

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA ASSOCIAÇÃO AMPLA UEPG
/ UNICENTRO / UEL
DOUTORADO EM QUÍMICA

BRUNA DE FÁTIMA PEREIRA SCHMITE

BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* DE ESPÉCIES METÁLICAS EM CHÁ DE
CAMOMILA E CHÁ-MATE: AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS E USO DOS
DISPOSITIVOS DE DIFUSÃO EM FILMES FINOS POR GRADIENTE DE
CONCENTRAÇÃO (DGT)

PONTA GROSSA
2024

BRUNA DE FÁTIMA PEREIRA SCHMITE

**BIOACCESSIBILIDADE *IN VITRO* DE ESPÉCIES METÁLICAS EM CHÁ DE
CAMOMILA E CHÁ-MATE: AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS E USO DOS
DISPOSITIVOS DE DIFUSÃO EM FILMES FINOS POR GRADIENTE DE
CONCENTRAÇÃO (DGT)**

Tese apresentada para obtenção do título de doutorado em Química, na Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em - Química Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, Área de Química Analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa E. dos Anjos.

PONTA GROSSA

2024

S355 Schmite, Bruna de Fátima Pereira
Bioacessibilidade *in vitro* de espécies metálicas em chá de camomila e chá-mate: avaliação de metodologias e uso dos dispositivos de difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) / Bruna de Fátima Pereira Schmite. Ponta Grossa, 2024.
134 f.

Tese (Doutorado em Química - Área de Concentração: Química),
Universidade Estadual de Ponta Grossa, Universidade Estadual de Londrina e
Universidade Estadual do Centro Oeste.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa Egéa dos Anjos.

1. Chá-mate. 2. Chá - Camomila. 3. Espécies metálicas. 4. Métodos -
Bioacessibilidade. 5. Dispositivos DGT. I. Anjos, Vanessa Egéa dos. II.
Universidade Estadual de Ponta Grossa. Universidade Estadual de Londrina.
Universidade Estadual do Centro Oeste. Química. III.T.

CDD: 540

TERMO DE APROVAÇÃO

BRUNA DE FÁTIMA PEREIRA SCHMITE

“BIOACESSIBILIDADE IN VITRO DE ESPÉCIES METÁLICAS EM CHÁ DE CAMOMILA E CHÁ-MATE: AVALIAÇÃO DE METODOLOGIAS E USO DOS DISPOSITIVOS DE DIFUSÃO EM FILMES FINOS POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO (DGT)”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química - Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **VANESSA EGÉA DOS ANJOS**
Data: 07/08/2024 13:19:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Vanessa Egéa dos Anjos (Orientadora)
UEPG/PR

Documento assinado digitalmente
 **ANDREA PINTO DE OLIVEIRA**
Data: 09/08/2024 14:36:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Andrea de Oliveira UFPR/PR

Documento assinado digitalmente
 **MARIA LURDES FELSNER**
Data: 13/08/2024 10:56:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Maria de Lurdes Felsner UNICENTRO/PR



Prof. Dr. Rafael Mazer Etto

Documento assinado digitalmente
 **PATRICIA LOS WEINERT**
Data: 13/08/2024 19:50:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Patrícia Los Weinert UEPG/PR

Ponta Grossa, 06 de agosto de 2024.

*Com muito amor, gratidão e carinho dedico à minha família,
meu esposo Fagner, minha filha Kalani e meus pais
Francisco e Rosilda, por todo apoio, dedicação e paciência
ao longo da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à Deus pela minha vida e por mais essa conquista;

Ao meu esposo Fagner que está comigo desde o início da minha caminhada lá na graduação, sempre com palavras de incentivo, carinho e amor, não me deixando abater diante das dificuldades;

A meus pais Francisco e Rosilda, pessoas simples e com muito caráter, que sempre me apoiaram e nunca deixaram faltar amor e carinho na minha vida;

À minha amada filha Kalani que chegou para deixar a minha vida mais colorida, que me fez ver o mundo de outra forma e entender o amor incondicional de uma mãe;

Aos meus irmãos Fernanda, Robson e meus sobrinhos amados;

À família do meu esposo, minha sogra Dilce, meu sogro José Serico (*in memoriam*) e meus cunhados que me receberam de braços abertos e sempre me incentivaram para realização dos meus sonhos;

À minha amiga Flávia, uma irmã que Deus me presenteou, que esteve e está sempre comigo me ajudando na finalização da tese e em todos os momentos da minha vida;

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

À Camila Moraes que ajudou muito nas realizações dos últimos experimentos e se tornou uma grande amiga;

Aos parceiros do nosso grupo de pesquisa LEQQA em especial a minha amiga Alessandra pelos momentos de descontração no laboratório;

Ao Prof. Dr. Jorge Iulek e a Profa. Dra Viviane Paula Martini pela síntese da amilase utilizada neste trabalho;

Ao Prof. Dr. Eduardo Sidinei Chaves pela disponibilidade de realizar as medidas no ICP-MS.

À Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner e ao Prof. Dr. Gilberto Abate pelas grandes contribuições feitas durante o exame de qualificação;

Ao C-LABMU pela infraestrutura disponibilizada para a realização das análises;

À Capes pelo apoio financeiro;

À UEPG pelo suporte fornecido.

Enfim, a todos que de alguma forma me ajudaram ao longo da minha caminhada.

RESUMO

Os alimentos e bebidas contribuem com o fornecimento de componentes específicos que são extremamente importantes no metabolismo celular, como as espécies metálicas. Desta forma, estudar a presença e a disponibilidade biológica dessas espécies em alimentos e bebidas como os chás, torna-se muito importante a fim de garantir a segurança alimentar. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a bioacessibilidade *in vitro* de espécies metálicas em amostras comerciais de chá de camomila e chá-mate e em infusões preparadas, utilizando duas metodologias diferentes: o physiologically based extraction - PBET e o unified bioaccessibility method - UBM e, ainda a técnica de Difusão em Filmes Finos por Gradiente de Concentração (DGT - do inglês Diffusive Gradients in Thin-films) para simular a absorção pela membrana celular. As determinações de cromo foram realizadas por FAAS e GF AAS. As concentrações totais de cromo no chá-mate variaram de 0,124 a 0,352 $\mu\text{g L}^{-1}$ entre as marcas e para camomila a concentração foi de 0,62 $\pm$ 0,11 $\mu\text{g g}^{-1}$. As porcentagens bioacessíveis de Cr no chá-mate, foram de 39 $\pm$ 9 % com o método UBM e 83 $\pm$ 15% com o PBET. Para ambos os chás houve diferença significativa nas porcentagens bioacessíveis entre os métodos avaliados ($p<0,05$). Ao aplicar os métodos (PBET e UBM) nas infusões de chá-mate as porcentagens bioacessíveis de cromo variaram de 43 $\pm$ 5% a 66 $\pm$ 7 % no método PBET e de 64 $\pm$ 3% a 115 $\pm$ 22% no UBM, de acordo com as massas utilizadas. Para as infusões de camomila, as porcentagens bioacessíveis variaram de 19 $\pm$ 2,4% a 28 $\pm$ 22 % para o método PBET e de 59 $\pm$ 26% a 74 $\pm$ 32% para o método UBM. Para aplicação da técnica dos dispositivos DGT utilizou-se apenas o método UBM e as amostras de chá-mate e suas infusões. Para avaliar a performance dos dispositivos DGT preparados de modo *homemade* estudos de determinação do coeficiente de difusão do cromo no hidrogel de agarose e fator de eluição, foram realizados. Com esses dados pode-se aplicar os dispositivos DGT *homemade* em soluções aquosas de Cr^{3+} e a recuperação foi de 88 $\pm$ 2%. Os dispositivos DGT foram então implantados nos fluidos gastrointestinais obtidos após aplicação do teste UBM no chá-mate e em suas infusões. As concentrações lábeis de Cr(III) nas frações bioacessíveis do chá-mate variaram de 0,06 $\pm$ 0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 0,079 $\pm$ 0,002 $\mu\text{g g}^{-1}$. Já nas frações bioacessíveis das infusões apenas na marca A foi quantificado Cr(III) lábil, cuja concentração foi de 0,058 $\pm$ 0,014 $\mu\text{g g}^{-1}$. Em estudo inédito também foi proposto o uso direto, dos dispositivos DGT *homemade* nas infusões de chá-mate. Para a amostra A, a concentração de cromo(III) lábil na infusão foi de 0,0585 $\pm$ 0,004 $\mu\text{g g}^{-1}$, ou seja, praticamente a mesma determinada pelos dispositivos DGT, 0,06 $\pm$ 0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$. Neste caso, utilizando a técnica do DGT, mais simples quando comparada aos ensaios de bioacessibilidade, chega-se a resultados estatisticamente iguais. Já para as amostras B e C, a quantidade de cromo(III) lábil encontrada após a aplicação dos dispositivos foram de 0,01 $\pm$ 0,001 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 0,005 $\pm$ 0,001 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Não chegando a 10% de cromo trivalente presente nessas infusões.

Palavras chave: Chá-mate. Chá de camomila. Espécies metálicas. Métodos de bioacessibilidade. Dispositivos DGT.

ABSTRACT

Food and drinks, contribute to the supply of specific components that are extremely important in cellular metabolism, such as metallic species. Therefore, studying the presence and biological availability of these species in foods and beverages such as teas becomes very important to ensure food safety. In this context, the present study aims to evaluate the in vitro bioaccessibility of metallic species in commercial samples of chamomile tea and mate tea and in prepared infusions, using two different methodologies: the physiologically based extraction - PBET and the unified bioaccessibility method - UBM, and the Diffusive Gradients in Thin-films technique (DGT) to simulate absorption by the cell membrane. Chromium determinations were performed by FAAS and GF AAS. Total chromium concentrations in mate tea ranged from 0.124 to 0.352 $\mu\text{g L}^{-1}$ among brands, and for chamomile the concentration was $0.62 \pm 0.11 \mu\text{g g}^{-1}$. Bioaccessible percentages of Cr in mate tea were $39 \pm 9\%$ with the UBM method and $83 \pm 15\%$ with PBET. For both teas, there was a significant difference in bioaccessible percentages between the methods evaluated ($p < 0.05$). When applying the methods (PBET and UBM) to mate tea infusions, bioaccessible percentages of chromium ranged from $43 \pm 5\%$ to $66 \pm 7\%$ in the PBET method and from $64 \pm 3\%$ to $115 \pm 22\%$ in UBM, according to the masses used. For chamomile infusions, the bioaccessible percentages ranged from $19 \pm 2.4\%$ to $28 \pm 22\%$ for the PBET method and from $59 \pm 26\%$ to $74 \pm 32\%$ for the UBM method. To apply the DGT device technique, only the UBM method and the mate tea samples, and their infusions were used. To evaluate the performance of the homemade DGT devices, studies to determine the diffusion coefficient of chromium in the agarose hydrogel and the elution factor were performed. With these data, the homemade DGT devices can be applied in aqueous solutions of Cr^{3+} and the recovery was $88 \pm 2\%$. The DGT devices were then implanted in the gastrointestinal fluids obtained after applying the UBM test to the mate tea and its infusions. The labile Cr(III) concentrations in the bioaccessible fractions of mate tea ranged from $0.06 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ to $0.079 \pm 0.002 \mu\text{g g}^{-1}$. In the bioaccessible fractions of the infusions, only brand A quantified labile Cr(III), with a concentration of $0.058 \pm 0.014 \mu\text{g g}^{-1}$. In an unprecedented study, the direct use of homemade DGT devices in mate tea infusions was also proposed. For sample A, the labile Cr(III) concentration in the infusion was $0.0585 \pm 0.004 \mu\text{g g}^{-1}$, that is, practically the same as that determined by the DGT devices, $0.06 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$. In this case, using the DGT technique, which is simpler when compared to bioaccessibility tests, statistically equal results were obtained. For samples B and C, the amount of labile Cr(III) found after application of the devices was $0.01 \pm 0.001 \mu\text{g g}^{-1}$ and $0.005 \pm 0.001 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively. The trivalent chromium content in these infusions did not reach 10%.

Keywords: Mate tea. Chamomile tea. Metallic species. Bioaccessibility methods. DGT devices.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) árvore da erva-mate (<i>Ilex paraguariense</i> St. Hil.) e (B) frutos, caules e folhas da erva-mate.....	28
Figura 2. A esquerda erva-mate utilizada no chimarrão e tererê e a direita o chá-mate após a etapa de tostagem.....	29
Figura 3. Estrutura química de alguns compostos orgânicos encontrados no chá-mate.....	30
Figura 4. Planta de camomila (<i>Matricaria recutita</i> L.)	31
Figura 5. Estrutura química dos flavonoides presentes no chá de camomila.....	32
Figura 6. Principais órgãos do sistema digestório humano.....	37
Figura 7. Estrutura do intestino delgado, os vilos presentes na mucosa e os enterócitos com as microvilosidades e as membranas apical e basolateral.....	39
Figura 8. Esquema simplificado dos processos envolvidos na absorção de espécies metálicas por microrganismos.....	46
Figura 9. Esquema representativo de um dispositivo DGT convencional.....	49
Figura 10. Estrutura química da agarose.....	52
Figura 11. Amostras do chá-mate comercial (A) e amostras do chá de camomila comercial (B) após quarteamento.....	59
Figura 12. Esquema geral de realização do método de bioacessibilidade utilizando o método PBET.....	61
Figura 13. Esquema representativo dos ensaios de bioacessibilidade utilizando o método UBM.....	64
Figura 14. Fotografias das etapas de preparo dos hidrogéis de agarose a serem utilizados em dispositivos DGT <i>homemade</i> . (A) solução de agarose colocada entre as placas de vidro (B) secção dos hidrogéis (C) discos dos hidrogéis de agarose.....	65
Figura 15. Esquema representativo da câmara de difusão utilizada para determinação do coeficiente de difusão das espécies de cromo em solução aquosa.....	66
Figura 16. Aplicação dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis deixados sob agitação magnética.....	68
Figura 17. Aplicação dos dispositivos nas infusões de chá-mate (A), abertura dos dispositivos DGT após 24h de imersão para retirada do gel de ligação (B) e eluição do gel de chelex-100 em HNO ₃ 1 mol L ⁻¹	70
Figura 18. Curva analítica empregada na calibração do ICP-MS para determinação das espécies metálicas nas amostras de chás e em suas frações bioacessíveis.....	71

Figura 19. Comparação das concentrações das espécies metálicas no material de referência, NIST 1640 ^a (barras em branco), com as determinadas por ICP-MS (barras em cinza)	73
Figura 20: Curva analítica típica na determinação de cromo por GF AAS (A) e FAAS (B).....	73
Figura 21. Porcentagem de cromo extraído das amostras comerciais de chá-mate (barras em laranja) e chá de camomila (barra verde) para as infusões preparadas com estes chás.....	74
Figura 22. Avaliação da bioacessibilidade de Cr nos compartimentos do estômago e duodeno e fase completa (após estômago e duodeno) para o chá-mate (A) e para o chá de camomila (B).....	80
Figura 23. Porcentagens bioacessíveis conforme método utilizado, de Cr nas infusões de chá-mate (A) e camomila (B) (Marca A) conforme variação de massa de chá utilizada para preparo das infusões. n=3.....	91
Figura 24. Concentração de cromo total, bioacessibilidade no estômago e bioacessibilidade total, nas amostras sólidas de chá-mate. n=3.....	95
Figura 25. Concentração de cromo total nas infusões preparadas com as amostras comerciais de chá-mate, cromo bioacessível no estômago e bioacessibilidade total. n=3.....	97
Figura 26. Concentração de cromo total, bioacessibilidade no estômago e bioacessibilidade total, nas amostras sólidas de chá-mate. n=3.....	99
Figura 27. Concentração de cromo total nas infusões preparadas com as amostras comerciais de chá-mate, cromo bioacessível no estômago e bioacessibilidade total. n=3.....	102
Figura 28. Concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ de cromo total, bioacessível e fração lábil de Cr(III) após aplicação dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis das três marcas de chá-mate.....	110
Figura 29. Concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ de nas infusões, bioacessível após ensaios UBM e fração lábil de Cr(III) após aplicação dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis das três marcas de chá-mate.....	111
Figura 30. Concentração de cromo nas infusões, concentração de Cr(III) lábil nas infusões após aplicação dos dispositivos DGT e concentração de cromo bioacessível com o método UBM, nas marcas A, B e C das amostras de chá-mate. n=3.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de atomização e faixa de trabalho utilizadas nas determinações de cromo em todas as etapas do trabalho por FAAS e GF AAS.....	57
Tabela 2. Parâmetros Instrumentais do ICP-MS.....	57
Tabela 3. Substâncias e suas concentrações para preparar 500 mL dos fluídos digestivos utilizados nos ensaios de bioacessibilidade.....	62
Tabela 4. Teores de umidade, expressos em porcentagem, determinados nas amostras de chá-mate e de camomila.....	75
Tabela 5. Concentrações totais de cromo determinados por GF AAS após procedimento de abertura de amostra para produto comercial de chá de camomila e de chá-mate, ambos da marca A (n = 3)	76
Tabela 6: Concentrações totais de cromo determinados por GF AAS após procedimento de abertura de amostra por via seca para produto comercial do chá-mate (marcas A, B e C). (n = 3)	78
Tabela 7. Concentração de cromo nas infusões a quente preparadas com as marcas (A, B e C) das amostras comerciais de chá-mate e chá de camomila. n=3.....	79
Tabela 8. Concentrações de espécies metálicas nas infusões de chá de camomila e chá-mate determinados por ICP-MS.....	81
Tabela 9. Fração bioacessível dos metais Cu Zn, Al, Cd e Pb após digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> das infusões de camomila e de mate, ambos da marca A (n=3)	84
Tabela 10. Avaliação da bioacessibilidade de Cr em amostras comerciais de chá, marca A, empregando diferentes métodos de digestão gastrointestinal <i>in vitro</i> . (n=4)	86
Tabela 11. Ensaios de precisão dos métodos de bioacessibilidade através do cálculo de balanço de massa, para as amostras comerciais dos chás, camomila e mate, para a marca A (n=3)	88
Tabela 12. Concentração de Cr bioacessível determinado nas fases gástrica, intestinal e completa por PBET e UBM para amostras comerciais de chá de camomila e chá-mate, para a marca A (n=3)	90
Tabela 13. Resultados dos testes de adição e recuperação de Cr em ensaios de bioacessibilidade de cromo em soluções aquosas empregando os métodos PBET e UBM e aplicação de teste estatístico T. n=3.....	94

Tabela 14. Comparação da porcentagem bioacessível de Cr nas infusões (preparadas com as massas médias dos chás) após aplicação dos métodos PBET e UBM. n=3. Marca A.....96

Tabela 15. Parâmetros utilizados para determinar o coeficiente de difusão das espécies de Cr(III) e Cr(VI) em hidrogel difusivo de agarose (1,5%) determinado com célula de difusão, à 25°C, pH 6,5 e 50 mmol L⁻¹ de NaNO₃.....103

Tabela 16. Porcentagem de retenção e eluição para as espécies de Cr(III) e Cr(VI) na fase ligante de hidrogel de agarose impregnado com resina Chelex-100® e fator de eluição dessas espécies (fe) em pH 6,5. n=3.....106

Tabela 17. Porcentagem de recuperação de Cr(III) após aplicação dos dispositivos DGT *homemade* em solução aquosa. n=3.....107

Tabela 18. Concentração de Cr(III) lábil após aplicação dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis obtidas com os ensaios de bioacessibilidade UBM nas diferentes marcas de chá-mate e em suas infusões. n=3.....109

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês Atomic Absorption Spectrometry
AES Espectrometria de Emissão Atômica, do inglês Atomic Emission Spectrometry
EDTA Ácido etilenodiaminotetracético
AOAC Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês Association of official analytical chemists.
FAAS Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry
GF AAS Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite, do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry
ICP-MS Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICP OES Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
PBET Teste de extração baseado na fisiologia, do inglês physiologically-based extraction test
UBM Método de bioacessibilidade unificado do inglês unified bioaccessibility method
BARGE Grupo de Pesquisa de Bioacessibilidade da Europa do inglês Bioaccessibility Research Group of Europe
RIVM Instituto Nacional Holandês de Saúde Pública e Método de meio ambiente do inglês Dutch National Institute for Public Health and the Environment Method
SHIME Simulador do ecossistema microbiano intestinal humano, do inglês simulator of the human intestinal microbial ecosystem
DGT Difusão em filmes finos por gradiente de concentração, do inglês diffusive gradients in thin films
LD limite de detecção
LQ limite de quantificação
R² Coeficiente de determinação

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVO GERAL	17
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1. DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES METÁLICAS EM ALIMENTOS	21
3.2. CHÁS	24
3.2.1. Chá mate	25
3.2.2. Chá de Camomila	28
3.3. PRESENÇA DE ESPÉCIES METÁLICAS NOS CHÁS	31
3.4. ESPECIAÇÃO DO CROMO EM AMOSTRAS ALIMENTARES	31
3.5. PROCESSO DE DIGESTÃO HUMANA	34
3.5.1. Intestino delgado: Partes e funções	36
3.6. BIODISPONIBILIDADE E BIOACESSIBILIDADE DAS ESPÉCIES METÁLICAS EM ALIMENTOS	38
3.7. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO EM AMOSTRAS ALIMENTARES	42
3.8. DIFUSÃO EM FILMES FINOS POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO (DGT)	45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1. TÉCNICAS LIMPAS	51
4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES	51
4.3. EQUIPAMENTOS	52
4.4. CONDIÇÕES DE ANÁLISE UTILIZADAS NOS EQUIPAMENTOS GF AAS, FAAS E PARÂMETROS INSTRUMENTAIS PARA AS DETERMINAÇÕES DOS METAIS POR ICP-MS	53
4.5. AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁ-MATE E CHÁ DE CAMOMILA	55
4.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DOS CHÁS DE CAMOMILA E MATE	56
4.7. DETERMINAÇÃO DOS TEORES TOTAIS DE ESPÉCIES METÁLICAS NAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁ DE CAMOMILA E CHÁ-MATE	56
4.8. PREPARO DAS INFUSÕES A QUENTE DE CAMOMILA E MATE UTILIZANDO OS CHÁS COMERCIAIS	57
4.9. MÉTODOS ANALÍTICOS (PBET E UBM) UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE Cr, Cu, Zn, Al, Cd, Pb E Co EM CHÁ-MATE E CHÁ DE CAMOMILA E NAS INFUSÕES PREPARADAS COM ESTES CHÁS	58
5. PREPARO DOS HIDROGEIS DE AGAROSE E DE CHELEX-100	62
5.1. PREPARO DO GEL DE AGAROSE	62
5.2. PREPARO DO GEL DE CHELEX-100®	63

5.3. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO DE ESPÉCIES DE CROMO NO HIDROGEL DE AGAROSE COM CÂMARA DE DIFUSÃO	63
5.4. DETERMINAÇÃO DO FATOR DE ELUIÇÃO DO CROMO DO HIDROGEL DE AGAROSE E CHELEX-100®	64
5.5. PREPARO DOS DISPOSITIVOS DGT <i>HOMEMADE</i>	65
5.6. ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DAS ESPÉCIES DE Cr(III) COM OS DISPOSITIVOS DGT <i>HOMEMADE</i>	66
5.7. APLICAÇÃO DOS DISPOSITIVOS DGT APÓS ENSAIOS DE BIOACESSIBILIDADE UBM NAS AMOSTRAS DE CHÁ-MATE E EM SUAS INFUSÕES	66
5.8. APLICAÇÃO DOS DISPOSITIVOS DGT NAS INFUSÕES PREPARADAS COM AS AMOSTRAS DE CHÁ-MATE	67
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
6.1. TÉCNICAS DE ANÁLISE UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES METÁLICAS	69
6.2. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE EM AMOSTRAS COMERCIAIS DOS CHÁS DE CAMOMILA E MATE	72
6.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE CROMO EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁS POR GF AAS	73
6.4. DETERMINAÇÃO DE CROMO EM INFUSÕES DE CAMOMILA E MATE POR GF AAS	76
6.5. DETERMINAÇÃO DE METAIS EM INFUSÕES A QUENTE PREPARADAS COM AS AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁ-MATE E CHÁ DE CAMOMILA POR ICP-MS.....	78
6.6. DETERMINAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DAS ESPÉCIES Co, Cu, Zn, Al, Cd E Pb NAS INFUSÕES PREPARAS COM AS AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁ DE CAMOMILA E CHÁ-MATE	80
6.7. BIOACESSIBILIDADE DO CROMO NAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁS DE CAMOMILA E MATE	83
6.8. BIOACESSIBILIDADE DO CROMO NAS INFUSÕES PREPARADAS COM AS AMOSTRAS COMERCIAIS DOS CHÁS DE CAMOMILA E MATE	90
6.9. PREPARO DE DISPOSITIVOS DGT COM AGAROSE E AVALIAÇÃO DE PERFORMANCE	96
6.9.1. Característica do Hidrogel Difusivo de Agarose e Determinação do Coeficiente de Difusão de Cr(III) e Cr(VI).....	97
6.9.2. Característica do Hidrogel Ligante de Agarose e Chelex-100 e capacidade de retenção de Cr(III) e Cr(VI)	101
6.9.3. Avaliação dos dispositivos DGT utilizando a agarose	103
7.1. ESTUDO DA LABILIDADE DO CROMO NAS FRAÇÕES BIOACESSÍVEIS UTILIZANDO O DGT <i>HOMEMADE</i>	105
7.2. ESTUDO DA LABILIDADE DO CROMO NAS INFUSÕES DE CHÁ-MATE UTILIZANDO O DGT <i>HOMEMADE</i>	109

7. CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS	113

1. INTRODUÇÃO

Na atualidade a preocupação com a saúde e bem-estar está cada vez mais frequente na vida das pessoas, principalmente em relação a alimentos e bebidas que estão consumindo. O interesse em saber se o que elas estão consumindo trará benefícios ou malefícios a saúde vem mobilizando a comunidade científica para estudar cada vez mais a fundo não só a composição dos alimentos e bebidas, mas também os reais efeitos causados por esses produtos (Moraes; Colla, 2006).

Os alimentos e bebidas além de fornecerem energia ao organismo humano, contribuem com o fornecimento de componentes específicos que são extremamente importantes no metabolismo celular, como as espécies metálicas. Essas espécies podem estar presentes nos alimentos naturalmente ou ser proveniente de contaminação ambiental e industrial (processo, manejo e transporte na produção dos alimentos) (Versantvoort *et al.*, 2005).

Dentre as espécies metálicas, presentes nos alimentos, tem-se aquelas essenciais (macronutrientes e micronutrientes), pois atuam como cofatores de enzimas, no equilíbrio osmótico na interface das membranas biológicas, em processos de biossinalização celular e ainda como constituintes de biomoléculas, como cálcio, ferro, zinco, cobalto, cromo trivalente (Gupta; Gupta, 2014; Tognon, 2012). E, as não essenciais que não participam de funções biológicas e dependendo das concentrações e forma química podem ser tóxicas ao organismo, como cádmio, chumbo, alumínio, cromo hexavalente etc. (Pytlakowska *et al.*, 2012).

Desta forma, estudar a presença e a disponibilidade biológica de espécies metálicas em alimentos e bebidas como os chás, muito consumidos por crianças e idosos, torna-se muito importante a fim de garantir a segurança alimentar uma vez que as legislações para alimentos, de forma geral, são baseadas em concentrações totais, que não estão relacionadas com a disponibilidade biológica de um determinado elemento. Assim, uma forma de entender a absorção das espécies metálicas presentes nos alimentos é avaliando a sua solubilidade no trato gastrointestinal, a partir de ensaios de bioacessibilidade *in vitro*, utilizando soluções bioquímicas que simulam os compartimentos digestivos e fazem o processamento do alimento onde uma fração do nutriente e/ou contaminante é liberada da matriz alimentar para absorção intestinal (Bosso; Enzweiler, 2008; Damodaran; Parkin; Fennema, 2010; Pereira, *et al.*, 2016).

Existe uma gama de estudos que avaliam a bioacessibilidade de espécies metálicas em alimentos. No entanto, utilizam metodologias e concentrações de reagentes diferentes, não sendo possível a comparação entre os trabalhos de forma a enriquecer as discussões e quem sabe contribuir para mudanças nas legislações. Além do método utilizado, a espécie metálica que estiver solúvel durante a digestão gastrointestinal somente será absorvida se estiver em uma forma química que permita sua absorção pela célula, ou seja, sua especiação (Tessier; Turner, 1995; Pelfrene; Waterlot; Douay, 2011). Desta forma, é imprescindível realizar a análise de especiação pois, determinar a fração da espécie metálica que será absorvida é de extrema importância para conhecer o risco ou o benefício associado ao consumo de determinado alimento.

No entanto, a análise de especiação, identificação e quantificação das espécies químicas de um determinado elemento, ainda é um desafio para os analíticos, isto porque estes estudos devem levar em consideração as propriedades específicas do elemento a ser avaliado, como labilidade, mobilidade, e ainda, ser simples, de baixo custo e ter sensibilidade adequada (Sigg *et al.*, 2006; Pesavento *et al.*, 2009; De Andrade, 2018).

Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a bioacessibilidade *in vitro* de espécies metálicas em amostras comerciais de chá de camomila e chá-mate e em infusões preparadas, utilizando duas metodologias diferentes e utilizar a técnica de Difusão em Filmes Finos por Gradiente de Concentração (DGT) para simular uma barreira biológica a fim de avaliar o transporte das espécies lábeis (íons metálicos livres e complexos metálicos cineticamente reversíveis) pelo epitélio intestinal e com isso a possível ação destas espécies no organismo.

2.0 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a bioacessibilidade *in vitro* de espécies metálicas em amostras comerciais de chá de camomila e chá-mate e em infusões preparadas. Para tal, realizar a avaliação de diferentes metodologias empregadas em estudos de bioacessibilidade e o uso da técnica de Difusão em Filmes Finos por Gradiente de Concentração (DGT).

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar e comparar métodos de bioacessibilidade de espécies metálicas através de digestão gastrointestinal simulada pelos métodos *in vitro* PBET e UBM em amostras de chá comercial e das bebidas preparadas;
- Determinar teores totais e bioacessíveis de espécies metálicas em amostras comerciais e em infusões preparadas de chá-mate e chá de camomila;
- Preparar dispositivos DGT *homemade*, utilizando agarose para preparo da fase difusiva e uso de hidrogel de agarose com Chelex-100® como fase ligante;
- Avaliar a performance dos dispositivos DGT *homemade* através de ensaios com câmara de difusão, determinação do fator de eluição e ensaios de adição e recuperação;
- Verificar a aplicabilidade de dispositivos DGT *homemade* nos ensaios de bioacessibilidade para estimar absorção de espécies metálicas pelo epitélio intestinal;
- Avaliar a labilidade de espécies metálicas em infusões de chá usando dispositivos DGT *homemade*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Cada vez mais as pessoas estão preocupadas com saúde e bem-estar. Por isso, a preocupação em saber se o que elas estão consumindo trará benefícios ou malefícios a saúde vem mobilizando a comunidade científica para estudar cada vez mais os alimentos e as bebidas, isto porque são eles os principais responsáveis pela ingestão de nutrientes e/ou contaminantes no organismo dos seres humanos (Moraes; Cola, 2006).

Pereira *et al.*, 2020 avaliaram as concentrações de diversos minerais (Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Pb, Zn) em feijões crioulos crus e cozidos. Os elementos que apresentaram maiores concentrações nos grãos, cru e cozidos, foram K e Mg. O K variou de 12.600 a 13.300 mg kg⁻¹ para o feijão cru e de 4.590 a 10.300 mg kg⁻¹ para o feijão cozido. O Mg variou entre 1.620 e 1.980 mg kg⁻¹ para o feijão cru e 670-1.040 mg kg⁻¹ para o feijão cozido. Ferreira e Tarley 2020, avaliaram se as farinhas de banana verde podem ser consideradas uma importante fonte de elementos, como Ca, Zn, Mn, Fe e Cu, para uma dieta saudável. Em geral, as maiores concentrações (mg 100g⁻¹) foram obtidas para Mg (99,2–161) > Ca (27,9–74,7) > Fe (2,6–11), podendo então as farinhas de banana serem consideradas como fontes desses minerais. Milani *et al.*, 2020 determinou os teores de dezesseis minerais essenciais (Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Se e Zn) e contaminantes inorgânicos (Al, As, Cd, Li, Ni, Pb, Sb, Sn e Sr) em amostras de chá gelado pronto para beber. Em geral, as amostras apresentaram baixos níveis de contaminantes inorgânicos e todas as amostras foram encontradas dentro dos limites brasileiros: As (0,05 mg kg⁻¹), Cd (0,02 mg kg⁻¹), Pb (0,05 mg kg⁻¹) e Sn (150 mg kg⁻¹) (Brasil, 2022). Para Li e Ni as regulamentações não apresentem um limite máximo, no entanto, esses elementos foram encontrados em baixas concentrações, variando de < 6,2 a 31 µg L⁻¹. Para Co, Cr e Sb as concentrações ficaram abaixo do limite de quantificação da técnica. não foram quantificáveis pela técnica ICP OES.

Além de serem responsáveis pela manutenção e funcionamento do organismo humano, alguns alimentos contribuem fornecendo componentes específicos, extremamente importantes no metabolismo celular, como as espécies metálicas, as quais podem estar presentes naturalmente ou ser proveniente de contaminação ambiental e industrial (processo, manejo e transporte na produção dos alimentos) (Versantvoort *et al.*, 2005).

Os nutrientes são fundamentais, pois alguns atuam como cofatores de enzimas, no equilíbrio osmótico na interface das membranas biológicas, em processos de biossinalização celular e ainda como constituintes de biomoléculas (Gupta; Gupta, 2014; Tognon, 2012).

A característica dessas espécies metálicas, que atuam como nutrientes, que os torna imprescindíveis na composição, funcional e estrutural, dos seres vivos é sua facilidade em perder elétrons e formar íons com cargas positivas que são os responsáveis pelas principais funções biológicas (Castillo-Blum *et al.*, 2000). Enquanto íons metálicos apresentam-se deficientes de elétrons, biomoléculas como proteínas e DNA são ricas em elétrons. Desta forma, uma atração entre estas oposições de cargas conduz a uma tendência geral de “íons metálicos interagirem com moléculas biológicas” (Castillo-Blum *et al.*, 2000). A carência dessas espécies metálicas pode prejudicar o funcionamento do organismo, assim como o excesso pode acarretar efeitos tóxicos (Gupta; Gupta, 2014).

Entre as espécies essenciais encontram-se os macronutrientes, requeridos em concentrações apreciáveis, na ordem de gramas. Exemplos, cálcio, magnésio e potássio. O cálcio é importante na mineralização óssea, além de atuar como sinalizador celular de vários processos metabólicos, promovendo a ligação de proteínas nas membranas fosfolipídicas. O magnésio é cofator de diversas enzimas que fazem parte do metabolismo alimentar e síntese de proteínas. O potássio é essencial nos fluídos intracelulares, nas reações enzimáticas, participando de funções musculares e cardíacas (Mafra; Cozzolino, 2004).

Além disso, existem os micronutrientes, necessários em concentrações de micro ou miligramas, para o funcionamento adequado do organismo, como por exemplo, ferro, cobalto, zinco, cobre, manganês, molibdênio, níquel, selênio etc. O zinco é ativador de enzimas e participa na síntese e degradação de proteínas, lipídios e carboidratos (Mafra; Cozzolino, 2005). O ferro da hemoglobina realiza o transporte de oxigênio no sangue. O cobalto é o principal componente da cianocobalamina, conhecida como vitamina B12, envolvida na formação das células sanguíneas e na formação dos neurônios (Alves; Della Rosa, 2003). O cobre é componente de diversas enzimas atuando diretamente na absorção do ferro e na síntese da hemoglobina (Macedo *et. al*, 2010). É encontrado em diversas matrizes alimentares, nos estudos conduzidos por Vasconcelos *et al.*, 2017, por exemplo, determinaram cobre na mandioca cultivada na região da Amazônia e encontraram concentrações que

variaram de $0,04 \pm 0,002 \text{ mg kg}^{-1}$ a $0,89 \pm 0,29 \text{ mg kg}^{-1}$. Pereira *et al.*, 2018, determinaram a concentração de diversas espécies metálicas, entre elas o cobre, em Bagas (mistura das polpas das frutas de amora, framboesa, mirtilo e morango) e chegou a concentrações na faixa de $0,20 \text{ mg kg}^{-1}$ a $0,99 \text{ mg kg}^{-1}$. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os limites máximos tolerados (LMT) de Cu em frutas, hortaliças e sementes oleaginosas *in natura* e industrializadas é de 10 mg kg^{-1} , ou seja, as concentrações encontradas estão dentro do LMT (Brasil, 2022).

Outros elementos químicos tais como cádmio, chumbo, alumínio, arsênio, mercúrio, podem estar presentes nos alimentos e nas bebidas. Esses elementos não apresentam função essencial no sistema biológico e podem ser tóxicas para o organismo, dependendo da concentração e forma química. A ingestão de chumbo na sua forma solúvel ou complexada com outros elementos como carboidratos e sais orgânicos está associada a problemas hepáticos, neuromusculares, renais, entre outros (Skerfving; Bergdahl, 2007). O cádmio pode acarretar danos aos rins, causar enfisema pulmonar, câncer e ainda enfraquecer a estrutura óssea dos seres vivos (Waalkes, 2003; Maihara; Fávaro, 2007). A ingestão de altas doses de alumínio através dos alimentos vêm sendo associada a problemas neurológicos e doenças neurodegenerativas (Da Costa *et al*, 2009; Bárcena-Padilla *et al.*, 2011).

Villa *et al.*, (2014) examinaram amostras de chocolates e encontraram concentrações de Cd e Pb na faixa de $0,0017\text{-}0,1076$ e $0,00021\text{-}0,1384 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente. Indicando que este alimento pode ser uma fonte significativa de ingestão de Cd e Pb, principalmente para crianças. Os limites máximos toleráveis (LMT), segundo a Anvisa (2022) para Cd em chocolates variam de $0,20$ a $0,30 \text{ mg kg}^{-1}$ e para Pb de $0,2\text{-}0,4 \text{ mg kg}^{-1}$. Apesar de abaixo dos LMT, essas espécies são cumulativas e a longo prazo podem trazer danos ao organismo. Schmite, *et al.* (2019), encontraram no chá mate, alumínio em concentrações que variaram de 11 mg kg^{-1} a 65 mg kg^{-1} , dependendo do modo de preparo do chá. A legislação não traz LMT para este elemento.

Uma vez presente nos alimentos essas espécies metálicas (Cd, Pb, Al) podem ligar-se à bionucleófilos, como aminoácidos, polipeptídios, proteínas e enzimas, ocasionar efeitos tóxicos ao organismo, pois estas espécies acabam competindo por sítios intracelulares, normalmente ocupados por nutrientes e assim interferem no funcionamento normal da célula. Esses metais tóxicos, por exemplo, ligam-se a grupos tióis, que normalmente constituem os sítios ativos de várias enzimas que são

determinantes para fornecer energia ou transportar oxigênio para as células (Gratão *et al.*, 2015; Lux *et al.*, 2011; Rabelo *et al.*, 2018).

Dessa forma, é importante saber da existência das espécies metálicas em alimentos e como são realizadas as determinações dessas espécies.

3.1. DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES METÁLICAS EM ALIMENTOS

A determinação/quantificação de espécies metálicas nas amostras utilizadas neste estudo foi realizada por técnicas espectrométricas de análise. Essa técnica pode ser baseada na absorção atômica, conhecida como espectrometria de absorção atômica, do inglês Atomic Absorption Spectrometry – AAS ou na emissão atômica, espectrometria de emissão atômica, do inglês Atomic Emission Spectrometry - AES) (Pohl, 2009; Korn *et al.*, 2008; Yücel; Sultanoğlu, 2012).

Em relação a espectrometria de absorção atômica, o analito pode ser atomizado por meio de uma chama, espectrometria de absorção atômica em chama, do inglês - Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS) ou por um forno, espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite, do inglês Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GF AAS). Já na espectrometria de emissão atômica a atomização ocorre por meio de um plasma, sendo elas a emissão atômica com plasma indutivamente acoplado, do inglês Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado, do inglês Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) (Pohl, 2009; Korn *et al.*, 2008; Yücel; Sultanoğlu, 2012).

A técnica de FAAS é adequada para determinar concentrações de espécies metálicas em mg L^{-1} . Já as técnicas de GF AAS, ICP OES e ICP-MS, são ideais para determinar elementos em concentrações traço ($\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}), pois apresentam baixos limites de detecção (Harris, 2012; Yücel; Sultanoğlu, 2012). As técnicas espectrométricas de absorção apresentam baixo custo, quando comparadas as técnicas de plasma, alta sensibilidade e seletividade, além de fornecerem resultados precisos e exatos. No caso do GFAAS uma outra vantagem é a introdução de amostras em suspensão (Pohl, 2012a; Yücel; Sultanoğlu, 2012).

No entanto, para determinar espécies metálicas em alimentos sólidos é necessário que a amostra passe por um tratamento, a fim de eliminar a fazendo com que o analito esteja disponível para quantificação (Pellerano et al., 2012).

Existem vários procedimentos de preparo de amostras que envolvem o uso de altas temperaturas como a digestão por via seca, e o uso de reagentes oxidantes como a digestão via úmida (Souza; Campos, 2015). A principal vantagem no uso desses procedimentos é a completa solubilização das amostras, minimizando assim as interferências no momento da análise. No entanto, há desvantagens devido ao uso de reagentes tóxicos e perigosos e tempo de preparo das amostras (Magalhães; Arruda, 1998; Sardans; Montes; Peñuelas, 2010).

Nas digestões por via seca ocorre a fusão de compostos inorgânicos, onde a amostra é colocada em forno mufla utilizando rampas de aquecimento que variam de 100 a 800 °C, dependendo do elemento a ser analisado. Nesse processo ocorre a carbonização da amostra e a formação de cinzas, constituída de óxidos, silicatos, fosfatos e carbonatos das espécies metálicas, que são solúveis em ácidos (Flores et al., 2016). No entanto, deve-se ter cuidado na escolha das temperaturas utilizadas, para evitar a perda do analito por volatilização (Flores et al., 2016). Esse procedimento é descrito como padrão em diversos documentos oficiais para amostras alimentares (De Souza; Campos, 2015).

No procedimento de digestão por via úmida são utilizados ácidos, normalmente o nítrico (HNO_3) e sulfúrico (H_2SO_4), pois estes atuam na decomposição da fração orgânica da matriz da amostra e possuem alto potencial de oxidação. Também podem ser utilizadas misturas de oxidantes como HNO_3 e H_2O_2 , que aumentam a eficiência da digestão, e ainda no caso dessa mistura gera água, gás carbônico e óxido nítrico como produtos da decomposição, facilitando o descarte dos resíduos (Mendes et al., 2006; Sardans; Montes; Peñuelas, 2010; Barin et al., 2016). Neste procedimento a amostra, juntamente com os reagentes, são levados para aquecimento até a decomposição da amostra, sendo que a temperatura deve ser controlada para que não ocorram perdas tanto da solução quanto do analito (De Souza; Campos, 2015).

Vários trabalhos realizaram a quantificação de espécies metálicas em diferentes tipos de amostras que passam previamente por uma etapa tratamento, por exemplo, Martins et. al., (2009) estudaram a composição de plantas da região Amazônica, utilizadas para preparo de chás, que possuem propriedades terapêuticas.

Os autores determinaram a concentração de Ca, Mg, Fe, Cu e Zn por FAAS. Para o tratamento das amostras, utilizou-se a digestão via úmida, onde 200 mg das folhas foram colocados em tubo digestor, com ácido nítrico e ácido perclórico à 180 °C até a completa digestão. A determinação das espécies metálicas foi realizada em FAAS. As concentrações de Ca variaram de 618 a 20058 mg L⁻¹, de Mg variaram de 39 a 9370 mg L⁻¹, para Fe as concentrações estavam na faixa de 20 a 87 mg L⁻¹, para Cu os teores foram de 7 a 16 mg L⁻¹ e, para Zn as concentrações variaram de 9 a 41 mg L⁻¹, respectivamente, de acordo com as plantas estudadas.

Pedro *et. al.*, (2016) utilizaram a digestão via seca como tratamento para determinar a presença de Na, K, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn) em plantas medicinais como: Barbatimão, Carqueja, Mangava-Brava e Quebra Pedra, comercializadas em Cuiabá. Para isso 5 g de amostra foram submetidas a calcinação em forno mufla a 580 °C, até completa digestão da matéria orgânica e as cinzas solubilizadas em ácido clorídrico. A solução foi analisada em FAAS. As maiores concentrações foram de K (21,6 mg g⁻¹ na planta Carqueja), Ca (12,2 mg g⁻¹ na planta Mangava Brava e Mg (2,97 mg g⁻¹ na planta Barbatimão).

Wang *et. al.*, 2019 determinaram a concentração de cromo em amostras de espinafre, alface e salsão. O tratamento das amostras foi realizado por digestão via úmida, onde 0,2 g (base seca) das hortaliças foram colocadas em tubos de centrífuga e digeridos com 5 mL de HNO₃ 65% m/m e 3 mL de H₂O₂ 30% v/v em um forno de digestão por micro-ondas. As soluções foram analisadas por ICP-MS e as concentrações obtidas de cromo foram 14,3 ± 0,3 µg g⁻¹ para o espinafre, 17,2 ± 0,5 µg g⁻¹ para a alface e 561,2 ± 9,8 µg g⁻¹ para o salsão.

Schmite *et al.*, 2019 avaliaram dois métodos de tratamento de amostras de chá-mate para determinação das concentrações totais de Cd e Cu, sendo um método por via úmida e outro por via seca. No método via úmida utilizou-se 0,75 mL de H₂O₂ (30% v/v) e 3 mL HNO₃ (65% m/m) adicionados em tubos de ensaio juntamente com a amostra e deixados em banho maria até dissolução. No método de pré-tratamento via seca, 1,0 g da amostra foi colocada em cadinho de porcelana e deixada em contato com a chama do bico de Bunsen para obtenção de cinzas. Posteriormente, o cadinho contendo a amostra previamente calcinada foi levado para calcinação em mufla por 3 horas à 500°C. Por fim, o material calcinado foi solubilizado com HNO₃ concentrado. As soluções obtidas em ambos os métodos foram analisadas por GF AAS. Para Cd as concentrações encontradas foram similares, em torno de 0,235 µg g⁻¹. Portanto,

não houve diferença significativa entre os métodos de pré-tratamento, após teste estatístico *teste t* de student em um nível de confiança de 95%. Os limites máximos toleráveis (LMT), segundo a Anvisa (2022) para Cd em chá, erva mate, e outros vegetais para infusão é de $0,40 \text{ mg kg}^{-1}$. Para Cu a concentração obtida com a digestão úmida foi de $13,0 \pm 0,44 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, superior a concentração obtida com digestão seca que foi de $8,76 \pm 0,02 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. Neste caso houve diferença significativa entre os métodos de tratamento das amostras de chá-mate para determinação de cobre e o método indicado foi o via úmida, pois forneceu as maiores concentrações do elemento.

Com base nos exemplos citados, a escolha do melhor tratamento de amostra irá depender da matriz com a qual está trabalhando. Além disso, experimentos de otimização são muito importantes a fim de buscar a condição ideal para a matriz e espécie de interesse. Também deve ser levado em conta as vantagens e desvantagens de cada procedimento, como volume de reagentes, o emprego de reagentes tóxicos e perigosos, tempo de preparo e as temperaturas de aquecimento da amostra, o que pode acarretar a perda do analito por volatilização ou a contaminação da amostra, prejudicando a qualidade analítica dos resultados, em termos de exatidão e precisão, análise final do elemento. Portanto, o tratamento da amostra é um dos fatores fundamentais para determinar as concentrações totais dos metais em alimentos (Pohl, 2009; Sardans; Montes; Peñuelas, 2010).

Uma bebida muito consumida por idosos e crianças que merece destaque e será objeto de estudo neste trabalho, são os chás.

3.2. CHÁS

No Brasil, chá é o produto constituído de uma ou mais partes de espécies vegetais inteiras, fragmentadas ou moídas, com ou sem fermentação, tostadas ou não, os quais são utilizados exclusivamente para o preparo de bebidas alimentícias a partir da infusão ou cocção em água potável (ANVISA, 2005).

O chá é uma das bebidas mais consumidas no mundo, e a sua popularização se deve não só ao seu agradável aroma e sabor, mas por sua rica composição em compostos biologicamente ativos como os flavonoides, catequinas, polifenóis, alcaloides, vitaminas, sais minerais, que podem de certa forma contribuir para a

prevenção e o tratamento de diversas doenças (Lima; Mazzafera; Moraes; Silva, 2009).

Por exemplo, o chá de camomila (*Matricaria recutita* L.) é consumido a fim de reduzir sintomas de ansiedade, tratar distúrbios gastrointestinais, amenizar cólicas de bebês e cólicas menstruais (Srivastava; Shankar; Gupta, 2010; Singh; Khanam; Misra; Srivastava, 2011). O chá-mate pode causar uma redução significativa nos níveis de colesterol e triglicerídeos sanguíneos, ajuda na proteção do fígado, estimula o sistema nervoso central, possui ação diurética, entre vários outros (Bastos *et al.*, 2007; De Mejia, 2009; Castaldelli *et al.*, 2011).

A legislação brasileira reconhece os chás como alimento sem indicação terapêutica, com isso não são requeridas proporções mínimas de constituintes químicos de cada espécie vegetal, diferente daqueles que são rotulados e vendidos por farmácias como medicamento fitoterápico (ANVISA, 2013).

Desta forma, o uso desses produtos naturais se tornou uma preocupação com a saúde pública, isto porque, assim como outros alimentos, estão sujeitos a inúmeras contaminações (químicas, físicas ou biológicas) que podem afetar de forma positiva ou negativa a qualidade de vida e a saúde da população que consome esse produto (Da Silva, 2013).

Existem inúmeras espécies de plantas utilizadas para o preparo das bebidas por infusões, e as que merecem destaque, são a erva-mate, utilizada no preparo do chá mate, e a camomila, pois além de serem amplamente consumidas no território brasileiro foram utilizadas neste trabalho para verificar a presença de espécies metálicas e para a aplicação dos ensaios de bioacessibilidade *in vitro*.

3.2.1. Chá mate

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) é uma árvore da família das Aquifoliaceae, com origem na América do Sul (Heck De Mejia, 2009; Bracesco *et al.*, 2011). Esta planta apresenta um caule cinza que pode atingir doze metros de altura, suas folhas são ovais e seu fruto pode nascer na cor verde ou vermelho-arroxeadado (Figura 1(A e B)). Sua área de ocorrência natural está restrita a três países da América do Sul: Brasil, Paraguai e Argentina, sendo que no Brasil o Estado do Paraná é o maior produtor da erva, e até na bandeira do Estado ela aparece juntamente com um ramo de Pinheiro.

Figura 1: (A) árvore da erva-mate (*Ilex paraguariense* St. Hil.) e (B) frutos, caules e folhas da erva-mate.



(A)

Fonte: <http://www.klimanaturali.org/2013/06/erva-mate-ilex-paraguariensis.html?m=0>

A erva-mate pode ser utilizada para preparar bebidas como chimarrão, tererê, formulações farmacêuticas e o chá mate, sendo que para este fim passa por um processamento até ser comercializada e consumida (Albas et al., 2014; Borges et al., 2017). O processamento ou beneficiamento da erva-mate envolve algumas etapas, para obtenção destes produtos, sendo elas: a colheita, etapa em que são cortados as folhas e os ramos da árvore; o sapeco ou branqueamento, responsável pela pré-secagem da erva à 500 °C de 10 a 180 segundos e também responsável pela inativação de enzimas que podem causar a degradação do produto; a secagem em estufa à 100 °C de 1 a 24 horas, para retirar toda a umidade da erva-mate e o cancheamento onde ocorre a separação das folhas e dos ramos, trituração e peneiramento da erva (De Campos, 2013).

A erva-mate cancheada para ser utilizada no chimarrão (infusão a quente) e no tererê (infusão a frio) (Figura 2(A)), é moída, misturada, peneirada, embalada e comercializada de imediato, garantindo assim a coloração verde tão apreciada (Maccari Junior, 2005). Enquanto a erva-mate cancheada, matéria-prima do chá-mate passa por um período de armazenamento em que ocorre a transformação do produto, devido a formação de compostos aromáticos, adquirindo a coloração amarela, seguido de uma moagem e mistura para obtenção da granulometria desejada. Por fim, a erva é tostada, com fogo direto, em torno de 160 °C por 12 min, para dar origem ao chá-mate tostado (Figura 2 (B)) (Da Costa et al., 2009).

Figura 2. A esquerda erva-mate utilizada no chimarrão e tererê e a direita o chá-mate após a etapa de tostagem.



(A)



(B)

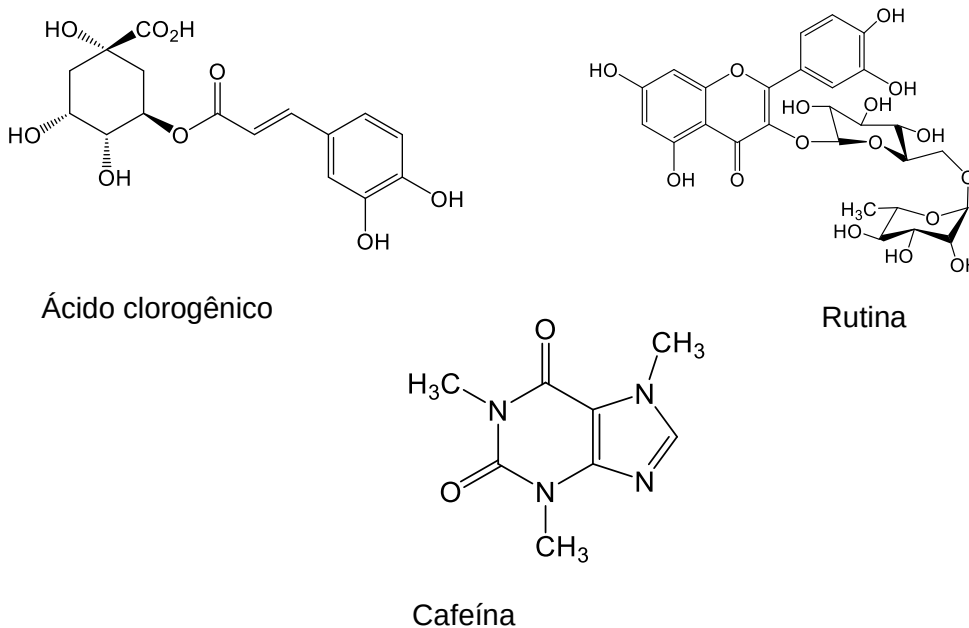
Fonte: a autora.

Vários estudos relatam a presença de espécies metálicas em diferentes espécies de chás e em suas infusões. Da Costa *et al.* (2009) estudaram a presença do Al em marcas comerciais de erva-mate verde (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). As concentrações de Al lixiviado para erva-mate e nas infusões do chá mate variaram de 12,8 a 18,1% e de 5,9 a 10,6%, respectivamente. Schmite *et al.* (2019), determinaram concentrações de Al, Cd, Pb e Cu em diferentes amostras comerciais de chá mate e em suas infusões, preparadas a quente e a frio, e encontrou concentrações totais que variaram de 0,08 a 0,320 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Cd); 0,36 a 0,44 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Pb); 10,3 à 12 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Cu) e de 347 à 526 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Al). Nas infusões a quente as maiores concentrações foram de Al e Cd, enquanto nas infusões a frio maiores concentrações de Cu e Pb, foram determinadas. De Campos *et al.* (2014) determinaram a fração biodisponível de Al em infusões de erva-mate obtidas em diferentes fases de industrialização, utilizando a Voltametria de Decapagem Catódica Adsorbtiva com o agente complexante vermelho de alizarina, variando o pH. Os resultados mostraram que 60% do Al, em pH 8, estava complexado com compostos orgânicos, diminuindo a sua biodisponibilidade. No entanto, a fração lábil do Al, obtida em pH 5, excedia a ingestão semanal máxima recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

O consumo regular do chá-mate está associado a efeitos benéficos a saúde humana como diminuição do colesterol, efeitos diuréticos, antioxidantes e vaso dilatadores, entre vários outros (Bastos *et al.*, 2007; De Mejia, 2009). Essas propriedades podem estar associadas a presença de compostos fenólicos (catequinas e flavonoides), ácidos clorogênicos, alcaloides (metilxantinas – cafeína e teobromina),

óleos voláteis, polissacarídeos, aminoácidos, lipídeos, vitaminas (A, complexo B, C e E), minerais, entre outros (De Moraes *et al.*, 2009; Bracesco *et al.* 2011; De Godoy *et al.*, 2013; Lanzetti *et al.*, 2013). A Figura 3, mostra algumas estruturas químicas orgânicas presentes no chá mate.

Figura 3. Estrutura química de alguns compostos orgânicos encontrados no chá-mate.



Fonte: Adaptado de HECK E DE MEJIA (2007); YANG *et al.* (2012); DE CAMPOS, 2013.

O processo de tostagem, pelo qual o chá-mate passa, pode causar perdas de compostos fenólicos, devido a degradação térmica. Entretanto, esses efeitos são minimizados pela formação de melanoidinas (compostos químicos que são formados quando açúcar e aminoácidos se combinam em altas temperaturas), caracterizadas pela coloração marrom, após a etapa de tostagem, que apresentam elevada atividade antioxidante e ainda, atuam na complexação de espécies metálicas, devido à presença em sua estrutura de carbonilas e hidroxilas, provenientes de cetonas e álcoois, respectivamente (De Campos, 2013).

3.2.2. Chá de Camomila

A camomila (*Matricaria recutita* L.) é uma herbácea da família Asteraceae originária do continente europeu. As características dessa planta incluem capítulos florais agrupados, flores com coroa branca e centro amarelo, frutos tipo aquênio cilíndrico e altura que pode chegar a 1 metro (Figura 4) (Lorenzi; Matos, 2002). Se

desenvolve melhor em climas temperados, onde predominam o tempo seco e úmido, temperatura amenas e, por este motivo no Brasil é cultivada na região Sul, com destaque mais uma vez para o Estado do Paraná, o maior produtor de camomila (Srivastava; Shankar; Gupta, 2010; Amaral *et al.*, 2014).

Figura 4. Planta de camomila (*Matricaria recutita* L.)



Fonte: <https://suplementosinvitta.com/blog/camomila-beneficios-propiedades/>

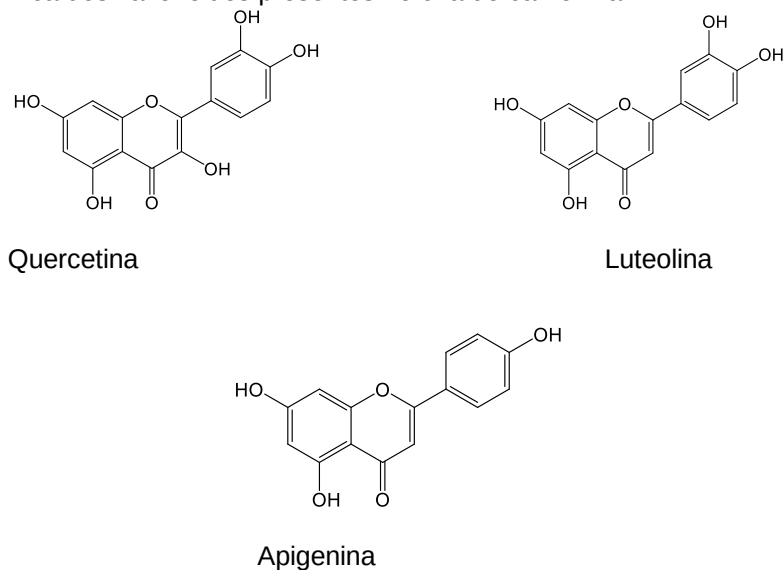
A colheita de camomila é feita por máquinas, mas também requer tarefas manuais. Os capítulos florais utilizados para o preparo dos chás, por exemplo, são colhidos um a um, o que torna a colheita um pouco trabalhosa (Sartório *et al.*, 2000). As flores colhidas são secas, e então vendidas a granel para fábricas onde serão embaladas em sachês de chás. Essas flores devem ser processadas o mais rápido possível, para evitar perdas uma vez que a qualidade diminui se o armazenamento se estender por mais de seis meses, devido a degradação do produto.

A camomila apresenta propriedades sedativas e calmantes e devido à sua importância terapêutica, consta em farmacopeias como, BRITISH Herbal Pharmacopoeia (1983, 1996), BRITISH Herbal Compendium (1992), EUROPEAN Pharmacopoeia (1992), PHARMACOPOEIA Helvética (1993) e FARMACOPÉIA Brasileira (1996) (Bezerra, S. B. 2009). O chá de camomila é consumido a fim de amenizar cólicas de bebês, reduzir ansiedade e problemas cardiovasculares, prevenir a osteoporose, melhorar os níveis de glicemia nos casos de diabetes, entre vários outros (Srivastava; Shankar; Gupta, 2010).

As características farmacológicas da planta, citadas acima, irão depender do grupo de compostos que está sendo estudado, uma vez que estes são divididos em dois grupos, um hidrofílico, constituído principalmente por flavonoides os quais são

responsáveis pela estabilização dos radicais livres nos processos metabólicos; e os lipofílicos, constituídos de óleo volátil, como o alfa-bisabolol e o camazuleno, cuja principal ação é atuar como anti-inflamatórios (Braibante; *et al.*, 2014; Caleja *et al.*, 2017). A Figura 5, mostra a estrutura química dos principais flavonoides encontrados no chá de camomila.

Figura 5. Estrutura química dos flavonoides presentes no chá de camomila.



Fonte: a autora.

Além dos compostos orgânicos, a camomila também pode apresentar em sua composição química espécies metálicas. Por exemplo, Milani *et al.* (2018), estudaram a presença de várias espécies metálicas em amostras de chás, entre eles o de camomila. Foram avaliadas as ervas e suas infusões. Na planta de camomila, as espécies metálicas encontradas em maiores concentrações foram Al $513 \mu\text{g g}^{-1}$, Fe $356 \mu\text{g g}^{-1}$, Mn $57 \mu\text{g g}^{-1}$, Zn $24 \mu\text{g g}^{-1}$, Cu $9,2 \mu\text{g g}^{-1}$ e Cr $1,77 \mu\text{g g}^{-1}$. Dessas espécies encontradas apenas o cobre foi extraído em mais de 50% para as infusões com esta planta. Bitobrovec (2019), determinou a concentração de cobre em duas marcas do chá de camomila vendidos em sachê e a granel e em suas infusões. As concentrações médias totais de cobre foram de $12 \mu\text{g g}^{-1}$ para os sachês e $50 \mu\text{g g}^{-1}$ para os chás a granel. Nas infusões preparadas com os sachês as concentrações de cobre variaram de 2,8 a $8 \mu\text{g g}^{-1}$ e de 1,7 a $2,4 \mu\text{g g}^{-1}$ para as infusões obtidas com as amostras a granel.

Sabendo que as espécies metálicas podem estar presentes em amostras de chás, torna-se importante compreender como isso ocorre.

3.3. PRESENÇA DE ESPÉCIES METÁLICAS NOS CHÁS

A presença de espécies metálicas nos chás está normalmente relacionada à poluição ambiental do solo, água de irrigação dos locais de cultivo, equipamentos de aço inoxidável usados nas indústrias alimentícias, ou até mesmo pertencer à composição natural das plantas (Pytlakowska *et al.*, 2012).

A presença de espécies metálicas na composição química dos chás, podem ser provenientes do solo, da água, do ar

Um estudo demonstrou que a presença de espécies metálicas nos chás é devido ao fato de as plantas do chá serem normalmente cultivadas em solos altamente ácidos, onde os oligoelementos são potencialmente mais biodisponíveis para absorção pelas raízes, como no caso do chá-mate (Han, *et al.*, 2006).

São poucas as legislações vigentes sobre chás no Brasil e as que existem normalmente estabelecem teores totais de metais tóxicos, como Cd, Pb e Hg, no produto comercial, não considerando a disponibilidade biológica e nem a espécie química presente na bebida preparada por infusão (ANVISA, 2013).

Com isso, estudos sobre composição, formas químicas (especiação) e biodisponibilidade biológica, das espécies metálicas presentes nos chás são de extrema importância para garantir a saúde da população que consome esses produtos e ainda, levantar dados para mudanças nas legislações.

Uma espécie metálica que pode estar presente no ambiente e em alimentos, seja devido a fatores naturais ou devido atividades antrópicas, e possui grande importância biológica é o cromo (Cr). Por isso, o estudo da especiação desta espécie nos alimentos é de extrema importância.

3.4. ESPECIAÇÃO DO CROMO EM AMOSTRAS ALIMENTARES

Especiação química é a distribuição das diferentes formas e espécies de um elemento na matriz de estudo (Templeton *et al.*, 2000). O cromo, metal de transição, está presente no ambiente em duas principais formas químicas estáveis, Cr(III) e Cr(VI) (Hamilton *et al.*, 2018).

O Cr(III) é um micronutriente essencial para os seres humanos. Sua atividade biológica está associada a potencialização dos efeitos da insulina na conversão da glicose em dióxido de carbono ou em lipídeo (White; Kahn, 1994; López-García *et al.*,

2013; Markiewicz *et al.*, 2015). Tem sido demonstrado que este elemento é capaz de ativar a proteína tirosina-cinase do receptor da insulina (Davis *et al.*, 1997).

Já o Cr(VI) na formas químicas, CrO_4^{2-} , HCrO_4^- , tem origem amplamente antrópica, existe como espécie aniônica. Dhal *et al.* (2013) relataram que a toxicidade do Cr(VI) é 100 vezes maior que o Cr(III), devido a sua alta mobilidade, solubilidade e biodisponibilidade. Essa espécie apresenta similaridades estruturais a ânions que são transportados por canais iônicos, como sulfato (SO_4^{2-}) e fosfato (PO_4^{3-}) assim, consegue penetrar membranas biológicas e causar doenças como o câncer (Aharchaou *et al.*, 2017; Bahadir *et al.*, 2016; López-García *et al.*, 2013; Peralta, 2014).

Devido às suas propriedades metálicas únicas (Markiewicz *et al.*, 2015) o cromo é muito utilizado em processos industriais como metalurgia, indústria de refratários e fabricação de produtos químicos e assim, acaba sendo despejado no ambiente em grandes quantidades (Yoshinaga *et al.*, 2018).

Desta forma, para discutir às concentrações totais e a especiação do cromo em alimentos é necessário considerar as fontes e as formas químicas desse elemento antes da absorção pelas plantas. Assim, compreender o comportamento químico do cromo na água e no solo é de extrema importância para prever a estabilidade das espécies e a possibilidade de ser transferido para os alimentos (Hamilton *et al.*, 2018).

A presença desse elemento na água pode ocorrer de forma natural, pelo desgaste e precipitação de rochas, ou devido a processos de contaminações de águas residuais de indústrias (Hamilton *et al.*, 2018). Nos solos normalmente tem origem de processos geoquímicos, como intemperismo e erupções vulcânicas ou ainda proveniente de lodos de esgoto, utilizados como fertilizantes nos solos (La Guardia; Morales-Rubio, 2003; Hamilton *et al.*, 2018).

No solo, as espécies catiônicas Cr^{3+} , $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$ e $\text{Cr}(\text{OH})_2^{2+}$, de Cr(III) tendem a formar complexos fortes com argilas, matéria orgânica do solo e óxidos hidratados de Fe/Al, restringindo assim a sua mobilidade e disponibilidade. Solos com pH maiores tem afinidade pelo Cr(III), devido ao aumento da carga negativa nas partículas do solo (Ritchie; Sposito, 2007; Hamilton *et al.*, 2018). Já as espécies negativas de Cr(VI), CrO_4^{2-} , HCrO_4^- , repelem os minerais de argila, carregados negativamente, aumentando a mobilidade e disponibilidade do Cr(VI) com o aumento do pH (Jardine, *et al.*, 2013). Os processos de oxidação, Cr(III), e de redução, Cr(VI), no solo irão depender de fatores como, pH, concentração de oxigênio, e de agentes redox apropriados, presentes nesse meio. Por exemplo, Fe(II) em $\text{pH} > 5,5$ e sulfeto em pH

mais baixo, podem reduzir o Cr(VI), enquanto que Cr(III) pode ser oxidado na presença de manganês e oxigênio (James; Bartlett, 1979).

Nas plantas ambas as espécies, Cr(III) e Cr(VI), podem ser absorvidas, sendo que a captação preferencial de Cr(VI) através de transportadores de sulfato tenha sido observada. O Cr não tem atividade essencial nas plantas e efeitos tóxicos como restrição do crescimento radicular, redução de biomassa e distorção da aparência foliar foram registrados para plantas cultivadas em meios com excesso de Cr(III) e Cr(VI) (Banerjee *et. al.*, 2008).

Uma vez presente no solo e em plantas o cromo pode chegar até os alimentos e a preocupação em relação a presença do Cr(VI), devido sua alta toxicidade e mobilidade, levou a diversos estudos a fim de avaliar as concentrações deste elemento e de suas espécies em diferentes matrizes alimentares.

Soares *et. al.* (2009), realizaram a determinação de espécies de cromo em 152 amostras de pão branco e integral, adquiridas na região norte de Portugal, sendo que as concentrações totais de cromo foram de $47,3 \pm 20,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ e $50,9 \pm 22,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o pão branco e integral, respectivamente. As concentrações de cromo hexavalente foram $5,65 \pm 5,44 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o pão branco e $6,82 \pm 4,88 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o pão integral, respectivamente. Assim, considerando a ingestão média diária de três unidades de pão, a ingestão diária calculada foi até $12,7 \mu\text{g dia}^{-1}$ para cromo total e $1,98 \mu\text{g dia}^{-1}$ para cromo hexavalente. De acordo com a recomendação diária de Cr prescrita pela Agência de Alimentos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration-FDA) o limite é de $0,12 \mu\text{g g}^{-1}$ (120 ng g^{-1}) do metal (FDA, 2013; Milani, Morgano; Cadore, 2016), ou seja, a ingestão diária após consumo de três pães excede o recomendado pela FDA, podendo ser prejudicial à saúde. Chen *et. al.* (2014) determinaram as concentrações de Cr total, suspenso, solúvel e as espécies de Cr(III) e Cr(VI) em folhas e infusões de chá verde, obtida de uma região da China. A concentração de Cr total nas folhas foi de $5,63 \pm 0,41 \mu\text{g g}^{-1}$. Nas infusões a concentração de Cr total foi de $3,36 \pm 0,18 \mu\text{g g}^{-1}$, ou seja, cerca de 60% do cromo presente nas folhas é extraído para as infusões. Em relação as espécies de cromo nas infusões, 17% estava na forma de Cr(III) e 4% na forma de Cr(VI) e o restante do cromo na forma solúvel e/ou em suspensão. Vieira *et. al.* (2014), realizaram a determinação de cromo total e Cr(VI) em diferentes amostras de cerveja lager embaladas em vidro ou em latas. A concentração média de Cr total variou entre 1,13

$\mu\text{g L}^{-1}$ na lager enlatada e $4,32 \mu\text{g L}^{-1}$ em cervejas de baixo teor alcoólico, enquanto a concentração média de Cr(VI) foi $<2,51 \mu\text{g L}^{-1}$.

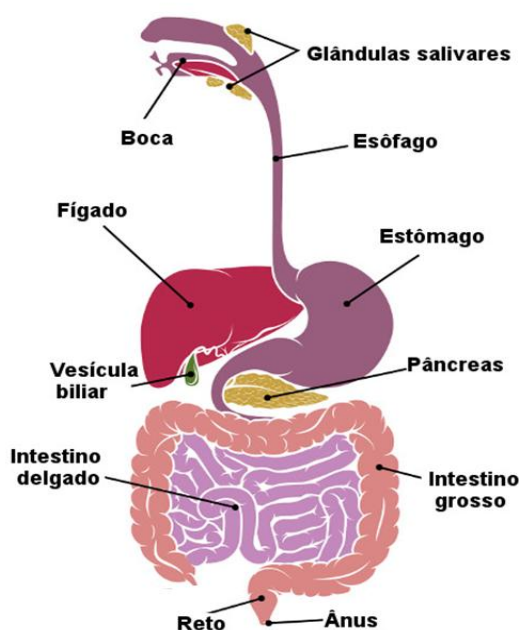
Em alimentos como chás, frutas, legumes, etc., o cromo(III), pode estar na forma de fosfato de cromo, em complexos com ligantes orgânicos ou ligados a proteínas, enquanto o cromo hexavalente é raramente encontrado (Zhitkovich, 2011; Delafiori *et al*, 2016).

Além de conhecer as formas químicas das espécies metálicas nos alimentos é necessário avaliar a sua disponibilidade biológica após o processo de digestão humana. Para isso é necessário conhecer um pouco melhor como ocorre a digestão humana e a absorção dos nutrientes.

3.5. PROCESSO DE DIGESTÃO HUMANA

A digestão humana é um muito complexa, pois envolve várias etapas e uma infinidade de processos físicos, químicos e biológicos. Por isso é muito importante conhecer os principais componentes do sistema digestório e suas funções para compreender a digestão de um alimento e absorção dos nutrientes pelo organismo ou o processo de absorção de agentes tóxicos. A Figura 6, mostra os principais componentes do sistema digestório.

Figura 6. Principais órgãos do sistema digestório humano.



A digestão dos alimentos inicia-se na boca, onde inicialmente o alimento sofre uma digestão mecânica, sendo cortado e triturado pelos dentes para melhor ação da enzima amilase, responsável pela quebra da celulose de frutas e vegetais e por catalisar a hidrólise de polissacarídeos como amido e glicogênio, formando o bolo alimentar. Em seguida, a língua ajuda a mover o bolo alimentar até o esôfago, órgão muscular que através de contrações musculares é responsável por levar o bolo alimentar até o estômago. 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, formando uma mistura semilíquida chamada de quimo (do grego chymos, suco) o qual permanece no estômago cerca de 2 a 6 horas (Fernández-Garcia et al., 2009; Hall; Guyton, 2011; Hur et al., 2011). Em seguida, por meio dos movimentos peristálticos estomacais a mistura é levada para o intestino delgado onde ocorre a junção do quimo com as secreções provenientes do pâncreas, fígado e do próprio intestino delgado.

A secreção do pâncreas é alcalina e rica em carboidratos e enzimas, como a tripsina, que atua nas proteínas; a amilase pancreática que transforma o amido em maltose e a lipase pancreática, que atua nos lipídios transformando-os em ácidos graxos e glicerol (Fernández-Garcia et al., 2009; Hal; Guyton, 2011).

A bile é composta por sais biliares (glicolato e taurocolato de sódio) responsáveis por emulsionar as gorduras e facilitar a ação das enzimas pancreáticas sobre os lipídeos, ela é produzida no fígado e armazenada na vesícula biliar, que através de um canal é lançada no intestino delgado.

O suco pancreático, é rico em bicarbonato, o qual neutraliza a acidez da mistura vinda do estômago, e garante a ação das enzimas pancreáticas (lipase, pancreatina) em pH levemente alcalino e neutro, sendo que essas enzimas serão as responsáveis pela digestão de proteínas, carboidratos e lipídeos (Fernández-Garcia et al., 2009).

Por fim, o intestino grosso é a parte final do sistema digestório, apresenta cerca de 1,5m, bem menor quando comparado ao intestino delgado em torno de 6m de comprimento. O material não digerido, forma as fezes, que posteriormente são empurradas por movimentos musculares ou peristálticos para fora do ânus. O cólon é responsável por grande parte da absorção de água e sais minerais e possui uma flora intestinal rica, composta majoritariamente por bactérias, que ajuda na fermentação

dos nutrientes não absorvidos no intestino delgado (Hall e Guyton, 2011; Kohlmeier, 2003).

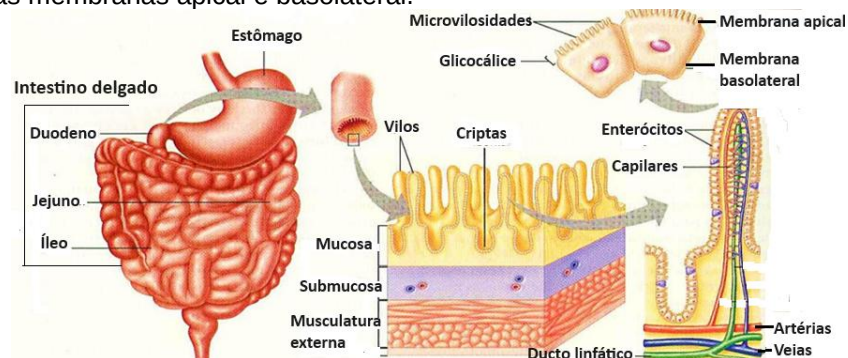
Como é no intestino que ocorre a absorção dos nutrientes é interessante conhecer melhor as suas partes e suas funções e como essa absorção ocorre.

3.5.1. Intestino delgado: Partes e funções

O intestino delgado, apresenta uma grande superfície de contato, cerca de 6m, o que proporciona uma digestão e absorção adequada, sendo dividido em duodeno, jejuno e íleo. O epitélio possui também projeções em direção ao lúmen (espaço interno ou cavidade dentro de uma estrutura com formato de tubo), chamados de vilos ou vilosidades que em sua base encontra-se as criptas. Tanto as criptas quanto as vilosidades, ficam recobertas pelos enterócitos, conhecidos como células de absorção (Balimane; Chong; Morrison, 2000).

Os enterócitos possuem duas membranas a apical com microvilosidades, as quais aumentam ainda mais a área de digestão e absorção apresentando contato com o lúmen intestinal e membrana basolateral que tem contato com a matriz extracelular, responsável pela absorção de nutrientes (Balimane; Chong; Morrison, 2000). Essas membranas são separadas por uma junção oclusiva que liga um enterócito ao outro permitindo a passagem sempre no sentido da apical para o basolateral (Hall et al., 2011; Johnson, 2006; Moreda-Piñeiro et al., 2011). Outra camada que se forma na membrana dos enterócitos é chamada de glicocálice, rica em diversas moléculas como glicoproteínas, oligossacarídeos e glicolipídios. A Figura 7, apresenta as camadas do intestino delgado, os vilos presentes na mucosa e os enterócitos com as microvilosidades e as membranas apical e basolateral.

Figura 7. Estrutura do intestino delgado, os vilos presentes na mucosa e os enterócitos com as microvilosidades e as membranas apical e basolateral.



Fonte: Adaptada de Johnson, 2006.

As secreções liberadas durante a digestão formam uma camada viscosa nos enterócitos, capaz de capturar moléculas na membrana apical. E, a água presente no ambiente, acaba se aderindo a essa camada viscosa por forças de tensão superficial. Assim, no lúmen do intestino, a água flui com uma velocidade maior e a água que passa pela camada viscosa flui mais lentamente, devido ao atrito formado, criando essa camada de água. Desta forma, uma barreira de difusão é formada sendo responsável por controlar a entrada de nutrientes e/ou contaminantes nos enterócitos (Johnson, 2006). A difusão é um processo físico, sem gasto de energia, onde ocorre o transporte de substâncias através da membrana plasmática a favor de um gradiente de concentração, ou seja, as substâncias passam livremente de um meio concentrado para outro de menor concentração (Alberts, et al. 2007).

Com relação aos mecanismos de absorção das espécies metálicas, presente nos alimentos, estes ainda não são bem claros e caracterizados. Dois são os possíveis caminhos (Finney; Halloran, 2003; Hostynek, 2003), para íons positivos, tais como sódio, o acesso ao meio intracelular, ocorre através de canais e bombas especiais na membrana celular (Finney; Halloran, 2003), enquanto que para outros íons, existem biomoléculas que facilitam seu transporte através da membrana celular, a partir de proteínas transportadoras específicas.

Em relação a absorção do cromo no organismo, esta ocorre por difusão passiva e varia entre 0,4 e 2,5% (Mafra; Cozzolino *et al.*, 2004). Quando associado ao ácido nicotínico a absorção do cromo é mais eficiente, principalmente quando ligado a três ácidos nicotínicos, formando o picolinato de cromo ($\text{Cr}(\text{pic})_3$) (Disilvestro; Dy, 2007). Depois de ingerido, ao chegar ao lúmen estomacal este composto torna-se solúvel e é hidrolisado, havendo a liberação e posterior absorção do cromo pelo intestino (Vincent, 2010). A absorção do cromo(III) depende ainda de compostos presentes no lúmen gastrointestinal que podem interferir ou ajudar nessa absorção (Guyton; Hall, 2006). A ingestão diária e segura de cromo em adultos recomendada é entre 50 e 200µg/dia (FAO/WHO, 2004).

Há ainda vários outros mecanismos pelos quais a célula pode captar e concentrar um íon metálico específico em seu ambiente, porém sem mecanismos elucidados. Por isso, para entender a absorção das espécies metálicas presente nos alimentos é necessário avaliar a sua solubilidade no trato gastrointestinal, a partir de ensaios de bioacessibilidade (Bosso; Enzweiler, 2008; Damodaran; Parkin; Fennema, 2010).

3.6. BIODISPONIBILIDADE E BIOACESSIBILIDADE DAS ESPÉCIES METÁLICAS EM ALIMENTOS

A quantidade total de espécies metálicas presente nos alimentos não está relacionada com a quantidade que será absorvida pelo organismo humano, isso porque, podem ocorrer interações dessas espécies com os componentes da matriz do alimento ou ainda, com as enzimas do processo de digestão o que pode afetar na sua real disponibilidade biológica.

A biodisponibilidade de íons metálicos em alimentos pode ser definida como a fração de íons metálicos que atinge a corrente sanguínea após processo de digestão gastrointestinal e está disponível para ser usado nas funções fisiológicas do organismo (Intawongse; Dean, 2006; Hu *et al.*, 2013; Abollino *et al.*, 2018).

Para avaliar a disponibilidade biológica são utilizados experimentos *in vivo* em animais com metabolismo próximo ao do ser humano, e nesses ensaios a concentração biodisponível do elemento de interesse é dada pela análise de amostras biológicas (pelos, unhas, sangue), pós dieta (Tognon, 2012). Esse método é geralmente caro, laborioso e apresenta limitações, tanto éticas como experimentais. Devido a isso, experimentos *in vitro* vem sendo realizados visando a simulação das condições fisiológicas, conhecidos por ensaios de bioacessibilidade.

A bioacessibilidade é uma forma de avaliar a biodisponibilidade, a partir de análises químicas *in vitro*, onde soluções bioquímicas simulam os compartimentos digestivos e fazem o processamento do alimento onde uma fração do nutriente e/ou contaminante é liberada da matriz alimentar para absorção intestinal (Pereira, et al., 2016).

Nos experimentos *in vitro* são simuladas as etapas de digestão que ocorrem no estômago e no intestino delgado, utilizando enzimas, sais e diversos reagentes, a fim de chegar o mais próximo possível da condição do organismo humano (Khouzam; Pohl; Lobinski, 2011; Machado; Cesio; Pistón, 2017). Por fim, a fração do elemento disponível para absorção pode ser quantificada utilizando uma técnica analítica apropriada (Versantvoort et al., 2005; Pohl et al.; 2012b).

Diferentes metodologias *in vitro* vem sendo aplicadas, fato que impede a comparação dos resultados entre os grupos de pesquisa. Os métodos comumente aplicados são classificados em estáticos, aqueles que consideram apenas a liberação dos elementos de suas matrizes, enquanto os métodos dinâmicos consideram a

liberação e a absorção dos elementos no intestino delgado, uma vez que no organismo esses processos ocorrem simultaneamente (Lu et al., 2021).

Os métodos estáticos são os mais usuais e dentre eles os comumente encontrados na literatura são: teste de extração baseado na fisiologia, do inglês physiologically-based extraction test (PBET) (Ruby et al., 1993; Basta; Gradwohl, 2000); Instituto Nacional Holandês de Saúde Pública e Método de meio ambiente do inglês Dutch National Institute for Public Health and the Environment method (RIVM) (Versantvoort; Kamp; Rompelberg, 2004; Smith Roberstson; Watchel 2008); simulador do ecossistema microbiano intestinal humano do inglês simulator of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME) (Van De Wiele; Verstraet; Siciliano, 2004); e o método de bioacessibilidade unificado do inglês unified bioaccessibility method (UBM) - desenvolvido pelo Grupo de Pesquisa de Bioacessibilidade da Europa (BARGE - Bioaccessibility Research Group of Europe) (Li et al., 2015).

O método estático PBET, foi descrito pela primeira vez por Ruby et al. (1996) e modificado por Cave e colaboradores (2002). Esse método leva em consideração a digestão no estômago e intestino. Na fase da digestão gástrica, a amostra é incubada a uma temperatura constante de 37 °C, para simular a temperatura corporal, com o suco gástrico. O suco gástrico é composto por pepsina, malato, citrato, ácido acético e ácido láctico em pH ácido. O suco é responsável pela quebra de proteínas e dissolução das amostras. Na fase intestinal, a solução resultante da fase gástrica é tratada com pancreatina, sais biliares e solução saturada de bicarbonato de sódio, combinação que resulta na quebra de proteínas, polissacarídeos e gorduras, tornando as espécies metálicas passíveis de absorção (Ruby et al., 1999; Intawongse; Dean, 2006; Navarro, *et al.*, 2008). O método PBET já foi aplicado para determinar a bioacessibilidade de diferentes elementos inorgânicos em solos (Bruce, *et al.*, 2007; Ruby et al., 1996), em diferentes alimentos e bebidas (Bermejo *et al.*, 2006; Pool, 2012; Schmite *et al.*, 2019; Stelmach; Pohl; Szymczycha-Madeja 2014; Yang; Lin, 2016;) e atualmente tem sido usado para determinar a bioacessibilidade de diversos compostos orgânicos em matrizes, como solo, poeira e alimentos (Lu et al., 2021).

O método UBM, também é um método estático, foi desenvolvido e aplicado para estudar a bioacessibilidade dos elementos As, Pb e Cd no solo e envolveu ensaios de validação interlaboratorial (Wragg *et al.*, 2011). Este método envolve as fases oral (saliva), gástrica e intestinal de modo sequencial. Ele foi desenvolvido, validado e padronizado pelo Grupo de Pesquisa em Bioacessibilidade da Europa

(BARGE), uma rede europeia que reúne grupos de pesquisa que estudam a bioacessibilidade humana de contaminantes em solos via trato gastrointestinal. Na primeira etapa da fase gástrica do UBM, a amostra é submetida a uma solução de saliva (simulação do fluído oral), seguida de uma solução de fluído gástrico em pH ácido simulando o compartimento do estômago. Na última etapa, a solução removida da fase gástrica é incubada com fluido duodenal e biliar em pH 6,3 (Pelfrene *et al.*, 2011; Wragg *et al.*, 2011). Em todas as etapas ocorre também a incubação com agitação em temperatura de 37°C.

Muitos trabalhos que avaliam a bioacessibilidade de espécies metálicas em alimentos vêm sendo realizados, utilizando os métodos estáticos e variando as condições experimentais e proporções de reagentes. Pohl *et al.* (2012b) estudaram a bioacessibilidade de espécies metálicas em amostras de mel e na metodologia utilizou, suco gástrico - composto por 3,2 g L⁻¹ de pepsina, 2,0 g L⁻¹ de NaCl e 0,08 mol L⁻¹ de HCl, deixados incubados e sob agitação à 37 °C durante 2 horas. O suco intestinal era composto por 10,0 g L⁻¹ de pancreatina, 12,5 g L⁻¹ de sais de bÍlis e 0,07 g L⁻¹ de K₂HPO₄ em NaOH 0,02 mol L⁻¹, incubação a 37 °C por 2 horas. Machado, Césio e Pistón (2017), estudaram a bioacessibilidade de metais em amostras de alcachofra, no método, simulou a fase gástrica e a fase intestinal. A fase gástrica era composta por 3 g L⁻¹ de pepsina e HCl 0,12 mol L⁻¹ deixada junto com a amostra em banho-maria à 37 °C por 2 horas. O suco intestinal era composto por 2 g L⁻¹ de sais biliares, 5 g L⁻¹ de pancreatina e 0,016 mol L⁻¹ de NaOH) deixados em banho-maria a 37 °C durante 2 horas. Schmite *et al.* (2019), avaliou a bioacessibilidade de espécies metálicas em infusões de chá-mate, simulando os compartimentos gástrico e intestinal. O suco gástrico era composto por pepsina 0,2 g L⁻¹ dissolvida em HCl 0,1 mol L⁻¹, agitação a 37 °C em shaker, por 2 horas. O suco intestinal era composto por 0,15 g L⁻¹ de pancreatina, 1,5 g L⁻¹ de sais de biles e 0,1 mol L⁻¹ de NaHCO₃ deixados incubados e sob agitação a 37 °C, por 2 horas.

Com base nesses trabalhos pode-se notar que existe uma gama de estudos que avaliam a bioacessibilidade de espécies metálicas em alimentos. No entanto, utilizam metodologias e concentrações de reagentes diferentes, não sendo possível a comparação entre os trabalhos de forma a enriquecer as discussões e quem sabe contribuir para mudanças nas legislações.

Com relação aos métodos dinâmicos a maioria são métodos estáticos modificados que após o processo de digestão gastrointestinal mimetizam a absorção

passiva dos elementos químicos no intestino delgado. Os primeiros métodos dinâmicos modificados, utilizaram células Caco-2 e EVA (Vasiluck et al, 2007). As células Caco-2 são extraídas do adenocarcinoma do cólon humano e sua estrutura e função se assemelha às do epitélio intestinal. Com isso essas células podem ser usadas para mimetizar a absorção dinâmica dos compostos químicos presentes no fluido de digestão. Vasiluck *et. al.* (2007) utilizaram pela primeira vez as células Caco-2 e o etileno acetato de vinila (EVA) como sumidouro lipídico e compararam a sorção de benzo(a)pireno (BaP) após liberação do solo entre os dois sumidouros. Descobriram uma forte relação linear entre os dados ($R^2 = 0,92$). Kang *et al.* (2018), também estudaram o EVA e descobriram que além dos resultados semelhantes determinados com as células Caco-2, para vários hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), o EVA forneceu dados de bioacessibilidade *in vitro* com uma excelente correlação com a biodisponibilidade relativa medida em camundongos ($R^2 > 0,6$), indicando que o EVA pode ser um substituto das células Caco-2. Posteriormente outros materiais foram utilizados para simular o processo que ocorre no intestino delgado, como a membrana C18 (James et al., 2011) e resina de polímero poroso, Tenax-TA (Yu et al., 2013).

Apesar de existirem inúmeros trabalhos que realizam ensaios de bioacessibilidade de metais em diferentes matrizes alimentares, a maioria utiliza os ensaios PBET. O método UBM, foi validado para uso em amostras de solo, porém vem sendo utilizado na determinação de metais em amostras alimentares, como na alface e no espinafre (Tokalioglu *et al.*, 2014), em peixes e caranguejos (Maulvault *et al.*, 2011) e em sementes de soja (Herrera-Agudelo, Miró e Arruda, 2017). No entanto, estes dados ainda são escassos, ou inexistentes para amostras de chás, como os de camomila e chá-mate.

Independentemente do método utilizado, a espécie metálica que estiver solúvel durante a digestão gastrointestinal somente será absorvida se estiver em uma forma química que permita sua absorção pela célula, ou seja, sua especiação (Tessier; Turner, 1995; Pelfrene; Waterlot; Douay, 2011).

Desta forma, é imprescindível realizar a análise de especiação pois, a espécie metálica que será absorvida é de extrema importância para conhecer o risco ou o benefício associado ao consumo de determinado alimento.

3.7. ANÁLISE DE ESPECIAÇÃO EM AMOSTRAS ALIMENTARES

A especiação dos elementos, como já mencionado, é uma ferramenta importante para prever o valor nutricional ou tóxico destas espécies nos alimentos.

No entanto, a análise de especiação, identificação e quantificação das espécies químicas de um determinado elemento, ainda é um desafio para os analíticos, isto porque estes estudos devem levar em consideração as propriedades específicas do elemento a ser avaliado, como labilidade, mobilidade, e ainda, ser simples, de baixo custo e ter sensibilidade adequada (Sigg *et al.*, 2006; Pesavento *et al.*, 2009).

A especiação de íons metálicos em alimentos, de modo geral, pode ser dividida em duas categorias: determinação off-line, realizada após o tratamento da amostra, onde ocorre a separação de espécies químicas por meio de extração seletiva e posterior determinação, normalmente por espectrometria atômica; especiação on-line usando técnicas hífenadas, que incorporam a separação pré-instrumento e subsequente determinação de espécies, acoplando, por exemplo, métodos cromatográficos, como cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC – do inglês) com a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (Hamilton *et al.*, 2018). Essas metodologias de especiação permitem uma avaliação rápida dos riscos e impacto de espécies metálicas nocivas na saúde humana (Pechancová; Pluháček; Milde 2018).

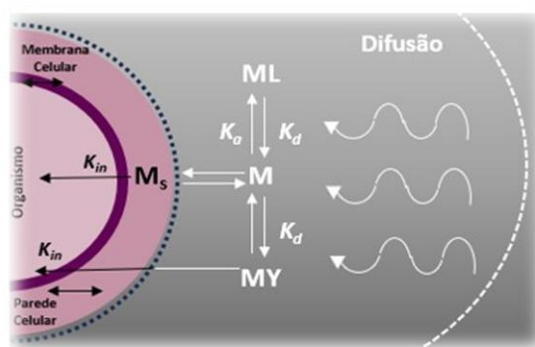
Desta forma, uma variedade de métodos analíticos vem sendo propostos para análise de especiação de cromo em matrizes alimentares.

Por exemplo, Ambushe; McCrindle; McCrindle (2009) determinaram cromo total e cromo (VI) em amostras de leite de vaca. O cromo total foi determinado por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com célula de reação dinâmica (DRC-ICP-MS) após mineralização das amostras. Para separar Cr (VI) de Cr (III), colunas de troca iônica NH_2 foram utilizadas, sendo o Cr(VI) adsorvido na coluna e posteriormente eluído com 2 mol L^{-1} de HNO_3 . Após a separação, o Cr(VI) foi quantificado por DRC-ICP-MS. O método foi validado através de ensaios de recuperação em amostras de leite enriquecidas com Cr(VI), que variaram de 96,4 a 99,2%. Chen *et al.* (2014) realizaram a especiação de cromo em folhas de chá e infusão de chá usando nanotubos de dióxido de titânio (TDNTs) como adsorvente de extração em fase sólida para espécies de cromo por meio de micro coluna compacta

acoplada ao (ICP-MS). Os resultados experimentais indicaram que o Cr(III) foi retido quantitativamente nos TDNTs na faixa de pH de 5,0–8,0, enquanto o Cr(VI) permaneceu na solução. Vacchina; De La Calle; Séby, (2015) desenvolveram um método para a determinação específica de Cr(VI) em alimentos e após validação do método utilizou para investigar diferentes produtos adquiridos no supermercado como lácteos, farinhas, chocolates, vegetais, frutas, carnes, peixes, ovos e bebidas. Para quantificação de Cr(VI) o método foi baseado em uma extração alcalina (solução de NH_4OH em pH 11,5) seguido de determinação de Cr(VI) por HPLC-ICP-MS de troca aniônica. O método foi satisfatório em termos de linearidade, especificidade, exatidão, repetibilidade e precisão intermediária. No entanto, Cr(VI) não foi encontrado em nenhuma das amostras avaliadas.

Outra técnica atraente e que vem sendo muito utilizada para análise de especiação metálica, principalmente em águas naturais e em solos, é a técnica de difusão em filmes finos por gradiente de concentração do inglês *diffusive gradients in thin films* - (DGT). A vantagem da utilização desta técnica, está no seu uso *in situ*, diminuindo erros associados a amostragem e ao armazenamento das amostras e ainda, a capacidade de pré-concentração (Alexa *et. al.*, 2009; Dos Anjos *et. al.*, 2016). Além disso, esses sensores possibilitam medidas que são indicadores confiáveis da biodisponibilidade e da bioabsorção de metais, pois os processos de absorção no organismo são similares ao que ocorre nos dispositivos (Sigg, *et. al.*, 2006), sendo que o processo de difusão é determinante na absorção de metais pelos organismos vivos e no funcionamento de sensores dinâmicos como o DGT. A Figura 8, mostra um esquema simples dos processos químicos que estão envolvidos na absorção de metais por micro-organismos.

Figura 8. Esquema simplificado dos processos envolvidos na absorção de espécies metálicas por microrganismos.



Legenda: (ML) complexo metálico, (MY) complexos metálicos lipofílicos (MY), (K_a e K_d) constante de velocidade de associação e dissociação, (K_{in}) constante de internalização e (M_s) sorção de metais. Fonte: adaptado de Köster e Van Leeuwen, 2004.

A Figura 8, mostra um esquema representativo dos processos de absorção de íons metálicos por micro-organismos. Cada célula viva, é circundada por uma membrana biológica, conhecida como membrana celular. Essa membrana apresenta no seu interior um núcleo lipídico e hidrofóbico e uma parede celular composta com quase 80% de água, por isso é hidrofílica. A função da membrana celular é separar o interior da célula do ambiente, geralmente hidrofílico. Devido a sua permeabilidade limitada e seletiva age como uma barreira responsável por regular o transporte de nutrientes ou elementos tóxicos do ambiente para o organismo (Köster; Van Leeuwen, 2004).

A disponibilidade de espécies químicas para os organismos é definida por uma série de características que envolvem a reatividade química, derivada de distribuições de equilíbrio de espécies e suas taxas de interconversão; o fornecimento (fluxo) dessas espécies químicas para os locais relevantes na superfície do organismo, conforme governado por suas propriedades de transporte de massa e pelo gradiente de concentração que surgem na interface a internalização das espécies químicas, regida por uma taxa constante de internalização (K_{in}) geralmente acompanhada ou seguida por algum processo de bioconversão (Köster; Van Leeuwen, 2004).

Essas etapas constituem um amplo espectro de aspectos físico-químicos, interações químicas e eletrostáticas, de processos de transferência de massa, difusão etc. Além disso, a especiação dos elementos também é muito importante na

biodisponibilidade, pois apenas uma fração do metal é bioativa na superfície da célula (Köster; Van Leeuwen, 2004).

De maneira simples a absorção de metais por organismos se inicia pelo transporte de metais da solução para a superfície da membrana da célula. O fluxo das espécies para sítios presentes na superfície da célula depende de uma constante transferência de massa, que ocorre por difusão. A difusão ocorre devido ao gradiente de concentração que se forma entre a interface da parede celular e o ambiente. Para que ocorra a transferência dos elementos para o interior da célula fatores como reatividade, estabilidade e afinidade biológica das espécies metálicas na camada de difusão, devem ser considerados. Por exemplo, complexos metálicos lipofílicos (MY) são transportados integralmente para o meio celular, enquanto outros complexos metálicos (ML) dependem da constante de velocidade de associação e dissociação (K_a e K_d) na camada de difusão para serem absorvidos na parede celular. O processo de interiorização das espécies químicas na célula ocorre pela transferência das espécies por difusão, governado pela constante de internalização (K_{in}) que depende da sorção de metais (M_s) nos sítios ativos da parede celular, onde apenas íons livres ou compostos cineticamente reversíveis podem ser transferidos via processo de difusão para o interior da célula (Köster; Van Leeuwen, 2004).

Desta forma, o uso de sensores dinâmicos, como os dispositivos DGT, que detectam as espécies metálicas de maneira similar ao organismo merecem destaque e devem ser investigados.

3.8. DIFUSÃO EM FILMES FINOS POR GRADIENTE DE CONCENTRAÇÃO (DGT)

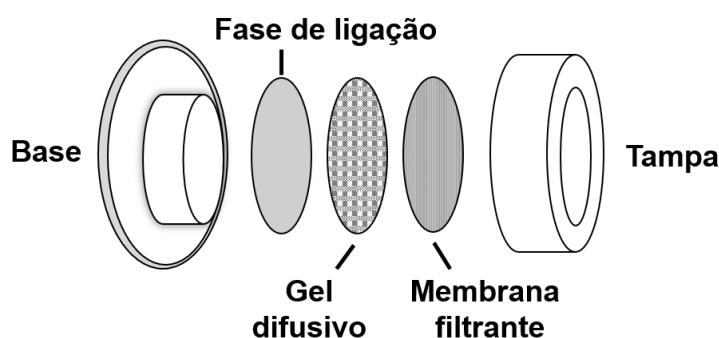
A técnica do DGT, foi desenvolvida por volta dos anos 1990 por Davison e Zhang para quantificar espécies metálicas lábeis, em águas naturais (*in situ*) (Davison; Zhang, 1994) e posteriormente usados em outras matrizes como sedimentos, água intersticial e solos (Zhang; Davison, 1995, 1999; Zhang *et. al.*, 2018). O uso destes dispositivos, até o momento, em amostras alimentares é inédito.

Espécies lábeis compreendem os íons livres hidratados e complexos orgânicos e inorgânicos cineticamente reversíveis, ou seja, aqueles que tem a capacidade de se dissociar e associar rapidamente (em menos de minutos) (Bowles *et. al.* 2006; Slaveykova *et. al.*, 2009).

O método DGT se baseia na difusão de espécies metálicas, seguindo a primeira Lei de Difusão de Fick, onde é estabelecido um gradiente de concentração entre a resina de ligação do dispositivo e a amostra (Zhang; Davison, 1999).

Os dispositivos DGT são amostradores passivos simples e fazem a separação de espécies lábeis da amostra, através de um gel difusivo e posterior acumulação das espécies de interesse em uma fase ligante. O dispositivo e seus componentes são mostrados na Figura 9.

Figura 9. Esquema representativo de um dispositivo DGT convencional



Fonte: Adaptada de ZHANG E DAVISON (1994).

O dispositivo DGT comercial da empresa DGT Reserch Ltd. é composto por uma base de 2,5 cm de diâmetro e uma tampa com janela de 2,0 cm de diâmetro, ambas de acrílico formando um pistão. A parte interna é composta por uma membrana filtrante, com porosidade de 0,45 μm ; uma camada de hidrogel (0,4 – 2 mm de espessura), que recobre uma camada do agente ligante formado por um hidrogel impregnado com a resina chelex-100.

A membrana filtrante utilizada nos sensores DGT geralmente é de nitrato de celulose com tamanho de poro de 0,45 μm e tem a função de proteger a superfície do hidrogel difusivo e ainda isolar partículas sólidas. Como ele é uma extensão da camada de difusão sua espessura deve ser levada em consideração nas medidas de metal lábil.

A camada difusiva, utilizada no DGT convencional, consiste em um hidrogel poroso, hidrofílico e de natureza polimérica conhecida, sendo este responsável por controlar o fluxo difusional das espécies metálicas lábeis dentro do sistema. Polímero é uma macromolécula formado por dezenas de milhares de unidades de repetições que são unidas por ligações covalentes. Para a produção de um polímero é necessário um monômero, cuja molécula que se dá origem a uma unidade repetitiva formando

uma cadeia polimérica (Aouada, et al., 2009). Assim, essas moléculas poliméricas com vários pontos reativos, em sua estrutura, formam uma rede tridimensional originando os hidrogéis. Os hidrogéis são materiais porosos e hidrofílicos, capazes de absorver grande quantidade de água e possuem em sua estrutura grupos funcionais como -OH, -COOH, -CONH₂, -NH₂, -SO₃H, responsáveis por controlar sua hidrofobicidade (Aouada, et al., 2009).

Para sintetizar o hidrogel de poli(acrilamida), usado na fase difusiva do DGT convencional, utiliza-se um monômero de acrilamida com reticulador (*crosslinker*) de agarose. A livre difusão só ocorre com espécies que apresentam tamanhos moleculares menores que o tamanho dos poros do hidrogel. Assim, o agente reticulante é quem irá controlar a porosidade do hidrogel, tornando-o mais restritivo (tamanho de poro menor) ou menos restritivo (tamanho de poro maior) a determinadas espécies. Força iônica, pH, composição da solução também podem afetar a difusão dos íons metálicos, uma vez que afetam os grupos funcionais presentes no hidrogel de poli(acrilamida) (INAP, 2002).

Por fim, os íons metálicos que se difundem pelo hidrogel são acumulados e pré-concentrados em um agente ligante, composto por um hidrogel impregnado com uma resina de troca iônica, comercializada como Chelex-100®. A resina Chelex é constituída por um copolímero de divinilbenzeno e estireno incorporados quimicamente com grupos complexantes, ácidos iminodiacéticos (Chostack, 2014; Dos Anjos, 2010).

A teoria do método DGT segue as características de difusão das espécies metálicas em um hidrogel e depende das propriedades e da capacidade de complexação do agente ligante.

As espécies livres e as que se dissociam facilmente de complexos metálicos na fase difusiva, são acumuladas na resina de ligação por meio de processos de complexação ou troca iônica. A labilidade é determinada pela quantidade de metais no interior do dispositivo e ainda, depende do tempo de dissociação dos complexos metálicos e coeficientes de difusão das espécies (Gimpel et al., 2003; Kersanach et al., 2009). Além disso, esses dispositivos são caracterizados por um tempo de resposta, difusão das espécies metálicas em solução pelo hidrogel, e de acumulação, que é o tempo no qual os íons metálicos se acumulam na resina de ligação.

A concentração do metal acumulado na resina de ligação pode ser determinada por uma técnica instrumental depois de uma etapa de eluição ácida (Zhang; Davison, 1995).

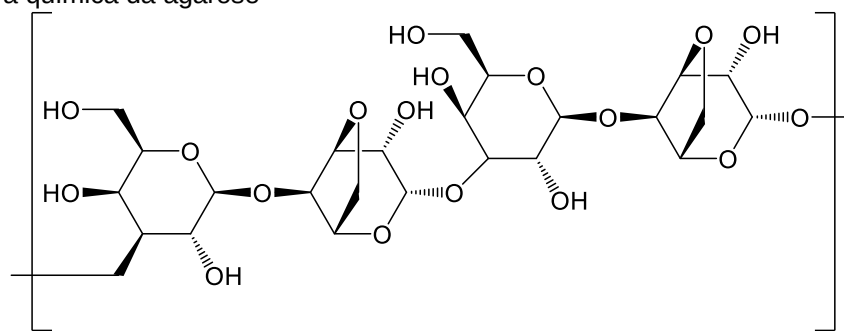
O aumento da aplicação destes dispositivos para um número cada vez maior de espécies inorgânicas e orgânicas fez com que pesquisadores propusessem novas fases de ligantes de forma a aumentar a especificidade do dispositivo e a capacidade de retenção. Assim, visando a aplicação desses dispositivos, para um número maior de espécies, vários trabalhos vêm sendo propostos para substituir as fases de difusão e ligação, por materiais de baixo custo, de fácil obtenção, menos tóxicos, específicos e com maior capacidade de retenção a determinadas espécies.

Larner e Seen (2005) utilizaram papel cromatográfico (Chr, Chr 3MM e 17 Chr), para substituir o hidrogel de poliacrilamida na determinação de cádmio. O papel cromatográfico (17 Chr) apresentou um coeficiente de difusão para o Cd de $5,08 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 20°C , muito próximo ao coeficiente de difusão da poliacrilamida que é $5,41 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Almeida, Nascimento Filho e Menegário (2012) também utilizaram papel cromatográfico (17 Chr) na fase difusiva e determinaram os coeficientes de difusão para Mn, Co, Ni, Cu, Zn e Pb, obtendo valores satisfatórios para Ni ($3,37 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) e Mn ($5,16 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) a 14°C . Gao *et al.* (2011) utilizaram gel de agarose como fase difusiva na determinação de íons de mercúrio (II) e encontraram um coeficiente de difusão de $8,44 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ a 20°C , semelhante ao encontrado por Docekalova e Divis (2005) $9,08 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Menegário *et al.* (2010), utilizaram na fase difusiva gel de agarose, e os resultados encontrados de coeficientes de difusão para Cu e Cd se mostraram promissores pois, ficaram muito próximos ao do gel convencional, $4,82 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para Cu e $5,22 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para Cd, respectivamente, obtidos a 25°C . Chostak *et al.* (2015), também utilizaram gel de agarose na fase difusiva dos dispositivos DGT. A aplicação envolveu os elementos Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn e encontrou resultados próximos aos de Menegário *et al.* (2012) para Cd e Cu, sendo os coeficientes de difusão encontrados de $5,44 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $5,29 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente.

Com base nos estudos mostrados acima ficou evidente que o gel de agarose, utilizado na fase difusiva dos dispositivos DGT, pode ser uma alternativa viável e de baixo custo para determinar as espécies metálicas lábeis uma vez que os resultados encontrados foram satisfatórios.

A agarose é um polissacarídeo, rico em grupos hidroxilas, não possui citotoxicidade, é extraído da parede celular de algas vermelhas. Sua estrutura é macrorreticular, apresenta ligações de hidrogênio formadas por cadeias repetidas de unidades alternadas β -1,3 D-galactose e α -1,4 3,6-anidro-L-galactose (SIGMA-ALDRICH), como mostra a Figura 10. Durante a produção do gel, a agarose pode ser intumescida, aumentando seu tamanho. Devido a essa característica, apresenta propriedades consideráveis para o uso como fase difusiva nos dispositivos DGT, entre as quais, a porosidade, permitindo que espécies metálicas se difundam pelo gel (Su et al., 2013; Chostack et al., 2014).

Figura 10. Estrutura química da agarose



Fonte: a autora.

No entanto, para utilização deste hidrogel alternativo na fase difusiva dos dispositivos DGT, é necessário determinar o coeficiente de difusão (D) das espécies metálicas para a obtenção de dados confiáveis após aplicação dos dispositivos *homemade*. O coeficiente de difusão pode ser determinado de forma aparente (D'), onde diversos dispositivos são aplicados em soluções contendo as espécies metálicas em função do tempo (Colaço, et al., 2012). Ou, utilizando câmaras de difusão e a medida (D) se refere apenas ao hidrogel difusivo (Devillers, et al., 2017). Esses hidrogéis controlam o transporte de massa de um determinado analito e conhecer a difusibilidade do elemento no hidrogel é muito importante nos cálculos dos metais lábeis determinados pelo DGT. Fatores como temperatura, viscosidade da solução e características dos elementos também influenciam nesses coeficientes (Colaço, et al., 2012).

Em relação a substituição da resina Chelex-100[®] suportada em hidrogel de poli(acrilamida), fase de ligação, vários estudos começaram a propor fases ligantes mais específicas e com maior capacidade de retenção para determinados íons. Menegário, Tonello e Durrant (2010) estudaram o uso da levedura *Saccharomyces*

cervisiae imobilizada em agarose, como fase de ligação para determinar Cd^{2+} em água de rio e água do mar e obteve recuperações acima de 90%. Chostak et al. (2015) imobilizaram o argilomineral montmorilonita, em hidrogel de agarose, e usou como fase ligante no DGT para determinar as espécies Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} e Ni^{2+} em águas naturais. Os resultados apresentaram elevada eficiência na pré-concentração dessas espécies, em comparação ao dispositivo comercial, com retenção entre 80 e 90%. Dos Anjos, Abate e Grassi (2017) também aplicaram o argilomineral montmorilonita para a determinação de espécies lábeis de As(V) , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr(III) , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sr^{2+} , V(V) e Zn^{2+} em águas naturais e os ensaios de recuperação foram eficientes, ficando acima de 70%.

Como visto, a técnica do DGT foi desenvolvida para quantificar espécies metálicas lábeis em águas, sedimentos e solos. No entanto, Pelfrene e colaboradores, 2011, fizeram o uso da técnica do DGT para simular a membrana intestinal humana, investigando o transporte de Cd, Pb e Zn bioacessíveis através do epitélio intestinal, uma vez que esses dispositivos respondem de uma maneira similar aos processos de absorção. Apesar de a técnica ter se mostrado simples, eficaz e confiável, esse é, até o momento, o único trabalho em que os dispositivos DGT são aplicados para simular a membrana biológica em fluidos gastrointestinais, pois a maioria dos estudos utilizam nessa etapa linhagens celulares de enterócitos humanos, linha Caco-2, como uma fase de absorção adequada (Oomen *et. al.*, 2003; Chan *et. al.*, 2007) e digestão em tubos de diálise (Shen *et. al.*, 1994; Bosscher *et. al.* 2001).

Desta forma, utilizar os dispositivos DGT simulando uma barreira biológica para avaliar o transporte das espécies lábeis (íons metálicos livres e complexos metálicos cineticamente reversíveis) pela célula torna-se muito interessante e inovador.

Com isso, obter diretamente informações sobre especiação de metais nas infusões dos chás e nos fluidos gastrointestinais podem ajudar a entender a disponibilidade das espécies metálicas e o transporte dessas espécies pelo epitélio intestinal e com isso a possível ação destas espécies no organismo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. TÉCNICAS LIMPAS

Procedimentos de técnicas limpas foram adotados, a fim de minimizar contaminações que pudessem alterar os resultados da pesquisa, visto que o trabalho envolveu determinações de metais traço (U.S.EPA, 1996; Campos; Bendo; Viel, 2002).

Para isso, todos os objetos foram manipulados com luvas e o local de manipulação das amostras foi limpo com álcool e com solução 0,1 mol L⁻¹ de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

Os materiais utilizados foram previamente lavados com detergente neutro e enxaguados com água corrente. Posteriormente foram mantidos em banho de HNO₃ 5% (v v⁻¹) por 24 horas. Concluída esta etapa, os materiais foram retirados do banho e lavados exaustivamente com água ultrapura. Por fim, os materiais foram secos e armazenados em sacos plásticos.

4.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes utilizados durante todas as etapas do trabalho foram de grau analítico. Para o preparo de todas as soluções foi utilizada água ultrapura, do tipo Milli-Q (Millipore - Synergy) a uma resistividade de 18,1 MΩ cm. Nas etapas de preparo das amostras de chá de camomila e de chá mate (digestão via úmida e via seca) foram utilizados, ácido nítrico (Sigma-Aldrich) e peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich).

Para os ensaios de bioacessibilidade com o método PBET o preparo das soluções gástrica e intestinal foram realizados com pepsina de mucosa gástrica de suínos (≥ 250 unidades mg⁻¹ - Sigma-Aldrich), ácido clorídrico (Sigma-Aldrich), pancreatina de pâncreas de suínos (adequado para a cultura de células, 4 × especificações USP - Sigma-Aldrich), sais biliares (Sigma-Aldrich) e bicarbonato de sódio (Biotec).

Para realização do método UBM foram utilizados nas etapas de digestão reagentes inorgânicos: cloreto de potássio (KCl - Sigma-Aldrich), dihidrogeno fosfato de sódio (NaH₂PO₄ – Dinâmica), tiocianato de potássio (KSCN - Dinâmica), sulfato de sódio (Na₂SO₄ - Dinâmica), cloreto de sódio (NaCl - Sigma-Aldrich), cloreto de cálcio (CaCl₂ - Dinâmica), cloreto de amônio (NH₄Cl - Dinâmica), bicarbonato de sódio

(NaHCO_3), dihidrogeno fosfato de potássio (KH_2PO_4), cloreto de magnésio (MgCl - Dinâmica), hidróxido de sódio (NaOH - Sigma-Aldrich) e ácido clorídrico (HCl - Sigma-Aldrich). Os reagentes orgânicos foram: ureia (Dinâmica), glicose (Dinâmica), ácido glucorônico (Sigma-Aldrich) e cloridrato de glucosamina (Sigma-Aldrich). E por fim, a composição enzimática: amilase salivar 1-3 unidades mg^{-1} foi preparada pelo grupo de pesquisa do Professor Jorge Iulek da Universidade Estadual de Ponta Grossa, mucina (Tpo II, Sigma-Aldrich), albumina bovina (Sigma-Aldrich), pepsina de mucosa gástrica de suínos (≥ 250 unidades mg^{-1} - Sigma-Aldrich), pancreatina de pâncreas de suínos (adequado para a cultura de células, 4 $\times$ especificações USP - Sigma-Aldrich), lipase (Tipo VII, ≥ 700 unidades mg^{-1} - Sigma-Aldrich) e sais biliares (Sigma-Aldrich).

Para obtenção da curva analítica no GF AAS e no FAAS as soluções de cromo foram preparadas a partir de solução inicial de 1000 mg L^{-1} (SpecSol).

No ICP-MS, a água foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) a uma resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, ácido nítrico 65% v v⁻¹ P.A bi-destilado abaixo da temperatura de ebulição em destilador de quartzo (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha) e as soluções dos elementos (Al, Co, Cd, Cu, Zn, Pb) foram preparadas a partir de solução multiementar ICP III (Merck) e solução estoque de ródio (Merck), todas contendo 1000 mg L^{-1} .

Um material de referência certificado, amostra de água natural NIST SRM 1640a (National Institute of Standards and Technology – USA) foi utilizado em práticas de controle de qualidade e a garantia de qualidade dos dados gerados pelo ICP-MS.

4.3. EQUIPAMENTOS

Os equipamentos: balança analítica (Shimadzu AUY220), lavadora ultrassônica (Unique, modelo USC-2800A, 40 kHz), placa de aquecimento (SPLabor), estufa (Nova Técnica, modelo NT 511), incubadora Shaker (SPLabor, modelo SP222), um potenciômetro Metrohm acoplado a um eletrodo de vidro combinado Ag / AgCl (modelo 827 pH Lab, Metrohm) e uma ultracentrífuga (Hitachi – Himac CR21GII) também foram utilizados no preparo das amostras. Para a quantificação de cromo em todas as etapas dos experimentos, foi utilizado o espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite, situado no Laboratório Multiusuários (C-LABMU) da UEPG.

O espectrômetro de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite da Marca Varian modelo 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 $0,3 \text{ L min}^{-1}$. Tubos de grafite do tipo pirolíticos com aquecimento longitudinal foram empregados.

Para quantificar o cromo, na faixa de mg L^{-1} , nos experimentos de determinação do coeficiente de difusão, foi utilizado o espectrômetro de absorção atômica com atomização em chama da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), pois o equipamento da UEPG estava sem operar. O equipamento de FAAS é da Marca Varian, modelo SpectraA 220, o fluxo dos gases, que compunham a chama, eram de $12,5$ e 8 L min^{-1} , para os gases acetileno e ar comprimido, respectivamente. As medidas consideraram a integração do sinal da absorbância, e o tempo de análise entre as réplicas da mesma amostra foi de 2s.

A lâmpada utilizada na determinação do cromo (por GF AAS e FAAS) foi do tipo multielementar de cátodo oco (Varian) operando a $357,9 \text{ nm}$ com uma corrente de 7 mA e largura de fenda de $0,2 \text{ nm}$.

Já as determinações dos outros elementos (Al, Co, Cu, Zn, Cd e Pb), por espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), foram realizadas em parceria com a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) com o Professor Eduardo Chaves. O equipamento ICP-MS utilizado nas determinações dos elementos, Cu, Zn, Al, Pb, Cd e Co, foi o modelo Elan 6000 (Perkin Elmer-Sciex, Thornhill, Canadá) e utilizando argônio (99,996%, White Martins, São Paulo, Brasil) como gás do plasma.

4.4. CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS DE ANÁLISE UTILIZADAS NOS EQUIPAMENTOS GF AAS, FAAS E PARÂMETROS INSTRUMENTAIS PARA AS DETERMINAÇÕES DOS METAIS POR ICP-MS

Na Tabela 1, estão mostradas as condições de análise utilizadas nas determinações de cromo por FAAS e GF AAS.

Tabela 1. Condições de atomização e faixa de trabalho utilizadas nas determinações de cromo em todas as etapas do trabalho por FAAS e GF AAS

Equipamento	Metal	Curva analítica	Chama	T Pirólise (°C)	T Atomização (°C)	I (mA)	λ (nm)
FAAS	Cr	1 – 15 (mg L ⁻¹)	Ar/Acetileno	-	-	7	357,9
GF AAS	Cr	0,1 – 15 (µg L ⁻¹)	-	1000	2600	7	357,9

Fonte: a autora.

As quantificações de Cr, por GF AAS, em todas as etapas foram realizadas através do método de calibração externa. A faixa de concentração das curvas analíticas foram de 0,1–15 µg L⁻¹ para cromo, sendo a faixa escolhida de acordo com os teores dos metais normalmente encontrados nesses chás.

O controle analítico, para a determinação de cromo, foi realizado a partir de 10 medidas do branco por GF AAS. Os brancos são as soluções compostas de todos os reagentes de cada etapa do experimento na ausência das matrizes, os chás de camomila e mate. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com a Equação 1 e 2, respectivamente.

$$LD = \frac{3,3 \times s}{S} \quad (1)$$

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

Onde “s” se refere a estimativa de desvio padrão das medidas do branco e “S” representa a inclinação da curva analítica (Templeton *et al.*, 2000).

Nas determinações por ICP-MS foram utilizados os parâmetros instrumentais apresentados na Tabela 2. Os isótopos monitorados foram selecionados de acordo com as respectivas abundâncias e potenciais interferências: ²⁷Al, ⁵⁹Co, ⁶³Cu, ⁶⁶Zn, ¹¹¹Cd e ²⁰⁸Pb.

Tabela 2. Parâmetros Instrumentais do ICP-MS.

Potência da Radiofrequência	1100 W
Resolução	0.7 amu (10% Altura de pico)
Leituras/Replicata	1
Replicatas	2
Dwell time	50 ms
Fluxo do gás do plasma	15 L min ⁻¹
Fluxo do gás auxiliary	1,2 L min ⁻¹
Fluxo do gás nebulizador	1,1 L min ⁻¹

Fonte: a autora.

As determinações (Cu, Zn, Al, Cd, Pb e Co) por ICP-MS foi realizada utilizando padrões externos na faixa de concentração entre 1 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ usando ^{103}Rh como padrão interno.

No caso da validação do método por ICP-MS neste trabalho, esta, se deu através do uso de um material de referência, utilizando uma amostra de água certificada, NIST SRM 1640^a.

4.5. AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁ-MATE E CHÁ DE CAMOMILA

As amostras dos chás comerciais de camomila e chá-mate foram adquiridas nos supermercados da cidade de Ponta Grossa, PR. Para cada tipo de chá comercial as marcas foram escolhidas e três diferentes lotes dessas de cada marca foram comprados.

A marca denominada como A para o chá de camomila e chá-mate tem a fábrica localizada Nova Candelária – RS. A marca B tem fabricação em Almirante Tamandaré – PR e a marca C em Fazenda Rio Grande – PR, respectivamente.

Para a amostragem dos chás, amostras compostas de diferentes lotes de uma mesma marca foram preparadas. Para tal, os saquinhos de cada um dos produtos comerciais, com diferentes lotes, foram abertos e misturados. Posteriormente um quarteamento foi realizado para obter a maior homogeneidade possível dessas amostras, uma vez que, apesar do processamento industrial, apresentavam tamanhos de partículas diferentes entre si.

Para realizar o quarteamento, as amostras são misturadas e colocadas em uma superfície, previamente limpa, e divididas em quatro porções iguais. Duas dessas porções são rejeitadas e duas são misturadas e divididas sucessivamente, até chegar ao tamanho ideal da amostra como mostra a Figura 11 (Cecchi, 2003).

Figura 11. Amostras do chá-mate comercial (A) e amostras do chá de camomila comercial (B) após quarteamento.



(A)

(B)

Fonte: a autora

4.6. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS DOS CHÁS DE CAMOMILA E MATE

O teor de umidade das amostras de chás comerciais foi determinado com o objetivo de verificar as características de cada amostra e para expressar todas as concentrações dos íons metálicos em função da massa seca da amostra. Para a determinação do teor de umidade das amostras foram pesadas as massas das médias dos saquinhos obtidos em uma caixa do chá. Portanto, foram utilizados nas medidas 1,13 g de chá de camomila e 1,70 g de chá-mate. As amostras foram mantidas em estufa à 105 °C, por 30 minutos. Após resfriamento, em dessecador, a massa da amostra foi medida em balança analítica. O processo de aquecimento foi repetindo até obter a massa constante. Por fim, realizou-se o cálculo de umidade de acordo com a Equação 3 (AOAC, 2005).

$$\text{Teor de umidade (\%)} = \frac{\text{Massa de água}}{\text{Massa total de chá}} \cdot 100 \quad (3)$$

4.7. DETERMINAÇÃO DOS TEORES TOTAIS DE ESPÉCIES METÁLICAS NAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁ DE CAMOMILA E CHÁ-MATE

Para a determinação dos teores totais nas amostras comerciais de chá de camomila e chá mate, dois métodos de preparo de amostra foram comparados: um por via seca e outro por via úmida. Nesse ensaio, foi utilizado o cromo como elemento de referência.

Para o preparo via seca, 0,500 g de amostra comercial de chá, foram pesadas em um cadinho de porcelana e este foi transferido para calcinação em mufla por 8 horas à 650°C. Após arrefecimento, as cinzas foram solubilizadas com HNO₃ (65% M/M) concentrado e a solução resultante transferida para um balão de 10 mL, tendo seu volume completado com água ultrapura, obtendo-se uma concentração final HNO₃ de 2 mol L⁻¹ (AOAC, 2012). Esses ensaios foram realizados em triplicata. As soluções foram armazenadas na geladeira em frascos de polietileno para posterior análise por GF AAS.

Para o procedimento de digestão via úmida, pesou-se cerca de 0,100 gramas da amostra comercial de chá. A massa pesada foi transferida para tubos plásticos de fundo cônico e foi adicionada 3,0 mL de HNO₃ 65% m/m 0,75 mL de H₂O₂ (30% v/v). O recipiente foi vedado e deixado em banho-maria, em ebulição, por aproximadamente uma hora, dentro da capela. Posteriormente, o frasco foi aberto e a amostra digerida foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com água ultrapura (Schmite *et. al.*, 2019). Por fim, foram armazenadas em geladeira até o momento da análise.

4.8. PREPARO DAS INFUSÕES A QUENTE DE CAMOMILA E MATE UTILIZANDO OS CHÁS COMERCIAIS

A infusão a quente, normalmente, é a mais utilizada no preparo dos chás, pela população. Para preparar essas infusões, foram usadas as massas médias obtidas na pesagem de cada saquinho de chá presente na caixa, embalagem comercial que contém as amostras dos chás. As infusões foram preparadas com 1,13 g de chá de camomila e 1,70 g de chá-mate. A amostra comercial utilizada foi a amostra composta, quarteada e previamente seca. A cada massa de amostra foi mantida em contato com 100 mL de água ultrapura em ebulição, aproximadamente 97°C, durante 5 minutos. Posteriormente, a infusão obtida foi filtrada com papel de filtro e armazenadas em geladeira até determinação dos metais.

Outro estudo com diferentes massas de chás e mesmo volume de água (100mL) foram realizados. Para a escolha das massas foi levado em consideração as massas médias de cada espécie de chá (1,70 g para o chá-mate e 1,13 g para o chá de camomila) escolhendo então massas menores que a massa média e maiores

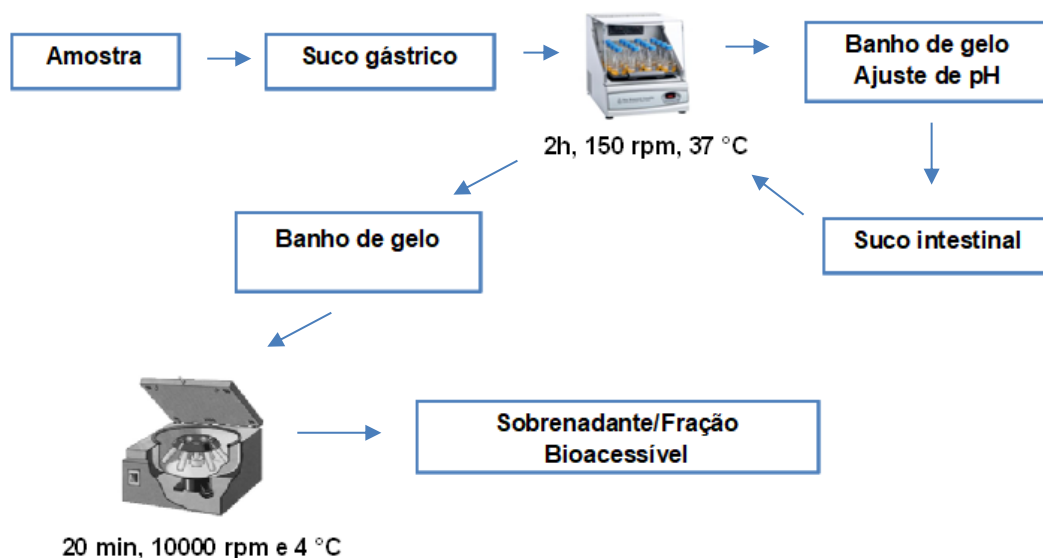
que a massa média. Para o chá-mate as massas escolhidas foram 2,0 g e 4,0 g e para o chá de camomila 0,500 g e 1,0 g.

4.9. MÉTODOS ANALÍTICOS (PBET E UBM) UTILIZADOS NA DETERMINAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE *IN VITRO* DE CR, CU, ZN, AL, CD, PB E CO EM CHÁ-MATE E CHÁ DE CAMOMILA E NAS INFUSÕES PREPARADAS COM ESTES CHÁS

Os métodos de bioacessibilidade foram aplicados diretamente nas amostras comerciais dos chás de camomila e mate e nas infusões a quente preparadas com estes chás.

Para o método PBET (Schmite, et al., 2019) o procedimento está esquematizado na Figura 12.

Figura 12. Esquema geral de realização do método de bioacessibilidade utilizando o método PBET.



Fonte: adaptado de Stelmach et al. 2014.

Nesse ensaio foi utilizado 0,100g das amostras comerciais dos chás de camomila ou mate, na aplicação direta do método PBET. Enquanto na aplicação do método PBET nas infusões utilizou-se 20 mL de infusão a quente (camomila/mate). As amostras, então, foram colocadas em tubo de polipropileno de 50 mL com 2,5 mL de suco gástrico (0,2 g L⁻¹ de pepsina dissolvida em HCl 0,1 mol L⁻¹). As soluções resultantes foram levadas para incubação a 37 °C em shaker, com agitação à 150 rpm, por 2 horas. Após esse período, as soluções foram retiradas da incubação,

colocadas em banho de gelo e o pH neutralizado com NaHCO_3 $1,5 \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente, 2,5 mL de suco intestinal ($0,15 \text{ g L}^{-1}$ de pancreatina, $1,5 \text{ g L}^{-1}$ de sais de biles e $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaHCO_3) foram adicionados a estas soluções que foram levadas novamente a incubação à 37°C , 150 rpm, por 2 horas. Por fim, as soluções foram retiradas da incubação e colocadas em banho de gelo, a fim de parar a atividade enzimática. Para análise da fração bioacessível, as soluções foram centrifugadas por 20 min, 10000 rpm a 4°C , sendo o sobrenadante utilizado para determinação dos metais de interesse.

O método UBM é simulado de forma a se aproximar das condições fisiológicas do organismo humano, ou seja, da composição química dos fluidos digestivos, pH e períodos de residência típico em cada etapa do processo de digestão.

Assim, os fluidos digestivos, compostos por soluções de saliva, gástrica, duodenal e biliar, utilizados para a avaliação da bioacessibilidade foram preparados conforme descritos na Tabela 3, e de acordo com procedimento adaptado do BARGE (Wragg *et. al.*, 2011). Os fluídos gástricos e intestinais simulados foram preparados um dia antes de realizar os ensaios de bioacessibilidade, de forma a garantir a dissolução de todos os reagentes utilizados. O pH das soluções foram ajustados, quando necessário, com soluções de NaOH ou HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Antes de iniciar os ensaios, os fluídos digestivos foram aquecidos a 37°C em shaker.

Tabela 3. Substâncias e suas concentrações para preparar 500 mL dos fluídos digestivos utilizados nos ensaios de bioacessibilidade

Fluído Salivar		Fluído Gástrico		Fluído Duodenal		Fluído Biliar	
Reagente	mol L^{-1}	Reagente	mol L^{-1}	Reagente	mol L^{-1}	Reagente	mol L^{-1}
KCl	6,11	KCl	5,53	KCl	3,8	KCl	2,5
NaH_2PO_4	3,71	NaH_2PO_4	1,11	NaCl	60	NaCl	45
KSCN	1,03	NaCl	23,5	NaHCO_3	33	NaHCO_3	34
Na_2SO_4	2,01	CaCl_2	3,33	KH_2PO_4	0,3	CaCl_2	1,8
NaCl	2,55	NH_4Cl	2,86	MgCl_2	0,3		
				CaCl_2	1,7		
Reagente	g L^{-1}	Reagente	g L^{-1}	Reagente	g L^{-1}	Reagente	g L^{-1}
Ureia	0,1	Mucina	1500	Ureia	50	Albumina	900
Amilase	0,0725	Albumina	500	Albumina	500	Bile	3000
Mucina	0,025	Pepsina	500	Pancreatina	1500	Ureia	125
Ácido úrico	0,0075			Lipase	250		

Fonte: a autora.

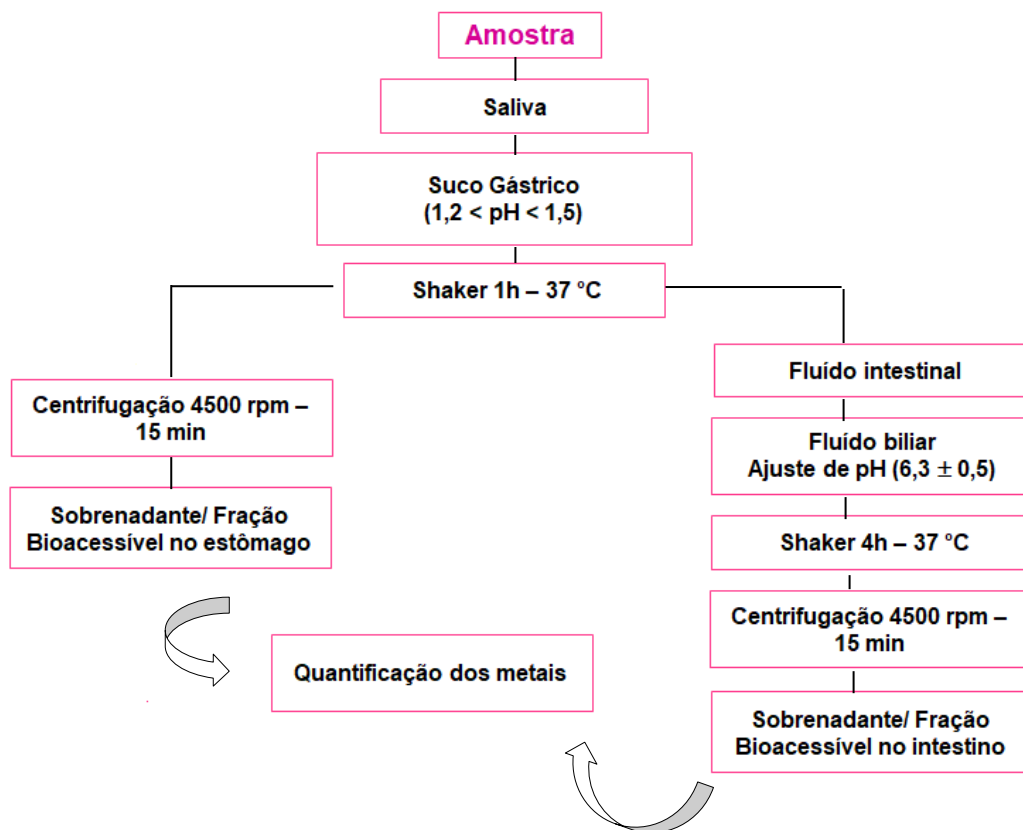
O procedimento do método UBM, consistiu em utilizar 0,100 g das amostras dos chás e 20 mL de cada infusão para aplicação do método UBM nas infusões. As amostras (sólida/líquida) foram colocadas em um tubo falcon de 50 mL, sendo

adicionado a ela 2,3 mL de fluido salivar seguido de agitação manual por 10 segundos. Em seguida, 3,3 mL de fluido gástrico foram adicionados a cada amostra e o pH ajustado para $1,2 \pm 0,05$. Os tubos foram levados para incubação em shaker a 37° C, 150 rpm por 1 h. Após retirar da incubação o pH de cada solução foi medido e os extratos gástricos foram centrifugados a 4500 rpm por 15 min.

Na etapa da digestão intestinal, na solução resultante da etapa gástrica foi adicionado 6,8 mL de fluido duodenal e 2,3 mL de fluido biliar. Os tubos foram agitados manualmente por alguns minutos e o pH da solução resultante foi verificado e, se necessário, ajustado para $6,3 \pm 0,5$ com hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} . A mistura foi novamente incubada em shaker a 37, 150 rpm 4 h. No final do processo de bioacessibilidade que ocorre na fase intestinal o pH foi verificado se estava entre 6,2 e 6,4 e então as soluções foram centrifugadas por 15 min a 4500 rpm. Por fim, uma alíquota de 0,5 mL de sobrenadante foi acidificada com ácido nítrico e armazenada até análise. Estes ensaios foram realizados em triplicata, e ainda, para cada etapa do procedimento foram realizados brancos. Os brancos consistem em realizar os mesmos procedimentos, etapas e reagentes utilizados nos desenvolvimentos dos métodos, no entanto, na ausência das matrizes. A Figura 13, mostra um esquema representativo do método UBM.

Nesses estudos, foi avaliada a influência da etapa gástrica na bioacessibilidade do cromo, nos dois métodos. Por isso, uma alíquota de 0,5 mL de sobrenadante da fase gástrica foi retirada e acidificada com ácido nítrico e armazenada para análise.

Figura 13. Esquema representativo dos ensaios de bioacessibilidade utilizando o método UBM.



Fonte: Adaptado da Metodologia BARGE.

Para verificar a exatidão e eficiência dos métodos de bioacessibilidade, aplicado nas amostras dos chás, um balanço de massa foi realizado. Para o balanço de massa além da determinação do cromo no sobrenadante ou fração bioacessível, foi realizada a determinação também na fase residual, ou seja, na fração que é obtida após a separação do sobrenadante. Para realizar a determinação de cromo na fração residual, foi necessário primeiramente a abertura dessa amostra. Para isso, utilizou-se o mesmo procedimento de abertura de amostra por via úmida, descrito no item 4.7 e posteriormente as quantificações de cromo foram determinadas por GF AAS.

No caso dos ensaios de bioacessibilidade aplicado nas infusões de camomila e mate, foi realizado um estudo de bioacessibilidade prévio em meio aquoso, a fim de verificar a interação entre o cromo e as enzimas presentes nos procedimentos avaliados. Esse estudo se deu só para o cromo, porque este é o elemento principal do trabalho. Assim, a exatidão dos métodos foi avaliada através de testes de recuperação em meio aquoso enriquecido com diferentes concentrações do íon cromo, $5 \mu\text{g L}^{-1}$; $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e $15 \mu\text{g L}^{-1}$.

Os resultados de recuperação para os metais em água foram obtidos considerando a Equação 4:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(CF - CI)}{CA} \cdot 100 \quad (4)$$

onde, CF = a concentração da amostra fortificada; CI = a concentração da amostra não fortificada; e CA = a concentração do analito adicionado à amostra (AOAC, 2012).

5. PREPARO DOS HIDROGEIS DE AGAROSE E DE CHELEX-100

5.1. PREPARO DO GEL DE AGAROSE

Os géis de agarose foram preparados com 1,5% (m v^{-1}). Para isso, 0,3 g de agarose foi colocada em um béquer com aproximadamente 15 mL de água ultrapura do tipo Milli-Q e aquecida em micro-ondas de 3 em 3 segundos, até completa dissolução da agarose. Logo em seguida, a mistura foi transferida para duas placas de vidro com tamanho 10,5 cm de altura e 12 cm de altura, separadas por um espaçador de plástico com espessura de 0,8mm. Os hidrogéis foram preparados na forma de filme fino após manutenção da placa em repouso e resfriamento, conforme Figura 14. Os géis foram seccionados em forma de discos com 2,0 cm de diâmetro que, em seguida, foram imersos em solução 0,1 mol L^{-1} de NaNO_3 e deixados sob refrigeração a 4 °C. Os géis apresentaram espessura média de 0,086 cm (Colaço, et al., 2012; Devillers, 2017).

Figura 14. Fotografias das etapas de preparo dos hidrogéis de agarose a serem utilizados em dispositivos DGT *homemade*. (A) solução de agarose colocada entre as placas de vidro (B) secção dos hidrogéis (C) discos dos hidrogéis de agarose.



Fonte: a autora.

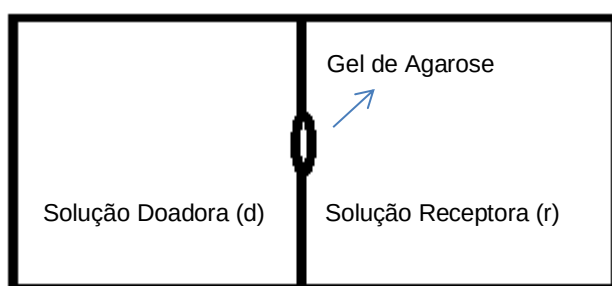
5.2. PREPARO DO GEL DE CHELEX-100®

Para o preparo deste hidrogel, foram colocados em um béquer, 0,22 g de agarose, 2,0 g de Chelex-100® e 10 mL de água pura do tipo Milli-Q. A mistura foi levada para micro-ondas e aquecida de 3 em 3 segundos até completa dissolução da mistura de agarose e Chelex-100®. Posteriormente a mistura foi prensada entre as placas de vidro, de dimensões 10,5 cm de largura x 12 cm de altura, com espaçador de plástico de 0,8mm de espessura e deixada em repouso até esfriar. Por fim, o gel foi seccionado em forma de discos média de 0,086 cm e imersos em solução de NaNO_3 até o momento do uso.

5.3. DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE DIFUSÃO DE ESPÉCIES DE CROMO NO HIDROGEL DE AGAROSE COM CÂMARA DE DIFUSÃO

A determinação do coeficiente de difusão de cromo(III) e cromo(VI) pelo hidrogel de agarose preparado foi realizada usando uma câmara de difusão. A câmara foi construída com dois compartimentos de vidro, com capacidade de 500 mL, separados por uma placa de vidro com um orifício de 3,14cm de diâmetro onde foi fixado o hidrogel de agarose, conforme Figura 15 (Colaço, et al., 2012).

Figura 15. Esquema representativo da câmara de difusão utilizada para determinação do coeficiente de difusão das espécies de cromo em solução aquosa.



Fonte: A autora

O agente difusivo (gel de agarose) foi fixado no orifício entre os dois compartimentos, ficando exposto às soluções que foram inseridas nos dois lados. Em um dos compartimentos foi colocada a solução doadora (D) e no outro a solução receptora (R). Ambas as soluções ficaram sob agitação constante. As soluções doadoras de Cr(III) e Cr(VI) foram preparadas em diferentes concentrações dessas espécies (5 e 18 mg L^{-1}), em pH 6,5 e NaNO_3 0,05 mol L^{-1} . A solução receptora

apresentava as mesmas características da solução doadora, na ausência das espécies de Cr(III) e Cr(VI).

A cada 30 minutos, alíquotas de igual volume foram retiradas de cada compartimento, durante um período de 4 h. Alíquotas da solução receptora foram preservadas em 2% (v v⁻¹) de HNO₃ para posterior análise das espécies de cromo por FAAS. A partir dos resultados obtém-se um gráfico da massa das espécies de cromo (III e VI) acumuladas no hidrogel em função do tempo de exposição no gel.

Conhecida a temperatura da solução, a massa dos íons que passa pelo agente difusivo, a espessura, área de exposição dos agentes difusivos e, considerando que a concentração dos íons na solução de trabalho é constante, pode-se determinar o coeficiente de difusão (D) segundo a Equação 5.

$$D = \frac{(a\Delta g)}{(C_a S)} \quad (5)$$

Onde: *D* é o coeficiente de difusão (cm² s⁻¹); *a* é coeficiente angular da reta definida pela relação massa do íon no compartimento receptor (*r*) por unidade de tempo (ng s⁻¹); Δg é a espessura do agente difusivo (cm); *C_a* é a concentração do compartimento íon no doador (*d*) (mg L⁻¹) (*S* é a área do orifício da câmara (cm²) (Colaço, et al., 2012).

5.4. DETERMINAÇÃO DO FATOR DE ELUIÇÃO DO CROMO DO HIDROGEL DE AGAROSE E CHELEX-100®

Para verificar a eficiência dos hidrogéis de Chelex-100® produzidos foram realizados ensaios para verificar a retenção de Cr(III) e Cr(VI) pela fase ligante e ainda o fator de eluição (*fe*) com base no que foi retido.

Desta forma, foram preparadas soluções individuais de Cr(III) e Cr(VI) com 10 µg L⁻¹ e NaNO₃ 0,01 mol L⁻¹. Essas soluções tiveram o pH ajustado com NaOH ou HNO₃ 0,01 mol L⁻¹, até permanecerem entre 6,5 e 7,5. Uma alíquota dessa solução foi retirada para determinar a concentração inicial efetiva por GF AAS.

Nos ensaios de retenção, 10 mL da solução contendo o metal foram colocados em um tubo de centrífuga com 1 hidrogel de Chelex-100. Os hidrogéis foram deixados totalmente imersos na solução sob agitação por 24 h no shaker a 150 rpm e temperatura de 23 °C. Após finalizado este tempo o hidrogel foi retirado da solução e colocado em outro tubo de centrífuga. O volume da solução resultante foi

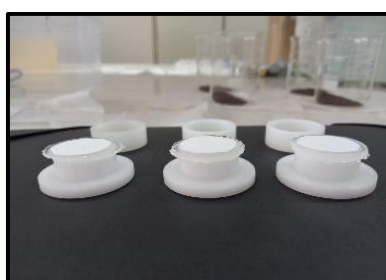
anotado. Posteriormente uma alíquota dessa solução foi retirada para medir a concentração de íon metálico não retido por GF AAS. Já a quantidade de espécie metálica retida no hidrogel de chelex-100 foi determinada diminuindo a concentração de cromo na solução inicial da concentração obtida na solução após imersão do hidrogel que não foi retida pela fase ligante.

Nos ensaios de eluição, o hidrogel, retirado da primeira etapa, foi colocado imerso em $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 e deixado em agitação por 24h. As soluções resultantes foram submetidas a análise por GF AAS. O fator de eluição foi calculado dividindo-se a massa eluída dos discos de Chelex-100[®] pela massa retida nesses discos.

5.5. PREPARO DOS DISPOSITIVOS DGT *HOMEMADE*

A montagem dos dispositivos DGT se deu, adicionando o disco de hidrogel com a fase ligante, chelex-100, sobre a base do dispositivo. Posteriormente, colocou-se hidrogel de agarose, fase difusiva, e o disco de nitrato de celulose. Por fim, adicionou-se a tampa, contendo uma área de exposição de $3,14\text{cm}^2$, local onde ocorrerá o contato do sistema DGT com a amostra, como mostra a Figura 16.

Figura 16: Montagem dos dispositivos DGT adicionando sobre a base os discos de chelex-100, hidrogel de agarose e membrana de nitrato de celulose, respectivamente (A) e ele pronto com a tampa para ser imerso nas amostras(B).



(A)



(B)

Fonte: a autora.

5.6. ESTUDO DE RECUPERAÇÃO DAS ESPÉCIES DE Cr(III) COM OS DISPOSITIVOS DGT *HOMEMADE*

Os ensaios de adição e recuperação das espécies de Cr(III) para verificar a exatidão dos dispositivos *homemade* produzidos foi conduzido em uma solução teste com o íon metálico Cr(III) na concentração de $3 \mu\text{g L}^{-1}$, pH $5,6 \pm 0,5$ e força iônica $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de NaNO_3 a 23°C . Este experimento foi realizado em triplicata com a imersão de três dispositivos modificados em três soluções separadas com 250 mL de solução teste sob agitação. Os dispositivos foram retirados da solução após 24 h de exposição. Os discos foram removidos dos dispositivos e eluidos com 3,5 mL de 1 mol L^{-1} de ácido nítrico, por 24 h sob agitação em shaker. Após isso o Cr(III) foi determinado por GF AAS.

As massas de Cr, retidas na resina, foram calculadas a partir da Equação 6.

$$M = \frac{C_e (V_{gel} + V_{ácido})}{f_e} \quad (6)$$

onde: C_e - concentração do íon metálico eluido da resina (g cm^{-3}); V_{gel} - volume do gel chelex (cm^3); $V_{ácido}$ - volume do ácido usado na eluição (cm^3) e f_e - fator de eluição do íon metálico.

E as concentrações das espécies lábeis ($C^{lável}$) na solução determinadas com DGT foram calculadas pela Equação 7:

$$C^{lável} = \frac{M \Delta g}{D A t} \quad (7)$$

Sendo, Δg a espessura da camada de difusão (soma do gel difusivo com a membrana de filtração - $0,094 \text{ cm}$), D - coeficiente de difusão do metal no hidrogel ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$), A - área do hidrogel exposta à solução ($3,14 \text{ cm}^2$) e t - tempo de imersão do dispositivo (s).

5.7. APLICAÇÃO DOS DISPOSITIVOS DGT APÓS ENSAIOS DE BIOACESSIBILIDADE UBM NAS AMOSTRAS DE CHÁ-MATE E EM SUAS INFUSÕES

Após os estudos realizados com o DGT modificado, os dispositivos foram aplicados nas frações bioacessíveis, das amostras do chá e das infusões, obtidas após os ensaios de bioacessibilidade realizados com o método UBM, para verificar a

quantidade de Cr(III) lábil, como mostra a Figura 17. As frações bioacessíveis são àquelas obtidas após os ensaios de bioacessibilidade (UBM) onde esta fração está disponível para ser absorvida pelo organismo.

Figura 17. Aplicação dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis deixados sob agitação magnética.



Fonte: a autora.

Foram utilizadas 150 mL das frações bioacessíveis, das amostras do chá-mate e das infusões, e nessas soluções foram imersos os dispositivos DGT. Esses ensaios foram realizados em triplicata. Também foram realizados os brancos, onde os dispositivos DGT foram aplicados nas frações bioacessíveis dos brancos. O branco se refere aos ensaios de bioacessibilidade onde todos os reagentes e todas as etapas do procedimento foram aplicados, na ausência das amostras. Desta forma, é possível fazer um controle analítico.

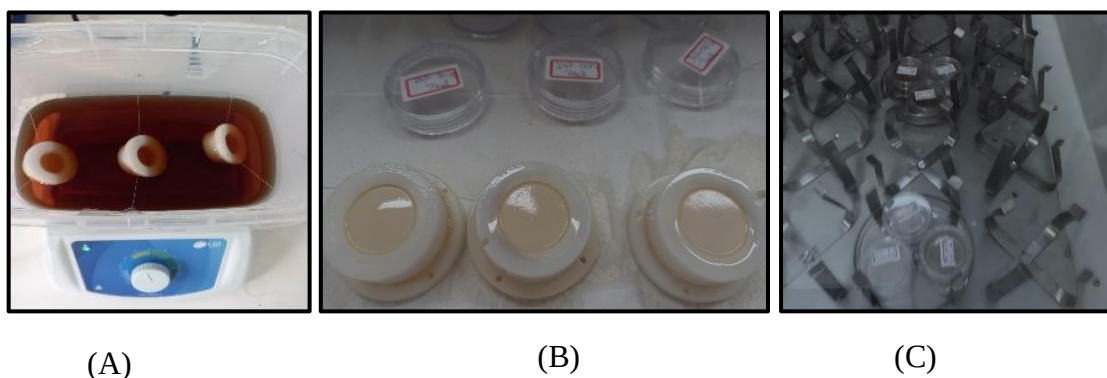
Passado o tempo de 24 h, o dispositivo foi desmontado e os géis de chelex-100 foram retirados e deixados em eluição com HNO_3 1 mol L^{-1} por 24 h sob agitação em shaker em temperatura ambiente. Posteriormente, uma alíquota foi retirada para determinação do cromo por GF AAS.

5.8. APLICAÇÃO DOS DISPOSITIVOS DGT NAS INFUSÕES PREPARADAS COM AS AMOSTRAS DE CHÁ-MATE

Para verificar a quantidade de cromo trivalente lábil presente nas infusões de chá-mate, os dispositivos DGT foram colocados diretamente nas infusões preparadas com as amostras de chá-mate. Para isso, foram preparadas 800 mL de infusões a quente de chá mate e nesta solução foram aplicados três dispositivos DGT

modificados que ficaram 24 h sob agitação magnética em temperatura ambiente. Posteriormente, os géis de ligação (chelex-100) foram retirados dos dispositivos e colocados para eluição com HNO_3 1 mol L^{-1} , por 24 h e sob agitação em shaker. Em seguida, uma alíquota foi retirada para determinação do cromo por GF AAS. A Figura 18, mostra algumas etapas desse experimento. Esse procedimento foi realizado nas três amostras de chá-mate em triplicata.

Figura 18. Aplicação dos dispositivos nas infusões de chá-mate (A), abertura dos dispositivos DGT após 24 h de imersão para retirada do gel de ligação (B) e eluição do gel de chelex-100 em HNO_3 1 mol L^{-1} .



Fonte: a autora

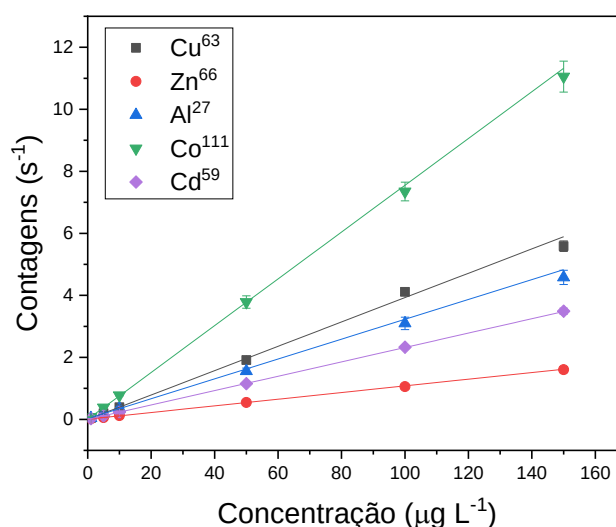
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. TÉCNICAS DE ANÁLISE UTILIZADAS NA DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES METÁLICAS

As determinações dos elementos Cu^{63} , Zn^{66} , Al^{27} , Cd^{111} , e Co^{59} , foram realizadas por ICP-MS na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelo Prof. Dr. Eduardo Sidnei Chaves. As vantagens desse tipo de análise incluem as determinações multielementares e isotópicas, rapidez, ampla faixa de concentração na calibração, alta sensibilidade e elevado nível de detectabilidade. Porém as desvantagens incluem complexidade instrumental, interferências espectroscópicas e não espectroscópicas e elevados custos do equipamento e das medidas quando comparado as técnicas de GF AAS e o FAAS (Harris, 2012).

As curvas analíticas no ICP-MS foram obtidas através de calibração externa com concentração dos analitos entre 1 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ usando ródio, ^{103}Rh como padrão interno, como mostra a Figura 19. Desta forma, o sinal analítico da resposta não é em relação somente ao analito e sim uma razão de intensidades entre o sinal do analito e o do padrão interno. A utilização do padrão interno foi necessária para minimizar a influência da matriz no sinal analítico e alterações da introdução da amostra no plasma e compensar os desvios referentes à presença de elementos facilmente ionizáveis presentes nas amostras, tais como cálcio, sódio, potássio etc., (Cuadros-Rodríguez *et al.*, 2001; Chaves, 2008). A escolha do elemento ródio, como padrão interno, se deve as suas características físico-químicas e pela sua possível ausência ou estar contido em concentrações abaixo dos limites de detecção nas amostras, ou seja, em uma concentração abaixo do que a técnica utilizada, neste caso o ICP-MS, consegue detectar (Cuadros-Rodríguez *et al.*, 2001; Chaves, 2008).

Figura 19. Curva analítica empregada na calibração do ICP-MS para determinação das espécies metálicas nas amostras de chás e em suas frações bioacessíveis.

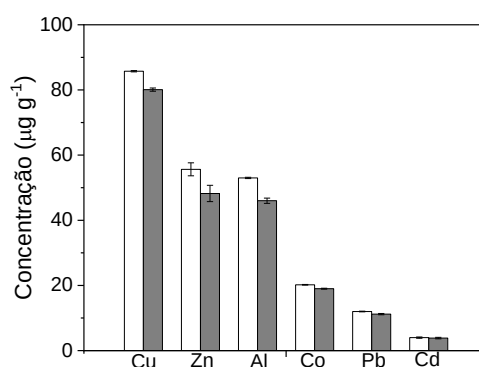


Fonte: a autora

Observando a Figura 19, pode notar que as relações entre os sinais analíticos e as concentrações foram lineares, para todos os elementos, obtendo coeficientes de determinação R^2 foram superiores a 0,99, na faixa linear de 0-100 μg L⁻¹. Além disso, pode-se notar a partir da inclinação das curvas que o elemento Zn é menos sensível a técnica quando comparado ao Co.

Para verificar a exatidão e precisão da técnica do ICP-MS utilizou-se a análise de um material de referência, uma amostra de água certificada, NIST SRM 1640^a para águas naturais. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 20.

Figura 20. Comparação das concentrações das espécies metálicas no material de referência, NIST 1640^a (barras em branco), com as determinadas por ICP-MS (barras em cinza). n=3.



Fonte: a autora.

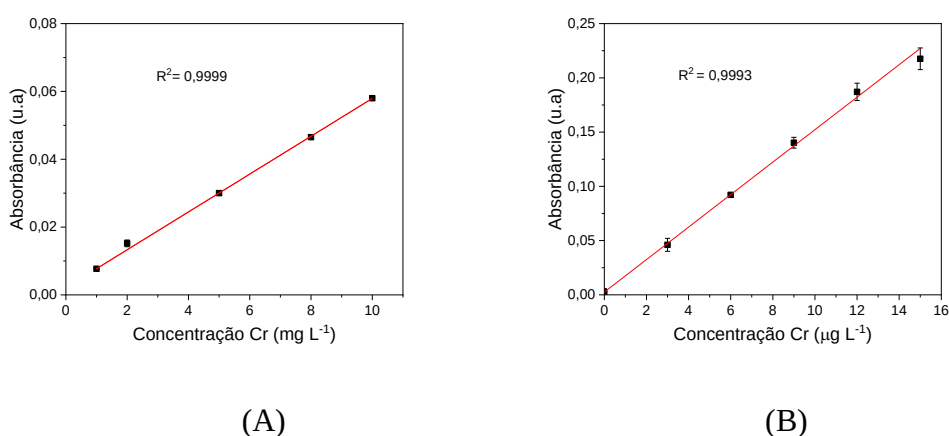
De acordo com a Figura 20, nota-se que as concentrações médias, determinadas por ICP-MS, não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) das concentrações certificadas, dentro da faixa de desvio, pois os valores de $t_{\text{calculado}}$ foram menores que 2,1, estando abaixo do t crítico (4,30). Avaliando os resultados em termos de porcentagem de recuperação, tem-se $\text{Cd}(96\%) > \text{Co}(95\%) > \text{Cu}(93\%) > \text{Pb}(92\%) > \text{Al}(87\%) > \text{Zn}(85\%)$, todas dentro do limite de recuperação sugerido pela AOAC (2012) que é de 80-120%. Desta forma, os resultados obtidos com análise do material certificado, demonstraram a confiabilidade e precisão da técnica ICP-MS na quantificação dos elementos.

Já as determinações das espécies de cromo, foram conduzidas por GFAAS e FAAS, devido a disponibilidade das técnicas, custo mais baixo se comparadas ao ICP-MS, e devido às concentrações de cromo presente nas amostras.

As quantificações de Cr, envolvendo FAAS e GF AAS, foram realizadas através de calibração externa em meio ácido, sendo este método utilizado para calibrar instrumentos e procedimentos quando não há interferência de componentes da matriz na solução do analito.

A Figura 21, mostra as curvas analíticas típicas para determinação de cromo por FAAS (A) GF AAS (B).

Figura 21. Curva analítica típica na determinação de cromo por FAAS (A) e GF AAS (B).



Fonte: a autora.

Com relação as curvas analíticas na Figura 21(A) e 21(B) pode-se notar que houve uma relação linear entre os sinais analíticos e as concentrações de cromo, apresentando coeficiente de determinação (R^2) superiores a 0,99, em ambas as

técnicas (FAAS e GFAAS), sendo adequado para as faixas de concentrações de cromo estudadas, as quais foram $0,02 - 15 \mu\text{g L}^{-1}$, no GF AAS e $0,1 - 10 \text{ mg L}^{-1}$ no FAAS (AOAC, 2002).

Para avaliar a sensibilidade das técnicas FAAS e GF AAS na quantificação do cromo, determinou-se os limites de detecção e de quantificação, obtidos a partir das equações (1 e 2). Os limites de detecção e quantificação para o cromo foram de $0,165 \mu\text{g L}^{-1}$ e $0,543 \mu\text{g L}^{-1}$ para GF AAS e de $0,1$ e $1,3 \text{ mg L}^{-1}$ para o FAAS. Esses valores são adequados, pois mostram que é possível a quantificação de baixas concentrações de Cr utilizando as técnicas de detecção por GF AAS e a FAAS.

6.2. DETERMINAÇÃO DE UMIDADE EM AMOSTRAS COMERCIAIS DOS CHÁS DE CAMOMILA E MATE

As quantificações de umidade foram realizadas em três amostras comerciais de chá-mate e em uma amostra de chá de camomila. As amostras de chá-mate das marcas A, B e C são provenientes dos estados do Paraná (A e B) e Rio Grande do Sul (C). E amostra de camomila da marca A é proveniente do Paraná. As medidas foram realizadas para amostra composta de cada uma das marcas (que incluem 3 diferentes lotes). Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Teores de umidade, expressos em porcentagem, determinados nas amostras de chá-mate e de camomila. n=3.

	Teor de umidade (%)		
	A	B	C
Chá-mate	$3,3 \pm 0,12$	$2,8 \pm 0,8$	$3,4 \pm 1,4$
Chá de camomila	$3,4 \pm 1,4$	*	*

*Para o chá de camomila utilizou-se apenas uma marca – A para os ensaios, por isso em B e C não aparecem teores de umidade.

Fonte: a autora.

Nota-se na Tabela 4 que todas as amostras analisadas apresentaram umidade menor que 5% e estão de acordo com a ANVISA, que recomenda no máximo 5% de umidade para chás comerciais (Brasil, 2022). Os dados de umidade são importantes, pois os cálculos de concentração realizados em todas as etapas são fornecidos em termos da massa da amostra seca.

6.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO TOTAL DE CROMO EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁS POR GF AAS

Inicialmente, foi avaliado o método de determinação da concentração total de espécies metálicas em amostras comerciais de chá. Para tal, realizou-se ensaios com o cromo em amostras de chá-mate (marca A) e de chá de camomila (marca A).

O método de determinação da concentração total utilizada neste trabalho envolve o uso de técnicas espectrométricas de análise, aliada a processo de abertura de amostra sólida. A etapa de abertura das amostras, de chá-mate e chá de camomila, envolveu a comparação de dois procedimentos de pré-tratamento a fim de escolher o procedimento mais adequado de se trabalhar para determinar cromo em amostras de chás. Os procedimentos foram a via seca, (calcinação), geralmente utilizados como método de referência na quantificação de metais em diferentes matrizes alimentares (Zenebon; Pascuet; Tiglea, 2008; AOAC, 2012) e o método via úmida em frasco fechado, utilizado em estudos prévios do grupo com chá-mate (Schmite *et al.*, 2019). Os dados obtidos estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Concentrações totais de cromo determinados por GF AAS após procedimento de abertura de amostra para produto comercial de chá de camomila e de chá-mate, ambos da marca A (n = 3).

Método de preparo	Concentrações de cromo ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Chá de Camomila	Chá-Mate
Via seca	$0,69 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,04$
Via úmida	$0,54 \pm 0,07$	$0,5 \pm 0,13$

Fonte: a autora.

Observando a Tabela 5, para a amostra comercial de chá de camomila, as concentrações de cromo, determinados após o processo de abertura de amostra, variaram de $0,54 \pm 0,07$ a $0,69 \pm 0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ com média de $0,62 \pm 0,11 \mu\text{g g}^{-1}$. Para a amostra de chá-mate, as concentrações de cromo variaram entre $0,35 \pm 0,04$ e $0,5 \pm 0,13 \mu\text{g g}^{-1}$, com média de $0,425 \pm 0,11 \mu\text{g g}^{-1}$.

Com os dados da Tabela 5, pode-se comparar os resultados obtidos com os dois métodos de preparo de amostra empregando o teste *t*. Para a amostra de camomila, o valor calculado ($t_{\text{calculado}}$) foi 2,42 e o valor tabelado (t_{tabelado}) foi 4,30, considerando os graus de liberdade para este estudo, com nível de confiança de 95%. O valor calculado foi inferior ao tabelado, indicando que as concentrações determinadas de cromo pelos dois métodos de abertura de amostra não apresentam

diferenças significativas. Para a amostra de chá-mate, o valor de $t_{calculado}$ foi 1,29 e o valor tabelado foi 4,30, indicado que não existem diferenças significativas entre os procedimentos de abertura de amostra avaliados. Esses resultados demonstram que o método de abertura de amostra por via úmida pode ser utilizado e os resultados obtidos são comparáveis ao método padrão (via seca).

Na literatura alguns trabalhos fazem a determinação total deste elemento em diferentes espécies de chás. Franco *et al.* (2011), fizeram a determinação de cromo e outros elementos no chá de camomila por FAAS e utilizaram como método de tratamento das amostras o recomendado pelas AOAC, via seca. As concentrações de cromo ficaram abaixo do limite de detecção da técnica utilizada $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Neste exemplo, o autor poderia ter realizado pré-concentração das amostras para poder detectar o metal pela técnica escolhida, ou ainda, optar por uma técnica mais sensível e com limites de detecção menores.

Seenivasan *et al.* (2008) fizeram a determinação de cromo e outros elementos em mais de cem amostras de chá preto, oriundos de diferentes regiões da Índia, onde as concentrações de cromo variam de $2,5$ a $11,4 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, utilizando o procedimento de pré-tratamento via seca, concentrações superiores as determinadas neste trabalho. Parreira (2012) utilizou pré-tratamento de amostra via seca para determinação de cromo por GF AAS e vários outros metais em diferentes chás comercializados em Portugal, provenientes de agricultura tradicional e biológica. As concentrações obtidas para o cromo variaram de $0,01$ a $1,93 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ dependendo da espécie de chá analisada e do tipo de cultura utilizada no cultivo desses chás.

Como visto nos resultados da Tabela 5 e com a análise estatística, não existe diferença significativa entre os métodos de pré-tratamento de amostra dos chás de camomila e mate. Por isso, a escolha do procedimento de abertura de amostra para determinação da concentração total de espécies metálicas em amostras de chás, deve ser levada em consideração as vantagens e desvantagens de cada procedimento.

A Tabela 6 mostra as concentrações de cromo total determinadas em outras amostras comerciais de chá-mate.

Tabela 6: Concentrações totais de cromo determinados por GF AAS após procedimento de abertura de amostra por via seca para produto comercial do chá-mate (marcas A, B e C). (n = 3)

Amostras de chá-mate	Concentração total de cromo ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Marca A	$0,35 \pm 0,04^a$
Marca B	$0,124 \pm 0,01^b$
Marca C	$0,181 \pm 0,01^c$

Médias seguidas por letras diferentes (a-c), diferem estatisticamente segundo o teste *t* com 95% de confiança.

Fonte: a autora.

Na Tabela 6, pode-se observar que as concentrações de cromo no produto comercial variaram de 0,124 (marca B) a 0,352 $\mu\text{g L}^{-1}$ (marca A). Ao comparar as médias das concentrações das marcas (A, B e C) utilizando o teste *t*, tem-se que as concentrações diferem estatisticamente, pois os valores de *t* calculado foram maiores que 5,71, acima do *t* crítico (4,30), ($p < 0,05$). Vários fatores podem influenciar nessas concentrações como a localização geográfica do cultivo da planta, visto que as amostras são de regiões diferentes de cultivo, características do solo, uso de fertilizantes e pesticidas, processos de contaminações ambientais ou até mesmo na etapa de processamento industrial (Abou-Arab *et al.*, 1999; De Campos *et al.*, 2014; Saidelles *et al.*, 2010).

Com relação as legislações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA) para amostras de chás, estas não trazem teores máximos de cromo em alimentos ou bebidas e sim recomendações de ingestões diárias desse elemento de acordo com a faixa etária da população.

Apesar ser de extrema importância conhecer as concentrações totais de espécies metálicas em amostras comerciais de chás, é necessário avaliar também a forma de ingestão desse alimento. No caso de chás comerciais, a forma de preparo mais utilizado pela população brasileira é na forma de infusões. Infusões consistem em colocar a água quente sobre a planta, ou as embalagens contendo os chás processados na indústria (saquinhos), deixando em contato por alguns minutos.

6.4. DETERMINAÇÃO DE CROMO EM INFUSÕES DE CAMOMILA E MATE POR GF AAS

Após as determinações da concentração total de cromo e do teor de umidade, nas amostras comerciais de chá-mate e chá de camomila, foram preparadas infusões a quente com estes chás e em seguida realizado a determinação de cromo nessas bebidas. Os resultados obtidos da concentração de cromo, calculados em relação à massa seca dos chás, estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Concentração de cromo nas infusões a quente preparadas com as marcas (A, B e C) das amostras comerciais de chá-mate e chá de camomila. n=3

Amostras	Concentração de cromo nas infusões $\mu\text{g g}^{-1}$	
	chá-mate	chá de camomila
A	$0,14 \pm 0,01^a$	$0,11 \pm 0,03^a$
B	$0,11 \pm 0,05^a$	-
C	$0,10 \pm 0,04^a$	-

Médias seguidas por letras iguais (a), não diferem estatisticamente segundo o teste *t* com 95% de confiança.

Fonte: a autora.

Com base nos resultados expressos na Tabela 7, pode-se notar que as concentrações de cromo nas infusões de chá-mate variaram de $0,10 \pm 0,04 \mu\text{g g}^{-1}$ a $0,14 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$, sem diferença significativa na concentração entre as três amostras analisadas para $p < 0,05$, pois os valores de $t_{\text{calculados}}$ foram menores que 1,37, abaixo do *t crítico* (4,30). Para as infusões de camomila a concentração de cromo obtida para a amostra A foi de $0,11 \pm 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$. Ou seja, apesar dos chás serem obtidos de espécies de plantas diferentes a concentração é estatisticamente igual. Além disso, a marca A de ambos os chás é proveniente da mesma região, fator que pode contribuir para a similaridade entre essas concentrações.

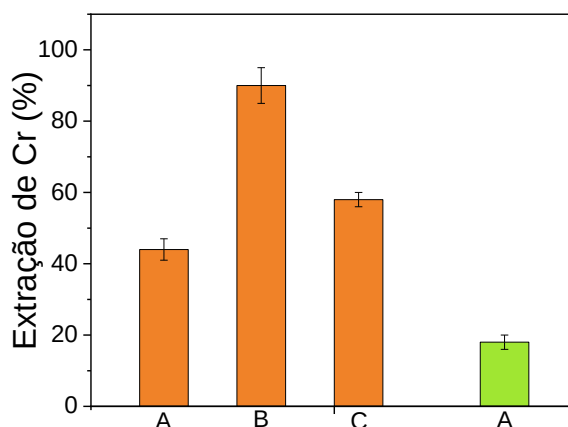
Segundo a Agência de Alimentos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration - FDA) o limite de ingestão diária de cromo é de $0,12 \mu\text{g g}^{-1}$ (FDA, 2013; CADORE, 2016). Assim, considerando as concentrações de cromo, obtidas nas infusões, as duas espécies de chás podem ser uma fonte tóxica de cromo para o organismo, visto que as concentrações desse elemento estão elevadas.

Na literatura, Wróbel *et. al.*, (2000) encontraram em infusões de chá-mate concentrações de Cr de $1,07 \mu\text{g g}^{-1}$, dez vezes maior as encontradas neste estudo.

De Andrade (2018) analisou uma série de amostras de chá-mate e as concentrações nas infusões variaram de $37,4 \pm 0,2$ a 443 ± 22 ng g⁻¹.

Considerando as concentrações de cromo total nas amostras de chá-mate e chá de camomila, obtidas após tratamento, é interessante calcular a porcentagem de extração do cromo para as bebidas. Assim, a Figura 22, apresenta as porcentagens de extração do cromo para infusões das amostras dos chás (A, B e C), em relação às concentrações totais de cromo obtidas no produto comercial.

Figura 22. Porcentagem de cromo extraído das amostras comerciais de chá-mate (barras em laranja) e chá de camomila (barra verde) para as infusões preparadas com estes chás.



Fonte: a autora.

Observando a Figura 22, para as infusões de chá-mate, pode-se notar que as porcentagens de extração de cromo para as bebidas variaram de $44 \pm 2\%$ (Amostra A) a $90 \pm 5\%$, sendo a amostra B a que apresentou a maior extração de cromo do chá para a infusão. Assim, apesar da concentração na infusão ser parecida, entre as amostras, na amostra B praticamente todo cromo presente é extraído para a bebida. Isto indica diferença na matriz dessa amostra, onde o cromo pode estar complexado fracamente aos componentes e isso acaba facilitando sua liberação para a bebida que envolve água aquecida. Essa grande variabilidade na extração de cromo entre as amostras (A, B e C) pode estar relacionada com a composição química desses chás, visto que fatores como solo de plantio e etapas de processamento industrial, por exemplo, Isolabella *et al.* (2010) observaram diferenças na composição química de extratos obtidos por decocção da erva-mate durante as etapas do processo industrial, onde maior conteúdo de metilxantinas (cafeína e teobromina) foram encontrados após o processamento industrial quando comparados com folhas verdes. Souza et al.

(2015) observaram diferenças no conteúdo de polifenóis dependendo da parte da planta utilizada (planta inteira, folha e caule) onde o extrato de folhas apresentou maior quantidade. Essas mudanças na composição interferem nos ligantes presentes nessa planta que acabam formando complexos mais ou menos estáveis com o cromo, como compostos fenólicos.

Já para a infusão de camomila, apenas $18 \pm 2\%$ do cromo presente no chá desta amostra (A) é extraído para a bebida. Neste caso, a baixa extração do cromo pode ser explicada pela possível formação de complexos estáveis desse elemento com outros componentes da matriz, como os flavonoides quercetina, luteolina e apigenina presentes na camomila, formando complexos insolúveis e influenciando nessa baixa extração.

6.5. DETERMINAÇÃO DE METAIS EM INFUSÕES A QUENTE PREPARADAS COM AS AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁ-MATE E CHÁ DE CAMOMILA POR ICP-MS

Além dos resultados obtidos para o cromo, foram determinados por ICP-MS outras espécies metálicas presentes nas infusões dos chás em estudo, sendo esse estudo aplicado na marca A. Os resultados obtidos das concentrações das espécies metálicas nas infusões dos chás de camomila e mate estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Concentrações de espécies metálicas nas infusões de chá de camomila e chá-mate determinados por ICP-MS.

Tipo de chá	Concentrações em infusões em $\mu\text{g g}^{-1}$					
	Co	Cu	Zn	Al	Cd	Pb
Camomila	0,08 $\pm$ 0,02	3,85 $\pm$ 0,03	11,4 $\pm$ 0,12	9,3 $\pm$ 0,4	0,06 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,15
Chá-Mate	0,24 $\pm$ 0,01	1,63 $\pm$ 0,02	20,5 $\pm$ 0,4	33 $\pm$ 5	0,09 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,01

Fonte: a autora

Com os dados obtidos na Tabela 8, para as infusões de chá-mate, a ordem de concentração das espécies foi $\text{Al} > \text{Zn} > \text{Cu} > \text{Co} > \text{Pb} > \text{Cd}$ e para as infusões de camomila $\text{Zn} > \text{Al} > \text{Cu} > \text{Pb} > \text{Co} > \text{Cd}$, sendo que em ambas as espécies de chás os elementos em maiores concentrações foram Al, Zn e Cu.

Pytlakowska *et. al.* (2012), analisaram ervas comerciais da Polônia e encontraram em infusões de camomila, concentrações superiores para Zn ($26,5 \pm 1,0 \mu\text{g g}^{-1}$) e na mesma faixa de concentração para Al ($10,9 \pm 0,3 \mu\text{g g}^{-1}$). Parreira e

Colaboradores (2012) determinaram a concentração de cobre em diversos tipos de chá entre eles a camomila, provenientes de agricultura tradicional e biológica de Lisboa, e o teor médio obtido foi $3,67 \mu\text{g g}^{-1}$, concentração próxima a obtida neste estudo.

Com relação ao chá-mate, assim como no chá de camomila as concentrações foram maiores para as mesmas espécies Zn, Al e Cu. No entanto, o Al foi encontrado em maior concentração no chá-mate $33 \pm 5 \mu\text{g g}^{-1}$. Uma característica esperada, visto que a erva-mate (usada para preparo do chá-mate) apresenta alta afinidade por alumínio, pois, diferente de outras plantas, ela se desenvolve melhor em solos que possuem elevados teores desse elemento, o que pode explicar os altos teores de Al na bebida em relação as infusões de camomila (Carr *et al.*, 2003; Bragança; Melnikov; Zanoni, 2011).

O alumínio é um metal que pode ser tóxico ao organismo humano (Alberti *et al.*, 2003) e nas infusões de chá-mate está presente em altas concentrações. Dessa forma, torna-se interessante realizar o cálculo de ingestão diária desse elemento a fim de comparar aos limites de ingestão aceitáveis segundo a JECFA (FAO/WHO) - Joint Food and Agricultural Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives. Assim, considerando 1,70 g de chá-mate, presente em um sachê, tem-se 56 μg de Al. Uma pessoa de 70 kg que ingere diariamente uma xícara de chá-mate consome então $0,8 \mu\text{g}$ de Al kg^{-1} por peso corpóreo e semanalmente $5,6 \mu\text{g}$ de Al kg^{-1} por peso corpóreo. O limite aceitável pela JECFA (FAO/WHO) é uma dose semanal de 2 mg kg^{-1} por peso corpóreo ($2000 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Apesar de abaixo dos limites recomendáveis pela JECFA (FAO/WHO) o chá-mate é uma fonte significativa de alumínio para o organismo humano um fator preocupante, visto que ele é considerado um agente neurotóxico relacionado a doenças como Alzheimer (Molloy *et al.*, 2007; Da Costa *et al.*, 2009; Mirza *et al.*, 2017). No entanto, ainda não são conhecidos os mecanismos envolvidos na toxicidade do alumínio (Bondy; Campbell, 2017).

Já elementos, como Co, Zn e Cu são essenciais aos seres humanos, pois participam de atividades biológicas de extrema importância para o funcionamento adequado do organismo, dependendo das concentrações e formas químicas em que se encontram.

Por exemplo, o Co, em níveis traço, é componente central da vitamina B12, necessária para boa manutenção do sistema nervoso (Alves; Della Rosa, 2003). O Zn

atua na estrutura e na catálise de metaloenzimas, e, na regulação da expressão genética (Scherz; Kirchhoff, 2006). O Cu participa como cofator de diversas enzimas responsáveis pela produção de energia celular, na formação de tecidos conectivos, na síntese de melanina, além de ser um regulador do colesterol (Fiorini, 2008).

As concentrações de cada um destes elementos nas plantas vão depender de diversos fatores sejam eles naturais, composição mineral do solo de plantio, clima da região, localização geográfica, ou relacionados à ações antrópicas, como contaminação do solo, contaminação da água de irrigação, uso de fungicidas, pesticidas durante o cultivo da planta, as condições industriais de preparo do chá-mate, como a etapa de torrefação entre outros. No entanto, independente da origem, esses elementos podem chegar até os seres humanos uma vez acumulados por essas plantas (Pytlakowska *et al*, 2012).

Desse modo, a forma solúvel de um elemento químico, presente em uma bebida amplamente utilizada pela população em faixas etárias amplas e de modo diário, pode influenciar na absorção desse elemento. E, ainda, as diferentes espécies que podem estar nessa forma solúvel podem apresentar absorção distinta, causando danos ou obtendo potencial nutricional no organismo dos consumidores.

Por isso, foram estudadas as frações bioacessíveis desses elementos utilizando dois métodos de digestão gastrointestinal *in vitro*.

6.6. DETERMINAÇÃO DA BIOACESSIBILIDADE DAS ESPÉCIES CO, CU, ZN, AL, CD E PB NAS INFUSÕES PREPARAS COM AS AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁ DE CAMOMILA E CHÁ-MATE

Apesar da importância de se conhecer as concentrações das espécies metálicas presentes nas infusões, isso não revela o quanto deles, realmente estará disponível biologicamente para provocar ação benéfica ou tóxica no organismo humano. Por isso, foram avaliadas as frações bioacessíveis dessas espécies a partir de dois métodos de digestão gastrointestinal *in vitro*, o PBET e o UBM. De modo em geral, o PBET é um método mais utilizado para determinar a bioacessibilidade de espécies metálicas em amostras alimentares, porém não existe uma metodologia padrão, pois cada trabalho faz adaptações utilizando reagentes, etapas e concentrações diferenciadas. Enquanto o UBM, apesar de ter sido inicialmente desenvolvido para amostras de solo, já está sendo aplicado em amostras alimentares.

Esse método também é mais moroso, pois apresenta várias etapas e utiliza diversos reagentes e enzimas que não são utilizadas no PBET.

Assim, a partir das concentrações das espécies metálicas, obtidas nas infusões pela técnica do ICP-MS, calcula-se a fração bioacessível na forma de porcentagem em relação a concentração nas infusões. Os resultados da porcentagem bioacessível dos elementos Cu, Zn, Al, Cd e Pb obtidos nas infusões de camomila e mate obtidos pelos métodos PBET e UBM estão mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Fração bioacessível dos metais Cu Zn, Al, Cd e Pb após digestão gastrointestinal *in vitro* das infusões de camomila e de mate, ambos da marca A (n=3)

Metal	Bioacessibilidade das espécies nas infusões (%)					
	Chá-mate			Chá de Camomila		
	PBET	UBM	teste <i>t</i> (<i>p</i> < 0,05)	PBET	UBM	teste <i>t</i> (<i>p</i> < 0,05)
Cu	66 ± 15	52 ± 34	0,53	46 ± 32	12 ± 5	1,5
Zn	18 ± 3	19 ± 1,2	0,44	<LQ	112 ± 108	-
Al	12 ± 3	54 ± 17	3,4	44 ± 11	<LQ	-
Cd	17 ± 5	53 ± 6	6,5	71 ± 10,5	1 ± 1,2	9,4
Pb	19 ± 4	212 ± 25	11	67 ± 53	<LQ	-
Co	13,4 ± 1,1	11,3 ± 1,5	1,6	31 ± 5 ^a	27 ± 3 ^a	0,97

- Não foi possível realizar o teste *t*, devido as concentrações ficarem abaixo dos limites de quantificação. *t* crítico (4,19).

Fonte: a autora.

Observando os resultados obtidos na Tabela 9, para o chá-mate, pode-se notar que utilizando o método PBET a ordem de bioacessibilidade foi Cu>Pb~Zn~Cd>Al~Co. Enquanto, utilizando o método UBM a ordem foi Al~Cd~Cu>Zn>Co. Após aplicação do teste *t*, pode-se verificar que não houve diferença significativa entre as porcentagens bioacessíveis obtidas nos dois métodos avaliados para as espécies de Cu, Zn e Co, dentro de um nível de confiança de 95%. Já para Al, Cd e Pb, houve diferença significativa indicando que estas espécies podem estar interagindo com a matriz enzimática do método.

Para a bioacessibilidade das espécies metálicas nas infusões de camomila utilizando o método PBET a ordem de bioacessibilidade foi Cd>Pb>Cu>Al>Co. No caso dos ensaios utilizando o método UBM, pode-se notar elevados desvios entre as réplicas, o que já era esperado devido à complexidade da solução utilizada para os ensaios. Além disso, o transporte das amostras para outro Estado, pode ter favorecido

as mudanças nas propriedades alterando, por exemplo, a homogeneidade e formando precipitados, devido a uma armazenagem inadequada, como foi observado. Desta forma, as mudanças nas características das amostras podem ter influenciado no transporte da amostra até o plasma e com isso a determinação dos metais de forma eficiente, uma vez que fatores como taxa de aspiração da solução e a eficiência de nebulização são altamente dependentes das propriedades físicas da solução (Chaves, 2008). Nas comparações estatísticas entre os métodos avaliados, utilizando *teste t*, aplicados nas infusões de camomila, pode-se observar que não houve diferenças significativas nas porcentagens bioacessíveis para os elementos Cu e Co, ou seja, apesar do método UBM ser mais completo, isso não interferiu nos teores bioacessíveis dessas espécies.

De maneira geral, elementos como Cu são conhecidos por apresentarem alta bioacessibilidade após digestão gastrointestinal (Takalioglu, 2014), isto porque normalmente estão associados a proteínas ou espécies orgânicas de baixo peso molecular, como ácidos orgânicos na matriz alimentar. Desta forma, durante a digestão sofrem à ação de enzimas, como a pepsina e a pancreatina, formando complexos mais solúveis e de maior absorção (Pereira, 2018).

Já espécies como Zn apresentam baixa bioacessibilidade após digestão, isto porque, normalmente esses elementos estão formando complexos insolúveis com os constituintes das matrizes em estudo, como compostos fenólicos, taninos e vitaminas (Koplik, *et al*, 2002).

O processo digestivo é um ambiente bioquímico muito complexo, onde as concentrações de enzimas, utilizadas nas soluções simuladas dos sucos gástricos e intestinais são de extrema importância para compreender os estudos de bioacessibilidade desses elementos, uma vez que ao interagirem com as enzimas, os íons metálicos estão sujeitos a complexação, absorção ou precipitação (Leufray, 2012; Pelfrene; Waterlot; Douay, 2011).

Os estudos de bioacessibilidade para os diferentes elementos foi de extrema importância, porém o foco deste trabalho é o elemento cromo. Desta forma, um estudo mais detalhado e completo para este elemento foi realizado.

6.7. BIOACESSIBILIDADE DO CROMO NAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁS DE CAMOMILA E MATE

A bioacessibilidade empregando os métodos PBET e UBM foram aplicados nas amostras comerciais na forma sólida de chá-mate e camomila. Isto porque, os métodos inicialmente foram desenvolvidos para a amostras sólidas. Além disso, a forma que os elementos se encontram na amostra sólida e nas infusões são distintas, pois uma maior diversidade de espécies pode ser encontrada na amostra sólida. Além disso, na maioria das vezes estes chás são cultivados pela agricultura familiar, sendo toda a produção, colheita e processamento realizada de maneira simples e em contato direto dos trabalhadores com os chás. Assim, eles podem acabar ingerindo, de maneira involuntária, esse produto.

Os resultados das concentrações de cromo bioacessíveis, após os ensaios de bioacessibilidade nas amostras comerciais de chá-mate e chá de camomila, estão apresentados na Tabela 10, juntamente com as porcentagens bioacessíveis, obtidas em relação às concentrações totais de cromo nas amostras dos chás (Tabela 5).

Tabela 10. Avaliação da bioacessibilidade de Cr em amostras comerciais de chá, marca A, empregando diferentes métodos de digestão gastrointestinal *in vitro*. n=4

Amostra	Método	Conc. Cr bioacessível ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Bioacessibilidade (%)	teste t $p < 0,05^*$
Chá-mate	PBET	$0,292 \pm 0,005$	83 ± 15	6,1
	UBM	$0,16 \pm 0,03$	39 ± 9	
Chá de camomila	PBET	$0,33 \pm 0,01$	54 ± 4	6,6
	UBM	$0,26 \pm 0,01$	43 ± 2	

* t crítico (3,18) aplicado entre as concentrações bioacessíveis ($\mu\text{g g}^{-1}$) para comparação dos métodos PBET e UBM.

Fonte: a autora.

De acordo com a Tabela 10, as concentrações de Cr bioacessível no chá de mate, variaram de $0,16 \pm 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$ com o método UBM e $0,29 \pm 0,005 \mu\text{g g}^{-1}$ para o método PBET. Neste caso, porcentagem bioacessível de cromo foi o dobro com o método PBET 83%, contra 39% do UBM. Esses resultados podem estar associados a etapa de processamento do chá-mate, onde durante a etapa de torrefação do chá, são formados compostos orgânicos que podem favorecer a complexação do cromo com os reagentes e/ou enzimas utilizados no método UBM (De Campos, 2013).

Estatisticamente, também houve diferença entre os métodos aplicados, visto que o t calculado foi superior ao t crítico, $p < 0,05$.

Para o chá de camomila as concentrações de Cr bioacessível variaram de $0,26 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ com o método UBM a $0,33 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ para o método PBET. Além disso, após análise estatística com o teste t , para comparação dos resultados em porcentagem, verificou-se que houve diferença significativa entre os métodos, UBM $43 \pm 2\%$ e PBET 54 ± 4 , isto porque os valores de t calculado, mostrados na tabela 6, foram superiores ao t tabelado que é 3,18 considerando os graus de liberdade para este estudo, com nível de confiança de 95%.

De forma geral, verificou-se que para ambos os chás avaliados o maior teor bioacessível de cromo foi obtido, utilizando o método PBET. Este método quando comparado ao UBM é mais simples, pois utiliza menor quantidade de reagentes e as etapas são mais rápidas e fáceis de serem executadas o que contribui para a sua maior bioacessibilidade. No entanto, o método UBM mimetiza melhor as condições fisiológicas do organismo.

Com base no teste estatístico, teste t , pode-se afirmar que houve diferença significativa entre os métodos PBET e UBM, para ambos os chás, mate e camomila, avaliados. Isto, se deve à complexidade da composição dessas matrizes, que podem acabar interagindo com os diferentes reagentes utilizados nos métodos, ou ainda, durante o processo bioquímico alguma matriz orgânica pode estar sendo destruída, contribuindo para a liberação do cromo no caso do PBET.

Desta forma, devido à diferença significativa obtida entre os métodos na bioacessibilidade do cromo, é interessante escolher para trabalhar, em ensaios posteriores, o método padronizado UBM, tornando possível a comparação de resultados com trabalhos da literatura, fato que não pode ser feito com o PBET, pois diferentes concentrações de reagentes são utilizadas no desenvolvimento do método, não sendo possível a comparação.

Até o momento não existem, na literatura, comparações entre os métodos de bioacessibilidade PBET e UBM para amostras de chás. Desta forma, este estudo pode contribuir para futuras comparações de trabalhos com bioacessibilidade de metais em chás utilizando método UBM.

Após os ensaios de bioacessibilidade, com o intuito de verificar precisão dos métodos, pode se aplicar o balanço de massa. O Balanço de massa é obtido pela soma da concentração de cromo obtido na fração bioacessível com a concentração

de cromo na fração residual, sendo o resultado comparado a concentração de cromo total determinada na amostra.

A fração solúvel ou bioacessível é aquela utilizada para verificar o quanto do metal está disponível para ser absorvido e a fração residual é a parte que será eliminada pelo organismo.

Desta forma, foi realizada a determinação de cromo nas frações residuais (parte que seria eliminada do organismo após digestão) dos métodos, onde os resíduos foram submetidos a abertura de amostra via úmida (com HNO_3 e H_2O_2), como realizado para determinação de cromo total. Dessa forma, pode-se realizar o balanço de massa do cromo nos ensaios de bioacessibilidade, cujos dados estão mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Ensaios de precisão dos métodos de bioacessibilidade através do cálculo de balanço de massa, para as amostras comerciais dos chás, camomila e mate, para a marca A (n=3)

Amostra	Método	Concentração de Cr ($\mu\text{g g}^{-1}$)			Total	Recuperação (%)
		FR*	FBioac*	BM**		
Camomila	PBET	$0,46 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,01$	$0,79 \pm 0,09$		129 ± 9
	UBM	$0,43 \pm 0,11$	$0,26 \pm 0,01$	$0,69 \pm 0,12$	$0,61 \pm 0,07$	112 ± 17
Chá-Mate	PBET	$0,23 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,01$	$0,52 \pm 0,04$		127 ± 4
	UBM	$0,43 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,03$	$0,56 \pm 0,19$	$0,41 \pm 0,03$	137 ± 5

* FR = fração residual; FBioac = fração bioacessível. ** BM= soma das médias das FR+FBioac.
Fonte: a autora.

Na Tabela 11 nota-se que as porcentagens de recuperação de cromo, após os cálculos do balanço de massa, variaram de $112 \pm 17\%$ a $135 \pm 5 \%$ para o Cr. Em ambos os métodos e para as duas espécies de chás analisadas, essas recuperações foram superiores a 100%, que corresponde a concentração de cromo total nas matrizes de estudo. Apesar da faixa de recuperação obtida para o cromo ser superior ao recomendado pela AOAC 2012, 80 - 120%, os resultados podem ser considerados válidos, devido à grande dificuldade de se realizar o balanço de massa e obter resultados representativos como esses, visto a complexidade das matrizes. Além disso, pode ocorrer uma junção de erros desde a realização dos ensaios de bioacessibilidade até os ensaios de abertura da fração residual. Por exemplo, no momento de retirar alíquotas das amostras para determinação de cromo é muito difícil separar a parte líquida da parte sólida, podendo esta ser retirada junto, fato que pode contribuir para concentrações de cromo maiores.

Após este estudo de balanço de massa nas amostras dos chás de camomila e mate, realizou-se uma análise mais completa, onde determinou-se em cada método de digestão *in vitro* estudado a fração bioacessível de Cr em diferentes etapas do processo de digestão simulando as condições que ocorrem no estômago e duodeno.

Em cada etapa dos métodos de bioacessibilidade, uma série de reagentes, pH e diferentes enzimas foram aplicadas e desta forma, poderão indicar como a matriz e as condições do processo digestivo influenciam na fração mais trocável (bioacessível) do cromo.

Para cada fase da digestão determinou-se a concentração de cromo bioacessível e a porcentagem de bioacessibilidade foi determinada em função do teor total de cromo presente na amostra. A Tabela 12 apresenta as concentrações bioacessíveis de cromo determinados na fase gástrica, intestinal e a fração bioacessível completa (final do ensaio) obtidas após aplicação dos métodos de bioacessibilidade (PBET e UBM) nas amostras sólidas dos chás. A fase intestinal foi estimada com base na concentração da fração completa (fase do estômago e duodeno) menos a concentração obtida na fase gástrica.

Tabela 12. Concentração de Cr bioacessível determinado nas fases gástrica, intestinal e completa por PBET e UBM para amostras comerciais de chá de camomila e chá-mate, para a marca A (n=3).

Amostra	Método	Conc. Cr Bioacessível nas Fases ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
		Gástrica	Intestinal	Completa
Chá-Mate	PBET	$0,312 \pm 0,004$	-	$0,292 \pm 0,005$
	UBM	$0,26 \pm 0,02$	-	$0,16 \pm 0,03$
Chá de camomila	PBET	$0,063 \pm 0,002$	$0,27 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,01$
	UBM	$0,18 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01$	$0,27 \pm 0,01$

Fonte: a autora.

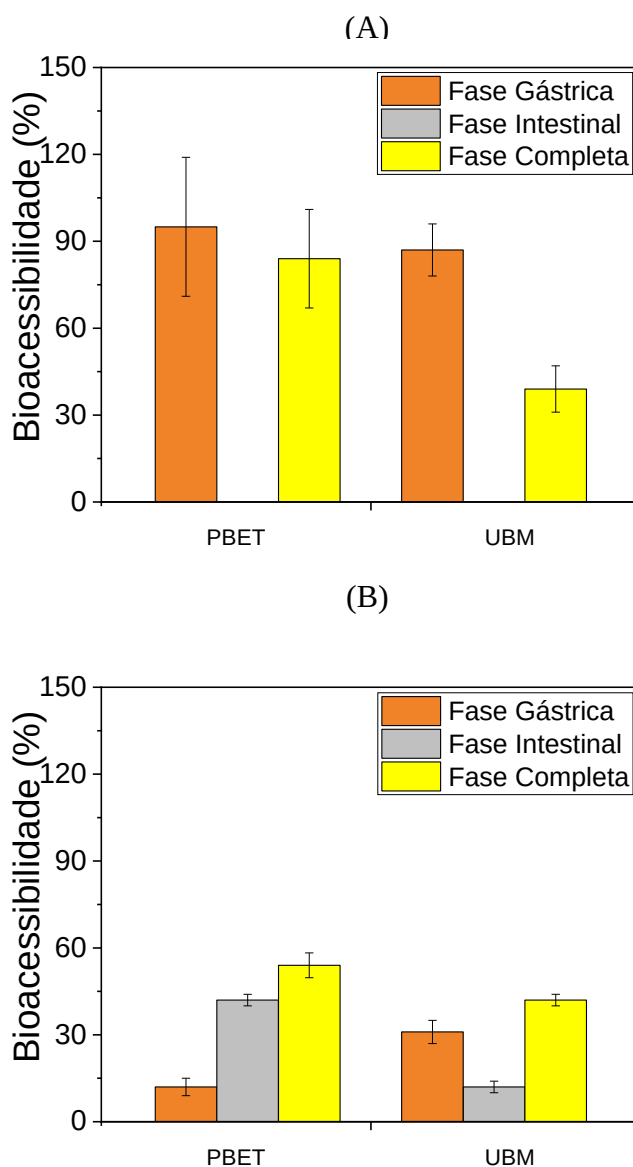
A Tabela 12 mostra que para o chá-mate, as concentrações de cromo nas fases gástricas dos métodos PBET e UBM foram $0,312 \pm 0,004 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,26 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Portanto, a bioacessibilidade do cromo é governada pela fase gástrica, em ambos os métodos, pois é esta fase que fornece 100% do cromo bioacessível, obtido após digestão completa. Esses resultados podem estar associados ao baixo pH da fase gástrica e ainda a complexação do metal com a enzima pepsina que facilita a liberação do metal no meio (Wragg et al., 2011). Já na

fase intestinal o pH neutro pode acabar favorecendo a formação de complexos entre o cromo e compostos orgânicos como os compostos fenólicos, e desta forma, diminui a bioacessibilidade do elemento na fase intestinal. Isso pode ser observado pela concentração da bioacessibilidade após digestão completa, pois está um pouco menor que a obtida na fase gástrica, mostrando a influência da fase intestinal na bioacessibilidade final (Wragg et al., 2011).

Os resultados da Tabela 12 para camomila, mostram que no método PBET as concentrações de cromo na fase gástrica foram de $0,063 \pm 0,002 \mu\text{g g}^{-1}$ e na fase intestinal $0,27 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$, ou seja, ambas as fases contribuem para a bioacessibilidade final, sendo a fase intestinal responsável por 82% da concentração de cromo bioacessível no organismo. Esses resultados mostram que o cromo é liberado da matriz alimentar dependendo das condições da extração e da forma que o metal se encontra na matriz sólida do chá. Já no método UBM, apesar de ambas as fases contribuírem para a bioacessibilidade final do cromo, é a fase gástrica a responsável por 70% cromo bioacessível. Essas diferenças na bioacessibilidade do cromo entre as fases digestivas dos chás (estômago e intestino), devem estar relacionadas a composição química dessas matrizes e suas possíveis interações com os reagentes dos métodos avaliados.

A comparação entre os métodos e a influência das fases da digestão na bioacessibilidade de Cr pode ser mais bem visualizadas em termos da porcentagem de bioacessibilidade, conforme Figura 23.

Figura 23. Avaliação da bioacessibilidade de Cr nos compartimentos do estômago e duodeno e fase completa (após estômago e duodeno) para o chá-mate (A) e para o chá de camomila (B).



Fonte: a autora

Analisando a Figura 23(A), para o chá mate, pode-se notar que a fase gástrica contribuiu majoritariamente para a fração bioacessível do cromo para os métodos aplicados. As porcentagens bioacessíveis de cromo na fase gástrica de $87 \pm 9,2$ e 95 ± 24 , para os métodos UBM e PBET, respectivamente. Já quando se avalia as porcentagens bioacessíveis no duodeno, nota-se que elas não aparecem no gráfico, Figura 23(A), pois estas interferem na bioacessibilidade do cromo, não sendo muito significativa no PBET, pois o teor bioacessível da fase gástrica é próximo ao da fase intestinal. Enquanto no método UBM essa interferência é bem notável, quase 50%.

Esses resultados podem estar associados a complexidade deste método, visto que utiliza diferentes enzimas, sais orgânicos e inorgânicos, que podem interagir com este elemento, formando complexos insolúveis que diminuem a bioacessibilidade do cromo (Leufroy *et al.*, 2012; Pelfrêne; Waterlot; Douay, 2011). Assim, após análise estatística utilizando o teste *t*, os métodos apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nas frações bioacessíveis finais para o chá mate, sendo elas $39 \pm 8\%$ para o UBM e $84 \pm 17\%$ para o PBET, mostrando que os diferentes extratores utilizados influenciam na bioacessibilidade do metal, e que apesar da diferença da porcentagem bioacessível o cromo é liberado da matriz alimentar em ambos os métodos.

Para o chá de camomila no método PBET (Figura 23(B)), pode-se verificar após teste estatístico T de Student, que houve diferença significativa ($p < 0,05$) na bioacessibilidade do Cr entre os compartimentos, estômago ($12 \pm 2,7\%$) e duodeno ($42 \pm 1,2\%$), e que a fase do duodeno aumenta a bioacessibilidade do Cr, o qual tem uma bioacessibilidade final de $54 \pm 4,3\%$. Isto porque ao comparar a fase completa, a bioacessibilidade é próxima da intestinal, indicando que a fase intestinal, governou a bioacessibilidade neste método. Já no método UBM a bioacessibilidade do metal foi maior na fase gástrica $31 \pm 4\%$, contra $12 \pm 2\%$ no duodeno, totalizando uma bioacessibilidade de $43 \pm 1,8\%$. Na literatura não foram encontrados dados de bioacessibilidade nos compartimentos digestivos para chás. No entanto, esses dados são condizentes, em geral, com os estudos de Hu *et al.*, (2013) e Wang *et al.*, (2016), que encontraram resultados semelhantes de bioacessibilidade de Cr em vegetais na fase gástrica. Ao comparar a bioacessibilidade entre os métodos (PBET e UBM) para o chá de camomila, pode-se notar que os compartimentos digestivos, estômago e duodeno, contribuem de modo diferenciado para a bioacessibilidade do cromo, notando-se uma diferença significativa entre os métodos avaliados ($p < 0,05$). Isso pode estar associado à composição dos extratores, bem como influência do pH, utilizados em cada compartimento, que acabam interferindo ou contribuindo na bioacessibilidade do Cr.

Portanto, os resultados apresentados indicam que as condições utilizadas nos ensaios de bioacessibilidade podem influenciar na resposta obtida. Como existem inúmeros procedimentos descritos na literatura não há como fazer uma comparação, pois normalmente as condições são muito distintas. Desta forma, é de extrema importância trabalhar com um método onde os resultados possam ser comparáveis e

mais bem discutidos e que mimetizem o mais próximo as condições fisiológicas do organismo, como o método UBM.

Contudo, a bioacessibilidade do cromo determinada na amostra comercial de chá pode não revelar os reais impactos ou benefícios à saúde, pois o consumo é realizado na forma de bebida. Assim, foram preparadas infusões com estes chás e foram quantificadas as concentrações nas infusões e realizados ensaios de bioacessibilidade com essas infusões.

6.8. BIOACESSIBILIDADE DO CROMO NAS INFUSÕES PREPARADAS COM AS AMOSTRAS COMERCIAIS DOS CHÁS DE CAMOMILA E MATE

Antes da aplicação dos ensaios de bioacessibilidade nas infusões, foi realizado um controle analítico, a fim de verificar a possível interação entre o cromo e as enzimas presentes nos procedimentos avaliados, sem a influência da matriz alimentar. Para isso, soluções aquosas de Cr foram preparadas e as enzimas empregadas nos ensaios de bioacessibilidade, conforme Tabela 3, foram adicionadas e todas as etapas dos ensaios de bioacessibilidade (PBET e UBM) foram realizadas. As concentrações de Cr(III) utilizadas nos ensaios foram 5, 10 e 15 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados dos testes de adição e recuperação de Cr em ensaios de bioacessibilidade de cromo em soluções aquosas empregando os métodos PBET e UBM e aplicação de teste estatístico *t*. n=3

Método	Concentração de Cr(III) $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperação (%)	<i>t</i> calculado
PBET	5,0	76 $\pm$ 2	0,215
UBM		76 $\pm$ 2	
PBET	10,0	88 $\pm$ 24	0,176
UBM		85 $\pm$ 2	
PBET	15,0	90 $\pm$ 1	0,632
UBM		89 $\pm$ 2	

* *t* crítico para $p < 0,05 = 4,30$.
Fonte: a autora.

Na Tabela 13, nota-se que para o procedimento PBET as recuperações variaram entre 76% e 90% para diferentes concentrações de cromo. Para o procedimento UBM, as recuperações de cromo estão na faixa de 76% e 89% para essas diferentes concentrações de Cr. As porcentagens de recuperação podem ser

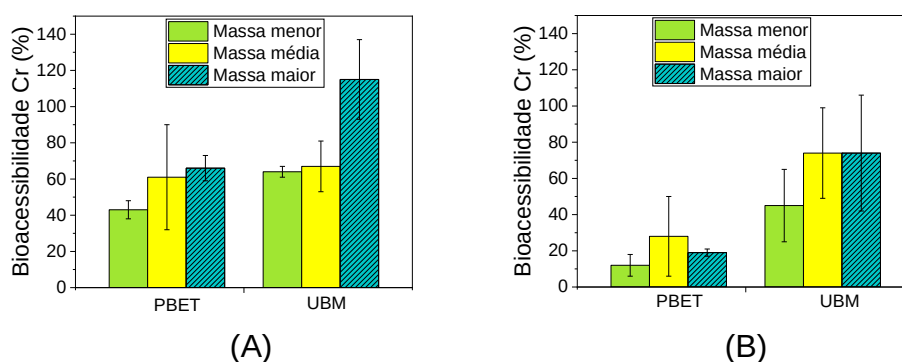
consideradas adequadas dentro dos limites aceitáveis que são 80-120% (AOAC, 2012). Portanto, as enzimas não influenciam na determinação de cromo por GF AAS.

No que diz respeito ao teste estatístico, *teste t*. Os resultados foram comparados entre os métodos para cada uma das concentrações. Na Tabela 13 nota-se que os valores *t* calculados variavam de 0,176 a 0,632 entre os métodos nas três concentrações avaliadas. O valor de *t* tabelado foi 4,30 e, portanto, os valores calculados foram inferiores, indicando que os resultados são similares estatisticamente sem diferenças significativas, em um nível de confiança de 95%. Isso indica que não existe interferência do meio enzimático na bioacessibilidade deste metal nos dois procedimentos avaliados em solução aquosa.

Como os estudos de bioacessibilidade dependem de como as infusões de chá são preparadas, foram realizados estudos variando a massa de chá comercial utilizadas no preparo das infusões à quente. Para o volume de 100 mL de solvente, foram utilizadas massas de 1,0 g (menor); 2,0 g (média) e 4,0 g (maior), para o chá-mate. E, 0,5 g (menor); 1,0 g (média) e 2,0 g (maior), para o chá de camomila; A variação dessas massas para mais ou para menos, foi com base no teor médio normalmente encontrado nos saquinhos de chá comercial.

As concentrações de cromo presentes nas infusões foram determinados por GF AAS, sem nenhum tipo de pré-tratamento e os ensaios de bioacessibilidade PBET e UBM foram conduzidos, e os teores bioacessíveis foram determinados por GF AAS. As concentrações bioacessíveis são utilizadas no cálculo da porcentagem de bioacessibilidade e os resultados estão mostrados na Figura 24.

Figura 24. Porcentagens bioacessíveis conforme método utilizado, de Cr nas infusões de chá-mate (A) e camomila (B) (Marca A) conforme variação de massa de chá utilizada para preparo das infusões. n=3.



Fonte: a autora.

Com base na Figura 24A, para as infusões de mate, pode-se notar que as porcentagens bioacessíveis de cromo variaram de $43 \pm 5\%$ a $66 \pm 7\%$ no método PBET de acordo com as massas utilizadas. Após teste estatístico t , pode-se verificar que não houve diferença significativa entre as diferentes massas utilizadas, pois os valores de $t_{\text{calculado}}$ variaram de 0,23 a 3,6, ou seja, menores que o $t_{\text{crítico}}$ que é de 4,10 ($p > 0,05$). Para o método UBM as porcentagens bioacessíveis variaram de $64 \pm 3\%$ a $115 \pm 22\%$ para o método UBM, sem diferença significativa entre as variações das massas, pois os valores de $t_{\text{calculado}}$ foram de 0,26 a 3,22, abaixo do $t_{\text{crítico}}$ (4,10). Os resultados mostram que as infusões de mate apresentaram alta bioacessibilidade de cromo, quando comparados as amostras de chá na forma sólida, após simulação da digestão, indicando que os componentes químicos presentes no chá mate estão ligados fracamente ao cromo ou de forma trocável o que facilita sua extração para a bebida e ainda sua bioacessibilidade no organismo.

Com base na Figura 24(B), para as infusões de camomila, pode-se notar que as porcentagens bioacessíveis de cromo variam de $19 \pm 2,4\%$ a $28 \pm 22\%$ para o método PBET e de $59 \pm 26\%$ a $74 \pm 32\%$ para o método UBM de acordo com as variações das massas. Para ambos os métodos não houve diferença significativa entre as variações das massas, pois todos os valores de $t_{\text{calculado}}$ foram inferiores ao $t_{\text{crítico}}$, dentro de um nível de confiança de 95%.

Além disso, para os dois métodos e para as duas matrizes, infusões de camomila e mate, as porcentagens bioacessíveis obtidas com as diferentes massas utilizadas não diferiram significativamente, dentro de um nível de confiança de 95%, ou seja, a massa de chá utilizada para preparo das infusões não influencia na fração de cromo bioacessível.

Por fim, para verificar se existe diferença entre os métodos de bioacessibilidade aplicados nas infusões, foram comparadas as porcentagens bioacessíveis obtidas com as massas dos chás de camomila e mate (menor, média e maior) e os dados estão mostrados na Tabela 14.

Tabela 14. Comparação da porcentagem bioacessível de Cr nas infusões (preparadas com as massas médias dos chás) após aplicação dos métodos PBET e UBM. n=3. Marca A.

Amostra	Massa (g)	% Bioacessível		teste <i>t</i> *
		PBET	UBM	
Camomila	0,5	22 ± 12	59 ± 26	1,82
	1,0	28 ± 22	74 ± 25	1,95
	2,0	19 ± 3	74 ± 32	2,42
Mate	1,0	43 ± 5	64 ± 3	4,85
	2,0	61 ± 29	67 ± 14	0,26
	4,0	66 ± 7	115 ± 22	3

* teste *t* – Aplicado entre os métodos (PBET e UBM) para cada massa de chá utilizada no preparo das infusões.

Fonte: a autora

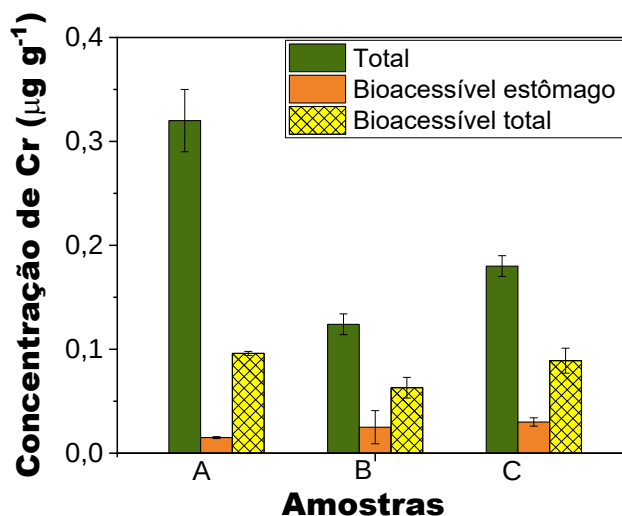
Analisando a Tabela 14, pode-se notar que de modo geral para ambas as matrizes alimentares, infusões de camomila e mate, não houve diferença significativa na porcentagem bioacessível obtida entre os métodos para todas as variações das massas estudadas, pois o $t_{\text{calculado}}$ foi inferior ao $t_{\text{crítico}}$ (4,10) ($p < 0,05$), diferente do que ocorre nos ensaios de bioacessibilidade nas amostras de chá. Assim, no caso das infusões a metodologia não influencia no teor de Cr bioacessível, podendo optar pelo uso da mais simples PBET, quando comparada ao UBM, pois apresenta custo mais baixo, menor quantidade de reagentes e etapas mais rápidas.

Assim, optou-se em prosseguir as próximas etapas do trabalho utilizando apenas o método de bioacessibilidade UBM, devido esse método mimetizar de forma mais próxima as condições fisiológicas do organismo.

Além disso, também se optou em seguir com apenas uma espécie de chá, sendo escolhido o chá-mate. Para isso, foi necessário ampliar a amostragem do chá-mate, onde três amostras (Marcas A, B e C) foram avaliadas em relação as frações bioacessíveis de cromo nos compartimentos digestivos, estômago e bioacessibilidade total (composta pela fase gástrica e intestinal).

O método UBM foi então aplicado diretamente nas amostras do chá-mate, forma sólida (Figura 25) e nas infusões preparadas com estes chás (Figura 26).

Figura 25. Concentração de cromo total, bioacessibilidade no estômago e bioacessibilidade total, nas amostras sólidas de chá-mate. n=3.



Fonte: a autora.

Observando a Figura 25, pode-se notar que para a amostra A, a concentração de cromo no estômago bioacessível é baixa quando comparada ao cromo total, indicando que cromo deve estar complexado de forma estável aos componentes da matriz nessa amostra o que dificulta a sua liberação após os ensaios de bioacessibilidade. A concentração de cromo bioacessível variou de $0,015 \pm 0,002 \mu\text{g g}^{-1}$ no estômago a $0,096 \pm 0,002 \mu\text{g g}^{-1}$ na fase total, ou seja, após digestão completa o cromo é liberado da matriz em maior concentração (30% em relação ao cromo total) e encontra-se mais bioacessível.

Para a amostras de chá-mate B e C, ambas apresentaram bioacessibilidade do cromo em torno de 50%, após bioacessibilidade total. Na amostra A as concentrações variaram de $0,0255 \pm 0,016 \mu\text{g g}^{-1}$ no estômago a $0,063 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ no duodeno, na amostra B as concentrações bioacessíveis foram de $0,025 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ no estômago e $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ no duodeno e na amostra C as concentrações variaram de $0,03 \pm 0,004 \mu\text{g g}^{-1}$ a $0,089 \pm 0,012 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente.

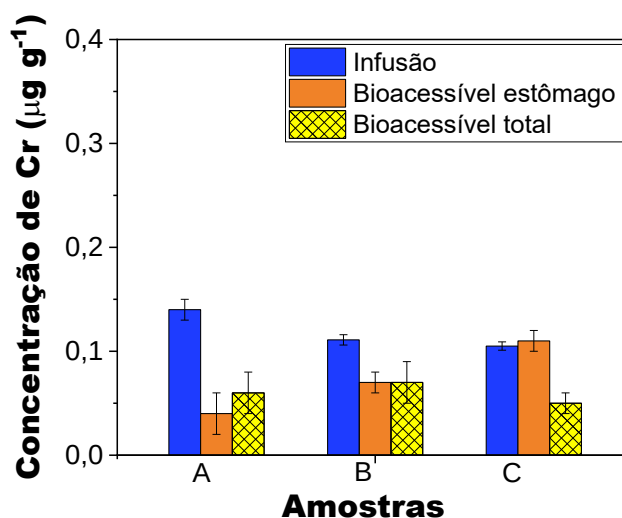
De forma geral, as três amostras de chá-mate seguiram um padrão de maior bioacessibilidade de cromo no duodeno (após digestão completa). Yu et al. (2012) relataram que ácidos orgânicos (como ácido acético, ascórbico, cítrico, láctico e málico) aumentaram a concentração bioacessível de Cr(III) na fase gastrointestinal. Como o chá-mate é rico em ácido clorogênico, este pode ser o responsável pelo aumento de cromo na fase completa.

Não há estudos na literatura que avaliam a bioacessibilidade de cromo em chás, nos compartimentos digestivos (estômago e duodeno) para possíveis comparações.

Wang *et. al.*, 2019, avaliou a bioacessibilidade do cromo, no estômago e no duodeno, em vegetais (espinafre, alface e salsa) e encontrou concentrações de cromo na fase gástrica que variaram de $0,49 \mu\text{g g}^{-1}$ a $2,7 \mu\text{g g}^{-1}$, e no duodeno de $0,29 \mu\text{g g}^{-1}$ a $1,38 \mu\text{g g}^{-1}$, ou seja, neste estudo as maiores concentrações bioacessíveis de cromo foram na fase gástrica.

Na Figura 26, estão os resultados de bioacessibilidade de cromo no estômago e total após aplicação do método UBM nas infusões preparadas com as amostras (A, B e C) de chá-mate. Neste caso, as concentrações bioacessíveis de cromo foram calculadas em relação ao cromo presente nas infusões.

Figura 26. Concentração de cromo total nas infusões preparadas com as amostras comerciais de chá-mate, cromo bioacessível no estômago e bioacessibilidade total. $n=3$.



Fonte: a autora.

Analisando a amostra A, pode-se notar que as concentrações de cromo bioacessível variaram de $0,04 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ no estômago a $0,06 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ na fase total, ou seja, as concentrações de cromo bioacessível não diferiram significativamente entre os compartimentos digestivos ($p < 0,05$), ficando em torno de 40% em relação ao cromo presente nas infusões, ou seja, a concentração de cromo liberada da matriz na fase gástrica é a mesma, após a digestão completa.

Na amostra B, as concentrações bioacessíveis de cromo no estômago e bioacessibilidade total foram iguais ($0,07 \mu\text{g g}^{-1}$), que corresponde a uma bioacessibilidade de 63% em relação ao cromo presente na infusão.

Enquanto as amostras A e B seguiram o mesmo perfil, concentrações praticamente iguais no estômago e após digestão, na amostra C isso não ocorre, pois na fase gástrica todo o cromo presente na infusão encontra-se bioacessível, no entanto, após a digestão completa apenas 50% do cromo encontra-se disponível para ser absorvido.

Enfim, os ensaios de bioacessibilidade são de extrema importância, pois fornecem resultados próximos das concentrações reais das espécies de cromo que podem ser absorvidas pelo organismo. No entanto, aliado a esses ensaios de bioacessibilidade seria muito interessante um estudo que levasse em consideração o transporte dessas espécies através das barreiras biológicas, uma vez que esse transporte é dependente da forma química que o elemento se encontra, sua especiação (Pelfrene; Waterlot; Douay, 2011).

Desta forma, neste trabalho foi proposto o uso de dispositivos DGT modificados para análise de especiação do cromo após os ensaios de bioacessibilidade. O intuito de utilizar esses dispositivos nas frações bioacessíveis é simular a membrana celular, uma vez que esses dispositivos respondem de uma maneira similar aos processos de absorção.

Assim, para tentar compreender a utilização do DGT nos estudos de bioacessibilidade, primeiramente é necessário realizar a produção desses dispositivos, devido à dificuldade na importação. Desta forma, vários estudos foram necessários para poder utilizar o DGT *homemade* e obter dados fidedignos.

6.9. PREPARO DE DISPOSITIVOS DGT COM AGAROSE E AVALIAÇÃO DE PERFORMANCE

Dispositivos de Difusão em Filmes Finos por Gradiente de Difusão (DGT) foram utilizados no trabalho para estudo da labilidade do cromo em infusões de chá comercial e na fração bioacessível obtida através dos procedimentos de digestão *in vitro* em infusões de chá comercial. Para tal, os dispositivos foram preparados de modo caseiro (*homemade*) baseado no uso agarose.

Como fase difusiva do dispositivo DGT foi utilizado hidrogel de agarose (1,5 % (m v⁻¹)), um material de natureza polimérica, hidrofílico e com porosidade. Durante a produção do gel, a agarose pode ser intumescida, aumentando seu tamanho e devido a essa característica, apresenta propriedades consideráveis para o uso como fase difusiva nos dispositivos DGT, entre as quais, a porosidade, permitindo que espécies metálicas se difundam pelo gel (Colaço *et. al.*, 2012; Chostack *et al.*, 2014). Assim, avaliou-se o coeficiente de difusão das espécies de cromo nesse tipo de hidrogel através de câmeras de difusão.

Como fase ligante do dispositivo DGT utilizou-se um hidrogel de agarose impregnado com resina Chelex-100 que apresenta a função de reter simultaneamente vários elementos. Assim, realizou-se estudos para avaliar a capacidade de retenção das espécies de cromo pela fase ligante e capacidade de eluição das espécies com o uso de soluções ácidas.

6.9.1. Característica do Hidrogel Difusivo de Agarose e Determinação do Coeficiente de Difusão de Cr(III) e Cr(VI)

Como forma de ampliar a aplicação do dispositivo DGT e ainda, diminuir a dependência do material importado do dispositivo convencional, a agarose vem sendo utilizada como fase difusiva (Chostak *et. al.*, 2015; Gao Li *et. al.*, 2019; Wang *et al.*, 2016) e como suporte da fase ligante (Chostak *et. al.*, 2015; Menegário *et al.*, 2010). Isso se deve as suas características de elevado tamanho de poro (>20 nm), baixa influência na taxa de difusão de cátions e ânions e ainda, baixo custo do material, quando comparado a acrilamida que é utilizada no gel convencional (Wang *et al.*, 2016).

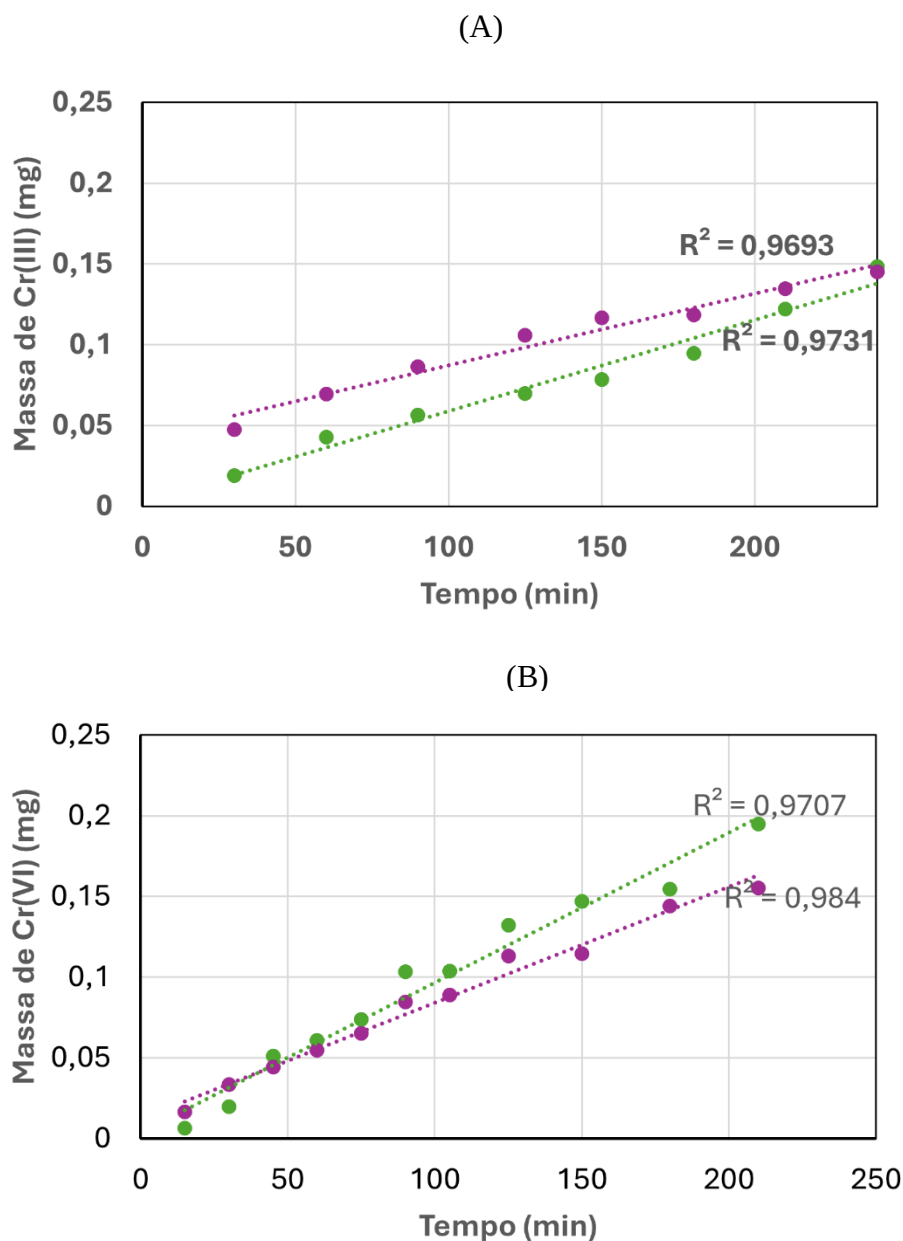
Os hidrogéis obtidos nesse estudo a partir da agarose apresentam poro aberto, pois não se utilizou agente reticulante. Conforme mostrado (Figura 13) os hidrogéis são translúcidos, visualmente sem bolhas e resistentes fisicamente para serem utilizados nos dispositivos DGT. Os hidrogéis ficaram acondicionados em solução de eletrólito de suporte, após a moldagem dos discos. A espessura média obtida, após intumescimento ficou em $0,86 \pm 0,02$ mm para 25 mm de diâmetro. Com relação ao hidrogéis dos dispositivos convencionais de DGT, (DGT Research LTDA) estes são fabricados a partir da poliacrilamida com reticulador derivado de agarose e possuem 25 mm de diâmetro e espessura de 0,8 mm. Em outros estudos a espessura

dos discos foi similar a encontrada neste trabalho, por exemplo, Colaço et al., 2012 obtiveram géis difusivos com espessura média de $1,00 \pm 0,05\text{mm}$, utilizando 1,5 % e 3,0 % de agarose. Wang *et al.*, 2016 estudaram o uso de agarose como fase difusiva em DGT para determinação de cátions e ânions e determinaram a espessura de 0,8mm para géis com 1,5 % de agarose.

Portanto, como os géis de agarose foram produzidos para serem utilizados na fase difusiva dos dispositivos DGT, foi necessário determinar o coeficiente de difusão das espécies avaliadas nesse trabalho, Cr(III) e Cr(VI), utilizando câmara de difusão.

Os ensaios com câmara de difusão foram realizados com o gel de agarose (1,5%) com espessura de 0,86 mm e de modo separado com Cr(III) e Cr(VI). As concentrações de cromo nas soluções doadoras e receptoras na câmara de difusão foram determinadas por FAAS em função do tempo do ensaio. As concentrações da fase doadora diminuía à medida que o tempo passava, até ficar em equilíbrio com a fase receptora. A partir da concentração de cromo na fase receptora foi calculado a massa das espécies de cromo que difundiu pelo hidrogel de agarose, conforme Equação 5. A Figura 27, mostra as massas de cromo que difundiram pelo hidrogel de agarose em função do tempo para duas concentrações iniciais de cada espécie de cromo.

Figura 27. Massa dos íons metálicos de Cr(III) (A) e Cr(VI) (B) que difundiram pelo gel de agarose em função do tempo, utilizando câmara de difusão. Em roxo está a curva com concentração de 5 mg L^{-1} e em verde 18 mg L^{-1} .



Fonte: a autora.

Ao observar a Figura 27 (A) e (B), nota-se para ambas as espécies de cromo (III) e (VI), houve um processo de acumulação linear da massa de cromo com o tempo, como previsto pela primeira Lei de difusão de Fick, com coeficientes de determinação (R^2) acima de 0,96. Os coeficientes angulares obtidos das curvas da Figura 25, foram usados no cálculo para determinar o coeficiente de difusão (D) para o hidrogel de agarose, de acordo com a Equação 5, nas concentrações de 5 e 18 mg L^{-1} .

Tabela 15. Parâmetros utilizados para determinar o coeficiente de difusão das espécies de Cr(III) e Cr(VI) em hidrogel difusivo de agarose (1,5%) determinado com célula de difusão, à 25°C, pH 6,5 e 50 mmol L⁻¹ de NaNO₃.

	Parâmetros	Concentração 5 mg L ⁻¹	Concentração 18 mg L ⁻¹
Cr(III)	C inicial (CA) (mg L ⁻¹)	5,67	18,6
	Coef. Angular (g/s)	7,6x10 ⁻⁹	9,4x10 ⁻⁹
	R ² curvas	0,9731	0,9693
	D (cm² s⁻¹)	3,8x10⁻⁵	1,4x10⁻⁵
Cr(VI)	C inicial (CA) (mg L ⁻¹)	5,3	18,4
	Coef. Angular (g/s)	9,3x10 ⁻⁹	1,1x10 ⁻⁸
	R ² curvas	0,9707	0,9846
	D (cm² s⁻¹)	4,5x10⁻⁵	1,5x10⁻⁵

Fonte: a autora.

Na Tabela 15, pode-se observar que os valores de coeficientes angulares, obtidos a partir das concentrações de cromo de 5 e 18 mg L⁻¹ para ambas as espécies de cromo foram bem próximos, sendo o valor médio obtido para o Cr(III) de 8,5x10⁻⁹ e para o Cr(VI) de 5,2x10⁻⁸. O valor médio do coeficiente de difusão determinado para o Cr(III) foi 2,6±1,7x10⁻⁵ cm² s⁻¹ e para o Cr(VI) foi 3,0±2,1x10⁻⁵ cm² s⁻¹. Os valores de coeficiente de difusão encontrados para ambas as espécies de cromo são maiores do que os reportados na literatura. Por exemplo, para o Cr(III), Chostak *et al.*, (2015) e Gao Li *et. al.*, 2019 determinaram o coeficiente aparente utilizando hidrogel de agarose e encontraram valores para D de 4,08x10⁻⁶ cm² s⁻¹ e 3,91x10⁻⁶ cm² s⁻¹, respectivamente. Para Cr VI, Wang *et al*, (2016) obteve um coeficiente de difusão de 7,95x10⁻⁶ cm² s⁻¹ e Gao Li *et al*, (2019) D=10,3x10⁻⁶ cm² s⁻¹, também utilizando o coeficiente aparente e hidrogel de agarose. O gel difusivo de poliacrilamida reticulado com agarose modificada, utilizado no DGT convencional, apresenta valor de D à 25 °C de 5,94 x10⁻⁶ cm² s⁻¹ para Cr(III) e 5,05 x10⁻⁶ cm² s⁻¹ para Cr(VI) (DGT Research LTDA).

Essas diferenças podem estar relacionadas ao produto comercial utilizado para produção dos hidrogéis, neste caso a agarose, pois características como tamanho dos poros e grau de hidratação do gel podem ser afetadas e desta forma, acabam interferindo na passagem das espécies pelo gel (Zhang; Davison, 1999). Além disso, fatores como composição da solução, pH, temperatura e força iônica

podem afetar a taxa de difusão dos íons metálicos, pois afetam os grupos funcionais presentes no hidrogel de agarose. Outro fator muito importante é a forma de determinação do coeficiente de difusão, pois todos os estudos citados acima utilizam a imersão dos dispositivos DGT para essa determinação, determinando o D aparente, enquanto este estudo foi realizado com a câmara de difusão, onde a medida determinada se refere apenas ao hidrogel difusivo.

Na câmara de difusão, o hidrogel está diretamente em contato com as soluções doadora e receptora do metal, facilitando a transferência de massa entre as soluções com o passar do tempo, enquanto na difusão com a utilização do DGT é preciso levar em conta a fase de ligação que pode influenciar no valor final do coeficiente de difusão.

As diferenças do coeficiente de difusão de agarose em relação ao hidrogel de poliacrilamida, que é usado no DGT convencional se deve ao tamanho dos poros, pois devido a estrutura os hidrogéis formam poros mais restritivos que os da agarose, diminuindo assim a difusão das espécies e com isso seu coeficiente de difusão (Colaço *et al.*, 2012).

Apesar das diferenças entre os coeficientes de difusão, é importante salientar que isso não irá comprometer os demais resultados, pois utilizando o valor correto para o material utilizado, hidrogel de agarose, esses valores serão utilizados no cálculo para determinar a labilidade da espécie de cromo.

6.9.2. Característica do Hidrogel Ligante de Agarose e Chelex-100 e capacidade de retenção de Cr(III) e Cr(VI)

Os hidrogéis utilizados na fase de ligação foram preparados com 3,0% de agarose impregnada com resina Chelex-100®, porcentagem um pouco maior que a utilizada no hidrogel difusivo a fim de melhorar a resistência física do disco. Os hidrogéis apresentaram-se mais opacos que o de agarose e visualmente sem bolhas de ar. Após intumescimento, a espessura dos discos foi em média de $0,86 \pm 0,02$ mm e 25 mm de diâmetro, a espessura foi o dobro da obtida no DGT convencional que é de 0,4mm para 25 mm de diâmetro. Com a espessura média maior, o volume do hidrogel *homemade* ($0,48 \text{ cm}^3$) também foi maior que o do hidrogel do DGT convencional ($0,16 \text{ cm}^3$).

Como a fase ligante foi confeccionada no laboratório, é necessário avaliar a sua performance frente a sua capacidade em reter os íons de Cr(III) e Cr(VI) e ainda a sua eficiência de extrair esses íons retidos utilizando solução ácida, este último conhecido como fator de eluição (fe).

O fator de eluição ou recuperação é usado para corrigir possíveis efeitos da eluição incompleta dos hidrogéis e muito importante para amostras nas quais a concentração de espécies é desconhecida. Assim, para determinar o fator de eluição são necessários estudos que envolvem a retenção e eluição na matriz proposta (Chostak *et. al.*, 2015).

Os hidrogéis de agarose impregnados com resina Chelex-100® foram deixados imersos em soluções individuais de Cr(III) e Cr(VI) a $10 \mu\text{g L}^{-1}$, pH 6,5. Após 24h de imersão os hidrogéis foram eluidos com HNO_3 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e a concentração de íon metálico eluido determinada por GF AAS. Uma alíquota da solução em que estava o hidrogel foi utilizada para medir a concentração de íon metálico não retido por GF AAS. Já a quantidade de espécie metálica retida no hidrogel de Chelex-100® foi determinada diminuindo a concentração de cromo na solução inicial da concentração obtida na solução após imersão do hidrogel que não foi retida pela fase ligante. O fator de eluição (fe) foi calculado dividindo-se a massa eluida dos discos de Chelex-100® pela massa retida nesses discos.

Os resultados obtidos nestes ensaios estão mostrados na Tabela 16. Para o Cr(VI) foi realizado os mesmos ensaios, visto que não se sabe como será o comportamento desta nova fase ligante frente a esta espécie.

TABELA 16. Porcentagem de retenção e eluição para as espécies de Cr(III) e Cr(VI) na fase ligante de hidrogel de agarose impregnado com resina Chelex-100® e fator de eluição dessas espécies (fe) em pH 6,5. n=3.

Espécie	Retenção (%)	Eluição (%)	Fe
Cr(III)	65 ± 5	$21 \pm 1,1$	$0,21 \pm 0,01$
Cr(VI)	$0,9 \pm 0,2$	<LQ	

<LQ menor que o limite de quantificação ($0,543 \mu\text{g L}^{-1}$).
Fonte: a autora.

Em relação ao Cr(III), observado na Tabela 16, a porcentagem média de retenção ficou em torno de 65%, ou seja, grande parte do cromo presente em solução

foi retido na resina. No entanto, nota-se que apenas 21% do analito retido na resina é eluído. Esse valor é muito baixo quando comparado ao estudo de Devillers *et. al.* (2017), que chega a uma eluição média de Cr(III) de 79% sob condições convencionais de eluição (1 mL de HNO_3 1 mol L^{-1} por 24 h) (Zhang; Davison, 1995).

No entanto, o gel utilizado para imobilização da resina Chelex-100 não foi o mesmo deste trabalho, pois, Devillers *et. al.* (2017), utiliza além da agarose, outros reagentes como acrilamida, tetrametiletenodiamina (TEMED) e persulfato de amônio, estes dois últimos utilizados para catalisar a polimerização de acrilamida na produção do gel, o que pode interferir nos sítios de ligação do gel e favorecer a etapa de eluição.

Para o Cr(VI), pode-se observar que praticamente não houve sorção na resina, como já era o esperado uma vez que esta fase ligante não é seletiva para esta espécie e a porcentagem de eluição ficou abaixo do limite de quantificação da técnica utilizada para quantificação - GFAAS. Os compostos de Cr (VI) quando em solução aquosa, pH entre 1 e 6,5, apresentam-se predominantemente nas formas aniônicas HCrO_4^- e $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (Vagheti, 2009). Neste pH os grupos funcionais iminodiacetatos presentes na resina chelex®-100 agem como grupos quelantes na ligação com espécies metálicas polivalentes catiônicas, ou seja, não tem afinidade por oxiânions tais como do Cr(VI) (Welz, 2011). Por isso, os estudos seguintes serão realizados apenas para o Cr(III).

Desta forma, o fator de eluição obtido para a fase ligante, proposta neste estudo, será utilizado posteriormente no cálculo do metal lábil utilizando a equação 7 evitando assim resultados equivocados.

6.9.3. Avaliação dos dispositivos DGT utilizando a agarose

Após a determinação do fator de eluição (f_e) e coeficiente de difusão (D) para os íons Cr(III), foram realizados experimentos de adição e recuperação das espécies de Cr(III) lábil. O ensaio foi realizado para uma solução contendo 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(III) em pH $5,6 \pm 0,5$ e força iônica 0,1 mol L^{-1} de NaNO_3 a 23 °C. O cromo retido na fase ligante foi eluído e a sua concentração foi determinada por GF AAS. Após, foi calculada a concentração determinada pelo dispositivo DGT de agarose através da Equação 9.

Os resultados de recuperação média das espécies de Cr(III) são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17. Porcentagem de recuperação de Cr(III) após aplicação dos dispositivos DGT *homemade* em solução aquosa. n=3.

Espécie	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperação (%)
	Adicionada	Determinada	
Cr (III)	$2,23 \pm 0,3$	$1,97 \pm 0,4$	88 ± 2

Fonte: a autora.

A Tabela 17 mostra que a concentração inicial, adicionada foi de $2,23 \pm 0,3$ e a concentração determinada de $1,97 \pm 0,4$. Dessa forma, pode-se notar que a recuperação da espécie de Cr(III) na solução foi de $88 \pm 2\%$. Esse valor está de acordo com o percentual de recuperação obtido com o DGT convencional que é de $100\% \pm 20$ (DGT Research, 2022).

Desta forma, a resposta foi satisfatória independente do fator de eluição e da fase difusiva utilizada.

Assim, concluídos os estudos com a técnica DGT utilizando os dispositivos modificados, os mesmos foram utilizados para determinar espécies de Cr(III) em amostras de chá-mate após os ensaios de bioacessibilidade.

O uso do dispositivo DGT em amostras alimentares é inédito, e seu uso pode trazer informações a respeito das espécies metálicas lábeis, aquelas que serão absorvidas pelo organismo causando efeitos benéficos ou tóxicos ao organismo humano. Além disso, o uso dos hidrogéis de agarose para determinação das espécies metálicas lábeis é uma alternativa viável, pois é fácil de manusear, produzir, fornece resultados confiáveis e ainda, no caso da fase difusiva, pode aumentar a aplicabilidade do dispositivo DGT, pois pode ser utilizada para determinar espécies com restrições na fase difusiva convencional (Docekalova; Divis, 2005; Chostak *et al.*, 2015).

Antes de prosseguir com a aplicação dos dispositivos DGT, foram determinadas as frações bioacessíveis do cromo nas fases gástricas e fase completa, utilizando apenas um método de bioacessibilidade e uma espécie de chá, optando-se pelo método UBM e diferentes amostras de chá-mate.

7.1. ESTUDO DA LABILIDADE DO CROMO NAS FRAÇÕES BIOACESSÍVEIS UTILIZANDO O DGT *HOMEMADE*

Os dispositivos DGT respondem de uma maneira similar aos processos de absorção que acontecem no intestino humano, devido a semelhança nos processos que ocorrem na membrana celular. Isso porque, o transporte de espécies metálicas através de membranas biológicas é altamente dependente da forma físico-química do metal, ou seja, somente os íons metálicos livres ou complexos metálicos cineticamente reversíveis (aqueles que se associam e se dissociam rapidamente) conseguem atravessar a membrana intestinal (Pelfrene; Waterlot; Douay, 2011).

Desta forma, obter informações sobre as formas químicas (especiação) dos metais nos fluidos gastrointestinais poderiam ajudar a entender a disponibilidade e a absorção dessas espécies no epitélio intestinal.

Com isso, o uso destes dispositivos foi proposto em estudos de bioacessibilidade para simular a etapa de absorção no intestino, após processo de digestão.

Desta forma, após avaliar o desempenho dos dispositivos DGT, propostos nesse estudo, realizou-se medidas da labilidade do Cr(III), pois a chelex-100 fase ligante é seletiva somente a esta espécie, nas frações bioacessíveis de chá-mate e nas frações bioacessíveis das infusões preparadas com o chá-mate.

Para isso, os dispositivos DGT foram implantados nos fluidos gastrointestinais (pH $6,5 \pm 0,5$) após o teste UBM ter sido realizado nas três marcas de chá-mate e nas infusões preparadas com o chá-mate.

Este estudo, aplicação dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis, em amostras comerciais de chá-mate e em suas infusões, é inédito até o momento e os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 18.

Tabela 18. Concentração de Cr(III) lábil após aplicação dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis obtidas com os ensaios de bioacessibilidade UBM nas diferentes marcas de chá-mate e em suas infusões. n=3.

Marcas do chá-mate	Concentração de Cr(III) lábil ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	Fração bioacessível do chá	Fração bioacessível das infusões
A	$0,06 \pm 0,01$	$0,058 \pm 0,014$
B	$0,063 \pm 0,01$	<LQ
C	$0,079 \pm 0,002$	<LQ

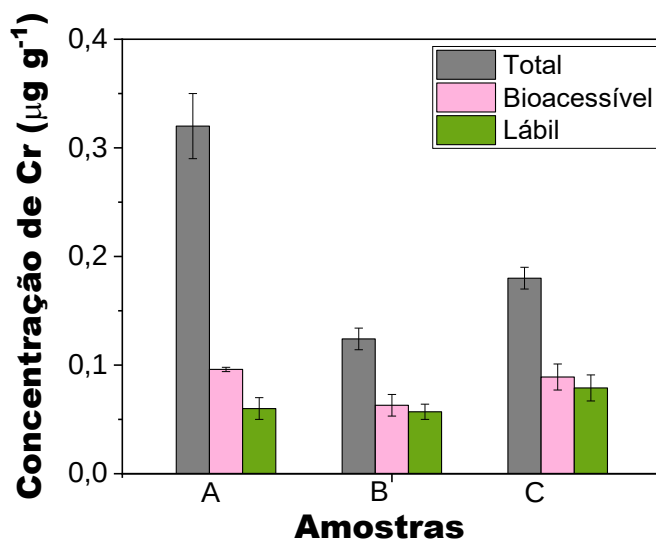
<LQ menor que o limite de quantificação ($0,543 \mu\text{g L}^{-1}$)

Fonte: a autora.

Observando a Tabela 18, pode-se notar que as concentrações lábeis de Cr(III) nas frações bioacessíveis do chá-mate variaram de $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ (Marca A) a $0,079 \pm 0,002 \mu\text{g g}^{-1}$ (Marca C). Independente das concentrações de cromo presente na fração bioacessível, a fração lábil desta espécie (Cr(III)) é estatisticamente a mesma para todas as marcas, pois ao aplicar *teste t* verificou-se que os valores de $t_{\text{calculados}}$ foram menores que 1,20, abaixo do $t_{\text{crítico}}$ (4,30) dentro de um nível de confiança de 95%. Já nas frações bioacessíveis das infusões apenas na marca A foi quantificado Cr(III) lábil, cuja concentração foi de $0,058 \pm 0,014 \mu\text{g g}^{-1}$. De modo geral, isso pode indicar que independente da fração bioacessível, chá ou infusão, a quantidade de cromo lábil trivalente no chá-mate será a mesma.

Para entender melhor as concentrações de cromo lábil trivalente, foi realizado um estudo comparativo desde a concentração de cromo total determinada no chá, até a fração lábil de Cr(III) obtida após aplicação dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis. Os resultados estão mostrados nas Figuras 28 e 29.

Figura 28. Concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ de cromo total, bioacessível e fração lábil de Cr(III) após aplicação dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis das três marcas de chá-mate.



Fonte: A autora.

Analisando a Figura 28, amostra A, pode-se notar que a concentração de cromo bioacessível foi de $0,095 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ e a concentração de cromo(III) lábil (íons livres hidratados e complexos orgânicos e inorgânicos cineticamente reversíveis) é de $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$. Ou seja, grande parte do cromo bioacessível (60%) está na forma lábil, capaz de penetrar a membrana plasmática e vir a trazer efeitos no organismo

humano. Enquanto, o restante do cromo bioacessível (40%), pode estar na forma de complexos que se dissociam lentamente, ou seja, inertes (Pelfrene; Waterlot; Douay, 2011).

Para a amostra B, a concentração bioacessível de cromo é de $0,063 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ e a concentração lábil de cromo(III) é de $0,057 \pm 0,007 \mu\text{g g}^{-1}$. Neste caso, 100% do cromo bioacessível está na forma de cromo(III), seja como íons livres, ou formando complexos cineticamente reversíveis.

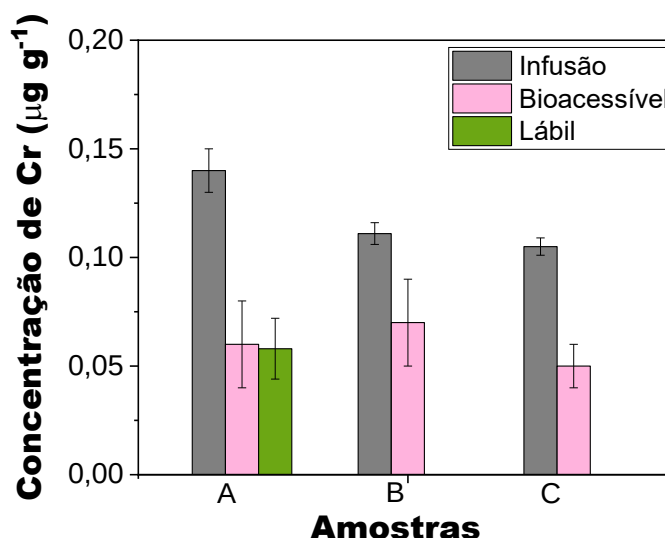
Na amostra C, acontece o mesmo que na amostra B, praticamente todo o cromo bioacessível ($0,089 \pm 0,012 \mu\text{g g}^{-1}$) está na forma de cromo(III) lábil ($0,079 \pm 0,002 \mu\text{g g}^{-1}$).

De forma geral, para as amostras de chá-mate, após os ensaios de bioacessibilidade grande parte da concentração de cromo bioacessível está na forma trivalente, íons livres ou formando complexos cineticamente reversíveis, ou seja, forma química facilmente absorvida pelo organismo e capaz de trazer efeitos benéficos.

Os resultados com o uso dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis do chá-mate mostraram-se promissores e muito interessantes, pois enquanto a bioacessibilidade forneceu uma medida da solubilidade do cromo no trato gastrointestinal os dispositivos DGT forneceram uma estimativa da biodisponibilidade do elemento, ou seja, a fração do metal ingerido que é absorvida pela circulação sistêmica, devido as semelhanças no processo de absorção pela célula (Pelfrene; Waterlot; Douay, 2011). Espera-se que esta fração biodisponível seja menor que a fração bioacessível, devido à captação incompleta do cromo no intestino delgado, como ocorreu neste estudo.

A Figura 29, faz a comparação entre as concentrações de cromo, presente nas infusões, nas frações bioacessíveis e o Cr(III) lábil, obtido após o uso dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis.

Figura 29. Concentração em $\mu\text{g g}^{-1}$ de nas infusões, bioacessível após ensaios UBM e fração lábil de Cr(III) após aplicação dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis das três marcas de chá-mate. n=3.



Fonte: A autora.

Observando a Figura 29, para a amostra A, pode-se notar que a concentração de cromo na infusão foi de $0,132 \mu\text{g g}^{-1}$ e a concentração bioacessível foi de $0,06 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$, ou seja, apenas 40% do cromo presente na infusão encontra-se bioacessível, disponível para absorção. No entanto, ao comparar a fração bioacessível ($0,06 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$) com a fração lábil $0,058 \pm 0,014 \mu\text{g g}^{-1}$, pode-se verificar que todo cromo bioacessível está na forma de cromo(III) lábil e possivelmente será absorvida pelo organismo após o consumo da infusão, preparada com esta amostra de chá-mate.

Para as marcas B e C as concentrações de cromo nas infusões foram de $0,111 \pm 0,005$ e $0,105 \pm 0,004 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. A concentração bioacessível para a amostra B foi de $0,07 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ e para a amostra C $0,05 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$, correspondendo a uma porcentagem bioacessível de cromo em torno de 63% e 48%, para as amostras B e C respectivamente. Em relação ao Cr(III) lábil, determinado após uso dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis, as concentrações ficaram abaixo do limite de quantificação da técnica, indicando que o cromo presente nas frações bioacessíveis provavelmente está formando complexos orgânicos inertes, ou seja, aqueles que apresentam uma baixa constante de dissociação (Pelfrene; Waterlot; Douay, 2011).

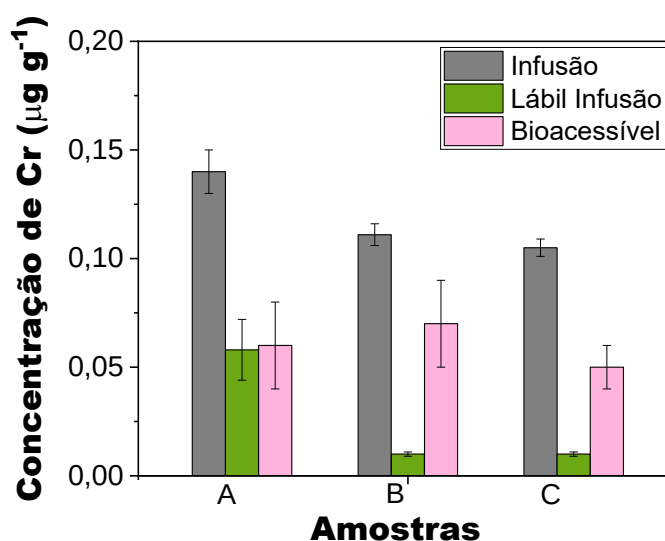
Até o momento apenas Pelfrene e Colaboradores (2011), fizeram o uso dos dispositivos DGT em frações bioacessíveis de amostras de solo e para espécies metálicas de Pb, Cd e Zn. Por isso, não há como fazer comparações com a literatura

sobre a aplicabilidade dos dispositivos DGT em amostras alimentares e para as espécies de cromo.

7.2. ESTUDO DA LABILIDADE DO CROMO NAS INFUSÕES DE CHÁ-MATE UTILIZANDO O DGT *HOMEMADE*

Outro estudo inédito proposto com o uso dos dispositivos DGT *homemade* foi avaliar a labilidade do cromo nas infusões de chá-mate a fim de verificar se de forma geral, a fração de Cr(III) lábil é a mesma que a fração bioacessível. Isto porque, utilizando esses dispositivos tem-se apenas o íon livre e os complexos cineticamente reversíveis (fração lábil) de Cr(III) que irão difundir-se pelo hidrogel e ser mobilizados na resina Chelex-100. Para isso, os dispositivos DGT foram aplicados diretamente nas infusões de chá-mate e os resultados de fração lábil de cromo trivalente estão mostrados na Figura 30, juntamente com a concentração de cromo nas infusões e nas frações bioacessíveis, para possíveis comparações.

Figura 30. Concentração de cromo nas infusões, concentração de Cr(III) lábil nas infusões após aplicação dos dispositivos DGT e concentração de cromo bioacessível com o método UBM, nas marcas A, B e C das amostras de chá-mate. n=3.



Fonte: A autora.

Observando a Figura 30, para a amostra A, pode-se notar, que a concentração de cromo na infusão foi de $0,140 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ e a concentração de cromo(III) lábil foi de $0,0585 \pm 0,004 \mu\text{g g}^{-1}$, ou seja, 42% do cromo presente nas infusões está na forma trivalente e lábil, enquanto os outros 58% pode estar como cromo hexavalente na forma de ânions (HCrO_4^- e $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), para os quais a chelex-100 não é seletiva, ou

ainda, na forma de complexos inertes, aqueles complexos que apresentam uma constante de velocidade de dissociação muito baixa (Vagheti, 2009; Pelfrene; Waterlot; Douay, 2011). Com relação a concentração de cromo bioacessível, para essa amostra, ela é a mesma que a determinada pelos dispositivos DGT, $0,06 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$. Neste caso, utilizando a técnica do DGT (fração lábil), mais simples quando comparada aos ensaios de bioacessibilidade, chega-se a resultados estatisticamente iguais, pois ao aplicar teste *t* verificou-se que o *t* calculado foi de 0,26 menor que o *t* crítico (4,30), dentro de um nível de confiança de 95%.

Já para as amostras B e C, a quantidade de cromo(III) lábil encontrada após a aplicação dos dispositivos foram de $0,01 \pm 0,001 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,005 \pm 0,001 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Não chegando a 10% de cromo trivalente presente nessas infusões. Isso explica o fato de as concentrações de cromo trivalente lábil ficarem abaixo do limite de quantificação, após aplicação dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis (Figura 26), ou seja, o cromo nestas marcas (B e C) de chá-mate pode estar na forma de complexos inertes com componentes da matriz, como polifenóis e xantinas, ou ainda ligados a espécies com tamanhos moleculares maiores que o tamanho dos poros do gel difusivo, impedindo a livre difusão através do hidrogel (Zhang; Davison, 1999).

Com relação as concentrações bioacessíveis de cromo, na amostra B foi de $0,07 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ e na amostra C de $0,05 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$, concentrações maiores as determinadas após utilização dos dispositivos DGT. Segundo Pelfrene, Waterlot e Douay (2011) a bioacessibilidade fornece uma medida de solubilidade do metal no trato gastrointestinal, enquanto a biodisponibilidade, extrapolada neste trabalho com o uso dos dispositivos DGT, é definida como a fração do metal ingerido que é absorvida pela circulação sistêmica. Por isso, essa fração será menor que a fração bioacessível, devido à captação incompleta dessas espécies no intestino delgado.

De modo geral os dados obtidos com a aplicação dos dispositivos DGT *homemade* nas frações bioacessíveis, dos chás e das infusões, mostraram-se muito interessantes e concordantes. No caso dos resultados para as amostras de chá pode-se observar que praticamente todo cromo bioacessível está na forma trivalente lábil, para as três marcas de chá avaliadas. Já as concentrações de cromo lábil nas frações bioacessíveis das infusões não foram determinadas, indicando que nessas amostras o cromo pode estar na forma de complexos inertes ou ligado a espécies com tamanhos moleculares maiores que o tamanho dos poros do gel difusivo, impedindo

a livre difusão através do hidrogel. Esses dados são comprovados após a aplicação dos dispositivos DGT diretamente nas infusões, onde mostra que menos de 10% do cromo presente está na forma trivalente lábil.

Por fim, deve-se ressaltar que cabe uma avaliação mais minuciosa quando se utiliza agarose como fase difusiva, pois como o hidrogel é pouco restritivo, pode acontecer uma superestimação da fração lábil e por consequência da biodisponibilidade das espécies de cromo. Para a extrapolação *in vivo* essa deve ser realizada cautelosamente e requer estudos mais profundos e completos. De qualquer maneira, pode-se afirmar que os dispositivos produzidos *homemade* apresentaram resultados bastante satisfatórios e concordantes quando aplicados em amostras de chá-mate, representando uma alternativa viável quando comparado com o dispositivo convencional.

7. CONCLUSÃO

A partir deste estudo verificou-se que ambos os métodos de tratamento, via seca e via úmida, podem ser utilizados na determinação de cromo total em amostras de chás de camomila e mate.

Os métodos PBET e UBM foram robustos na determinação do cromo, não apresentando interferência enzimática na bioacessibilidade quando aplicados nas infusões.

Com relação às infusões, preparadas com os chás de camomila e mate, pode-se verificar que ambos os chás são fontes de elementos essenciais ao organismo humano como Co, Zn, Cu. No entanto, também apresentam espécies não essenciais como Cd, Pb e Al que podem ser tóxicos ao organismo mesmo em baixas concentrações.

Os dispositivos DGT produzidos *homemade* mostraram-se eficientes na determinação das espécies lábeis de cromo(III), pois apresentaram recuperações superiores a 80%.

A aplicação dos dispositivos DGT nas frações bioacessíveis das amostras de chá-mate, mostrou que praticamente todo cromo bioacessível está na forma trivalente lábil. No entanto, nas frações bioacessíveis das infusões, verificou-se que apenas na marca A, todo cromo bioacessível está na forma de cromo(III) lábil, enquanto nas amostras B e C o cromo não foi quantificado.

Com a aplicação dos dispositivos DGT diretamente nas infusões de chá-mate pode-se concluir que em uma das marcas, todo cromo bioacessível está na forma de cromo trivalente lábil, ou seja, usando a técnica do DGT chega-se a resultados iguais aos obtidos com os ensaios de bioacessibilidade UBM.

Por fim, o trabalho mostrou-se muito relevante e inovador, pois aborda as concentrações totais do metal cromo em amostras de chás, compara dois métodos de bioacessibilidade, para determinação de diferentes espécies metálicas em amostras de chás e em suas infusões, e, ainda faz a extrapolação do uso da técnica dos dispositivos DGT para simular a absorção pelo epitélio intestinal a fim de verificar a fração lábil de cromo trivalente que possivelmente será absorvida pelo organismo podendo trazer efeitos benéficos aos consumidores dessa bebida.

REFERÊNCIAS

- ABOLLINO, O.; GIACOMINO, A.; PAPARELLA, G.; MAGI, E.; CONCA, E.; MALANDRINO, M. Potentially toxic elements in ayurvedic formulations: Total and bioaccessible content. **Microchemical Journal**, v. 136, p. 236–243, jan. 2018.
- ABOU-ARAB, A. A. K.; KAWTHER M. S.; TANTAWY M. E. El.; BADEAA R. I.; KHAYRIA N. Quantity estimation of some contaminants in commonly used medicinal plants in the Egyptian market. **Food Chemistry**, v.67, n.4, p. 357-363, dez. 1999.
- AHARCHAOU, I.; ROSABAL, M.; LIU, F.; BATTAGLIA, E.; VIGNATI, D. A. L.; FORTIN, C. Bioaccumulation and subcellular partitioning of Cr(III) and Cr(VI) in the freshwater green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 182, p. 49-57, jan. 2017.
- ALBAS, C. S.; SOUZA, J. P.; NAI, G. A.; PARIZI, J. L. S. Avaliação da genotoxicidade da *Ilex paraguariensis* (erva mate) pelo teste do micronúcleo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 345-349, jan. 2014.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the cell**. 5 ed. Garland Science, 2007.
- ALEXA. N; ZHANG H.; LEAD J. R. Development of a miniaturized diffusive gradients in thin films (DGT) devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 655, p. 80-85, nov. 2009.
- ALMEIDA, E. do.; NASCIMENTO FILHO, V. F. ; MENEGÁRIO, A. A. Paper-based diffusive gradients in thin films technique coupled to energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the determination of labile Mn,Co, Ni, Cu, Zn and Pb in river water. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 71–72, p. 70–74, jun. 2012.
- ALVES, A. N. L.; DELLA ROSA, H. V. Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.39, n. 2, p. 129-139, jun. 2003.
- AOUADA, F. A. **Síntese e caracterização de hidrogéis de poliacrilamida e metilcelulose para liberação controlada de pesticidas**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 2009.
- AMBUSHE, A. A.; MCCRINDLE, R. I.; MCCRINDLE, C. M. E. Speciation of chromium in cow's milk by solid-phase extraction/dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (DRC-ICP-MS). **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 24, n. 4, p. 502–507, fev. 2009.
- ANDRADE, C. K.; ANDRADE, J. K.; DOS ANJOS, V. E.; QUINÁIA, S. P. Bioaccessibility of Zinc from Yogurt and Determination of Total Concentration Using Slurry Sampling and Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 12, p. 2721-2730, dez. 2019.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Portaria n. 277**, de 22 de setembro de 2005. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/saudelegis/anvisa/2005/res0277_22_09_2005>. Acesso em: 30 de set 2022.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução Normativa - in nº 160, de 1º de julho de 2022 (Publicada no DOU nº 126, de 6 de julho de 2022). Disponível em: https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/IN_160_2022_.pdf. Acesso em: 12 de agosto 2023.

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

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.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. Gaithersburg: **Published by AOAC International**. Washington DC, 18. ed., 2005.

BALIMANE, P. V.; CHONG, S.; MORRISON, R. A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. **Journal Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 1, p. 301-312, ago. 2000.

BAHADIR, Z.; BULUT, V. N.; HIDALGO, M.; SOYLAK, M.; MARGUÍ, E. Cr speciation in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with total reflection X-ray fluorescence spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 115, p. 46-51, jan. 2016.

BANERJEE, A.; NAYAK, D.; CHAKRABORTTY, D.; LAHIRI, S. Uptake studies of environmentally hazardous (51) Cr in Mung beans. **Environmental Pollution**, v. 151, n. 2, p. 423-427, jan. 2008.

BÁRCENA-PADILLA, D. A; BERNAL-GONZÁLEZ, M.; PANIZZA-DE-LEÓN, A.; GARCÍA-GÓMEZ, R. S.; DURÁN-DOMÍNGUEZ-DE-BAZÚA, C. Aluminum Contents in 161 Dry Leaves and Infusions of Commercial Black and Green Tea Leaves: Effects of Sucrose and Ascorbic Acid Added to Infusions. **Natural Resources**, v. 2, n.3, p. 141-145, set. 2011.

BARGE - UBM procedure for the measurement of inorganic contaminant bioaccessibility from solid matrix. **Ineris Controlling Risks for sustainable development**, p. 1-10, dez. 2010.

BARIN, J. S.; BIZZI, C. A.; FLORES, E. M. M.; NÓBREGA, J. A.; KRUG, F. J. Decomposição de materiais orgânicos por via úmida. In: KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2. ed. São Paulo: EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2016.

BASTA, N.; GRADWOHL, R. Estimation of Cd, Pb and Zn bioavailability in smelter contaminated soils by a sequential extraction procedure. **Journal of Soil Contamination**, v. 9, n.2, p. 149–164, jan 2000.

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

BERMEJO, P.; PENA, E. M.; DOMINGUEZ, R.; BERMEJO, A.; COCHOB, J. A.; FRAGA, J. M. Iron and zinc in hydrolised fractions of human milk and infant formulas using an in vitro method. **Food Chemistry**, v. 77, n.3, p. 361–369, jun. 2002.

BANERJEE, A., NAYAK, D., CHAKRABORTTY, D.; LAHIRI, S. Uptake studies of environmentally hazardous ⁵¹Cr in Mung beans. *Environmental Pollution*, v.151, n.2, p. 423-427, 2008.

BEZERRA, S. B. **Atividade gastroprotetora e antimicrobiana do extrato seco de matricaria recutita (camomila) e do alfa-bisabolol: possíveis mecanismos de ação**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

BIO-RAD. Chelex® 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin: **Instruction Manual**, [200-].

Disponível em: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT200.pdf>. Acesso em: 02/02/2024.

BITOBROVEC, A. **Avaliação da presença de compostos bioativos e contaminantes em infusões de chá: estudo de bioacessibilidade in vitro**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2019.

BONDY, S. C.; CAMPBELL, A. Aluminum and Neurodegenerative Diseases. In: ASCHNER, M.; COSTA, L. G. *Environmental Factors in Neurodegenerative Diseases*. Cambridge: Elsevier, 2017. cap. 5.

BONET, A.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELO, J. Chromium III-iron interaction in Fe-deficient and Fe-sufficient bean plants. I. Growth and nutrient content. **Journal Plants Nutrition**, v.14, n. 4, p. 403–414, abr. 1991.

BORGES, A. R.; BAZANELLA, D. N.; DUARTE, A. T.; ZMOZINSKI, A. V.; VALE, M. G. R.; WELZ, B. Development of a method for the sequential determination of cadmium and chromium from the same sample aliquot of yerba mate using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 130, p.116–120, jan. 2017.

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.

BOSSCHER, D.; LU, Z.; JANSSENS, G.; VAN CAILLIE-BERTARND, M.; ROBBERECHT, H.; DE RYCKE, H.; DE WILDE, R.; DEELSTRA, H. In vitro availability of zinc from infant foods with increasing phytic acid contents. **The British Journal of Nutrition**, v 86, n. 2, p. 241-247, ago. 2001.

BOWLES, K. C.; APTE, S. C.; BATLEY, G. E.; HALES, L. T.; ROGERS, N. J. A rapid Chelex column method for the determination of metal speciation in natural waters. **Analytica Chimica Acta**, v. 558, p 237-245, fev 2006.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on Ilex paraguariensis research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n.3, p. 378-384, jul. 2011.

BRAIBANTE, M. F.; DA SILVA, D.; BRAIBANTE, H. T.; PAZINATO, M. S. A Química dos Chás. **Química Nova na Escola**, v. 0, n. 0, p. 1-8, 2014.

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, abr. 2011.

BRASIL. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução **RDC 42**, de 29 de agosto de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria n. 269**, de 22 de setembro de 2005. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 23 set. 2005.

BRUCE, S.; NOLLER, B.; MATANITOBUA, V.; NG, J. In Vitro Physiologically Based Extraction Test (PBET) and Bioaccessibility of Arsenic and Lead from Various Mine Waste Materials. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 70, p.1700-1711, ago. 2007.

CALEJA, C. et al. Caracterização do perfil fenólico de extratos aquosos de Matricaria recutita L. obtidos por decocção. Revista de Ciências Agrárias, v.40, n.spe, p.136-139, 2017.

CAMPOS, M. L. A.; BENDO, A.; VIEL, F. C. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle da contaminação de metais traço em águas naturais. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 808-813, 2002.

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.

CASTILLO-BLUM, S. E. Coordination chemistry of some biologically active ligands. **Coordination Chemistry Reviews**, v.196, p. 3-30, 2000.

CAVE, M. R.; WRAGG, J.; PALUMBO, B.; KLINCK, B. A. **Measurement of the Bioaccessibility of Arsenic in UK Soils**. R&D Technical Report P5-062/TR02, Environment Agency, 2003.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2ª Ed. Editora da Unicamp: Campinas, 2003.

CHAN, D. Y.; BLACK, W. D.; HALE, B. A. Cadmium bioavailability and bioaccessibility as determined by in vitro digestion, dialysis and intestinal epithelial monolayers, and compared to in vivo data. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 42, n. 9, p. 1283-1291, jul. 2007.

CHAVES, E. S. **Determinação de elementos traço em diesel e biodiesel por espectrometria de emissão atômica em chama e por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com introdução da amostra por vaporização eletrotérmica**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2008.

CHEN, S.; ZHU, S.; HE, Y.; LU, D. Speciation of chromium and its distribution in tea leaves and tea infusion using titanium dioxide nanotubes packed microcolumn coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 150, p. 254–259, mai. 2014.

CHOSTACK, L. C. **Dispositivos DGT modificados com materiais alternativos para uso na especiação de elementos traço**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná. 2014.

COLAÇO, C. D.; MENEGÁRIO, A. A.; YABUKI, L. N. M.; ALCÂNTARA A. L. Coeficientes de difusão de metais em materiais não convencionais (agarose e acetato de celulose) usados na técnica de difusão em filmes finos por gradientes de concentração. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1360-1364, jun. 2012.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; GÁMIZ-GRACIA, L.; ALMANSA-LÓPEZ, E.; LASO-SÁNCHEZ, J. Calibration in chemical measurement processes: I. A metrological approach, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, p. 195-206, April 2001.

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 196–200. 2009.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.; FENNEMA, O. **Química de alimentos de Fennema**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DAVIS, C. M.; ROYER, A. C.; VINCENT, J. B. (1997) Synthetic Multinuclear Chromium Assembly Activates Insulin Receptor Kinase Activity: Functional Model for Low-Molecular-Weight Chromium-Binding Substance. **Inorg. Chem.** 36: 5316.

DHAL, B.; THATOI, H. N.; DAS, N. N.; PANDEY, D. V. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical

solid waste: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 250–251, p. 272-291. 2013.

DEAN, J. R. MA, R. Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: A critical review. **Chemosphere**, v. 68, n. 8, p. 1399 – 1407, jul. 2007.

DE ANDRADE, C. K. **Determinação das Concentrações Totais e Bioacessíveis de Íons Metálicos em Matrizes Alimentares Empregando Espectrometria De Absorção Atômica**. 2018. 176 f. Tese (Doutorado Associado em Química – UEL/UEPG/UNICENTRO), Ponta Grossa, 2018.

DE CAMPOS, B. K. **Avaliação da labilidade do Alumínio em infusões de erva-mate (Ilex paraguariensis St. Hil.) empregando voltametria adsorvativa de redissolução catódica**. 2013. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

DE 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 adsorvativa de redissolução catódica. **Química Nova**, v.37, p. 1479-1486. 2014.

DE GODOY, R. C. B.; DELIZA, R.; GHENO, L. B.; LICODIEDOFF, S.; FRIZON, C. N. T.; RIBANI, R. H.; DOS SANTOS, G. G. Consumer perceptions, attitudes and acceptance of new and traditional mate tea products. **Food Research International**, v. 53, p. 801–807. 2013.

DELAFIORI, J.; RING, G.; FUREY, A. Clinical applications of HPLC–ICP-MS element speciation: A review. **Talanta**, v. 1, p. 306-331. 2016.

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 MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 315-320. 2009.

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.

DEVILLERS D, BUZIER R, CHARRIAU A, GUIBAUD G. Improving elution strategies for Chelex®-DGT passive samplers. **Anal Bioanal Chemistry**. 2017

DISILVESTRO, A. R.; DY, E. Comparison of acute absorption of commercially available chromium supplements, **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.21, p. 120-124, jun.2007.

DOCEKALOVA H.; DIVIS, P.; Application of diffusive gradient in thin films technique (DGT) to measurement of mercury in aquatic systems. **Talanta**, v. 65, n. 5, p. 1174–1178, mar. 2005.

DOS ANJOS, V. E. **Desenvolvimento e avaliação de sensores baseados em difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) para o estudo de especiação de metais em águas naturais**. 2010. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

DOS ANJOS, V. E.; ABATE, G.; GRASSI, M. T. Comparação da labilidade de metais empregando voltametria, difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) e modelo computacional. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1307-1312, jun. 2010.

DOS ANJOS, V. E.; ABATE, G.; GRASSI, M. T. Determination of labile species of As(V), Ba, Cd, Co, Cr(III), Cu, Mn, Ni, Pb, Sr, V(V), and Zn in natural waters using diffusive gradients in thin-film (DGT) devices modified with montmorillonite. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 409, p. 1963-1972, mar. 2017.

DOS ANJOS, V. E.; ABATE, G.; GRASSI, M. T. Potentialy of the use of montmorillonite in diffusive gradient in thin film (DGT) devices for determination of labile species of Cu, Cr, Cd, Mn, Ni, Pb, and Zn in natural waters. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 1, n.4, p. 187-193, abr. 2011.

DOS ANJOS, V. E.; ROHWEDDER, J. R.; CADORE, S.; ABATE, G.; GRASSI, M. T. Montmorillonite and vermiculite as solid phases for the preconcentration of trace elements in natural waters: Adsorption and desorption studies of As, Ba, Cu, Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb, Sr, V, and Zn. **Applied Clay Science**, v. 99, p. 289-296, jul. 2014.

FAO/WHO- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. 2. ed. Thailand: WHO Library, 2004. p. 235-240.

FAO/WHO- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Joint FAO/WHO food standards program: Codex committee on contaminants in foods. Report of the sixth session of the codex committee on contaminants in foods. Rome, Italy, 2-7 July. 2012.

FAO/WHO- Food and Agriculture Organization/World Health Organization. Joint FAO/WHO food standards program: Codex committee on contaminants in foods. Working document for information and use in discussions related to contaminants and toxins in the GSCTFF. Eighth session, The Hague, Netherlands, 31 March-4 April. 2014.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed., São Paulo, **Atheneu**, 1988.

FDA – Food and Drug Administration. Guidance for industry: A food labeling guide. 14. Appendix F: Calculate the percent daily value for appropriate nutrients. 2013. Disponível em: Acesso em: 21/10/2023.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I; PÉREZ-GÁLVEZ, A. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. **Nutrition Research**, v. 29, p. 751-760, 2009.

FERREIRA M. P.; TARLEYA C. R. T. Assessment of in vitro bioaccessibility of macrominerals and trace elements in green banana flour. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 92, p. 103582, 2020.

FINNEY, L. A.; HALLORAN, T. O. V. Transition metal speciation in the cell: insights from the chemistry of metal ion receptors. **Science**, v. 300, p. 931-936, mai. 2003.

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

FLORES, E. M. M.; FLORES, E. L. M.; PANIZ, J. N. G.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; KRUG, F. J. Decomposição de materiais orgânicos por combustão. In: KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2. Ed. São Paulo: EditSBQ – Sociedade Brasileira de Química, 2016.

FRANCO, M. J.; CAETANO, I. C. S.; CAETANO J.; DRAGUNSKI, D. C. Determinação de metais em plantas medicinais comercializadas na região de Umuarama-PR. **Arquivos de Ciência e Saúde da UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 121-127, ago. 2011.

GAO, Y.; CANCK E. de; LEERMAKERS, M.; BAEYENS, W.; VOORT, P. V. der. Synthesized mercaptopropyl nanoporous resins in DGT probes for determining dissolved mercury concentrations. **Talanta**, v. 87, p. 262– 267, dez. 2011.

GAO, Y.; CRAEMER, S. de; BAEYENS, W.; A novel method for the determination of dissolved methylmercury concentrations using diffusive gradients in thin films technique. **Talanta**, v.120, p. 470 – 474, mar. 2014.

GIMPEL J. ; ZHANG H. ; HUTCHINSON W. ; DAVISON W. Effect of solution composition, flow and deployment time on the measurement of trace metals by the diffusive gradient in thin films technique, **Analytica Chimica Acta**, v. 448, n.1-2, p. 93–103, dez. 2001.

GONZALVEZ, A.; CERVERA, M.L.; ARMENTA, S.; DE LA GUARDA, M. A review of non-chromatographic methods for speciation analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 636, n.2, p.129–157, mar. 2009.

GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v.32, n. 6, p. 481–494, jul. 2005.

GUERTIN, J. Toxicity and Health effects of chromium. In: GUERTIN, J.; JACOBS, J. A.; AVAKIAN, C. P. (Ed.). **Chromium (VI) Handbook**. CRC Press, 2005. 215-234 p.

GUPTA, U. C.; GUPTA, S. C. Sources and deficiency diseases of mineral nutrients in human health and nutrition: a review. **Pedosphere**, v. 24, n. 1, p. 13–38, fev. 2014.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro/RJ, Elsevier. 2006. 1115p.

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**, v.43, n. 6, p. 533-538, ago. 2008.

HALL, J.E.; GUYTON, A.C., **Tratado de fisiologia médica**, 12. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HAMILTON, E. M.; YOUNG S. D.; BAILEY E. H.; WATTS M. J. Chromium speciation in foodstuffs: A review. **Food Chemistry**, v. 250, p. 105–112, jun. 2018.

HAN, W. Y.; ZHAO, F. J.; SHI, Y. Z.; MA, L. F.; RUAN, J. Y. Scale and causes of lead contamination in Chinese tea. **Environmental Pollution**, v. 139, n. 1, p. 125–132, jan. 2006

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

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**, v. 72, n. 9, p.138-147, 2007.

HERRERA-AGUDELO, M. A.; MIRÓ, M.; ARRUDA, M. A. Z. *In vitro* oral bioaccessibility and total content of Cu, Fe, Mn and Zn from transgenic (through *cp4* EPSPS gene) and nontransgenic precursor/successor soybean seeds. **Food Chemistry**, v. 225, p. 125–131, jun. 2017.

HOSTYNEK, J. J. Factors determining percutaneous metal absorption. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 327-345, mar. 2003.

HU, J.; WU, F.; WU, S.; CAO, Z.; LIN, X.; WONG, M. H. Bioaccessibility, dietary exposure and human risk assessment of heavy metals from market vegetables in Hong Kong revealed with an *in vitro* gastrointestinal model. **Chemosphere**, v. 91, n. 4, p. 455–456, abr. 2013.

HUANG, R. L.; TAN, Z. L.; XING, T. X.; PAN, Y. F.; LI, T. J. An *in vitro* method for the estimation of ileal crude protein and amino acids digestibility using the dialysis tubing for pig feedstuffs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 88, n. 1-2, p. 79-89, nov. 2000.

HUR, S.J.; LIM, B.O.; DECKER, E.A.; McCLEMENTS, D.J. *In vitro* human digestion models for food applications. **Food Chemistry**, v.125, n.1, p. 1-12, mar. 2011.

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. 876–886, out. 2006.

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C., FERRARO, G.; FILIP, R. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122(3), p. 695-699, 2010.

JAMES, B. R.; BARTLETT, R. J. Behavior of Chromium in Soils: VII. Adsorption and Reduction of Hexavalent Forms. **Journal of Environmental Quality**, v.12, n. 2, p. 177-181, abr. 1983.

JAMES, B. R.; PETURA, J. C.; VITALE, R. J.; MUSSOLINE, G. R. Hexavalent Chromium Extraction from Soils: A Comparison of Five Methods. **Environmental Science & Technology**, v. 29, n.9, p. 2377-2381, set. 1995.

JAMES, K.; PETERS, R. E.; LAIRD, B. D.; MA, W. K.; WICKSTROM, M.; STEPHENSON, G. L.; SICILIANO, S. D. Human exposure assessment: a case study of 8 PAH contaminated soils using in vitro digestors and the juvenile swine method. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 10, p. 4586–4593, 2011.

JARDINE, P. M.; STEWART, M. A.; BARNETT, M. O.; BASTA, N. T.; BROOKS, S. C., FENDORF, S.; MEHLHORN, T. L. Influence of Soil Geochemical and Physical Properties on Chromium(VI) Sorption and Bioaccessibility. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n.19, p. 11241-11248, out. 2013.

JOHNSON, L. R. **Physiology of the gastrointestinal tract**. 4. Ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2006.

KANG, Y.; ZENG, D. Y.; MAN, Y. B.; LIU, J.; YANG, Y.; LI, S.W.; SITU, K.; XIONG, W.; ZENG, L.X.; ZHANG, Q.Y.; LUO, J. W.; PAN, W. J.; JIANG, F.; WONG, M.H. Comparison of sorption kinetics of PAHs by sorptive sinks and Caco-2 cell and the correlation between bioaccessibility and bioavailability of PAHs in indoor dust. **Science of The Total Environment**, v. 645, p. 170–178, dez. 2018.

KERSANACH, M. W.; ANDRADE, C. F. F.; ZHANG, H.; MILANI, M. R.; NIENCHESKI, L. F. H.; In situ measurement of trace metals in estuarine water of the Patos Lagoon using Diffusive Gradients in Thin Films (DGT). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n.2, p. 333-340, 2009.

KHOUZAM, R.B.; POHL, P.; LOBINSKI, R., Bioaccessibility of essential elements from white cheese, bread, fruit and vegetables. **Talanta**, v. 86, p. 425-428, out. 2011.

KÖSTER, W.; VAN LEEUWEN, H. P.; Physicochemical Kinetics and Transport at Biointerfaces. **IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems**, v. 9, p. 147, 2004.

KOHLMEIER, M., **Nutrient Metabolism**. 2. Ed. Online Academic Press, 2003.

MOREDA-PIÑEIRO, J.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; ROMARÍS-HORTAS, V.; MOSCOSO-PÉREZ, C.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI-LORENZO, S.; BERMEJO-BARRERA, P.; PRADA-RODRÍGUEZ, D. In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 324-345, fev. 2011.

KOPLÍK, R.; BORKOVÁ, M.; MESTEK, O.; KOMÍNKOVA, J.; SUCHÁNEK, M. Application of size - exclusion chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry for fractionation of element species in seeds of legumes. **Journal of Chromatography B**, v. 775, n. 2, p. 179-187, ago. 2002.

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, n. 2, p. 67–92, mar. 2008.

LA GUARDIA, M.; MORALES, A. Sample preparation for chromium speciation. In *Comprehensive Analytical Chemistry XLI*. **Elsevier Science**, Amsterdam, Netherlands, p. 1115-1171, 2003.

LANGARD, S.; COSTA, M. Chromium. In: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. (Ed.). *Handbook on the Toxicology of Metals*. **Academic Press**. p. 487-510, 2007.

LANZETTI, M.; PIRES, K. M. P.; SANTOS, J. C.; RIBEIRO, M. L.; BORGES, R. M.; DA SILVA, A. J. R.; PORTO, L. C.; BENJAMIMA, C. F.; VALENCA, S. S. Ready-to-drink 169 Matte® tea (diet and regular) increased life span and pulmonary health in aged mice. **Food Research International**, v. 54, p. 675–682, 2013.

LARNER, B. L.; SEEN, A. J., Evaluation of paper-based diffusive gradients in thin film samplers for trace metal sampling. **Analytica Chimica Acta**, v.539, n.1-2, p. 349–355, mai. 2005.

LEUFROY, A.; NOËL, L.; BEAUCHEMIN, D.; GUÉRIN, T. Use of a continuous leaching method to assess the oral bioaccessibility of trace elements in seafood. **Food Chemistry**, v.135, n. 2, p. 623–633, nov. 2012.

LI, C.; CUI, X.Y.; FAN, Y.Y.; TENG, Y.; NAN, Z. R.; MA, L.Q. Tenax as sorption sink for invitro bioaccessibility measurement of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils. **Environmental Pollution**, v. 196, p. 47–52, jan. 2015.

LI, K.; LI, C.; YU, N.Y.; JUHASZ, A.L.; CUI, X.Y.; MA, L.Q. In vivo bioavailability and in vitro bioaccessibility of perfluorooctanoic acid (PFOA) in food matrices: correlation analysis and method development. **Environmental Science Technology**, v. 49, n. 1, p. 150–158, jan. 2015.

LIANG, P.; SANG, H. Speciation of chromium in water samples with cloud point extraction separation and preconcentration and determination by graphite furnace

atomic absorption spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**. v. 154, n. 1-3, p. 1115–1119, jun. 2008.

LIMA, J. D.; MAZZAFERA, P.; MORAES, W. D.; DA SILVA, R. B. Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 39, n. 4, p.1270-1278, 2009.

LÓPEZ-GARCÍA, I.; BRICEÑO, M.; VICENTE-MARTÍNEZ, Y.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for the speciation of traces of chromium using electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 115, p. 166-171, out. 2013.

LÓPEZ-GARCÍA, I.; VICENTE-MARTÍNEZ, Y.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Determination of very low amounts of chromium(III) and (VI) using dispersive liquid–liquid microextraction by *in situ* formation of an ionic liquid followed by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 27, n. 5, p. 874-880, mai. 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil - nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, p. 148-9, 2002.

LU, M.; LI, G.; YANG, Y.; YU, Y. A review on *in-vitro* oral bioaccessibility of organic pollutants and its application in human exposure assessment. **Science of The Total Environment**, v.752, p.142001, jan. 2021.

LUX, A.; MARTINKA, M.; VACULÍK, M.; WHITE, P.J. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. **Environmental and Experimental Botany**, v.62, n. 1, p. 21–37, jan. 2011.

MACCARI JUNIOR, A. **ANÁLISE DO PRÉ-PROCESSAMENTO DA ERVA-MATE PARA CHIMARRÃO**. 2015. Campinas. Tese (Doutorado Engenharia Agrícola) – Universidade de Campinas, 2005.

MACÊDO, E. M. C.; AMORIM, M. A. F.; DA SILVA, A. C. S.; CASTRO, C. M. M. B. Efeitos da deficiência de cobre, zinco e magnésio sobre o sistema imune de crianças com desnutrição grave. **Revista Paulista de Pediatria**, v.28, n. 3, p. 329-336, set. 2010.

MACHADO, I.; CESIO, M. V.; PISTÓN, M. *In vitro* bioaccessibility study of As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb and Zn from raw edible artichoke heads (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*). **Microchemical Journal**, v. 133, p. 663–668, jul. 2017.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. *Revista de Nutrição*, n. 1, v. 17, p. 79-87. 2004.

MAIHARA, V. A.; FÁVARO, D. I. T. Elementos Tóxicos. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2. ed. Barueri: Manole, 2007.

MANDIWANA, K. L.; PANICHEV, N.; PANICHEVA, S. Determination of chromium(VI) in black, green and herbal teas. **Food Chemistry**, v. 129, n.4, p. 1839–1843, dez. 2011.

MARKIEWICZ, B; KOMOROWICZ, I.; SAJNÓG, A.; BELTER, M.; BARALKIEWICZ, D. Chromium and its speciation in water samples by HPLC/ICP-MS – technique establishing metrological traceability: a review since 2000. **Talanta**. v.132, p. 814–828, jan. 2015.

MARTINS, A. S.; ALVES, C. N.; LAMEIRA, O. A.; SANTOS, A. S.; MÜLLER, R. C. S. Avaliação de minerais em plantas medicinais amazônicas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2B, p. 621-625, jun. 2009.

MATHEBULA, M. W.; MANDIWANA, K.; PANICHEV, N. Speciation of chromium in bread and breakfast cereals. **Food Chemistry**, v. 217, p.655-659, fev. 2017.

MAULVAULT, A. L.; MACHADO, R.; AFONSO, C.; LOURENÇO, H. M.; NUNES, M. L.; COELHO, I. Bioaccessibility of Hg, Cd and As in cooked black scabbard fish and edible crab. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 11, p. 2808–2815, nov. 2011.

MENDES, T. M. F. F.; BACCAN, N. S.; CADORE, S. Sample treatment procedures for the determination of mineral constituents in honey by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n.1, p. 168-176, fev. 2006.

MENDIL, D.; BARDAK, H.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Selective speciation of inorganic antimony on tetraethylenepentamine bonded silica gel column and its determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 107, p. 162-166, mar. 2013.

MENDOZA, C. J; GARRIDO, T. R.; QUILODRÁN, C. R. SEGOVIA, M. C.; PARADA, J. A. Evaluation of the bioaccessible gastric and intestinal fractions of heavy metals in contaminated soils by means of a simple bioaccessibility extraction test. **Chemosphere**, v. 176, p. 81-88, jun. 2017.

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.

MACEDO, E. M. C.; AMORIM, M. A. F.; DA SILVA, A. C. S.; CASTRO, C. M. M. B. Efeitos da deficiência de Cu, Zn, Mg sobre o sistema immune de crianças com desnutrição grave. *Revista Paulista de Pediatria*, 28, 329, 2010.

MENEGÁRIO, A. A.; TONELLO, P. S.; DURRANT S. F., Use of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in agarose gel as a binding agent for diffusive gradients in thin films. **Analytica Chimica Acta**, v. 683, n. 1, p. 107–112, dez. 2010.

MENEGÁRIO, A.A.; YABUKI, L.N.M.; LUKO, K.S.; WILLIAMS, P.N.; BLACKBURN, D.M. Use of diffusive gradient in thin films for in situ measurements: A review on the

progress in chemical fractionation, speciation and bioavailability of metals in waters, **Analytica Chimica Acta**. 2017.

MILANI, R. F.; MORGANO, M. A.; CADORE, S. A Simple and Reliable Method to Determine 16 Trace Elements by ICP OES in Ready to Drink Beverages. **Food Analytical Methods**, 11, 1763–1772, 2018.

MILANI, R. F., SILVESTRE, L. K., MORGANO, M. A.; CADORE, S. Investigation of twelve trace elements in herbal tea commercialized in Brazil. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 52, p.111-117, 2019.

MILLER-IHLI, N. J. CHROMIUM. In: STTOEPPLER, M. (Ed.). Hazardous Metals in the Environment. **Elsevier Science**. p. 373-404, 1992.

MIRZA, A.; KING, A.; TROAKES, C.; EXLEY, C. Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 40, p. 30–36. 2017.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 110-119, nov. 2006.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NHI) (2005) **Office of dietary supplements**. Dietary supplement fact sheet: Chromium. Disponível em: <http://ods.od.nih.gov/factsheets/chromium/>. Data de acesso: 10 de abril de 2021.

NAVARRO, P., ARANA, G., ETXEBARRIA, N.; DEAN, J. R. (2008). Evaluation of the physiologically based extraction test as an indicator of metal toxicity in mussel tissue. **Analytica Chimica Acta**, v. 622, n. 1-2, p.126-132, ago. 2008.

NOVOTNIK, B.; ZULIANI, T.; ŠČANČAR, J.; MILAČIČ, R. Content of trace elements and chromium speciation in Neem powder and tea infusions. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 31, p. 98–106, jul. 2015.

NRIAGU, J.O. Chromium in the Natural and Human Environments: Production and uses of chromium. Wiley, New York, 1988, 81–104 p.

OOMEN, A.G.; TOLLS, J.; SIPS, A.J.A.M.; GROTEN, J. P. In Vitro Intestinal Lead Uptake and Transport in Relation to Speciation. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, p. 116–124, jan. 2003.

OOMEN, A.G.; TOLLS, J.; SIPS, A.J.A.M.; GROTEN, J. P. Lead speciation in artificial human digestive fluid. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, p. 116–124, 2016.

OZYOL, E.; SAÇMACI, S.; SAÇMACI, M.; ULGEN, A. A new turn-on fluorimetric method for the rapid speciation of Cr(III)/Cr(VI) species in tea samples with rhodamine-

based fluorescent reagent. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 191, p. 62-68, fev. 2017.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Review Article: Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**. v. 5, p 1-15, out. 2016.

PARREIRA, A. R. B.; MENDES, M. E.; MATEUS, M. L. A. **Estudo comparativo do teor de metais contaminantes em amostras de chás provenientes de agricultura tradicional e biológica**. 2012. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2012.

PECHANCOVÁ, R.; PLUHÁČEK, T.; MILDE, D. Recent advances in chromium speciation in biological samples. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v.152, p. 109-122, fev. 2018.

PEDRO, F.G.G.; ARRUDA, G.L.; OLIVEIRA, J.C.; SANTOS, A.D.; SIGARINI, K.S.; HERNANDES, T.; VILLA, R.D.; OLIVEIRA, A.P. Composição centesimal e mineral de plantas medicinais comercializadas no mercado do Porto de Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.18, n.1, p.297-306, jan. 2016.

PELFRENE, A.; WATERLOT, C.; DOUAY F. Investigation of DGT as a metal speciation tool in artificial human gastrointestinal fluids. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, n.2, p. 177– 186, ago. 2011.

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

PERALTA, M. M. C. **Uso de um Lodo de Cromo Proveniente da Indústria de Curtume na Fabricação de Vidros Sodo-Cáusticos**. Tese (Doutorado em Química) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PEREIRA A. M.; BONEMANN D. H.; SCHERDIEN S. H.; AVILA B. P.; ANTUNES I. F.; RIBEIRO A. S.; GULARTE M. A. Evaluation of total and bioaccessible concentration of minerals in creole beans. **Journal of Food Composition and Analysis** v. 94, p. 103622, 2020.

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** v.68, p. 73–78, mai. 2018.

PEREIRA, N. P.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Composição química do óleo fixo obtido dos frutos secos da [*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert] produzida no município de Mandirituba, PR. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p.334-337, dez. 2005.

PESAVENTO, M.; ALBERTI, G.; BIESUZ, R. Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity

of environmental waters: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 631, n. 2, p. 129-141, jan. 2009.

POHL, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 117-128, jan. 2009.

POHL, P.; SERGIEL, I. Direct determination of the total concentrations of copper, iron and manganese and their fractionation forms in freshly ripened honeys by means of flame atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, v. 168, p. 9-15, fev. 2010.

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, n. 1, p. 392–396, set. 2012.

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. 737-751, ago. 2012.

PORTO, D. S.; AKIBA, N.; DE OLIVEIRA, M. A. L.; GAUBEUR, I. Speciation of Chromium in Water Samples after Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, and Detection by Means of High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 2, p. 266-276, fev. 2017.

PRATT, P. F. **Chromium**. In **Diagnostic Criteria for Plants and Soils**. Ed. H D Chapman. University of California, Riverside. v. 9. p. 136–141, 1966.

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, n. 2, p. 494–501, nov. 2012.

QUINÁIA, S. P; CAMPOS, B. K.; PRAZERES, J. P.; TORRES, Y. R.; DOS ANJOS, V. E. Avaliação da labilidade de Alumínio em infusões de Erva-Mate empregando voltametria adsorbtiva de redissolução catódica. **Química Nova**, v.37, n. 9, p. 1479-1486, ago. 2014.

RABELO, F.H.S.; LUX, A.; ROSSI, M.L.; MARTINELLI, A.P.; CUYPERS, A.; LAVRES, J. Adequate S supply reduces the damage of high Cd exposure in roots and increases N, S and Mn uptake by Massai grass grown in hydroponics. **Environmental and Experimental Botany**. v.148, p. 35–46, abr. 2018.

RITCHIE, G. S. P.; SPOSITO, G. **Chemical Speciation in the Environment: Speciation in Soils**, Blackwell Science Ltd., 2007. 237-264 p.

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; CHAPPELL, W. Advances in Evaluating the Oral Bioavailability of Inorganics in Soil for Use in Human Health Risk Assessment. **Environmental Science Technology**. v. 33, p. 3697–3705, set. 1999.

RUBY, M.V.; DAVIS, A.; LINK, T.E.; SCHOOFF, R.; CHANEY, R. L.; FREEMAN, G. B.; BERGSTROM, P. Development of an in vitro screening test to evaluate the in vivo bioaccessibility of ingested mine-waste lead. **Environmental Science Technology**, v. 27, n. 13, p. 2870–2877, dez, 1993.

SAHU, K. K.; VERMA, V. K.; BAGCHI, D.; KUMAR, V.; PANDEY, B. D. Recovery of chromium (VI) from electroplating effluent by solvent extraction with tri-n-butyl phosphate. **Indian Journal of Chemical Toxicology**, v. 15, p. 397-402, jul. 2008.

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, jun. 2010.

SAPUTRO, S.; YOSHIMURA, K.; MATSUOKA, S.; TAKEHARA, K.; NARSITO; AIZAWA, J.; TENNICHI, Y. Speciation of dissolved chromium and the mechanisms controlling its concentration in natural water. **Chemical Geology**, v. 364, p. 33-41, jan. 2014.

SARDANS, J.; MONTES, F.; PEÑUELAS, J. Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 2 p. 97–112, fev. 2010.

SARTÓRIO, M. L. Cultivo de Plantas Medicinais. Viçosa, MG: **Aprenda Fácil**, p.260, 2000.

SCHERZ, H.; KIRCHHOFF, E. Trace elements in foods: Zinc contents of raw foods—A comparison of data originating from different geographical regions of the world. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 5, p. 420–433, ago. 2006.

SCHMITE, B. F. P.; BITOBROVEC, A.; HACKE A. C. M.; PEREIRA, R. P.; WEINERT, P.L; DOS ANJOS, V. E. *In vitro* bioaccessibility of Al, Cu, Cd, and Pb following simulated gastro-intestinal digestion and total content of these metals in different Brazilian brands of yerba mate tea. **Food Chemistry**, v. 281, p.285-293, mai. 2019.

SEENIVASAN, S.; MANIKANDAN, N.; MURALEEDHARAN, N. N.; SELVASUNDARAM, R. Heavy metal content of black teas from south India. **Food Control**, v.19, n. 8, p. 746–749, ago. 2008.

SHANKER, A.K.; CERVANTES, C.; LOZA-TAVERA, H.; AVUDAINAYAGAM, S. Chromium toxicity in plants. **Environment International**, v. 31, n.5, p. 739-753, jul. 2005.

SHEN, L. H.; LUTEN, J; ROBBERECHT, H; BINDELS, J; DEELSTRA, H. Modification of an in-vitro method for estimating the bioavailability of zinc and calcium from foods. **Z. Lebensm Unters Forsch**, v.199, p. 442-445, dez. 1994.

SIGG, L.; BLACK, F.; BUFFLE, J.; CAO, J.; CLEVEN, R.; DAVISON, W.; GALCERAN, J.; GUNKEL, P.; KALIS, E.; KISTLER, D.; MARTIN, M.; NOEL, S.; NUR, Y.; ODZAK, N.; PUY, J.; VAN RIEMSDIJK, W.; TEMMINGHOFF, E.; WAEBER, M. L. T.;

TOEPPERWIEN, S.; TOWN, R. M.; UNSWORTH, H.; WARNKEN, K. W.; WENG, L.; XUE, H.; ZHANG, H. Comparison of analytical techniques for dynamic trace metal speciation in natural freshwaters. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 6, p.1934-1941, 2006.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em <<http://www.sigmaaldrich.com>>. Acesso janeiro 2023.

SINGH, O.; KHANAM, Z.; MISRA, N.; SRIVASTAVA, M. K. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. **Pharmacognosy Reviews**, v. 5, n. 9, p.82-95, abr. 2011.

SKERFVING, S.; BERGDAHL, I. A. Lead. In NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M.; FRIBERG, L. T. **Handbook on the Toxicology of Metals**. United States: Academic Press Inc. 2007. 599–635 p.

SLAVEYKOVA, V. I.; KARADJOVA, I. B; KARADJOVA, M.; TSALEV, D. L. Trace metal speciation and bioavailability in surface Waters of the Black Sea coastal área evaluated by HF-PLM and DGT. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n.6, p 1798 – 1803, fev. 2009.

SMITH, E., WEBER, J., ROFE, A., GANCARZ, D., NAIDU, R., JUHASZ, A.L. Assessment of DDT relative bioavailability and bioaccessibility in historically contaminated soils using an in vivo mouse method and fed and unfed batch in vitro assays. **Environmental Science Technology**, v. 46, n. 5, p. 2928–2934, jan. 2012.

SMITH, R.P.; ROBERTSON, A.M.; WATCHEL, C.J. Measurement of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) bioaccessibility and their use in the assessment of human health risk. **Geoscience South-West England**, v. 12, n. 1, p. 27–31, jan.2008.

SOARES, M. E.; VIEIRA, E.; BASTOS, M. Chromium Speciation Analysis in Bread Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 1366-1370, nov. 2009.

SOUZA, A. H.; CORRÊA, R. C.; BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; SANTOS-BUELGA, C., PERALTA, R. M.; FERREIRA, I. C. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An in-vitro comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, v. 78, p. 286-294, 2015.

SRIVASTAVA, J. K.; SHANKAR, E.; GUPTA, S. Chamomile: A herbal medicine of the past with a bright future (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 3, n. 6, p. 895-901, set. 2010.

STELMACH, E.; POHL, P.; SZYMZYCHA-MADEJA, A. Evaluation of the Bioaccessability of Ca, Fe, Mg and Mn in Ground Coffee Infusions by *in vitro* Gastrointestinal Digestion. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 11, p. 1993-1999, nov. 2014.

SU, Y.; CHU, B., GAO, Y.; WU, C.; ZHANG, L.; CHEN, P.; WANG, X.; TANG, S. Modification of agarose with carboxylation and grafting dopamine for promotion of its cell-adhesiveness. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n.2, p. 2245– 2251, fev. 2013.

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.

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, n. 8, p. 1453-1470, 2000.

TERRY, N. An analysis of the growth responses of Beta vulgaris L. to phtotoxic trace elements. II. Chromium. **Final report to the Kearney Found. Soil Sci**, 1981.

TESSIER, A; TURNER, D. R. **Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems**, IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems, Wiley, Chichester, 1995, 45–102 p.

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

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, mai. 2014.

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

VACCHINA, V.; DE LA CALLE, I.; SÉBY, F. Cr(VI) speciation in foods by HPLC-ICPMS: investigation of Cr(VI)/food interactions by size exclusion and Cr(VI) determination and stability by ion-exchange on-line separations. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 13, p. 3831–3839, mar. 2015.

VAN CAMPEN, D.R.; GLAHN, R. P. Micronutrient bioavailability techniques: Accuracy, problems and limitations. **Field Crops Research**, v. 60, p. 93-113, jan. 1999

VAN DE WIELE, T.; VERSTRAETE, W.; SICILIANO, S.D. Polycyclic aromatic hydrocarbon release from a soil matrix in the in vitro gastrointestinal tract. **Journal Environmental Quality**, v. 33, n. 4, p. 1343–1353, jul. 2004.

VAN ELDIK, R. Fascinating inorganic/bioinorganic reaction mechanisms. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 13-14, p. 1649-1662, jul. 2007.

VAN LEEUWEN, H. P. Metal speciation dynamics and bioavailability: Inert and labile complexes. **Environmental Science and Technology**, v. 33, n. 21, p. 3743-3748, set. 1999.

VAGHETTI, J.C.P. (2009) Utilização de biossorventes para remediação de efluentes aquosos contaminados com íons metálicos. 99f. Tese (Doutorado) – Universidade

Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/17482/000709030.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em 06 de jul. 2024.

VASILUCK, L.; PINTO, L. J.; WALJI, Z. A.; TSANG, W. S.; GOBAS, F. A. P. C.; EICKHOFF, C.; MOORE, M. M. Benzo[a]pyrene bioavailability from pristine soil and contaminated sediment assessed using two in vitro models. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 387–393, dez. 2009.

VERSANTVOORT, C.H.M., KAMP, E.V.D., ROMPELBERG, C.J.M. Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. **RIVM**, 2004.

VERSANTVOORT, C.H.M.; OOMEN, A.G.; KAMP, E.V.D.; ROMPELBERG, C.J.M.; SIPS, A.J.A. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 31–40, jan. 2005.

VIEIRA, E.; SOARES, M. E.; KOZIOR, M.; KREJPCIO, Z.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; BASTOS, M. L. Quantification of Total and Hexavalent Chromium in Lager Beers: Variability between Styles and Estimation of Daily Intake of Chromium from Beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 37, 9195-9200, set. 2014.

VIEIRA, M. A.; GRINBERG, P.; BOBEDA, C. R. R.; REYES, M. N. M.; CAMPOS, R. C. Non-chromatographic atomic spectrometric methods in speciation analysis: A review. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 64, p. 459–476, abr. 2009.

VILLA, J. E. L.; PEIXOTO, R. R. A.; CADORE, S. Cadmium and Lead in Chocolates Commercialized in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 34, p. 8759-8763, ago. 2014.

VINCENT, J. B. Chromium: celebrating 50 years as an essential element? **The Royal Society of Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3787-3794, abr. 2010.

WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 533, n. 1-2, p. 107–120, dez. 2003.

WANG, P.; YIN, N.; CAI, X.; DU, H.; LI, Z.; SUN, G.; CUI, Y. Variability of chromium bioaccessibility and speciation in vegetables: The influence of in vitro methods, gut microbiota and vegetable species. **Food Chemistry**, v. 277, p. 347-352, mar. 2019.

WANG, Y.; DING, S.; GONG, M.; XU, S.; XU, W.; ZHANG, C. Diffusion characteristics of agarose hydrogel used in diffusive gradients in thin films for measurements of cations and anions. **Analytica Chimica Acta**, v. 945, p. 47-56, nov. 2016.

WARINGTON, K. Molybdenum as a factor in the nutrition of lettuce. *Ann. Applie Biological*, v. 33, n. 3, p. 249-254, ago.1946.

WELZ, B.; SANTELLI, R.E.; MACHADO, W.T.V. Avaliação da resina quelante Chelex-100 na pre-concentração e da espectrometria de absorção atômica de alta resolução

com fonte contínua e forno de grafite para a determinação de metais traço em água produzida de alta salinidade. **Dissertação (Mestrado em Química)**, UFRJ, 2011.

WHITE, M. F.; KAHN, C. R. The insulin signaling system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 1, p. 1-4, jan. 1994.

WRAGG, J.; CAVE, M.; BASTA, N.; BRANDON, E.; CASTEEL, S.; DENYS, S.; GRON, C.; OOMEN, A.; REIMER, K.; TACK, K.; VAN de WIELE, T. An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 19, p. 4016–4030, set. 2011.

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, p. 272-277. 2000.

YANG, Y.; LIN, H.; SU, K.; CHEN, C.; YU, Y.; LIN, C.; YU, S.; YAN, H.; SU, K.; CHEN, Y. S. Rutin, a Flavonoid That Is a Main Component of *Saussurea involucrata*, Attenuates the Senescence Effect in D-Galactose Aging Mouse Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

YOSHINAGA, M.; NINOMIYA, H.; AL HOSSAIN, M. M.A.; SUDO, M.; AKHAND, A.A.; AHSAN, N.; MD. ALIM, M.A.; KHALEQUZZAMAN, M.D.; ILDA, M.; YAJIMA, I.; OHGAMI, N.; KATO, M. A comprehensive study including monitoring, assessment of health effects and development of a remediation method for chromium pollution. **Chemosphere**, v. 201, p.667–675, jun. 2018.

YU, S.; DU, J.; LUO, T.; HUANG, Y.; JING, C.; Evaluation of chromium bioaccessibility in chromite ore processing residue using *in vitro* gastrointestinal method. **Journal of Hazardous Materials**, v. 209-210, p.250-255, 2012.

YÜCEL, Y.; SULTANOĞLU, P. Determination of industrial pollution effects on citrus honeys with chemometric approach. **Food Chemistry**, v. 135, p. 170–178. 2012.

YUYAMA, L. K. O.; YONEKURA, L.; AGUIAR, J. P. L.; RODRIGUES, M. L. C. F.; COZZOLINO, S. M. F. Zinco. In: COZZOLINO, S. M. F. Biodisponibilidade de nutrientes. 2. ed. Barueri: Manole, 2007. cap. 27.

ZENEBON, O., PASCUET, N. S., TIGLEA, P. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ZHANG, H ; DAVISON, W. Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurement of trace metals in aqueous solution. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 19, p. 3391–3400, out.1995.

ZHANG, H.; DAVISON, W. Diffusional characteristics of hydrogels used in DGT and DET techniques. **Analytica Chimica Acta**, vol. 398, n. 2-3, p. 329-340, out. 1999.

ZHANG, N.; ZANG, S.; SUN, Q. Health risk assessment of heavy metals in the water environment of Zhalong Wetland, China, **Ecotoxicology**, v. 23, p. 518-526, jan. 2014.

ZHANG, S. ; WANG, Y. ; PERVAIZ, A. ; KONG, L. ; HE, M. Comparison of diffusive gradients in thin-films (DGT) and chemical extraction methods for predicting bioavailability of antimony and arsenic to maize. **Geoderma**, v. 332, 1-9, dez. 2018.

ZHAO, H, LI, W.; TEASDALE, P.R.; JOHN, R.; ZHANG, S. Application of a cellulose phosphate ion exchange membrane as abinding phase in the diffusive gradients in thin films technique for measurement of trace metals. **Analytica Chimica Acta**, v. 464, n. 2, p. 331–339, ago. 2002.

ZHITKOVICH, A. Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 10, p. 1617-1629, jul. 2011.