valores de LD e LQ obtidos para a etapa de determinação dos metais por espectrometria atômica.

Tabela 3. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) instrumentais obtidos para os elementos Cd, Cu, Pb determinados por GF AAS e o Al determinado por FAAS

Elemento	LD	LQ
Cd	0,04 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,15 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Cu	0,3 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,0 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Pb	0,09 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,2 ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Al	0,3 (mg L^{-1})	1,0 (mg L^{-1})

Fonte: A autora.

O LOD é definido como a menor concentração do analito que pode ser distinguido do ruído com um nível de confiança, sendo encontrados valores que variaram entre 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cd) e 0,3 mg L^{-1} (Al).

O LOQ é definido como a menor quantidade de analito que pode ser medida com exatidão razoável, os valores determinados nesse trabalho ficaram na faixa de 0,15 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Cd) até 1,0 mg L^{-1} (Al).

Esses teores são adequados quando se trabalha com matrizes alimentares como os chás, pois normalmente as espécies metálicas presentes nessa bebida estarão em níveis traços e desta forma, poderão ser quantificadas pelo equipamento de maneira satisfatória.

5.2. Avaliação dos procedimentos de abertura de amostra para determinação dos teores totais de metais por Espectrometria Atômica

5.2.1. Pré-tratamento por via seca e determinação de Cu e Cd

Para determinação da concentração total de íons metálicos nas amostras comerciais de chá-mate foi necessário realizar um pré-tratamento da amostra, com o intuito de destruir a matéria orgânica, para que o analito pudesse ser quantificado. Para isso testou-se a decomposição por via seca para Cd e Cu (usado como modelo) e na amostra comercial de Marca A, considerada modelo. Os dados obtidos da determinação dos teores de Cd e Cu por GF AAS após abertura por via-seca estão mostrados na Tabela 4. O pré-tratamento por via seca foi um teste inicial, realizado apenas para os elementos Cd e Cu, para verificar se havia diferença nas concentrações desses metais, quando se utiliza a abertura via seca ou via úmida.

Tabela 4. Teores totais dos íons de Cd e Cu, obtidos após abertura da amostra comercial de chá-mate por via seca e determinação por GF AAS. (n = 3).

Ensaio	Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)
1	$0,29 \pm 0,012$	$8,76 \pm 0,02$

Fonte: A autora.

Na Tabela 4 é possível observar que o teor de cádmio foi inferior ao teor de cobre na amostra de chá-mate. Esse resultado é esperado, pois normalmente os teores de cobre são superiores em amostras de plantas e também ambientais. É importante destacar, que o cobre pode ser considerado um micronutriente e as bebidas podem ser consideradas uma fonte desse elemento para os humanos. Conforme Portaria 685 da ANVISA os níveis toleráveis de Cu variam de 0,1 a 10 $\mu\text{g.g}^{-1}$, em alimentos, mas não especifica valores para os chás, ervas, etc. De modo oposto, o cádmio é um elemento sem atividades biológicas conhecidas. Segundo a ANVISA (2013) o limite máximo permitido de Cd para chá, erva-mate, e outros vegetais para infusão é de 0,4 $\mu\text{g g}^{-1}$, indicando que nesta amostra o teor de Cd é aceitável, mesmo em se tratando da erva-mate beneficiada e tostada.

Analisando a Tabela 4, pode-se notar que para o Cd a concentração encontrada foi 0,29 $\mu\text{g g}^{-1}$, foi superior a dados relatados por MAIOCCHI et al., 2015. Porém, esses autores analisaram a erva-mate (proveniente do Sul da Argentina).

Neste estudo, foram encontradas concentrações menores que $0,003 \mu\text{g g}^{-1}$. Essa diferença pode estar relacionada às diferenças entre a erva-mate e o chá-mate e também, diferenças decorrentes das características do solo da região, problemas de contaminação ambiental ou industrial. Além disso, a temperatura utilizada por Maiocchi (2015), para abertura da amostra da erva-mate (650°C) foi maior que a utilizada neste trabalho (500°C), fator que pode influenciar nos teores, visto que o Cd é um elemento volátil. Vulcano et al. (2008) determinaram o teor de Cd e Pb em amostras de chá-mate comercializado na região metropolitana de Belo Horizonte, Brasil. Para amostras de chá-mate digeridos por via úmida, o teor médio de cádmio encontrado foi $3 \pm 1,4 \mu\text{g g}^{-1}$, valores maiores dos encontrados neste estudo. Essa diferença pode estar relacionada a abertura de amostra escolhida, devido a volatilidade do Cd em altas temperaturas como as utilizadas na digestão por via seca, diminuindo assim os teores desse metal.

No caso do cobre, a concentração encontrada de $8,76 \mu\text{g g}^{-1}$, está de acordo com os dados obtidos por Maiocchi et al., 2015, que foi de $8,7 \mu\text{g g}^{-1}$, que também utiliza a abertura via seca, para determinar o analito na erva-mate.

A digestão via seca é normalmente aplicada para determinar componentes majoritários da matriz e apresenta vantagens como, ser aplicada para grandes quantidades de amostras e para aquelas de difícil solubilização em ácidos. Entretanto, este método demanda tempo maior, se comparado à digestão via úmida, maiores chances de contaminação, o que pode comprometer a exatidão da análise, e principalmente, não é recomendada para elementos voláteis (SOUZA e CAMPOS, 2015). Devido a estas desvantagens foi testada a decomposição por via úmida.

5.2.2 Pré-tratamento por via úmida e determinação de Cu e Cd por Espectrometria Atômica

A fim de viabilizar uma condição de pré-tratamento das amostras de chá-mate comercial por via úmida em frasco fechado, o uso de planejamento fatorial foi fundamental para otimizar as condições de digestão, minimizando tempo, custo e uso de reagentes. Inúmeros trabalhos apresentam condições diferentes para abertura desse tipo de amostra. Assim, estudos de otimização foram necessários.

Inicialmente, foi testada a realização da abertura de amostra em tubos criogênicos de 5 mL e em tubos do tipo cônico (Falcon). Os resultados mais reprodutíveis foram obtidos com tubos Falcon. Assim, optou-se por realizar a

otimização por planejamento fatorial usando esse tipo de frasco. A escolha dos agentes oxidantes, como o ácido nítrico foi para minimizar processos de interferência nas medidas por GF AAS e do peróxido de hidrogênio por seu alto potencial oxidante, favorecendo a destruição da matéria orgânica do chá-mate.

O planejamento fatorial utilizado foi do tipo 2^2 com ponto central em triplicata, sendo que os fatores estudados foram o volume de HNO_3 e o volume de H_2O_2 , visto que esses fatores podem influenciar na eficiência da digestão das amostras. Os níveis escolhidos foram baseados em outro trabalho descrito na literatura (SANTOS et al., 2002). A matriz do planejamento fatorial e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Matriz do planejamento fatorial 2^2 com ponto central para o tratamento da amostra de erva-mate comercial por via úmida e teores totais de Cd e Cu encontrados por GFAAS e FAAS, respectivamente.

Ensaio	V HNO_3 (mL)	V H_2O_2 (mL)	Conc. Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Conc. Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
1	3,0 (+1)	0,75 (+1)	0,3092	0,2985	13,71	13,34
2	1,0 (-1)	0,25 (-1)	0,1647	0,1594	11,27	10,65
3	3,0 (+1)	0,25 (-1)	0,2031	0,2341	11,66	11,42
4	1,0 (-1)	0,75 (+1)	0,2115	0,2061	12,34	12,78
Ponto Central	2,0 (0)	0,50 (0)	$0,235 \pm 0,0084$		$12,5 \pm 0,36$	

* Os ensaios foram realizados em duplicata e o ponto central em triplicata. * Os valores entre parênteses representam os níveis do planejamento fatorial: superior (+1), inferior (-1) e ponto central (0).

Fonte: A autora.

Observando a Tabela 5, pode se notar que tanto para o Cd, quanto para o Cu, o Ensaio 1, no qual se utiliza o maior volume de ácido e de peróxido, foi o que obteve a maior concentração das duas espécies. Para o Cd, as concentrações variam entre 0,1594 a 0,3092 $\mu\text{g g}^{-1}$ e de 10,65 a 13,71 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o Cu. A condição 1 (+ +) obteve os melhores resultados de concentração dos íons metálicos pelo fato de se utilizar maiores volumes dos oxidantes, e desta forma a destruição da matriz acaba sendo mais eficiente, facilitando a abertura da amostra.

O ponto central foi realizado para as duas espécies metálicas, pois além de ser uma condição a mais a ser avaliada, também objetiva estimar o erro da análise. Pode-se notar que tanto para o Cd quanto para o Cu, as concentrações encontradas

estão na faixa dos resultados obtidos quando se mudam os níveis dos fatores (volume de ácido e de peróxido).

Através dos dados obtidos com o planejamento fatorial foram avaliados os efeitos principais e os de interação entre os fatores avaliados. A Tabela 6 mostra os resultados avaliados através da ANOVA, que mostra a adequação do modelo linear para o planejamento proposto, obtida para o Cd através do programa Statistic (Statsoft software, version 13.0, 2014).

Tabela 6. Resultados obtidos da análise estatística ANOVA para os valores de efeito principal e de interação do planejamento fatorial conduzido na otimização de abertura de amostra por via úmida para determinação de Cd por GF AAS em amostras comerciais de chá-mate.

ANOVA $R^2=0,955$; R ajustado=0,9352					
Fator	SQ	GL	MQ	F	P
V HNO ₃	11481,53	1	11481,53	107,6359	0,000047
V H ₂ O ₂	8722,86	1	8722,86	81,7742	0,000102
V HNO ₃ x V H ₂ O ₂	742,79	1	742,79	6,9635	0,038600
Falta de ajuste	346,92	1	346,92	3,2523	0,121378
Puro Erro	640,02	6	106,67		
Total SQ	21934,12	10			

SQ- soma quadrática, GL- graus de liberdade, MQ- média quadrática, F- teste F (F calculado) P- falta de ajuste.
Fonte: Adaptado de Statsoft software, version 13.0, 2014.

Na Tabela 6, pode-se observar os valores para o Teste F obtidos com a ANOVA para os valores de efeito principal e de interação. O teste F pode ser empregado para verificar a precisão do método. Os valores de $F_{\text{calculado}}$ para os fatores foram superiores ao valor $F_{\text{tabelado}} (1,6) = 5,99$. Portanto, a interação entre o volume de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio foi significativo, assim como os fatores avaliados independentemente. Isso significa que aumentando os volumes de HNO₃ e H₂O₂, maiores teores de Cd foram determinados nas amostras comerciais de chá-mate. A Tabela 6 também mostra que não há falta de ajuste do modelo Linear, pois o F calculado para a falta de ajuste (3,25) é menor que o F (1,6) tabelado, ou seja, esse modelo de primeira ordem explica satisfatoriamente o planejamento estudado. Além disso, pode se notar um coeficiente de determinação, R^2 , superior a 0,9, pois quanto mais perto de 1 estiver o valor de R^2 , melhor é o ajuste do modelo de primeira ordem às respostas observadas (BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2007). Assim no caso do Cd, o modelo explica com 93,5%, (R ajustado) de chance de os dados serem satisfatórios, dentro dos 95,5%.

Com relação ao cobre, os dados obtidos nos ensaios do planejamento fatorial (Tabela 5) foram utilizados no cálculo dos efeitos principais e de interações. Para esses dados, foi realizado a (ANOVA) para avaliar a significância dos efeitos. Os resultados obtidos com ANOVA para o Cu estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados obtidos da análise estatística ANOVA para os valores de efeito principal e de interação do planejamento fatorial conduzido na avaliação do processo de abertura de amostra por digestão via úmida em frasco fechado para determinação de Cu por GF AAS em amostras comerciais de chá-mate.

ANOVA; $R^2=0,886$; R ajustado=0,838					
Fator	SQ	GL	MQ	F	P
V HNO ₃	1,193513	1	1,193513	10,97118	0,016159
V H ₂ O ₂	6,426113	1	6,426113	59,07107	0,000254
V HNO ₃ x V H ₂ O ₂	0,074112	1	0,074112	0,68127	0,440726
Falta de ajuste	0,332564	1	0,332564	3,05704	0,130973
Puro erro	0,652717	6	0,108786		
Total SQ	8,679018	10			

SQ- soma quadrática, GL- graus de liberdade, MQ- média quadrática, F- teste F (F calculado) P- falta de ajuste.
Fonte: Adaptado de Statsoft software, version 13.0, 2014.

Analizando a Tabela 7 referente ao Cu, pode-se notar que os fatores principais foram significativos, pois os valores dos $F_{\text{calculados}}$ estão acima do F_{Tabelado} (1,6) = 5,99. No entanto, a interação entre os fatores, volume de HNO₃ e de H₂O₂, não foi significativa, pois o $F_{\text{calculado}}$ está abaixo do F (1,6) tabelado.

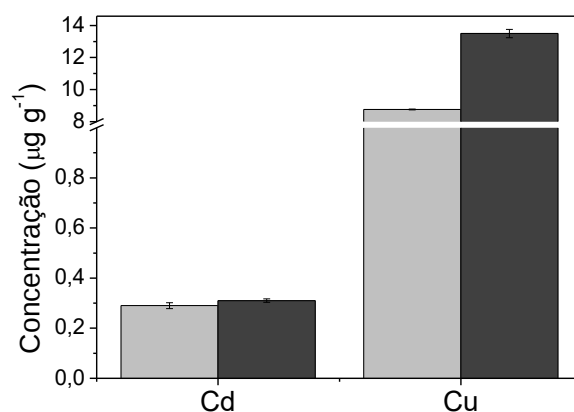
Na Tabela 7 também pode-se observar que o modelo Linear não tem falta de ajuste, comprovado pelo teste F, que apresenta valor menor (3,057) que o F_{tabelado} (5,99). Desta forma, o modelo Linear explica satisfatoriamente o planejamento estudado. Além disso, apresenta um coeficiente de determinação, R^2 , superior a 0,8. Assim, o modelo do Cu explica com 83,8%, (R ajustado) de chance de os dados serem satisfatórios, dentro dos 88,6%.

Com base nos dados obtidos para as duas espécies metálicas, pode-se concluir que tanto para o Cd quanto para o Cu, os melhores resultados foram quando se utilizou os maiores volumes de HNO₃ e de H₂O₂. A partir dos dados gerados, para as duas formas de decomposição da amostra comercial de chá-mate, foi possível comparar os resultados obtidos para se optar pela melhor condição de abertura da amostra.

5.2.3. Comparação entre os procedimentos de pré-tratamento de amostra de chá-mate

Após realizar os procedimentos de abertura das amostras comerciais de chá-mate por via seca e úmida e determinar os teores de Cd e Cu por GF AAS, foi realizada uma comparação dos resultados obtidos para escolher a melhor condição de abertura da amostra. A Figura 11 mostra os resultados obtidos, considerando a melhor condição para a abertura por via úmida.

Figura 11. Concentrações de Cd e Cu determinadas por GF AAS em chá-mate comercial após procedimento de abertura da amostra por via seca (■) e úmida (■)



Fonte: A autora.

Na Figura 11, é possível observar que os teores determinados de cádmio na amostra de chá-mate através da digestão seca e úmida são bastante similares. Esse resultado foi comprovado com o teste T, onde o $T_{\text{calculado}}$ foi de 1,43, menor que o T_{tabelado} que tem valor de 2,77. Portanto, os teores obtidos nas duas digestões não diferem significativamente dentro de um intervalo de confiança de 95%.

Com relação ao cobre, na Figura 8 nota-se que o teor obtido com a digestão ácida ($13,0 \pm 0,44 \mu\text{g g}^{-1}$) foi superior ao teor obtido com digestão seca ($8,76 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$). Os resultados foram comparados por teste T. Nesse caso, o $T_{\text{calculado}}$ (24,5) foi superior que o valor T_{Tabelado} (2,77). Portanto, para o Cu, a diferença entre os métodos de abertura de amostra foi significativa num intervalo de confiança de 95%. Esses resultados diferentes obtidos podem estar relacionados com a forma que o cobre encontra-se na amostra de chá-mate (erva-mate processada e com torrefação). Apesar de o cobre obter um alto ponto de ebulição, ele provavelmente

encontra-se complexado com algum componente da matriz, por exemplo, compostos fenólicos, e como esses compostos são destruídos na matriz, pode-se obter uma perda do Cu durante a etapa de calcinação. Portanto, para o cobre a ação conjunta do ácido nítrico com peróxido de hidrogênio favoreceu a eliminação da matriz orgânica sem perda do metal, pois temperaturas mais brandas foram utilizadas.

É importante destacar que para os dois procedimentos, amostras controle foram analisadas para desconto do branco.

Portanto, a abertura de amostra por digestão via úmida em frasco fechado foi a escolhida para ser otimizada para os elementos Pb e Al, isto porque para o Cd o resultado da abertura (via seca e via úmida) foi similar e para o Cu as maiores concentrações foram obtidas na digestão por via úmida. Além disso, este procedimento possui algumas vantagens em relação à digestão por via seca tais como a redução de custos, devido à redução do consumo de ácidos ultrapuros, minimização dos impactos ambientais, perdas por volatilização, e redução nas contaminações e erros sistemáticos, obtendo resultados mais exatos (SOUZA e CAMPOS, 2015).

5.2.4 Otimização através de planejamento fatorial 2^2 das condições de decomposição da amostra de chá-mate por via úmida em frasco fechado para os metais Pb e Al

A fim de verificar as melhores condições experimentais para os outros dois metais de estudo, Pb e Cd, foi aplicado também o planejamento fatorial, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 8. Para esses metais não foi aplicado o ponto central, visto que o planejamento obtido para Cu e Cd, mostrou que as réplicas de cada experimento já foram suficientes para estimar os possíveis erros experimentais. Assim, minimiza-se o consumo de reagente e a geração de resíduos ácidos.

Tabela 8. Matriz do planejamento fatorial 2^2 e as respostas obtidas para a avaliação das condições de pré-tratamento da amostra de chá-mate comercial por via úmida e determinação de Pb e Al por GF AAS e FAAS, respectivamente.

Ensaio	V HNO ₃ (mL)	V H ₂ O ₂ (mL)	Conc. Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Conc. Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
1	3,0 (+1)	0,75 (+1)	0,224	0,245	291	300
2	1,0 (-1)	0,25 (-1)	0,264	0,229	289	278
3	3,0 (+1)	0,25 (-1)	0,184	0,165	232	248
4	1,0 (-1)	0,75 (+1)	0,230	0,239	251	258

Fonte: A autora.

Com base nos valores da Tabela 8, pode-se notar que os fatores influenciaram os resultados de modo diferente para o Pb e Al. Para o Pb, a condição do ensaio 1 (+ +) possibilitou determinar a concentração média de $0,23 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$, valor muito similar para o ensaio 2 (- -) cuja concentração média determinada foi $0,25 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$. No caso do Al, as maiores concentrações foram obtidas quando se utiliza os maiores volumes de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio. Comparando os resultados da Tabela 5 e 8, nota-se que a condição considerada ótima para os elementos Cd, Cu e Al, foi a mesma, ou seja, maiores volumes de ácido e peróxido de hidrogênio. Contudo, a resposta para Pb não ficou clara a melhor condição. Idealmente, seria interessante que o processo de abertura de amostra seja igual para todos os elementos. Dessa forma, optou-se por aplicar um modelo matemático de normalização das respostas obtidas no planejamento (concentração das espécies metálicas), conhecido como o método de respostas múltiplas (BEZERRA et al, 2006).

5.2.5 Respostas Múltiplas para padronização da melhor condição experimental para abertura de amostra por via úmida em frasco fechado para os metais Cd, Pb, Cu e Al

Para os resultados obtidos no planejamento fatorial para os quatro metais foi realizada uma normalização utilizando respostas múltiplas (RM) para avaliar as melhores condições de abertura de amostra e os efeitos principais e de interações de cada fator nas repostas.

O valor da resposta múltipla (RM) leva em consideração o valor de concentração de cada elemento obtida no planejamento e a concentração máxima

determinada no mesmo planejamento. A RM podem ser calculadas de acordo com a Equação 3 (BEZERRA et al, 2006).

$$RM = \frac{C_{Cd}}{0,309} + \frac{C_{Cu}}{13,71} + \frac{C_{Pb}}{0,264} + \frac{C_{Al}}{299,6} \quad (\text{Equação 3})$$

Na equação 3, C_{Cd} , C_{Cu} , C_{Pb} e C_{Al} representam cada uma das concentrações das espécies metálicas, Tabela 5 e 8, em $\mu\text{g g}^{-1}$. Os valores 0,309; 13,71; 0,264 e 299,6 são as concentrações máximas de Cd, Cu, Pb e Al obtidas no planejamento fatorial (Tabela 5 e 8), respectivamente. Após obtenção da RM, as condições ótimas do planejamento foram reavaliadas, assim como a influência dos fatores nas respostas. A Tabela 9 mostra a matriz do planejamento e as concentrações das espécies metálicas (CEM) obtidas nos ensaios realizados.

Tabela 9. Matriz do planejamento fatorial 2^2 para digestão da Marca A, avaliada pela (CEM) liberadas do chá-mate (n=2).

Experimento	Matriz planejamento		CEM ($\mu\text{g g}^{-1}$)				RM
	HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Cd	Cu	Pb	Al	
1	3,0 (+1)	0,75 (+1)	0,309	13,71	0,224	290,7	3,82
			0,300	13,34	0,245	299,6	3,89
2	1,0 (-1)	0,75 (+1)	0,212	11,66	0,230	251,3	3,26
			0,206	11,42	0,239	257,9	2,94
3	1,0 (-1)	0,25 (-1)	0,165	11,27	0,264	288,5	3,32
			0,159	10,65	0,229	278,0	3,10
4	3,0 (+1)	0,25 (-1)	0,203	12,34	0,184	231,5	3,04
			0,234	12,78	0,165	248,4	3,14

Fonte: A autora.

Na Tabela 9 pode-se observar que o valor da múltipla resposta variou entre 2,94 e 3,89. Considerando a média, nota-se que o valor superior da RM foi $3,855 \pm 0,049$ obtido na condição + +, ou seja, maiores volumes de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio. Assim, avaliou-se os valores dos efeitos principais e de segunda ordem (interação). A Tabela 10 mostra os resultados obtidos da aplicação da análise

de variância (ANOVA) para os efeitos obtidos para as respostas múltiplas, através do programa Statistic (Statsoft software, version 13.0, 2014).

Tabela 10. Resultados obtidos da análise estatística ANOVA para os valores de efeito principal e de interação do planejamento fatorial para as Respostas Múltiplas.

ANOVA; $R^2=0,937$; R ajustado=0,890					
Fator	SQ	GL	MQ	F	P
V HNO_3	0,20161	1	0,20161	9,73386	0,03553
V H_2O_2	0,21451	1	0,21451	10,35667	0,03234
V HNO_3 x V H_2O_2	0,38281	1	0,38281	18,48220	0,01265
Puro erro	0,08285	4	0,02071		
Total SQ	0,88179	7			

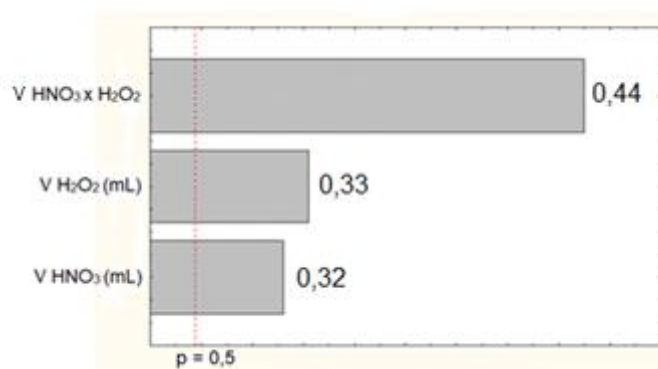
SQ- soma quadrática, GL- graus de liberdade, MQ- média quadrática, F- teste F (F calculado) P- falta de ajuste.
Fonte: Adaptado de Statsoft software, version 13.0, 2014.

Analisando os dados da Tabela 10, pode-se notar que os dois fatores bem como a interação entre eles são significativos, pois os valores dos $F_{\text{calculados}}$ estão acima do $F_{\text{Tabelado}} (1,4) = 7,71$.

Além disso, o modelo linear apresentou um bom coeficiente de determinação, R^2 , superior a 0,9. Assim, o modelo com múltiplas respostas explica com 89%, (R ajustado) de chance de os dados serem satisfatórios, dentro dos 94%.

Para uma melhor visualização desses dados avaliados estatisticamente, a Figura 12 mostra o gráfico de Pareto.

Figura 12. Gráfico de Pareto obtido a partir do programa Statistic, para as Respostas Múltiplas



Fonte: Statsoft software, version 13.0, 2014.

Analisando a Figura 12, pode-se notar que os fatores - volume de ácido nítrico e volume de peróxido e a interação entre eles são significativos, na digestão das

amostras comerciais de chá-mate para a quantificação dos teores dos quatro metais estudados. Sendo que o fator de segunda ordem apresentou maior significância para o planejamento, comprovando a necessidade de realizar estudos multivariados, pois os dois fatores influenciam de maneira conjunta na resposta.

Desta forma o planejamento utilizando respostas múltiplas mostra que o volume de ácido nítrico, assim como o volume de peróxido de hidrogênio devem ser ajustados nos níveis mais altos, dentro de um nível de significância de 95% para obter as melhores respostas, ou seja, as maiores concentrações dos metais avaliados.

Assim, essa condição ótima foi utilizada na determinação dos teores de Al, Cu, Cd, e Pb em amostras comerciais de chá-mate de quatro fabricantes diferentes.

5.3. Determinação de umidade e concentração total de Al, Cd, Cu, e Pb em amostras comerciais de chá-mate

As quantificações de umidade e dos elementos Cd, Cu, Pb e Al foram realizadas em quatro marcas de chá-mate, provenientes dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, adquiridas nos supermercados de Ponta Grossa. Os teores de umidade foram de $6,3 \pm 0,12\%$ (Marca A); $4,8 \pm 0,78\%$ (Marca B); $5,9 \pm 0,76\%$ (Marca C) e $6,1 \pm 0,36\%$ (Marca D). Esses teores estão de acordo com a ANVISA, que recomenda no máximo 7% de umidade para chás comerciais (BRASIL, 2002).

Todas as digestões por via úmida em frasco fechado (condição otimizada) foram realizadas em triplicata e as espécies metálicas foram determinadas por GF AAS. A Tabela 11 apresenta as concentrações médias totais dos elementos Al, Cd, Cu e Pb obtidas para as amostras comerciais de chá-mate.

Tabela 11. Teor médio das concentrações totais das espécies metálicas em amostras comerciais de chá-mate obtidas com abertura de amostra por via úmida em fraco fechado e determinação por GF AAS (n=10). Aplicação do Teste Newman-Keuls para verificar se as amostras diferem entre si nas concentrações dos metais.

Marca	Cd (ng g ⁻¹) ^a	Cu (µg g ⁻¹) ^a	Pb (µg g ⁻¹) ^b	Al (µg g ⁻¹) ^a
A	304 ± 4	13,5 ± 0,15	0,388 ± 0,003	347 ± 78
B	320 ± 6	11,9 ± 0,41	0,36 ± 0,05	457 ± 7
C	76 ± 8	11 ± 1,44	0,44 ± 0,04	526 ± 60
D	280 ± 4	10,3 ± 0,42	0,37 ± 0,024	471 ± 41

*(a) – as amostras diferem estatisticamente na mesma coluna (Newman-Keuls a p < 0,05). (b) – não diferem.

Fonte: A autora.

Na Tabela 11, pode-se observar que de modo geral a ordem de concentração dos elementos é Al>Cu>>Pb>>Cd. Nenhuma marca apresentou os menores ou maiores teores dos elementos, indicando que inúmeros fatores podem contribuir para as concentrações determinadas. Essas diferenças podem estar relacionadas a diversos fatores como, localização geográfica do cultivo, característica do solo, processo de contaminação ambiental, uso de fertilizantes, pesticidas, emissões veiculares, mineração ou o processamento industrial.

Para o cádmio, os teores variaram entre 76 ng g⁻¹ (C) até 320 ng g⁻¹ (B). O valor médio determinado para as quatro amostras foi 200 ± 11 ng g⁻¹. Portanto, nota-se que os teores diferem estatisticamente (Teste Newman-Keuls). Esses valores estão de acordo com valores encontrados por Heinrichs (2001) e Saidelles (2010) que também avaliam os teores de metais na erva mate, por abertura de amostra via úmida. Os teores para Cd estão abaixo do valor recomendado pela ANVISA que é de 0,4 µg g⁻¹ para erva-mate e outros vegetais para infusão (BRASIL, 2013). Para as normas Européias, o limite tolerável de Cd é de até 0,1 µg g⁻¹. (SAIDELLES et al., 2010).

Para o chumbo como pode ser visto na Tabela 11, os teores variaram entre 0,36 µg g⁻¹ (B) e 0,44 µg g⁻¹ (C). O valor médio determinado para as quatro amostras foi 0,39 ± 0,04 µg g⁻¹. Portanto, nota-se que os teores foram bastante similares e não diferem estatisticamente (Teste Newman-Keuls). Wróbel (2000) e Saidelles (2010) encontraram valores semelhantes. Segundo Anvisa (BRASIL, 2013) o limite aceitável é de 0,60 µg g⁻¹ de Pb em chás, erva-mate e outros vegetais para infusão. Portanto, esses valores estão abaixo do limite exigido pela legislação.

Para o cobre, os teores variaram entre $10,3 \mu\text{g g}^{-1}$ (D) até $13,5 \mu\text{g g}^{-1}$ (B). Onde o valor médio para as quatro amostras foi $11,1 \pm 0,71 \mu\text{g g}^{-1}$. Os teores de Cu diferem estatisticamente entre as amostras avaliadas (Teste Newman-Keuls). Esses valores estão de acordo com valores encontrados por Wróbel (2000) e Saidelles (2010) que avaliam as concentrações totais do metal na erva-mate. A legislação não trás um limite aceitável de Cu para chá-mate, mas um teor diário recomendável de $0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ (BRASIL, 2013), devido a essencialidade deste elemento no organismo. Portanto, para o cobre os teores encontrados estão acima do valor diário recomendado.

Por fim para o Al, os teores variaram entre $347 \mu\text{g g}^{-1}$ (A) até $526 \mu\text{g g}^{-1}$ (C). O valor médio determinado para as quatro amostras foi $450 \pm 75 \mu\text{g g}^{-1}$. Os teores de Al diferem estatisticamente entre as amostras estudadas (Teste Newman-Keuls). Essas concentrações estão de acordo com Wróbel (2000) e Da Costa (2009). No entanto, estão abaixo dos valores encontrados ($18 \pm 2 \text{ mg g}^{-1}$) por De Campos et al. (2014), em chá-mate. Essas diferenças podem estar associadas a vários fatores como, por exemplo, pré-tratamento da amostra, pois De Campos e colaboradores utilizam a digestão via seca em forno mufla, que pode ter favorecido a liberação do metal da matriz orgânica, devido a alta temperatura utilizada (550°C), visto que para este trabalho não foram comparadas as digestões via seca e úmida para este elemento. Além disso, outros fatores podem ter contribuído para essa diferença, como as condições ambientais e plantio da planta, as condições industriais de preparo do chá-mate, como a etapa de torrefação, o uso de fertilizantes e herbicidas durante o plantio, fatores climáticos locais, entre vários outros que acabam influenciando nessas concentrações (ABOU-ARAB et al., 1999; DE CAMPOS et al., 2014; SAIDELLES et al, 2010).

As legislações não trazem limite aceitável para o alumínio em ervas, folhas ou chás.

Enfim, é interessante conhecer os teores totais dos elementos que estão presentes em determinadas plantas. No entanto, a população não consome o chá-mate na forma *in natura*, e sim como bebidas, que podem ser preparadas por infusões. Desta forma, é importante avaliar os teores desses elementos nas bebidas de chá-mate consumidas pela população em diferentes formas de preparo e assim avaliar qual delas libera maiores teores desses elementos.

5.4. Concentração de compostos fenólicos nas infusões preparadas com amostras de chá-mate

Como mencionado anteriormente, a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) contém uma diversidade de constituintes químicos que incluem os polifenóis (ácidos fenólicos e flavonoides) (CARDOZO; MORAND, 2016). Estes compostos são provenientes do metabolismo secundário das plantas e exercem uma variedade de funções relacionadas ao crescimento, defesa e desenvolvimento das mesmas.

Os compostos orgânicos presentes na erva-mate, principalmente os compostos fenólicos que incluem os flavonoides possuem sítios disponíveis para a complexação de metais, devido a presença de diversas hidroxilas (-OH) diretamente ligadas a um anel aromático (DE CAMPOS et al., 2014).

Os teores de fenólicos no chá-mate podem ser maiores do que os encontrados na erva-mate, devido a diferença no processamento industrial, pois durante o beneficiamento do chá-mate, na etapa de torrefação, os compostos orgânicos podem ser degradados, o que pode modificar suas estruturas e acabar influenciando nos teores totais dos metais presentes nas infusões (DE CAMPOS et al., 2014).

Por isso, foi interessante fazer a quantificação desses compostos nas infusões (forma de consumo do chá-mate), visto que a presença destes pode interferir na absorção das espécies metálicas no organismo (FLATEN, 2002).

Os teores de compostos fenólicos obtidos para as infusões preparadas com as amostras comerciais de chá-mate estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Teores totais de compostos fenólicos (mg de ácido gálico por g de chá) presentes nas infusões a quente e a frio nas amostras de chá-mate estudadas

Amostras	Conc. de fenólicos totais (mg g ⁻¹)	
	Infusão a quente	Infusão a frio
A	13 ± 1,01 b	7,8 ± 0,32 a
B	16 ± 1,24 c	14 ± 1,97 b
C	17 ± 1,25 c	13 ± 1,16 b
D	12,0 ± 0,72 b	13,0 ± 0,85 b

*Valores apresentados como a média ± desvio padrão (n=3).

Médias seguidas por letras diferentes (a-c) diferem estatisticamente na mesma linha (Newman-Keuls a p < 0,05).

Fonte: A autora.

Os valores, mostrados na Tabela 12, indicam que a concentração de compostos fenólicos é variável ao comparar as infusões preparadas a quente e a frio, exceto para a amostra comercial D, em que não houve diferença estatística

entre os teores. A diferença entre os teores de compostos fenólicos para as infusões preparadas a frio e a quente pode ser explicada devido a maior temperatura empregada na infusão a quente, o que facilitou a extração destes compostos (Hajiaghaalipour; Sanusi; Kanthimathi, 2016). Além disso, a diferença entre o conteúdo de compostos fenólicos entre uma amostra e outra pode ser justificada devido a fatores como o método industrial de secagem e ao local geográfico de coleta das folhas das plantas.

Não houve diferença estatística entre o conteúdo de compostos fenólicos das infusões preparadas a frio, exceto para a amostra de chá A, em que houve uma diminuição na extração ($p < 0,05$). Além disso, de acordo com os resultados da Tabela 12, as infusões da amostra de chá D não exibiram diferença estatística entre os seus conteúdos de compostos fenólicos, o que pode ser explicado devido à uma maior termossensibilidade destes compostos para esta amostra de chá (RODRIGUES et al., 2015).

Em um estudo recente realizado por Konieczynski, Viapiana e Wesolowski (2017) foram determinados alguns compostos fenólicos como os ácidos gálico, cafeico, *p*-cumárico e ferúlico, além de alguns flavonoides como a catequina, rutina e quercetina nas infusões de *Ilex paraguariensis*. O ácido clorogênico parece ser o composto fenólico presente em maior concentração nesta planta (COLPO et al., 2016), o que pode justificar a sua alta atividade antioxidante. Além disso, Fernandes e colaboradores (2016) demonstraram que os extratos metanólico e aquoso desta mesma planta apresentaram altos teores de compostos fenólicos.

Além disso, os resultados mostram que as infusões, preparadas a frio, também exibiram teores de compostos fenólicos. Damiani e colaboradores (2014) compararam as infusões de *Camellia sinensis* preparadas a quente e a frio e verificaram que as infusões preparadas a frio também exibiram altos teores de compostos fenólicos. Contudo, neste mesmo estudo, foi observado que as infusões preparadas a frio apresentaram um maior teor destes compostos comparado com aquelas a quente. A diferença pode ser explicada pelo fato de que estes autores empregaram um maior tempo (2 horas) na extração destes compostos, enquanto que neste estudo, a infusão foi preparada a partir da imersão da planta em água fria por 5 minutos.

Assim, como observado neste estudo, Colpo e colaboradores (2016) verificaram que o extrato aquoso obtido a partir de *Ilex paraguariensis* também

demonstrou teores de compostos fenólicos em sua composição. Além disso, tais autores observaram diferença estatística no conteúdo de fenólicos entre amostras de diferentes regiões. Isto sugere que fatores climáticos e geográficos possuem uma influência direta no metabolismo secundário da planta, e conseqüentemente, na produção de compostos fenólicos pela mesma.

5.5. Concentrações de Cd, Pb, Cu e Al nas infusões a quente e a frio preparadas com amostras comerciais de chá-mate

Após a determinação total das concentrações dos metais nas amostras comerciais do chá da erva-mate, foram preparadas infusões a quente e a frio e em seguida realizou-se a determinação dos teores dos íons metálicos Cd, Pb, Cu e Al nessas bebidas utilizando AAS.

O preparo do chá-mate por infusões (quente e fria) foi realizado a fim de verificar se a forma de consumo pela população irá influenciar nos teores das espécies metálicas que podem ser absorvidas pelo organismo. A Tabela 13 mostra os resultados obtidos nas análises das bebidas preparadas com diferentes amostras de chá-mate.

Tabela 13. Valores médios das concentrações para íons metálicos determinados em infusões a quente e a frio de chá-mate de diferentes marcas (n=3).

Marca	INFUSÕES A QUENTE				INFUSÕES A FRIO			
	Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cd ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Al ($\mu\text{g g}^{-1}$)
A	$0,04 \pm 0,008$ a	$0,02 \pm 0,002$ a	$0,40 \pm 0,09$ a	30 ± 2 a	$0,02 \pm 0,004$ b	<LQ* b	$0,04 \pm 0,004$ b	11 ± 2 b
B	$0,050 \pm 0,004$ a	$0,12 \pm 0,05$ a	$0,247 \pm 0,005$ a	$65 \pm 1,3$ a	$0,042 \pm 0,009$ a	$0,29 \pm 0,01$ b	$0,368 \pm 0,002$ b	$40,4 \pm 0,42$ b
C	$0,05 \pm 0,002$ a	$0,05 \pm 0,01$ a	$0,69 \pm 0,04$ a	60 ± 2 a	$0,047 \pm 0,002$ a	$0,02 \pm 0,0002$ b	$0,14 \pm 0,01$ b	35 ± 6 b
D	$0,054 \pm 0,001$ a	<LQ* a	$0,247 \pm 0,002$ a	$38,9 \pm 0,93$ a	$0,045 \pm 0,004$ a	<LQ* a	$0,11 \pm 0,01$ b	38 ± 8 a

*LQ – Limite de quantificação para o Pb = $0,013 (\mu\text{g g}^{-1})$

Médias seguidas por letras diferentes (a-b), para a mesma marca e mesmo metal, modos de preparo diferentes, diferem estatisticamente segundo o teste T de Student com 95% de confiança.

Fonte: A autora.

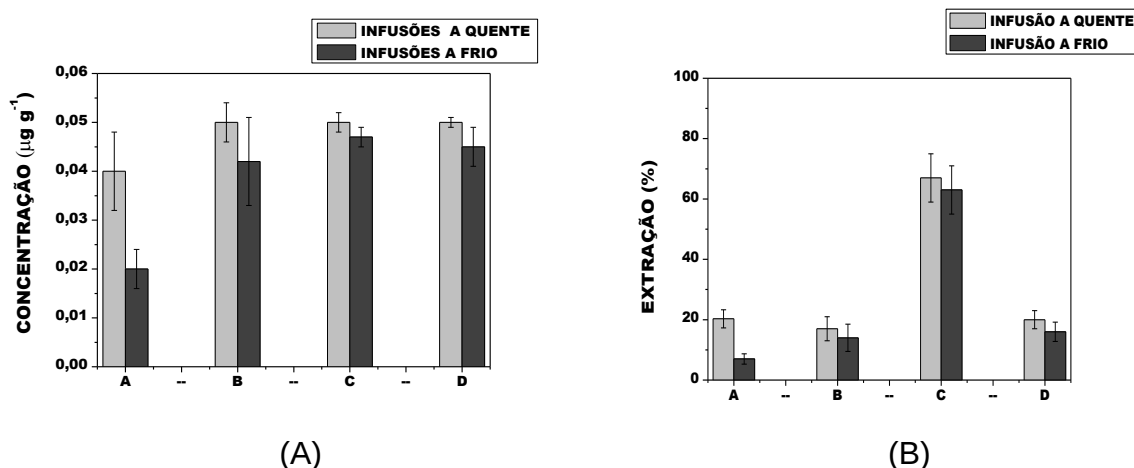
Com relação ao teor de metais determinados nos dois modos de preparo, pode-se notar que, de maneira geral, concentrações superiores das espécies metálicas Cd, Pb, Cu e Al foram obtidas nas infusões a quente. Esse fato pode estar associado a temperatura mais alta (aproximadamente 97°C) utilizada nessas infusões, que acabou favorecendo a extração dos metais, visto que o tempo de contato do chá com a água foi o mesmo para ambas as infusões.

As exceções nas maiores concentrações, nas infusões a frio, foram para as amostras B e C, para os metais Pb e Cu, respectivamente.

Analisando os dados obtidos para as amostras e cada metal, para poder realizar comparações de modo mais fácil, os dados da Tabela 13 foram apresentados na forma de figuras. Além disso, foi realizado um estudo de correlação linear (R^2), para os quatro elementos em estudo, a fim de verificar se os teores de fenólicos influenciavam linearmente no teor dos metais nas infusões a quente e a frio.

A Figura 13 mostra a concentração de Cd em $\mu\text{g g}^{-1}$ nas infusões e a porcentagem de extração desse elemento, considerando o teor determinado na amostra comercial de chá-mate.

Figura 13. Concentrações de Cd determinados nas infusões a quente e a frio para as amostras de chá-mate estudadas (A). Porcentagem de extração de Cd para cada amostra em relação ao teor de Cd presente na amostra comercial (B).



Fonte: A autora.

Na Figura 13A observa-se que as quatro marcas apresentam praticamente as mesmas concentrações de cádmio tanto nas infusões a quente, quanto nas infusões

a frio, com exceção da Marca A. Esses teores variam de $0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ (Marca A – infusão a frio) a $0,054 \mu\text{g g}^{-1}$ (Marca D – infusão a quente). Pela análise estatística pode-se notar que as amostras A e D tiveram diferença significativa nas extrações pelo modo de preparo, Tabela 13.

A presença de cádmio no chá-mate pode estar relacionada a algum processo de contaminação nas áreas de plantio ou em etapas de industrialização e processamento da erva, variando de região para região, onde a erva é cultivada.

Como já mencionado anteriormente, o Cd não apresenta nenhuma função biológica no organismo humano, sendo tóxico e cumulativo. Os teores aceitos deste elemento em folhas e raízes de plantas variam de acordo com algumas normas. Para as normas Européias o limite tolerável é de até $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (SAIDELLES et al., 2010), enquanto que a ANVISA aceita até $0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ (BRASIL, 2013). Analisando a Tabela 14, nota-se que todas as amostras de chá-mate, preparadas por infusões a quente e a frio, apresentam concentrações inferiores de Cd segundo as normas Européias e normas da ANVISA. Vulcano (2008) relata valores de Cd de $0,07 \mu\text{g g}^{-1}$ nas infusões de chá-mate e Bragança (2011) indica o valor de Cd de $0,004 \mu\text{g g}^{-1}$ em infusões do chá-mate.

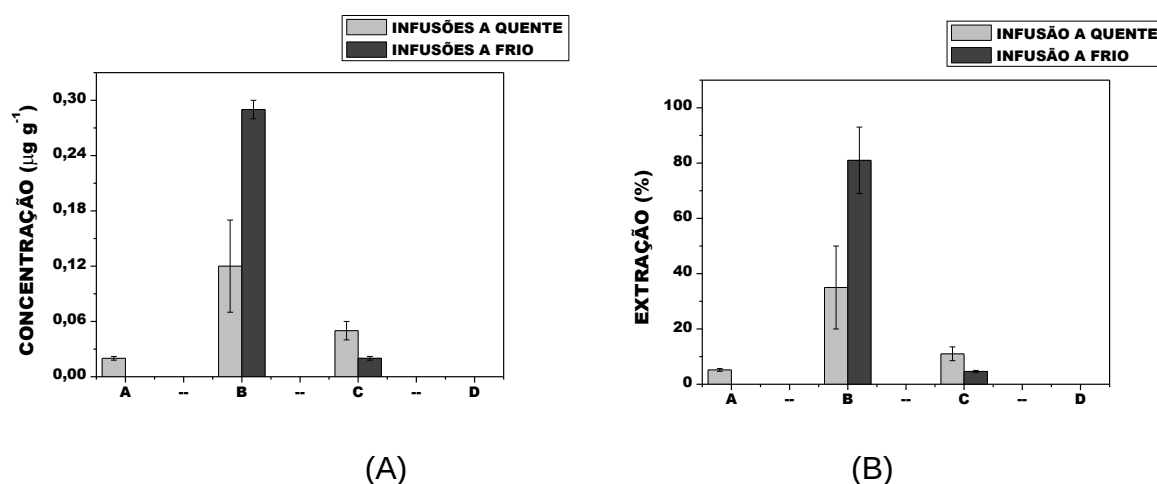
Analisando a Figura 13B, pode-se notar que a porcentagem de extração não variou muito entre as infusões a quente e a frio, com exceção da amostra A. Portanto, a forma de preparo não influenciou significativamente. Além disso, apenas a amostra A apresentou diferença significativa entre os modos de preparo da bebida, como mostrado na Tabela 13. Contudo, pode-se notar semelhanças nas porcentagens extraídas de Cd para as amostras A, B e D, tanto nas infusões a frio, quanto nas infusões a quente. Para a amostra C foram obtidas as maiores extrações nas duas infusões, acima de 60%. Essa diferença na extração da amostra C pode estar relacionada com a composição da matriz visto que essa Marca em questão é a cultivada no Rio Grande do Sul, diferente das demais que são provenientes do Paraná. Além disso, essa amostra foi a que obteve os maiores teores de fenólicos, nas infusões a quente e a frio (17 e 13 mg g^{-1} , respectivamente). Neste caso, para o Cd quanto maior os teores de fenólicos maiores as concentrações do metal, pois estas espécies podem afetar a solubilidade, facilitando a sua liberação da matriz (BEZERRA; TAKIYAMA; BEZERRA, 2009).

De modo geral, para a infusão a frio, quanto maior o teor de compostos fenólicos maiores foram os teores de Cd com coeficiente de correlação de 0,84.

Contudo, para a infusão a quente, o comportamento observado foi diferente, pois não se observou relação linear para o cádmio ($R^2 = -0,106$).

A Figura 14 mostra a concentração de Pb nas infusões e a porcentagem de extração do Pb, considerando o teor determinado na amostra comercial de chá-mate.

Figura 44. Concentrações de Pb determinados nas infusões a quente e a frio para as amostras de chá-mate estudadas (A). Porcentagem de extração de Pb para cada amostra em relação ao teor de Pb presente na amostra comercial (B)



Fonte: A autora.

De acordo com a Figura 14A, para o metal Pb observa-se uma maior variação entre as amostras. Sendo que o Pb não foi detectado na infusão a quente da marca D e também não foi detectado nas infusões a frio das marcas A e D. Para as marcas A e C notam-se teores mais elevados dos metais nas infusões a quente. Para a amostra B, nota-se maior concentração de Pb na infusão a frio. Pode-se observar também que o teor do metal Pb na infusão a frio foi praticamente o dobro do encontrado na infusão a quente. Esse resultado não era esperado, visto que o Pb normalmente forma compostos de baixa solubilidade (BOSSO e ENZWEILER, 2008) e em temperatura ambiente teria mais dificuldade de ser extraído. No entanto, nesta amostra o chumbo pode estar formando complexos instáveis, e em uma temperatura mais baixa tem-se uma maior solubilização do mesmo na bebida.

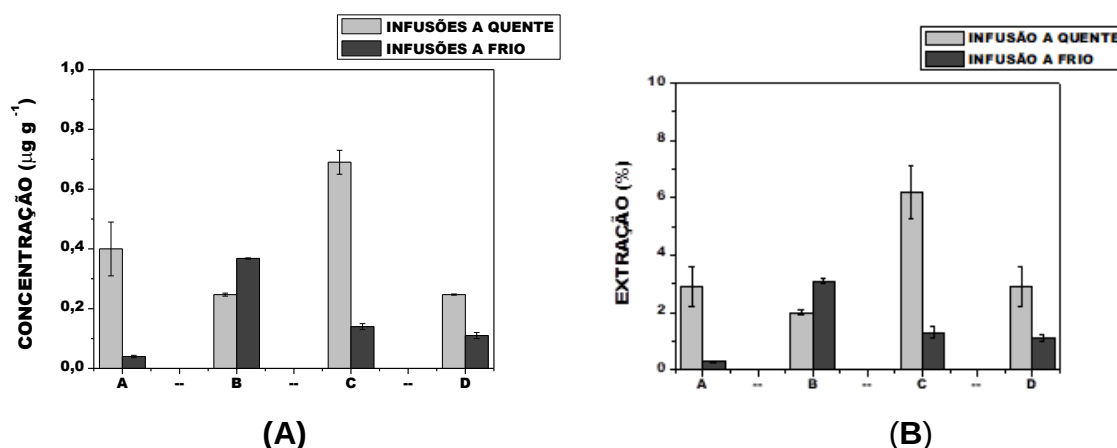
Assim como o cádmio, o chumbo não apresenta atividade biológica no organismo humano e pode ser cumulativo trazendo sérios riscos à saúde. Segundo Anvisa (BRASIL, 2013) o limite aceitável é de $0,60 \mu\text{g g}^{-1}$ de Pb em chás, erva-mate e outros vegetais para infusão. Na literatura Vulcano (2008) e Bragança (2011), avaliaram infusões de erva-mate e encontraram concentrações de $0,09 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,004 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

Na Figura 14B, nota-se que a amostra B foi a que obteve as maiores extrações para os dois modos de preparo das bebidas, sendo que na infusão a frio essa porcentagem foi duas vezes maior. Esse fato pode estar relacionado aos compostos com que metal pode estar ligado, pois no caso de substâncias voláteis ele pode acabar sendo volatilizado juntamente com elas em temperaturas altas, como as utilizadas nas infusões a quente, diminuindo a quantidade do metal na bebida.

De modo geral, para a infusão a frio e quente, a relação entre o teor de chumbo presente nas infusões e o teor dos compostos fenólicos não apresentou comportamento linear ($R^2 = -0,102$ e $0,31$).

A Figura 15 mostra a concentração de Cu nas infusões e a porcentagem de extração do metal, considerando o teor determinado na amostra comercial de chá-mate.

Figura 15. Concentrações de Cu determinados nas infusões a quente e a frio para as amostras de chá-mate estudadas (A). Porcentagem de extração de Cu para cada amostra em relação ao teor de Cu presente na amostra comercial (B).



Fonte: A autora.

Para o Cu, conforme Figura 15A as concentrações apresentaram diferenças significativas entre todas as amostras, variando de $0,04 \mu\text{g g}^{-1}$ (Marca A – infusão a frio) a $0,690 \mu\text{g g}^{-1}$ (Marca C – infusão a quente). Essa variabilidade pode estar relacionada, principalmente, com a composição do solo de cultivo da erva-mate, bem como o uso de produtos químicos, formado por compostos de cobre, que são utilizados no controle de pragas da erva (BRAGANÇA, MELNIKOV e ZANONI, 2011).

O cobre, diferentemente dos outros metais (Cd e Pb), é um mineral essencial, participante de diversas atividades metabólicas e seu valor diário recomendável, segundo a ANVISA é de $0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ (BRASIL, 2013).

Na literatura, Bragança (2011) estuda infusões da erva-mate, do Mato Grosso do Sul, e encontra valores que variam de $0,012$ a $0,025 \mu\text{g g}^{-1}$, dependendo da região de plantio.

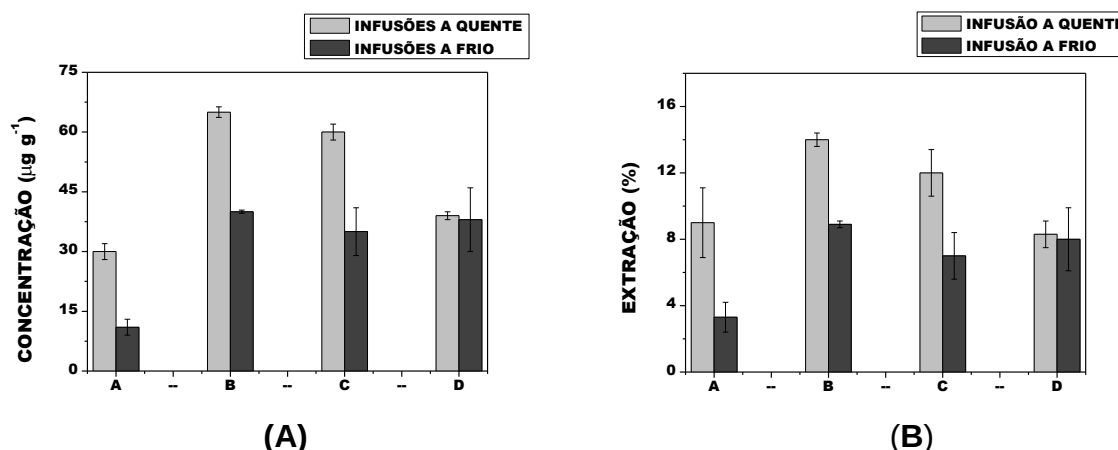
No caso da porcentagem de extração do Cu (Figura 15B), pode-se notar que as extrações do metal foram menores que 7% para as duas formas de preparo da bebida. O cobre é um elemento essencial não só para os seres humanos, como para as plantas também, por isso a baixa extração desse metal nas bebidas pode ser explicada pela formação de complexos estáveis desse metal com outros componentes da matriz em estudo, visto que apesar do cobre ser um metal presente em altas concentrações na erva, quando comparado com as concentrações dos metais Cd e Pb, por exemplo, como mostrado na Tabela 13, pouca quantidade dessa espécie foi liberada na bebida.

A maior porcentagem de Cu extraída para a infusão a frio, foi observada para a marca B, que é a amostra que apresentou maior teor de composto fenólico em relação a outras marcas. Já a maior porcentagem de Cu extraída para a infusão a quente, foi observada para a marca C, que é a amostra que apresentou maior teor de composto fenólico em relação a outras marcas.

De modo geral, para a infusão a frio, quanto maior o teor de compostos fenólicos maiores foram os teores de Cu nessa infusão, demonstrando uma forte correlação linear entre esses elementos $R^2 = 0,92$.

A Figura 16 mostra as concentrações de Al nas infusões e a porcentagem de extração do Al, considerando o teor determinado na amostra comercial de chá-mate.

Figura 16. Concentrações de Al determinados nas infusões a quente e a frio para as amostras de chá-mate estudadas (A). Porcentagem de extração de Al para cada amostra em relação ao teor de Al presente na amostra comercial (B)



Fonte: A autora.

Por fim, para o metal Al, é possível observar na Figura 16A que as concentrações variam de 11 µg g⁻¹ (Marca A – infusão a frio) a 65 µg g⁻¹ (Marca B – infusão a quente). De maneira geral, para o alumínio também se observa uma grande variabilidade entre os teores dependendo da amostra, onde o solo de cultivo pode ser o grande responsável por tal variação, além das etapas de processamento utilizadas na industrialização. Além disso, pode-se notar (Figura 16B) que nas infusões a quente os teores de alumínio liberados são maiores que nas infusões a frio. No entanto, esses teores extraídos são bem baixos (menos de 15%), dos teores totais. Este fato pode estar associado a presença de compostos fenólicos presentes nas infusões que acabam complexando com o alumínio, diminuindo assim a sua solubilidade. (CARR et al., 2003; BRAGANÇA, MELNIKOV e ZANONI, 2011; DE CAMPOS et al., 2014).

Segundo o Comitê Internacional de Avaliação de Riscos de Contaminação em Alimentos - o JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives da FAO/WHO), a dose aceitável de Al é de 2 mg por kg de peso corpóreo por semana (CODEX ALIMENTARIUS, 2014). Apesar de ainda não ter sido comprovado a toxicidade deste metal no organismo humano, há vários estudos que relacionam altas doses de ingestão de Al com o surgimento de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (MOLLOY et al., 2007; DA COSTA et al, 2009).

Na literatura, podem ser encontradas concentrações em infusões do chá-mate que variam de $0,708 \mu\text{g g}^{-1}$ segundo Bragança (2011) e $78,60 \mu\text{g g}^{-1}$, segundo Wróbel (2000).

De modo geral, pode-se notar que as porcentagens de extração nas infusões a quente foram superiores em relação às infusões a frio, com exceção da Marca D. Para a marca D, nota-se uma similaridade na porcentagem de extração na infusão a quente e a frio. Pode-se observar na Tabela 12 que os teores de compostos fenólicos não diferem estatisticamente para a infusão a quente e infusão a frio para marca D. Assim como para o cobre as extrações de alumínio nas bebidas também foram baixas, visto que esse metal foi o que apresentou as maiores concentrações no chá-mate, em torno de $450 \mu\text{g g}^{-1}$. Como já discutido anteriormente a erva-mate apresenta alta afinidade por alumínio, diferente de outras plantas, ela se desenvolve melhor em solos que possuem elevados teores desse elemento (CARR et al., 2003; BRAGANÇA, MELNIKOV e ZANONI, 2011). Dessa forma, o alumínio deve formar complexos estáveis e não é facilmente liberado para as bebidas nessas formas de preparo.

De modo geral, para a infusão a frio, quanto maior o teor de compostos fenólicos maiores foram os teores de Al nessa infusão, demonstrando uma forte correlação entre o Al e compostos fenólicos, com coeficiente de correlação de 0,98. Para a infusão a quente, também foi observada uma relação crescente, porém com um coeficiente de correlação menor de 0,665.

Pode-se observar que a presença dos metais nas infusões depende de inúmeros fatores, desde a característica do próprio metal até a composição do produto. Nas amostras de chá-mate comercial, ao se preparar infusão a quente, maiores porcentagens de $\text{Cd} > \text{Pb} > \text{Al} > \text{Cu}$ são extraídos e dissolvidos em solução. Já para a infusão a frio, nota-se $\text{Cd} > \text{Pb} > \text{Al} > \text{Cu}$. Para os elementos Cu e Al, nota-se que pequenas porcentagens desses elementos são extraídas para as soluções, mesmo esses elementos serem encontrados em maiores concentrações nos produtos comerciais. Porém, as concentrações de espécies metálicas presentes nas bebidas, seja pelo preparo por infusão a quente ou pelo preparo por infusão a frio, não revelam os teores reais desses elementos que estarão disponíveis no organismo para vir a agir como nutriente ou como contaminante. Por isso, foram

avaliadas as frações bioacessíveis desses elementos utilizando ensaios de digestão gastrointestinal *in vitro*.

5.6. Avaliação da bioacessibilidade de Cd, Pb, Cu e Al nas bebidas preparadas com chá-mate comercial

O procedimento experimental utilizado nesse trabalho para avaliar a bioacessibilidade envolveu apenas a etapa gástrica e intestinal. A etapa de digestão que envolve a boca não foi utilizada, devido ao alto custo da enzima amilase e também por este trabalho envolver a digestão de bebidas, sendo a passagem pela boca muito rápida. Diversos trabalhos descritos na literatura utilizam diferentes teores de enzimas, e outros reagentes. Assim, nesse trabalho o procedimento foi baseado em no método de Stelmach, 2014, em ensaios validados por uma aluna de doutorado do grupo de pesquisa (DE ANDRADE, 2018).

Assim, a precisão e a exatidão do procedimento utilizado nesse trabalho foram avaliadas utilizando testes de recuperação, que consistiu na adição de concentrações conhecidas das espécies metálicas na matriz de estudo, cujos dados encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14. Teste de recuperação das espécies metálicas presentes nas infusões a quente de chá-mate (n=3).

Metal	Conc. adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Conc. determinada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Cd	0,4	$0,46 \pm 0,07$	102
Pb	0,4	$0,38 \pm 0,04$	96
Cu	3,0	$2,42 \pm 0,06$	81
Al	2000	1840 ± 50	90

Fonte: A autora.

Como pode ser observado na Tabela 14, as recuperações para Cd, Pb, Cu e Al em chá-mate variaram entre 81% e 102%. Esses resultados são adequados, considerando um limite aceitável de 80-120%, levando-se em consideração a faixa de concentração avaliada (AOAC, 2012). Desta forma, pode-se confirmar a exatidão do método e que este pode ser utilizado para os ensaios de bioacessibilidade. A repetibilidade do método também foi eficiente devido aos baixos desvios apresentados nas réplicas das medidas. Os testes foram realizados apenas para

comprovar a exatidão do método nas infusões, visto que este procedimento já foi validado em outros trabalhos do grupo de pesquisa (DE ANDRADE, 2018).

Assim, foram realizados os testes de bioacessibilidade dos metais Cd, Pb, Cu e Al, nas bebidas preparadas por infusões a frio e a quente. A comparação entre a bioacessibilidade das espécies metálicas no consumo do chá-mate, preparado por infusão a quente ou por infusão a frio, é interessante para verificar se o modo de preparo da bebida irá influenciar na quantidade de metal absorvido pelo organismo, visto que de maneira geral, as quantidades de metais presentes nas infusões preparadas tanto por infusões a quente, quanto por infusões a frio não diferiram significativamente entre as amostras estudadas.

Os valores determinados dos metais na solução final obtida do procedimento de digestão gastrointestinal in vitro foram utilizados para calcular a porcentagem bioacessível em relação ao teor presente na infusão. Os resultados de bioacessibilidade dos elementos Cd, Pb, Cu e Al para as amostras de infusões do chá-mate estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Frações bioacessíveis dos metais, Cd, Pb, Cu e Al, nas infusões a quente e a frio para as amostras avaliadas.

Amostras	(%) Bioacessível Infusões a Frio				(%) Bioacessível Infusões a Quente			
	Cd	Pb	Cu	Al	Cd	Pb	Cu	Al
A	95 ± 8	<LQ	35 ± 5	30 ± 5	87 ± 13	83 ± 5	88 ± 11	33 ± 4
B	49 ± 11	<LQ	68 ± 11	68 ± 11	77 ± 10	<LQ	90 ± 11	89 ± 15
C	86 ± 11	85 ± 13	44 ± 6	44 ± 6	94 ± 8	77 ± 7	90 ± 14	<LQ
D	<LQ	<LQ	48 ± 8	48 ± 8	<LQ	<LQ	81 ± 22	32 ± 6
LQ (µg g ⁻¹)	0,01	0,01	0,07	70	0,01	0,01	0,07	70

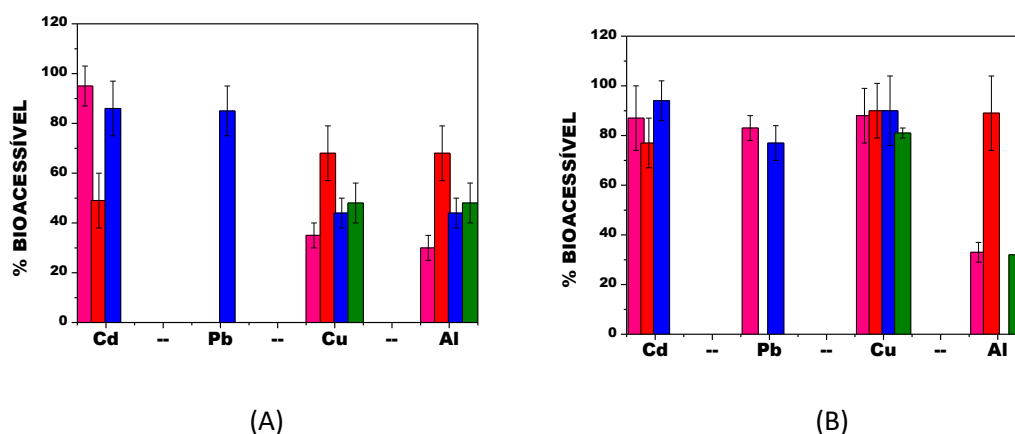
Fonte: A autora.

Com relação à Tabela 15, pode-se notar que de forma geral a ordem das frações bioacessíveis nas infusões a frio foram Cd>>Cu>Al>>Pb. Sendo que para o Pb somente a amostra C apresentou fração bioacessível. Para as infusões a quente a ordem foi Cd>Cu>Pb~Al. Neste caso considerando a média das quatro amostras o chumbo apresenta praticamente a mesma fração bioacessível que o Al.

Os dados obtidos para as amostras e para cada metal foram apresentados na forma de figuras para melhor visualização.

As Figura 17A e 17B mostram as % bioacessíveis das espécies metálicas (Cd, Pb, Cu e Al), para as quatro marcas nas infusões do chá-mate preparadas a frio e a quente, respectivamente.

Figura 17. Fração bioacessível dos metais nas infusões a frio (A) e a quente (B) em relação ao teor presente nas infusões. Marca A (■), Marca B (■), Marca C (■) e Marca D (■)



Fonte: A autora.

Com base nas Figuras 17A e 17B, pode-se notar que para o Cd a porcentagem bioacessível foi similar entre as amostras A, C e D, havendo diferença significativa apenas para a amostra B nos modos de preparo da bebida por infusão a quente e a frio, pois $T_{\text{calculado}} = 3,21$ foi maior que o $T_{\text{tabelado}}(4) = 2,77$, dentro de um intervalo de confiança de 95%. Essas porcentagens variaram entre 0 % (para a Marca D, nas duas infusões (quente/frio)) e 95% para a Marca A. Além disso, é possível perceber que apesar do cádmio estar presente em baixas concentrações nas infusões, como mostrado na Tabela 13, ele apresenta potencial para ser praticamente todo absorvido pelo organismo. Esse dado é muito interessante, uma vez que esse elemento é um contaminante bioacumulativo e pode causar efeitos tóxicos aos humanos, como já mencionado anteriormente. Segundo a literatura, Versantvoort (2004) estudou a bioacessibilidade de Cd em alface e rabanete em três campos contaminados com o metal, e em seus resultados obteve uma bioacessibilidade de 56 - 68%. Cwers (1985) estudou em cereais, carnes, peixes e vegetais e obteve frações bioacessíveis de 0 – 110%.

Para o metal chumbo, pode-se notar que nas infusões preparadas a frio (Figura 17A), apenas a amostra C obteve o metal disponível e em uma fração alta ($85 \pm 13 \%$) e foi praticamente a mesma que a obtida nas infusões a quente (77 ± 7), considerando os desvios. Essa é a única amostra cultivada em outra região e este fator pode estar relacionado a forma com que o metal está ligado a outros componentes da matriz, facilitando a absorção pelo organismo após o processo digestivo. A amostra A preparada por infusão a quente (Figura 17B), também obteve uma fração bioacessível considerável para o Pb (85 ± 5). Além disso, essa amostra apresenta maiores teores de fenólicos $13 \pm 1,01 \text{ mg g}^{-1}$ (Tabela 12) nas infusões a quente, favorecendo a bioacessibilidade. Na literatura, os dados variam com a matriz, por exemplo, em cereais, carnes, peixes e vegetais, as porcentagens variam de 0 – 40%, e em cacau em pó e licor esses valores variam de 5 – 10% de acordo com uma revisão realizada por Intawongse e Dean, 2006.

Para o Cu praticamente não houve diferença significativa nos teores bioacessíveis pelos modos de preparo das infusões variando de 72% a 90%. Com exceção da amostra A que apresentou apenas 35% de biodisponibilidade do metal no modo de preparo da bebida por infusão a frio. Segundo a Cwrs (1985) as frações bioacessíveis de cobre variam entre 5 e 90% em alimentos como cereais, carnes, peixes e vegetais. Pool (2012) estudou a bioacessibilidade do metal em mel de abelha comercial e obteve frações em torno de 96%.

A alta bioacessibilidade do cobre pode ser explicada pela baixa tendência desse metal complexar com elementos como polifenóis, proteínas e peptídeos (POHL et al, 2012).

Por fim, para o alumínio as variações de bioacessibilidade entre os modos de preparo da bebida não foram significativas entre as amostras avaliadas, apenas para a amostra C, infusão a quente, na qual não houve bioacessibilidade. Mais um resultado em que a amostra C, que possui região diferente de plantio da erva-mate, diverge das demais amostras. Além disso, com base nos teores de compostos fenólicos apresentados na Tabela 12, pode-se notar que nessa amostra, no modo de preparo da bebida por infusão a quente, foram determinadas as maiores concentrações de compostos fenólicos $17,4 \text{ mg g}^{-1}$ planta. Isso mostra que a bioacessibilidade do alumínio é afetada pela presença desses compostos, pois quando estes estão presentes em altas concentrações, não há bioacessibilidade

para o metal (no caso da amostra A), pois estes compostos tendem a formar complexos estáveis com o alumínio, devido a presença de grupos hidroxis que fornecem inúmeros sítios para essa complexação (FLATEN, 2002). Desta forma, se esses polifenóis fossem degradados no intestino, o Al estaria mais biodisponível.

Segundo revisão de Intawongse e Dean, 2006, em um estudo de bioacessibilidade de Al em comidas prontas feitas com carne bovina, de frango e peixes as frações bioacessíveis ficaram entre 0,85 e 2,15%. Já em outro estudo realizado para verificar o conteúdo e bioacessibilidade do alumínio em dietas duplicadas no Sul da Espanha, foi verificado que as quantidades de Al absorvíveis nas dietas variaram de 0,30% a 17,26% (CABRERA-VIQUE e MESÍAS, 2013).

Com base nas frações bioacessíveis dos metais estudados Cd, Pb, Cu e Al foi possível calcular a dose de ingestão dessas espécies por um adulto de 60 Kg que consome regularmente (1,5 g em 100 mL) dessa bebida. Para os cálculos de ingestão de cada espécie metálica foram consideradas as médias das concentrações obtidas nas infusões e as médias das frações bioacessíveis das amostras (A, B, C e D) nas formas de preparo por infusão a quente, geralmente a forma mais consumida entre a população. Os dados obtidos estão mostrados na Tabela 16.

Tabela 16. Estimativa da ingestão humana de Cd, Pb, Cu e Al (μg por kg de peso corpóreo) para um adulto que consome chá-mate preparado por infusão a quente com frequência.

Frequência de ingestão	Cd ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Al ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Diária	0,0011	0,0012	0,0087	0,625
Semanal	0,0077	0,0084	0,0061	4,375
Mensal	0,0330	0,036	0,261	18,75

Fonte: A autora.

Analisando a Tabela 16, pode-se notar que um consumo semanal dessas amostras de chá-mate, fornece teores médios ingeridos para Cd, Pb, Cu e Al de 0,077; 0,0084; 0,0061 e 4,375 μg por kg de peso corporal, respectivamente. A Organização Mundial da Saúde estabelece uma ingestão diária aceitável de Al de 1 mg kg^{-1} de peso corpóreo e de Cu de 0,5 mg kg^{-1} , sem causar efeito nocivo à saúde. Para o Pb a dose semanal é de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ por peso corpóreo (WHO, 2014).

A CODEX ALIMENTARIUS traz para o Cd uma dose mensal aceitável de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Com base nos dados obtidos, pode-se observar que os valores encontrados estão todos abaixo dos limites aceitáveis. No entanto, essas legislações não são específicas para chás e quando realizam esses cálculos de ingestão, em estudos de segurança alimentar, se baseiam nos teores totais presentes nos alimentos, o que não reflete a real absorção do nutriente ou do contaminante. Além disso, metais como Pb e Cd são biocumulativos e podem causar efeitos nocivos e irreparáveis a saúde humana mesmo que seja a longo prazo.

A fim de aprofundar o estudo e tentar chegar o mais próximo possível do modo de consumo do chá-mate pela população, foram realizados ensaios com a adição de alguns ingredientes a bebida para verificar se a absorção das espécies metálicas pode ser alterada com a presença desses elementos.

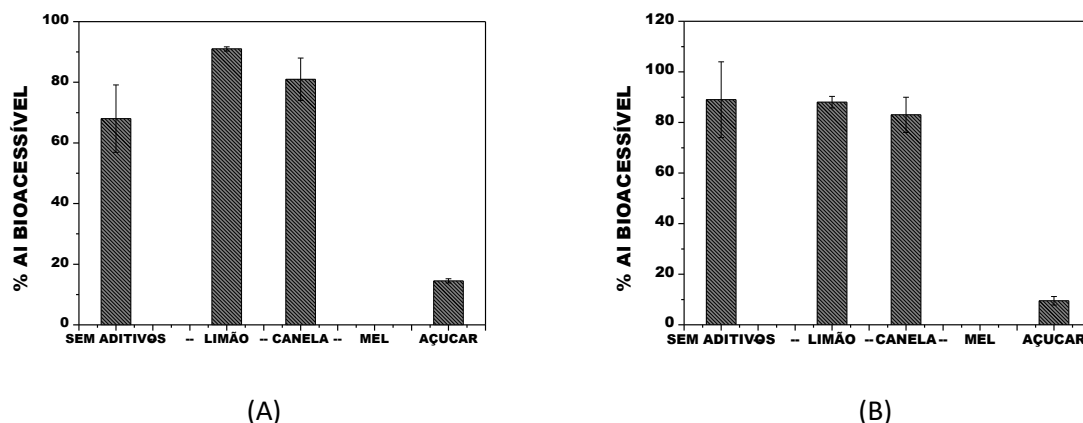
5.7. Bioacessibilidade do Al nas bebidas preparadas por infusões com adição de canela, limão, açúcar e mel

Algumas pessoas tem o costume de adicionar algum componente ao chá para que consumo da bebida se torne mais prazeroso. Dentre esses componentes podemos citar limão, canela, açúcar, mel, etc. Desta forma, torna-se interessante estudar se a bioacessibilidade de uma espécie metálica é alterada com a adição de algum desses elementos.

Baseado nisso, foi escolhida a amostra A e o metal Al, que obteve as maiores concentrações nas bebidas, para estudar a influência na bioacessibilidade após a adição de limão, canela, mel e açúcar.

Os resultados obtidos na bioacessibilidade do Al, após a adição desses compostos nas infusões (quente/frio) estão mostrados nas Figuras 18A e 18B.

Figura 5. Fração bioacessível do Al nas infusões a frio (A) e a quente (B) após adição de limão, canela, mel e açúcar no preparo da bebida.



Fonte: A autora.

Com base na Figura 18A, pode-se notar que a percentagem bioacessível, nas infusões a frio, do alumínio aumentam quando foi adicionado limão no preparo. Esse fato pode ser explicado devido a diminuição no pH da bebida, o que contribui para degradação dos compostos fenólicos, aumentando a disponibilidade do metal (DE CAMPOS et al., 2014). Na infusão a quente, Figura 18B, a bioacessibilidade não apresenta diferenças, em relação a amostra sem aditivos, isso porque provavelmente as altas temperaturas utilizadas nas infusões a quente já degradaram os compostos fenólicos, sendo neste caso o pH baixo irrelevante.

A adição de canela, tanto nas infusões a quente quanto nas infusões a frio, não apresentaram diferenças nas frações bioacessíveis, ou seja, esse elemento quando adicionado na bebida não irá influenciar na absorção do metal pelo organismo.

Já o mel e açúcar quando adicionados às bebidas nas duas formas de preparo, diminuem a bioacessibilidade do alumínio, como mostrado nas Figuras 18A e 18B. Isso pode estar relacionado a complexidade dessas matrizes, que possuem diversos constituintes químicos, como carboidratos, proteínas, vitaminas, entre outros, que podem complexar com o alumínio, diminuindo assim essa disponibilidade.

Desta forma, pode-se observar, de maneira geral, que a forma com que a população consome a bebida pode ou não influenciar na bioacessibilidade de determinada espécie química, neste caso o alumínio. Além disso, a

bioacessibilidade das espécies metálicas, sejam elas essenciais ou tóxicas, irá depender do funcionamento de cada organismo, uma vez que cada organismo se comporta de uma forma diferente.

Por fim do ponto de vista alimentar pode-se dizer que, neste estudo, a melhor forma de consumo da bebida, que possui menores teores bioacessíveis de Al são nas infusões a quente com a adição de mel e açúcar, visto que o alumínio é um elemento que não apresenta função biológica conhecida e pode estar relacionado com doenças neurotóxicas como o Alzheimer, Parkinson e, encefalopatia de diálise (CAMPOS et al., 2014).

6. CONCLUSÕES

Com a realização destes estudos foi possível verificar que a digestão por via úmida foi o pré-tratamento mais adequado, para determinação total das espécies metálicas Cd, Pb, Cu e Al, que a digestão por via seca, devido vantagens como a redução de custos, redução do consumo de ácidos ultrapuros, minimização dos impactos ambientais, perdas dos metais por volatilização, e redução nas contaminações e erros sistemáticos, obtendo resultados mais exatos.

O planejamento fatorial mostrou, a partir da análise estatística dos dados, que a melhor condição de abertura das amostras, padronizada por respostas múltiplas para os metais Cd, Pb, Cu e Al, foi obtida quando se utilizou 3,0 mL de ácido nítrico e 0,75 mL de peróxido de hidrogênio.

Com relação à comparação entre as concentrações das espécies metálicas, presentes no chá-mate e o teor liberado após o preparo do chá observou-se que de maneira geral, as maiores concentrações das espécies metálicas foram nas infusões a quente.

As determinações dos compostos fenólicos totais serviram para mostrar que a presença desses compostos pode interferir nos teores das espécies metálicas liberadas nas infusões, devido a presença de inúmeros sítios de ligações presentes em suas estruturas que podem favorecer a complexação com os metais.

Com relação a bioacessibilidade dos outros metais pode-se notar que o Cd, apesar de estar presente em baixas concentrações nas infusões ele é praticamente todo biodisponível, e desta forma, pode vir a causar efeitos nocivos à saúde de quem consome essa bebida. O Pb não apresenta bioacessibilidade na maioria das amostras estudadas, principalmente nas infusões preparadas a frio.

Já o cobre, um elemento essencial ao organismo, apresenta alta biodisponibilidade para a maioria das amostras e, de maneira geral, não há diferença na bioacessibilidade deste elemento quanto ao modo de preparo da bebida.

Além disso, pode se verificar que quando é adicionado algum elemento como limão, canela, mel e açúcar, na hora de preparo do chá, estes compostos podem acabar interferindo na bioacessibilidade de determinada espécie, como o alumínio, seja aumentado, no caso do limão, ou diminuindo, no caso do mel e do açúcar, essa fração bioacessível do metal.

Desta forma, considerando a bioacessibilidade das espécies metálicas tóxicas como Cd, Pb e Al a melhor maneira de consumir o chá-mate é a partir de infusões a frio, pois a disponibilidade desses elementos na corrente sanguínea será menor.

Por fim, este trabalho mostrou-se muito relevante, pois diferente de estudos já descritos na literatura, apresentou desde as concentrações totais das espécies metálicas até os teores que realmente estarão disponíveis, podendo contribuir para cobrança de legislações mais específicas que levem em conta as frações bioacessíveis que realmente irão agir como um nutriente ou como um contaminante no organismo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-ARAB, A. A. K., KAWTHER M. S., TANTAWY M. E. El., BADEAA R. I., NAGUIB KHAYRIA N. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medical plants in the Egyptian market. **Food Chemistry**. v. 67, p. 357-363, 1999.

ACTION, free software, version 2.7, 2014.

ALBERTI G.; BIESUZ R.; PROFUMO A.; PESAVENTO M. Determination of the total concentration and speciation of Al(III) in tea infusions. **Journal of Inorganic Biochemistry** v. 97, p.79–88, 2003.

ALMEIDA M. M. B.; LOPES G. F M.; NOGUEIRA D. M. C; MAGALHÃES C. E. C; MORAIS T. M. N. Determinação de nutrientes minerais em plantas medicinais. **Ciênc. Tecnol. Alim.** v. 22, n. 1 , p. 94-97, 2002.

AJASA, A. M. O.; BELLO O. M.; IBRAHIM O. A.; OGUNWANDE. Heavy trace metals and macronutrients status in herbal plants of Nigéria. **Food Chem.**, v. 85, p. 67-71, 2004.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2002. p. 11-29.

AOAC Association of official analytical chemists. Appendix F: Official Methods of Analysis of AOAC International – Guidelines for Standard Method Performance Requirements, p. 7-9, 13-14. 2012.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na indústria**. 3 ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2007. p. 263-290.

BASTOS, D.H. OLIVEIRA D. M.; MATSUMOTO R. T L.; CARVALHO P. O.; RIBEIRO M. L. Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology** 1, 37–46, 2007.

BATLEY, G. E.; APTE, S. C.; STAUBER, J. L. Speciation and Bioavailability of trace metals in water: Progress since, 1982. **Australian Journal of Chemistry**, v. 57, p. 903. 2004.

BERMEJO, P.; PENA, E. M.; DOMINGUEZ, R.; BERMEJO, A.; COCHOB, J. A.; FRAGA, J. M. Iron and zinc in hydrolysed fractions of human milk and infant formulas using an in vitro method. **Food Chemistry**, v. 77, p. 361–369. 2002.

BEZERRA S. S. P.; TAKIYAMA R. L.; BEZERRA B. W. C. Complexação de íons de metais por matéria orgânica dissolvida: modelagem e aplicação em sistemas reais. **Acta Amazôia**, v. 39, p. 639 – 648. 2009.

BOSSO, S. T.; ENZWEILER, J. Ensaios para determinar a (bio)disponibilidade de chumbo em solos contaminados: Revisão. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 394-400. 2008.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378-384. 2011.

BRAGANÇA V. L. C; MELNIKOV P.; ZANONI L. Z. Trace Elements in Different Brands of Yerba Mate Tea. **Biol Trace Elem Res** v. 144, p. 1197–1204. 2011.

BRAIBANTE M. E. F.; DA SILVA D.; BRAIBANTE S.; PAZINATO M. S. A Química dos Chás. **Química Nova na Escola**, v. 36, n. 3, p. 168-175. 2014.

BRANDON, E. F. A.; OOMEN, A. G.; ROMPELBERG, C. J. M.; VERSANTVOORT, C. H. M.; VAN ENGELEN, J. G. M.; SIPS, A. J. A. M. Consumer product in vitro digestion model: Bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 44, p. 161–171. 2006.

BRASIL. Resolução RDC 42, de 29/08/2013. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 de agosto de 2013.

BRASIL. Resolução RDC 303, de 07/11/2002. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 7 de novembro de 2002.

CABRERA-VIQUE C.; MESÍAS M. Content and Bioaccessibility of Aluminium in Duplicate Diets from Southern Spain. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 8, 2013.

CAMPOS, M. L. A. M.; BENDO, A.; VIEL, F. C. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle da contaminação para a determinação de metais traços em águas naturais. **Química Nova**, v. 25, p. 808-813. 2002.

CAMPOS, B. K.; DOS PRAZERES, J. P.; TORRES, Y. R.; DOS ANJOS, V. E.; QUINÁIA, S. P. Avaliação da labilidade de Alumínio em infusões de Erva-Mate empregando voltametria adsorptiva de redissolução catódica. **Química Nova**, v.37, p. 1479-1486. 2014.

CARDOZO, E. L. J.; MORAND, C.; Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440-454, 2016.

CARR, H.; LOMBI, E.; KÜPPER, H.; MCGRATH, S.; WONG, M. Accumulation and distribution of aluminium and other elements in tea (*Camellia sinensis*) leaves. **Agronomie**, EDP Sciences, v. 23, n. 8, p.705-710. 2003.

CASTALDELLI A. P., VIEIRA L. P., PRZYGODDA F., MARTINS Z. N., PADOIN M. J. Efeito da erva mate (*Ilex paraguariensis* A. St. -Hil.) no comportamento e fisiologia de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 9, n. 4, p. 514-519, out./dez. 2011.

CHERFI, A.; ABDOUN, S.; GACI, O. Food survey: Levels and potential health risks of chromium, lead, zinc and copper content in fruits and vegetables consumed in Algeria. **Food and Chemical Toxicology**, 70, p. 48–50. 2014.

CODEX ALIMENTARIUS C. Joint FAO/WHO food Standards programme codex committee on contaminants in foods. Working document for information and use in discussions related to contaminants and toxins in the GSCTFF. Prepared by Japan and the Netherlands. 2014.

COLPO, A. C.; ROSA, H.; LIMA, M. E.; PAZZINI, C. E. F.; CAMARGO, V. B.; BASSANTE, F. E. M.; PUNTEL, R.; ÁVILA, D. S.; MENDEZ, A.; FOLMER, V. Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill.) – based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. **Food Chemistry**, v. 209, p. 185-195, 2016.

CREWS H. M.; BURREL J. A.; Mc WEENY D. J. Trace Element Solubility from Food Following Enzymolysis. **Originalarbeiten**. V. 180, p. 221-226, 1985.

DA COSTA A. M. G; NOGAMI E. M.; VISENTAINER J. V.; DE SOUZA N. E.; GARCIA E. E. Fractionation of Aluminum in Commercial Green and Roasted Yerba Mate Samples (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) and in Their Infusions. **J. Agric. Food Chem.** v. 57, p. 196–200, 2009.

DAMIANI, E.; BACCHETTI, T.; PADELLA, L.; TIANO, L.; CARLONI, P. Antioxidant activity of different white teas: comparison of hot and cold tea infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, p. 59-66, 2014.

DE ANDRADE, C. K. Determinação das concentrações totais e bioacessíveis de íons metálicos em matrizes alimentares empregando espectrometria de absorção atômica. 2018. 174 F. Tese (Programa de Pós Graduação em Química - Doutorado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste – Unicentro, Guarapuava, Paraná.

DE ANDRADE, C. K.; DOS ANJOS, V. E.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. R.; QUINÁIA, S. P. Direct determination of Cd, Pb and Cr in honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 146, p. 166-173. 2014.

DEAN, J. R. **Bioavailability, Bioaccessibility and Mobility of Environmental Contaminants**. Inglaterra: John Wiley & Sons, 2007. ISBN: 978-0-470-02577-2.

DE MEJIÁ E. G; SONG S. S.; CALEB I. HECK C. I.; RAMÍREZ-MARES M. V. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidante capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of functional foods**, p. 23–34, 2009.

DE SOUZA L. A . Determinação e Avaliação da bioacessibilidade de minerais em amostras de linhaça e gergelim por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. 2015. 85 F. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia.

DE SOUZA R. A.; CAMPOS N. S.; ORLANDO R. Preparação de Amostras para Análise Elementar. Apostila de Apoio. Universidade Federal Juíz de Fora, Juíz de Fora, Minas Gerais.

DOBROWOLSKI, R.; PAWLOWSKA-KAPUSTA, I.; DOBRZYNSKA, J. Chromium determination in food by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry using classical and permanent modifiers. **Food Chemistry**, v. 132, p. 597–602. 2012.

DOMÍNGUEZ-GONZÁLEZ, R.; ROMARÍS-HORTAS, V.; GARCÍA-SARTAL, C.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; BARCIELA-ALONSO, M. C.; Bermejo-Barrera, P. Evaluation of an in vitro method to estimate trace elements bioavailability in edible seaweeds. **Talanta**, v. 82, p. 1668–1673. 2010.

EFSA. Safety of aluminium from dietary intake. Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and food contact materials (AFC). **EFSA Journal** n. 754, p. 1-34, 2008.

FERNANDES, C. E .F.; KUHN, F.; SCAPINELLO, J.; LAZAROTTO, M.; BOHN, A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ZANATTA, M. S.; ZANATTA, L.; MAGRO, J. D.; OLIVEIRA, J. V. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 139-146, 2016.

FIORINI, L. S. Dossiê: os minerais na alimentação. **Food Ingredients Brasil**, n. 4, p. 49-59. 2008.

FLATEN T. P. Aluminium in tea*/concentrations, speciation and bioavailability. **Coordination Chemistry Reviews**, n. 228, p. 385-395, 2002.

FRAGA C. G. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. **Molecular Aspects of Medicine** v. 26, p. 235–244, 2005.

GUPTA, U. C.; GUPTA, S. C. Sources and deficiency diseases of mineral nutrients in human health and nutrition: a review. **Pedosphere**, v. 24, p. 13–38. 2014.

HABAN M.; HABANOVA M.; OTEPKA P.; LUKAC N.; MASSANYI P. Concentration of heavy metals in various children's herbal tea types and their correlations, **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, 43:6, 533-538, 2008. DOI: 10.1080/03601230802174755.

HACKE A. C. M. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS EXTRATOS DE *Cymbopogon citratus*. 2017. 104 F. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil.

HADIAGHAALIPOUR, F.; SANUSI, J.; KANTHIMATHI, M. S. Temperature and time of steeping affect the antioxidant properties of white, green, and black tea infusions. **Journal of Food Science**, v. 81, p. 246-254, 2016.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8ª edição, Rio de Janeiro: LTC, 2012.

HE Z.; TAO Y.; ZENG M; ZHANG S.; TAO G.; QIN F.; CHEN J. High pressure homogenization processing, thermal treatment and milk matrix affect in vitro bioaccessibility of phenolics in apple, grape and orange juice to different extents. **Food Chemistry**, v. 200, p. 107–116, 2016.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, n. 9, v. 72, p.138-147, 2007.

HEINRICHS R.; MALAVOLTA E. Composição Mineral Do Produto Comercial Da Erva-Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.781-785, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. Comissão Técnica de Química CT05. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**: documento de caráter orientativo: DOQCGCRE-008: revisão 04. Brasília, DF, 2011. 19 p.

INTAWONGSE, M; DEAN, J. R. In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 25, n. 9, p. 876–885. 2006.

JUNIOR A. M. ANÁLISE DO PRÉ-PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE PARA CHIMARRÃO. 2005. 215 F. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade de Estadual de Campinas, Campinas.

KONIECZYNSKI, P.; VIAPIANA, A.; WESOLOWSKI, M. Comparison of infusions from black and green teas (*Camellia sinensis* L. Kuntze) and erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) based on the content of essential elements, secondary metabolites, and antioxidant activity. **Food Analytical Methods**, v. 10, p. 3063-3070, 2017.

KORN, M. G. A.; DA BOA MORTE, E. S.; DOS SANTOS, D. C. M. B.; CASTRO, J. T.; BARBOSA, J. T. P.; TEIXEIRA, A. P.; FERNANDES, A. P.; WELZ, B.; DOS SANTOS, W. P. C.; DOS SANTOS, E. B. G. N.; KORN, M. Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods—A Review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, p. 67–92. 2008.

LEHNINGER A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995.

MAIOCCHI M. G.; DEL VITTO L.; PETENATTI M. E.; MARCHEVSKY E. J.; AVANZA M. V.; PELLERANO R. G.; PETENATTI E. M. Multielemental composition and nutritional value of "dumosa" (*Ilex dumosa*), "yerba mate" (*I. paraguariensis*) and their commercial mixture in different forms of use. **Rev. FCA UNCUIYO**. V. 48(1), p. 145-159, 2015.

MCDONALD P.; GREENHALGH J. F. D.; MORGAN C. A.; EDWARDS R. **Animal nutrition**. 7 ed. Pearson Canada, 2010.

MOLLOY, D. W.; STANDISH, T. I.; NIEBOER, E.; TURNBULL, J. D.; SMITH, S. D.; DUBOIS, S. Effects of Acute Exposure to Aluminum on Cognition in Humans Cognitive Effects of Aluminum. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 70, p. 2011–2019. 2007.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, J. E. D., MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**: aprendendo a aprender. 2ª Ed. São Paulo: Sarvier, 2008.

OOMEN, A. G.; HACK, A.; MINEKUS, M.; ZEIJDNER, E.; CORNELIS, C.; SCHOETERS, G.; VERSTRAETE, W.; WIELE, T. V.; WRAGG, J.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. J. A. M.; WIJNEN, J. H. V. Comparison of Five In Vitro Digestion Models To Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 15, p. 3326-3334, 2002.

PARREIRA A. R. B. Estudo Comparativo de teor de metais contaminantes em amostras de chás provenientes de agricultura tradicional e biológica. 2012. 125 F. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade e Toxicologia) – Universidade de Lisboa, Portugal.

PELLERANO, R. G.; UÑATES, M. A.; CANTARELLI, M. A.; CAMIÑA, J. M.; MARCHEVSKY, E. Analysis of trace elements in multiflora Argentine honeys and their classification according to provenance. **Food Chemistry**, v. 134, p. 578-582. 2012.

PEREIRA C. C.; DA SILVA E. N.; DE SOUZA A. O.; VIEIRA M. A.; RIBEIRO A. S.; CADORE S. Evaluation of the bioaccessibility of minerals from blackberries, raspberries, blueberries and strawberries. **Journal of Food Composition and Analysis**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2016.12.001>.

POHL, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 117-128. 2009.

POHL, P.; STECKA, H.; SERGIEL, I.; JAMROZ, P. Different aspects of the elemental analysis of honey by Flame Atomic Absorption and Emission Spectrometry: A Review. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 740. 2012a.

POHL, P.; STECKA, H.; GREDA, K.; JAMROZ, P. Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. **Food Chemistry**, v. 134, p. 392–396. 2012b.

PYTLAKOWSKA K.; KITA A; JANOSKA P; POŁOWNIAK M; KOZIK V. Multi-element analysis of mineral and trace elements in medicinal herbs and their infusions. **Food Chemistry** v.135, p.494–501, 2012.

RAMOS, T. J. N.; LAMEIRA, O. A.; SILVA, M. S. M.; MÜLLER, R. C. S.; FAIAL, K. C. F.; LIMA, M. O. Avaliação da Composição Mineral de Folhas e Chás de Embaúba (*Cecropia palmata* Willd. e *Cecropia obtusa* Trécul.) por Espectrometria de Emissão Ótica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES). **Rev. Virtual Quim**, v. 9 n. 6, 2017.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, n. 5, v. 27, p. 777-778. 2004.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, J. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

RIBEIRO J. R; SIQUEIRA S.; NOVAES S. G., NETO J. H. S. DETERMINAÇÃO DE METAIS EM ÁGUA E FOLHA DE *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. **Quim. Nova**, v. 39, n. 4, p. 442-449, 2016.

RODRIGUES V. C. COMPOSTOS BIOATIVOS DE CHÁS: Comparação das infusões a quente e a frio. 2015. 38 F Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil.

RODRIGUES, V. C.; SILVA, M. V.; SANTOS, A. R.; ZIELINSKI, A. A. F.; HAMINIUK, C. W. I. Evaluation of hot and cold extraction of bioactive compounds in teas. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, p. 2038-2045, 2015.

RUBY, M. V.; SCHOOF R.; BRATTIN W.; GOLDADE M.; POST G.; HARNOIS M.; MOSBY D. E.; CASTEEL S. W. BERTI W.; CARPENTER M.; EDWARDS D.; CRAGIN D. Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. *Environ. Scien. Techn.* v. 33, p. 3697–3705, 1999.

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

SANTOS D. JR.; BARBOSA F. JR.; TOMAZELLI A.; KRUG F. J.; NÓBREGA J. A.; ARRUDA M. A. Determination of Cd and Pb in food slurries by GFAAS using cryogenic grinding for sample preparation. *Anal Bioanal Chem* (2002) 373:183–189. DOI 10.1007/s00216-002-1296-9.

SILVEIRA, T. F. F.; MEINHART, A. D.; SOUZA, T. C. L.; CUNHA, E. C. E.; MORAES, M. R.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Optimization of the preparation conditions of yerba mate tea beverage to maximize chlorogenic acids extraction. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 72, p. 219-223, 2017.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTO, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v. 299, p. 152-178, 1999.

SISTEMA DIGESTIVO – Laboratório de Biologia – IFSC. Apostila versão eletrônica. Disponível em: biologia.ifsc.usp.br/bio2/apostila/apost-fisiol-parte4.pdf. Acesso em: 30 dez. 2017.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, v. 18, p. 1202-1205, 2015.

STAGG G.V., MILLIN, D.J. The nutritional and therapeutic value of tea – a review. **Journal Science Food Agriculture**, London, v.26, p.1439-1459, 1975.

STELMACH E.; POHL P.; MADEJA S. A. Evaluation of the Bioaccessability of Ca, Fe, Mg and Mn in Ground Coffee Infusions by *in vitro* Gastrointestinal Digestion. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 25, n. 11, p. 1993-1999, 2014.

TEMPLETON, D. M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSSON, L. G.; MUNTAU, H.; van LEEUWEN, H. P.; LOBINSKI, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendations 2000). IUPAC. **Pure and Applied Chemistry**, v. 72, p. 1453-1470, 2000.

TOGNON A. L. Quantificação e Avaliação da Bioacessibilidade *in vitro* de Micro e Macroelementos em Frutas, Hortaliças e Cereais. 2012. 128 F. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

TOKALIOGLU S.; CLOUGH R.; FOULKES M.; WORSFOLD P. Bioaccessibility of Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Se and Zn from nutritional supplements by the unified BARGE method. **Food Chemistry**, v. 150, p. 321–327, 2014.

TORMEN, M. J. Economia ervateira brasileira. In: WINGE, H. et al. (Ed.) **Erva-Mate: biologia e cultura no cone sul**. Porto Alegre: Universidade/UFRGS. p. 27-40, 1995

VERSANTVOORT, C. H. M.; OOMEN, A. G.; KAMP, E. V.; ROMPELBERG, C. J. M.; SIPS, A. J. A. M. Applicability of an *in vitro* digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 31-40, 2005.

U.S.EPA. *Method 1669 - sampling ambient water for determination of trace metals at EPA Water Quality Criteria level*. Office of Science and Technology Eng. And Analysis Division. Washington, DC. 1996.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. Phenolic compound biochemistry. Estados Unidos. **Springer**, p. 279, 2006.

VOGEL, A. I. **Análise Química Quantitativa**. 6ª edição, Rio de Janeiro: LTC, 2002. p. 325 – 343.

VULCANO, I. R. C.; SILVEIRA, J. N.; ALVAREZ-LEITE, E. M. Teores de chumbo e cádmio em chás comercializados na região metropolitana de Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 425-431. 2008.

ZHANG, M.; ZHOU, C.; HUANG, C. Relationship Between Extractable Metals in Acid Soils and Metals Taken Up by Tea Plants. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 37, p. 347–361, 2006.

YANG X.; LIN T. Leaching and *in vitro* bio-accessibility of aluminium from different teas. **Integr Food Nutr Metab**. v. 3, n. 5, p. 431-435, 2016.

WHO, World Health Organization. CF/8. The Hague, The Netherlands, 114p. 2014.

WRÓBEL K.; WRÓBEL K, URBINA E. M. C. Determination of Total Aluminum, Chromium, Copper, Iron, Manganese, and Nickel and Their Fractions Leached to the Infusions of Black Tea, Green Tea, *Hibiscus sabdariffa*, and *Ilex paraguariensis* (Mate) by ETA-AAS. **Biological Trace Element Research**. v. 78, 2000.