



RAQUEL FERNANDA MILANI

**ELEMENTOS INORGÂNICOS EM CHÁS: ESPÉCIES DE ARSÊNIO,
TEOR TOTAL E AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ELEMENTOS
TRAÇO NO PREPARO DA BEBIDA**

CAMPINAS

2015



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

RAQUEL FERNANDA MILANI

**ELEMENTOS INORGÂNICOS EM CHÁS: ESPÉCIES DE ARSÊNIO, TEOR
TOTAL E AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO NO
PREPARO DA BEBIDA**

ORIENTADOR: PROFA. DRA. SOLANGE CADORE

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRA EM QUÍMICA NA
ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
POR RAQUEL FERNANDA MILANI, E ORIENTADA PELO PROFA. DRA. SOLANGE CADORE.**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2015**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

M589e Milani, Raquel Fernanda, 1987-
Elementos inorgânicos em chás: espécies de arsênio, teor total e avaliação da extração de elementos traço no preparo da bebida / Raquel Fernanda Milani. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Solange Cadore.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Chá. 2. Elementos inorgânicos. 3. ICP-MS. I. Cadore, Solange. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Inorganic elements in teas: arsenic species, total content and evaluation of trace elements in beverages brewing

Palavras-chave em inglês:

Tea

Inorganic elements

ICP-MS

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Solange Cadore [Orientador]


Celio Pasquini

José Anchieta Gomes Neto


Data de defesa: 23-06-2015

Programa de Pós-Graduação: Química


BANCA EXAMINADORA


Profa. Dra. Solange Cadore (Orientadora)


Prof. Dr. José Anchieta Gomes Neto (IQ-UNESP - Araraquara)


Prof. Dr. Celso Pasquini (IQ-UNICAMP)

Este exemplar corresponde à redação final da
Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **RAQUEL
FERNANDA MILANI**, aprovada pela Comissão
Julgadora em 23 de junho de 2016.



Profa. Dra. Solange Cadore
(Presidente da Banca)

*Dedico este trabalho aos meus pais
Luiz e Rita e à minha irmã Lígia.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua presença em minha vida, Seu suporte e por guiar meus passos.

Aos meus pais e minha irmã pelo amor, confiança e apoio incondicional.

À Profa. Solange Cadore pela amizade, apoio, dedicação e por partilhar um pouco de seu conhecimento e de sua experiência.

Ao Dr. Marcelo A. Morgano pela amizade, ótimas sugestões e pela oportunidade de trabalhar neste projeto.

Às minhas amigas Adriana, Elisabete, Mayra e Natália por todo apoio, amizade, conhecimentos e paciência.

Ao Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do Instituto de Tecnologia de Alimentos por disponibilizar a estrutura necessária à realização deste projeto. Em especial aos amigos com os quais tive o privilégio de trabalhar, Adriana, Dilza, Caroline, Eni, Esther, Isabella, Leandro, Letícia, Marta, Priscila, Rosana e Sônia.

Ao Instituto de Química da UNICAMP, seus funcionários e em especial ao grupo GEATOM pelo apoio e disponibilidade.

À FAPESP, CNPq, INCTAA pelo apoio financeiro e Agilent Technologies Brasil por disponibilizar o ICP-MS para a realização das análises.

Aos membros das bancas pelas valiosas sugestões.

A todos, muito obrigada!

SÚMULA CURRICULAR Raquel Fernanda Milani

Formação Acadêmica

- Bacharelado em Química – Universidade Estadual de Campinas, 2007-2012
- Técnico em Bioquímica – Escola Técnica Estadual Conselheiro Antônio Prado, 2003-2005

Atuação Profissional

Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL

- Técnico de Apoio à Pesquisa Científica e Tecnológica, 2008-atual
- Técnico de laboratório, 2006-2008
- Bolsista de Treinamento Técnico (TT-II) no projeto “Caracterização higiênico-sanitária da cadeia produtiva do pescado marinho da baixada santista”, 2006-2006

Atividades Acadêmicas

a) Publicações recentes

Morgano, M.A.; **Milani, R.F.**; Perrone, A.A.M. Determination of Total Mercury in Sushi Samples Employing Direct Mercury Analyzer. **Food Analytical Methods**, 2015 (aceito para publicação, doi 10.1007/s12161-015-0117-7)

Milani, R.F.; Morgano, M.A.; Saron, E.S.; Silva, F.F.; Cadore, S. Evaluation of direct analysis for trace elements in tea and herbal beverages by ICP-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 26(6), 1211-1217, 2015.

De la Hoz, L.; Ponezi, A.N.; **Milani, R.F.**; da Silva, V.S.N.; de Souza, A.S.; Bertoldo-Pacheco, M.T. Iron-binding properties of sugar cane yeast peptides. **Food Chemistry**, 142, 166-169, 2014.

Morgano, M.A.; Martins, M.C.T.; Rabonato, L.C.; **Milani, R.F.**; Yotsuyanagi, K. Rodriguez-Amaya, D.B. A comprehensive investigation of the mineral composition of Brazilian bee pollen: geographic and seasonal variations and contributions to human diet. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 23, 727-736, 2012.

Morgano, M.A.; **Milani, R.F.**; Martins, M.C.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Determination of water content in Brazilian honeybee-collected pollen by Karl Fischer titration. **Food Control**, 22, 1604-1608, 2011.

Morgano, M.A.; Rabonato, L.C.; **Milani, R.F.**; Miyagusku, L.; Balian, S.C. Assessment of trace elements in fishes of Japanese foods marketed in São Paulo (Brazil). **Food Control**, 22, 778-785, 2011.

b) Artigo submetido

Milani, R.F.; Morgano, M.A.; Cadore, S. Trace elements in *Camellia sinensis* market in southeastern Brazil: extraction from tea leaves to beverages and dietary exposure. (Submetido)

c) Trabalhos recentes em Congressos nacionais e internacionais

Milani, R.F.; Morgano, M.A.; Saron, E.S.; Silva, F.F.; Cadore, S. Evaluation of Al, Fe, Mn, and Zn in beverages prepared by infusion of black, green, white and chamomile tea using ICP-MS. **5th International IUPAC Symposium for Trace Elements in Food**, 2014.

Morgano, M.A.; **Milani, R.F.**; Perrone, A. A. M. Avaliação de mercúrio total em sushi de atum, salmão e Kani por TDA-AAS. **VI Simpósio de Controle de Qualidade do Pescado**, 2014.

Morgano, M.A.; **Milani, R.F.**; Silvestre, L.K. Mercúrio em sushi: influência da massa e validação de metodologia de análise direta por TDA AAS. **37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2014.

Milani, R.F.; Morgano, M.A.; Silvestre, L.K.; Saron, E.S.; Silva, F.F.; Cadore, S. Especificação de arsênio em chás por HPLC-ICP-MS. **XXIV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2014.

Martins, M.C.T.; **Milani, R.F.**; Rodriguez-Amaya, D.; Morgano, M. A. Aluminium, arsenic, cadmium, lead, and mercury in Brazilian bee pollen. **10º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 2013.

Milani, R.F.; Morgano, M.A.; Silvestre, L.K.; Peron, L.I.; Saron, E.S.; Silva, F.F.; Cadore, S. Alumínio, Arsênio, Cádmio e Chumbo em Chás de *Camellia sinensis*. **10º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, 2013.

Milani, R.F.; Morgano, M.A.; Saron, E.S.; Silva, F.F.; Cadore, S. Contaminantes inorgânicos em chás: avaliação e estimativa de ingestão. **XIII Encontro Nacional Sobre Contaminantes Inorgânicos**, 2013.

Milani, R.F.; Silva, F. F.; Peron, L.I.; Saron, E.S.; Morgano, M.A.; Cadore, S. Validação de método para determinação de elementos em infusões de chás por ICP-MS com amostragem discreta. **XVII Encontro Nacional e IV Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos**, 2013.

Morgano, M.A.; **Milani, R.F.;** Saron, E.S.; Silva, F.F.; Cadore, S. Avaliação e estimativa de ingestão de alumínio em chás. **36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2013.

Milani, R.F.; Morgano, M.A.; Saron, E.S.; Silva, F.F.; Cadore, S. Trace elements in tea leaves commercialized in Brazil. **49th Congress of the European Societies of Toxicology**, 2013.

Morgano, M.A.; Rabonato, L.C.; **Milani, R.F.;** Miyagusku, L. Inorganic contaminants in octopus and mullet sashimi and estimated weekly intake. **16th World Congress of Food Science and Technology**, 2012.

Baggio, S.R.; Morgano, M.A.; Camargo, M.C.R. ; **Milani, R.F.;** Padovani, G. R. ; Furlani, R.P.Z. ; Tfouni, S. Omega-3 fatty acids and chemical contaminants in encapsulated fish oil. **16th World Congress of Food Science and Technology**, 2012.

RESUMO

ELEMENTOS INORGÂNICOS EM CHÁS: ESPÉCIES DE ARSÊNIO, TEOR TOTAL E AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇO NO PREPARO DA BEBIDA

Autora: Raquel Fernanda Milani

Orientadora: Profa. Dra. Solange Cadore

Este trabalho teve por objetivo principal avaliar a extração de Al, As, Ba, Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn no preparo de chá a partir de amostras comercializadas no país. Desta forma, foram avaliados os teores destes elementos nas amostras comerciais (ervas ou sachês) e nas infusões preparadas a partir destas amostras, utilizando a técnica de espectrometria de massas com plasma com acoplamento indutivo (ICP-MS). A avaliação das espécies de arsênio presentes nas bebidas foi realizada através da técnica de ICP-MS hifenada à cromatografia líquida (HPLC-ICP-MS). Para o desenvolvimento de cada uma das etapas foram avaliadas as melhores condições instrumentais de análise, os métodos de preparo de amostras e as figuras de mérito (sensibilidade, através dos limites de detecção e de quantificação, exatidão e precisão), as quais foram aplicadas a noventa amostras das dez variedades de chá mais consumidas no país. O método de digestão ácida assistida por micro-ondas foi adequado à análise nas ervas, apresentando concordância entre 77-118% com os valores de dois materiais de referência certificados. As amostras de chá apresentaram grande variação nos teores destes elementos, sendo que algumas delas apresentaram teores acima do permitido pela legislação do país e do MERCOSUL para As, Cd e Pb. A análise multivariada foi também aplicada a estas amostras. Embora as amostras fossem constituídas por misturas de ervas, provenientes de diferentes localidades, as dez variedades foram satisfatoriamente classificadas em três

grupos distintos: amostras de *Camellia sinensis*, amostras de chá mate e demais variedades, usando apenas sua composição inorgânica. Para as infusões, comprovou-se a extração máxima destes elementos no período de até 5 minutos de contato entre as ervas e a água fervente. O método direto foi considerado adequado, sendo obtida concordância entre 82-120% em ensaios de recuperação em três níveis de concentração. Em relação à adequação à legislação nacional, nenhuma amostra apresentou níveis acima do permitido para nenhum dos elementos determinados. As espécies de arsênio avaliadas (As (III), As (V) e ácidos monometil-arsônico e dimetil-arsínico) permitiram verificar a predominância das espécies inorgânicas nas infusões. O método proposto apresentou seletividade, ausência de interconversão entre as espécies, concordância com os valores encontrados para o teor de As total (87-127%) e limites de quantificação inferiores aos reportados na literatura. A avaliação da estimativa de ingestão diária de uma xícara de chá demonstrou importante relevância para Mn: o consumo de apenas uma xícara de chá por dia pode contribuir com até 14% da ingestão recomendada pela ANVISA. A estimativa de exposição aos contaminantes inorgânicos mostrou a baixa contribuição para alcançar os valores estabelecidos pelo CODEX ALIMENTARIUS, exceto para o Al nas amostras de *Camellia sinensis*: valores de até 48% da ingestão semanal tolerável provisória (PTWI) foram observados para este elemento.

ABSTRACT

INORGANIC ELEMENTS IN TEAS: ARSENIC SPECIES, TOTAL CONTENT AND EVALUATION OF TRACE ELEMENTS IN BEVERAGES BREWING

Author: Raquel Fernanda Milani

Adviser: Prof. Solange Cadore, PhD

The main objective of this work was evaluate the extraction of Al, As, Ba, Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn in tea brew using tea samples commercialized in Brazil. To perform this evaluation, trace elements were analyzed in both the commercial samples (herbs or sachet) and in their infusions, using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). For arsenic species in the infusions, the assessment was performed by HPLC-ICP-MS. For the development of each step, the optimal instrumental analytical condition, sample procedure and figures of merit (sensibility, limits of detection and quantification, accuracy and precision) were evaluated and then applied to ninety samples from the ten most consumed tea varieties in Brazil. The microwave assisted digestion was adequate for herbs analysis, agreeing between 77-118% with values provided by two certified reference materials. Tea samples presented great variability in the elements levels and, for some of them, values above the maximum allowed by Brazilian and MERCOSUL regulation were verified to As, Cd and Pb. Multivariate analysis was also applied to these samples. Although they were composed by a mix of herbs from different locations, the ten varieties were adequately classified in three distinct groups: *Camellia sinensis* samples; mate samples and the others varieties, using only their inorganic composition. For the infusions, the 5-minute contact between herbs and boiling water showed to be the maximum extraction time for the analytes. The direct method was considered adequate, agreeing between 82-120% in spiked experiments in three different concentration levels. Regarding

to the Brazilian regulation, none sample presented levels above the threshold. The arsenic species evaluated (As (III), As (V), monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid) allowed to verify the predominance of inorganic species in tea infusions. The proposed method presented selectivity, absence of species interconversion, agreement to total As concentration (87-127%) and limits of quantification lower than those reported in literature. The estimative of the daily intake of one cup of tea demonstrated a remarkable relevance for Mn: a single cup of tea every day may contribute with 14% of the ingestion recommended by ANVISA. The exposure estimative for inorganic contaminants showed the low contribution of a daily cup of tea to the achievement of CODEX Alimentarius thresholds, except for Al in samples of *Camellia sinensis*: values up to 48% of the provisional tolerable weekly Intake (PTWI) were observed for this element.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xxi
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxvii
1. JUSTIFICATIVA	1
2. OBJETIVOS	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1 - Espectrometria de massas com plasma com acoplamento indutivo	7
3.1.1 - Técnicas hífenadas	10
3.1.2 – Interferências isobáricas e poliatômicas.....	11
3.1.3 – Elementos com alto potencial de ionização.....	14
3.2 - Chá: variedades existentes.....	15
3.3 – Características dos elementos-traço que podem ser encontrados em chás.....	18
3.4 – Determinação dos elementos-traço em chás (ervas e bebidas)	21
4. PARTE EXPERIMENTAL	25
4.1 – Instrumentação	25
4.2 – Reagentes	28
4.3 - Limpeza e descontaminação dos materiais utilizados	28
4.4 - Aquisição das amostras de chá	29
4.5 - Procedimento experimental	30
4.5.1 – Determinação dos elementos inorgânicos nas amostras comerciais de chá (ervas ou sachês)	30
4.5.1.1 – Avaliação das condições de leitura dos elementos traço no ICP-MS	30
4.5.1.2 – Avaliação das condições de preparo de amostra	31
4.5.1.3 – Avaliação das figuras de mérito do método do método otimizado para determinação dos elementos traço nas amostras de chá	32
4.5.2 – Determinação dos elementos nas bebidas preparadas pela infusão destas amostras	33
4.5.2.1 – Avaliação das condições de leitura das bebidas no ICP-MS	33
4.5.2.2 – Avaliação das condições de preparo das infusões	33
4.5.2.3 – Avaliação das condições do método de preparo de amostra	33

4.5.2.4 – Avaliação das figuras de mérito do método otimizado para determinação dos elementos traço nas bebidas de chá	35
4.5.3 – Determinação das espécies de arsênio nas infusões de chá	36
4.5.3.1 – Avaliação das condições de leitura de As no ICP-MS	36
4.5.3.2 – Avaliação das condições de separação cromatográfica	36
4.5.3.3 – Avaliação das condições de preparo de amostra para determinação das espécies de As	37
4.5.3.4 – Avaliação das figuras de mérito do método para espécies de As.....	37
5. RESULTADOS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS INORGÂNICOS NAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁ.....	39
5.1 – Avaliação das condições de leitura no equipamento de ICP-MS	39
5.2 – Avaliação do método para o preparo de amostra	40
5.3 – Avaliação das figuras de mérito do método	42
5.4 – Aplicação do método para análise das amostras comerciais de chá	44
5.5 – Análise multivariada	49
6. RESULTADOS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS NAS BEBIDAS PREPARADAS PELA INFUSÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS	57
6.1 – Otimização das condições de quantificação dos elementos traço.....	57
6.2 – Avaliação do modo de preparo da infusão	58
6.3 – Avaliação do método para o preparo de amostra utilizado para a análise das bebidas de chá	62
6.4 – Avaliação das figuras de mérito	65
6.5 – Aplicação do método para análise das infusões de chá	67
6.6 – Avaliação da estimativa de ingestão e exposição aos elementos traço	73
7. RESULTADOS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO PRESENTES NAS AMOSTRAS DE CHÁ	81
7.1 – Otimização das condições de quantificação de As	81
7.2 – Avaliação do método de preparo de amostra e efeito de matriz	88
7.3 – Avaliação das figuras de mérito do método para espécies de As.....	89
7.4 – Aplicação do método para análise das infusões de chá e avaliação da estimativa de exposição às espécies de arsênio	92
8. CONCLUSÃO	97
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE ABREVIATURAS

ABIR: Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não Alcoólicas

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA: Análise de variância

BMDL_{0.5}: Limite inferior da dose de referência para aumentar em 0,5% a incidência de câncer de pulmão (para arsênio)

DMA: Ácido dimetil-arsínico

FAO/WHO: Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

He: Modo de operação da célula de colisão/reação com introdução de fluxo de He de 5,0 mL min⁻¹

HEHe: Modo de operação da célula de colisão/reação com introdução de fluxo de He de 10,0 mL min⁻¹

HPLC-ICP-MS: Cromatografia de alta eficiência hifenada à espectrometria de massa com plasma com acoplamento indutivo

IARC: Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer

ICP OES: Espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma com acoplamento indutivo

ICP-MS: Espectrometria de massas com fonte de plasma com acoplamento indutivo

IDR: Ingestão diária recomendada

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LOD: Limite de detecção

LOQ: Limite de quantificação

MMA: Ácido monometil-arsônico

MRC: Material de Referência Certificado

NoGas: Modo de operação da célula de colisão/reação sem a introdução de gás

PCA: Análise de componentes principais

PTFE: Politetrafluoroetileno

PTMI: Ingestão mensal tolerável provisória

PTMDI: Ingestão diária tolerável provisória

PTWI: Ingestão semanal tolerável provisória

REC: Recuperação (razão em porcentagem entre o valor obtido e o certificado)

TDI: Ingestão diária tolerável

VD: Valor diário

WHO: Organização Mundial da Saúde

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Principais interferências isobáricas e poliatômicas para Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn.	12
Tabela 3.2: Vegetais e suas partes aprovadas para a produção de chá.....	17
Tabela 4.1: Condições experimentais utilizadas na quantificação dos elementos inorgânicos nas amostras de chá	25
Tabela 4.2: Condições utilizadas para a amostragem discreta (ISIS-DS)	26
Tabela 4.3: Condições otimizadas para a separação cromatográfica das espécies de arsênio	27
Tabela 4.4: Condições experimentais utilizadas para a aquisição dos dados de arsênio durante a especiação.....	27
Tabela 4.5: Condições experimentais utilizadas na avaliação dos métodos para determinação dos elementos inorgânicos nas amostras de chá	31
Tabela 5.1: Condições definidas para a quantificação dos elementos nas amostras comerciais de chá	39
Tabela 5.2: Avaliação da introdução de solução contendo isopropanol na quantificação de ⁷⁵ As no CRM de folhas de pêssego	40
Tabela 5.3: Comparação de métodos para a digestão das amostras de chá utilizando o material de referência certificado <i>Peach Leaves</i>	41
Tabela 5.4: Resultados obtidos para as figuras de mérito do método para análise nas amostras comerciais de chá	43
Tabela 5.5: Média e faixa de concentração obtidas para os elementos traços nas amostras de chá (ervas ou sachês). Os valores referem-se a três lotes de três marcas diferentes, para cada variedade de chá.	45

Tabela 6.1: Condições definidas para a quantificação dos elementos nas infusões de chá	58
Tabela 6.2: Avaliação do efeito do uso do sachê no preparo das infusões de chá	61
Tabela 6.3: Comparação da análise direta (método A), diluição ácida (método B) e análise após digestão ácida assistida por microondas (método C) utilizando amostra de chá verde fortificada com 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos	63
Tabela 6.4: Comparação do coeficiente angular e de correlação linear obtido para as curvas analíticas de calibração externa (meio HNO_3 0,2%) e por adição de padrão em chás preto e de boldo (meio chá preto e meio chá boldo)	64
Tabela 6.5: Resultados para a validação do método para análise dos elementos traço nas bebidas de chá.	66
Tabela 6.6: Média e faixa de concentração observada para os elementos traços nas amostras de infusões de diferentes tipos de chá	68
Tabela 6.7: Média e faixa de extração observada no preparo das bebidas de chá pelo procedimento de infusão	71
Tabela 6.8: Avaliação da estimativa de exposição aos elementos traço pelo consumo diário de uma xícara de chá (200 mL) por um adulto (peso corpóreo, pc, 70kg)	74
Tabela 6.9: Estimativa de ingestão diária pelo consumo de uma xícara de chá (200 mL) baseada em uma dieta de 2000 calorias	78
Tabela 7.1: Avaliação da introdução de solvente orgânico frente ao sinal obtido para ^{75}As de uma solução 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As.....	83
Tabela 7.2: Avaliação das condições da separação cromatográfica para as espécies de arsênio.....	86
Tabela 7.3: Avaliação do efeito de matriz através de curvas de calibração externa (em meio de fase móvel) e em presença de matriz (infusão de chá de flores e frutos com As total <0,46 $\mu\text{g L}^{-1}$).....	89

Tabela 7.4: Avaliação das figuras de mérito de sensibilidade (limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão para o método de determinação de espécies de arsênio em infusões de chá.	91
Tabela 7.5: Resultados obtidos para as amostras de infusões de chá cujo teor de As total foi quantificado (As total >0, 46 µg L ⁻¹).....	92
Tabela 7.6: Avaliação da estimativa de exposição à arsênio decorrente do consumo diário de uma xícara de chá por um adulto de 70 kg.	95

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1:** Montagem típica de um ICP-MS8
- Figura 5.1:** Gráficos de *escores* (a) e de *loadings* (b) para as amostras de chá analisadas. Letras diferentes indicam variedades diferentes de chá: Bl=preto, B=boldo, C=camomila, F=Flores e frutos, G=verde, L=capim cidreira, M=mate, P=hortelã, S=morango, W=branco.....51
- Figura 5.2:** Gráficos de *escores* (a) e de *loadings* (b) para as amostras analisadas de *Camellia sinensis*. Letras diferentes indicam variedades diferentes de chá: Bl=preto, G=verde e W=branco.....53
- Figura 5.3:** Gráficos de *escores* (a) e de *loadings* (b) para as amostras das demais variedades analisadas. Letras diferentes indicam variedades diferentes de chá: B=boldo, C=camomila, F=Flores e frutos, L=capim cidreira, M=mate, P=hortelã e S=morango.....55
- Figura 6.1:** Efeito do tempo de contato entre a água desionizada fervente e as amostras de chá branco (em azul), verde (em verde) e flores e frutos (em vermelho) no preparo das infusões60
- Figura 7.1:** Cromatogramas obtidos para as espécies de As ($5 \mu\text{g L}^{-1}$). Condição cromatográfica: FM $20 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pH 6,0; vazão de FM de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; coluna PRP-X100, partícula de $10 \mu\text{m}$, dimensões de $4,1 \times 250 \text{ mm}$, volume de injeção de $100 \mu\text{L}$; temperatura do forno 27°C . MMA = ácido monometil-arsônico e DMA = ácido dimetil-arsínico.....87
- Figura 7.2:** Cromatogramas obtidos para extratos fortificados com $1 \mu\text{g L}^{-1}$ das espécies de arsênio. Condição cromatográfica: FM $20 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pH 6,0; vazão de FM de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; coluna PRP-X100, partícula de $10 \mu\text{m}$, dimensões de $4,1 \times 250 \text{ mm}$, volume de injeção de $100 \mu\text{L}$; temperatura do forno 27°C . MMA = ácido monometil-arsônico e DMA = ácido dimetil-arsínico90

Figura 7.3: Cromatograma obtido para amostras de infusões de chá de capim cidreira, morango e flores e frutos. Condição cromatográfica: FM 20 mmol L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄, pH 6,0; vazão de FM de 1,5 mL min⁻¹; coluna PRP-X100, partícula de 10 μm, dimensões de 4,1 x 250 mm, volume de injeção de 100 μL; temperatura do forno 27°C. MMA = ácido monometil-arsônico e DMA = ácido dimetil-arsínico.....93

1. JUSTIFICATIVA

O chá é uma bebida tradicional, conhecida e apreciada em todo o mundo e, nos últimos anos, tem apresentado aumento em seu consumo em razão de sua composição nutricional diferenciada, incluindo minerais como Fe, Mn, K e Zn e compostos antioxidantes, como catequinas e flavonoides (Karak & Bhagat, 2010; Szymczycha-Madeja & Pohl, 2012; Flaten, 2002; Welna *et al.*, 2013). Alguns efeitos benéficos ao organismo têm sido associados ao consumo de chá, destacando-se a prevenção de várias doenças como câncer de pele, infarto de miocárdio e doença de Parkinson (Jin *et al.*, 2005), além de reduzir os níveis séricos de colesterol e o risco de diabetes tipo 2 (Pinto, 2013).

A origem desta bebida é atribuída à China e estima-se que seja consumida há cerca de 10 mil anos. As primeiras plantas chegaram à Inglaterra apenas no século XIX e, ainda hoje, a China é o único país a produzir e fabricar todas as variedades do chá de *Camellia sinensis* (Dattner, 2011), diferenciadas pelos processos aos quais as ervas são submetidas, como a desidratação e a fermentação (Silva *et al.*, 2010, Dattner, 2011).

No Brasil, o termo chá é definido na Resolução RDC 277 como “*produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não*” podendo ser adicionado de aromas ou especiarias (Brasil, 2005) sendo que as espécies vegetais e partes da planta que podem ser utilizadas para o preparo da bebida constam nas resoluções RDC 267 e RDC 219 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO/WHO), em 2010 foram consumidas cerca de três milhões de toneladas de chá no mundo, sendo quase oito mil toneladas no Brasil. Destas, cerca de seis mil toneladas são de chá preto (FAO, 2012). Assim, parte do chá consumido no país pode possuir matéria-

prima proveniente de outras localidades e, deste modo, a qualidade do chá torna-se um fator importante na segurança alimentar.

Um dos parâmetros de qualidade existente é a concentração de elementos inorgânicos e seus limites máximos permitidos são estabelecidos no país pelo Decreto 55871/1965 e pela resolução RDC nº 42/2013; na comunidade europeia, pela diretiva EC 1881/2006, e no MERCOSUL, pelo Regulamento Técnico 12/2011. Todavia, poucos são os limites máximos definidos especificamente para chá:

- Regulamento EC 1881/2006: Cádmio ($0,20 \text{ mg kg}^{-1}$) em hortaliças, ervas frescas, aipo e cogumelos *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*.
- Regulamento Técnico 12/2011 e Resolução 42/2013: categoria “chá, erva mate, e outros vegetais para infusão” para os elementos As ($0,6 \text{ mg kg}^{-1}$), Cd ($0,4 \text{ mg kg}^{-1}$) e Pb ($0,6 \text{ mg kg}^{-1}$) e categoria “bebidas analcoólicas (excluídos sucos)” para As e Pb ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$) e Cd ($0,02 \text{ mg kg}^{-1}$) (Brasil, 2013);
- Decreto 55871/1965: categoria alimentos líquidos para Se ($0,05 \text{ mg kg}^{-1}$), categoria qualquer alimento para Cr ($0,10 \text{ mg kg}^{-1}$) e Ni ($5,00 \text{ mg kg}^{-1}$)(Brasil, 1965).

A presença de contaminantes inorgânicos como, por exemplo, arsênio, cádmio e chumbo são, em geral, decorrentes da absorção dos elementos do solo, da poluição atmosférica, de equipamentos utilizados no processamento das folhas de chá (Yuan *et al.*, 2005), de aditivos, de fertilizantes e de lençóis freáticos (WHO, 2009). Em alguns casos, a forma química em que este contaminante se apresenta é determinante para sua toxidez. Um exemplo é o arsênio, cujas espécies inorgânicas (AsH_3 , As (III) e As (V)) são apontadas como as mais tóxicas, sendo estabelecido pela FAO/WHO (2015) um $\text{BMDL}_{0.5}$ (limite inferior da dose de referência para aumentar em 0,5% a incidência de câncer de pulmão) de $3,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo por dia. As espécies orgânicas, por sua vez, possuem

baixa toxidez e são encontradas em peixes e frutos do mar nas formas metiladas e como arsenobetaína. Deste modo, a especiação química mostra-se uma importante ferramenta, uma vez que permite a identificação destes compostos.

As técnicas baseadas na espectrometria atômica e espectrometria de massas são importantes para a determinação de elementos em nível traço, apresentando limites de detecção que conferem sensibilidade adequada a quantificação, amplas faixas lineares de concentração, determinações simultâneas ou sequenciais muito rápidas (Krejčová & Černohorský, 2003 e Sahan *et al.*, 2007) e a possibilidade de utilização conjunta a técnicas de separação, como a cromatografia gasosa (CG-ICP-MS) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-ICP-MS).

Alguns estudos em amostras de chá foram reportados, como o de Jin *et al.*(2005), que determinaram níveis de Pb de 0,11 a 4,55 mg kg⁻¹ em amostras de chás de *Camellia sinensis* da província de Zhejiang (China) e de Łozak *et al.* (2002), que investigaram macro e microelementos em amostras de folhas de hortelã e urtiga provenientes da Polônia, que apresentaram, em média, 2,41; 0,941 e 2,99 mg kg⁻¹ de Pb, Cr, e Ni, respectivamente, em sua composição. Entretanto, são escassos os dados relativos às amostras de chás comercializadas no Brasil, seja nas folhas ou nas bebidas preparadas a partir destas amostras.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é determinar os teores de Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn em amostras de chás comercializados no país. Para esta avaliação, foram considerados os seguintes aspectos:

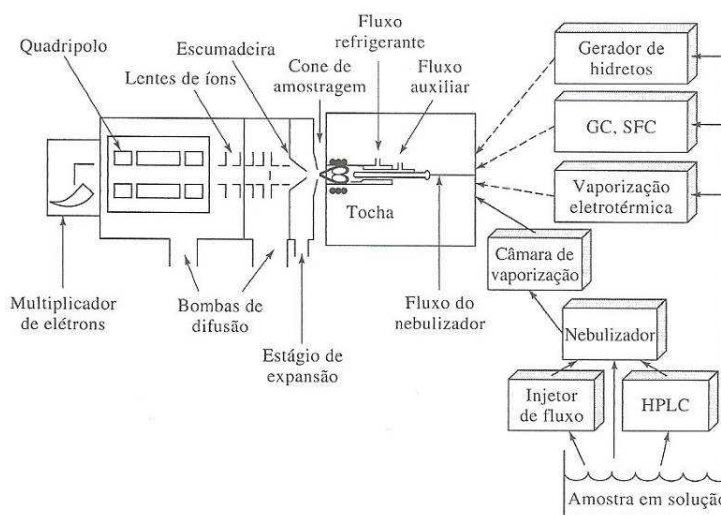
- Avaliar e aplicar um método para a determinação do teor destes elementos em amostras de chá comerciais;
- Avaliar e aplicar um método para a determinação do teor destes elementos nas bebidas preparadas pela infusão das mesmas amostras de chá comerciais;
- Avaliar e aplicar um método para o estudo de espécies de arsênio nas bebidas de chá preparadas por infusão e comparar os valores obtidos com o valor determinado para arsênio total.
- Com base nos dados obtidos, avaliar a estimativa de ingestão ou exposição a estes elementos decorrentes do consumo diário de uma xícara de chá.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 - Espectrometria de massas com plasma com acoplamento indutivo

A determinação de elementos traço em amostras de chá pode ser feita utilizando diversas técnicas espectrométricas, como a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS) (Mandiwana *et al.*, 2011); a espectrometria de absorção atômica com atomização por chama (FAAS) (Gallaher *et al.*, 2006 e Pohl & Prusisz, 2006), a espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP OES) (Fernández *et al.*, 2002 e Özcan *et al.*, 2008) e a espectrometria de massas com fonte de plasma com acoplamento indutivo (ICP-MS) (Pohl & Prusisz, 2006). As técnicas baseadas em emissão atômica são especialmente interessantes em razão de seus baixos limites de detecção, ampla faixa linear e quantificação simultânea ou sequencial rápida (Krejčová & Černohorský, 2003 e Sahan *et al.*, 2007).

Um ICP-MS típico é constituído de um sistema de introdução da amostra (nebulizador e câmara de nebulização), uma fonte de íons (plasma com acoplamento indutivo), uma interface, um conjunto de lentes iônicas, um espectrômetro de massas e um detector (Barshick, *et al.*, 2000). Uma montagem típica é apresentada na Figura 3.1



Fonte: Skoog *et al.*, 2002

Figura 3.1: Montagem típica de um ICP-MS

Apesar de a amostra poder ser introduzida no plasma na forma líquida, sólida (ablação) ou gasosa, a forma mais comum é a introdução de soluções livres de partículas (<math> < 2 \text{ mg L}^{-1}</math> de sólidos totais dissolvidos) através de nebulizadores concêntricos. Nestes, a formação do aerossol é obtida através do contato entre a amostra e um jato de argônio, onde as gotas são finamente divididas (na câmara de nebulização) e apenas as menores são carregadas para o plasma – correspondendo a cerca de 1 a 2% da amostra. O restante (>98%) é eliminado através de um dreno (Skoog *et al.*, 2002 e Thomas, 2008).

O plasma, usualmente definido como uma mistura gasosa condutora de eletricidade, consiste na fonte de íons do ICP-MS e sua formação é idêntica ao processo que ocorre no ICP OES: envolvendo a parte superior da tocha de quartzo (três tubos concêntricos com presença de fluxos de argônio de até 20 L min^{-1}), existe uma bobina de indução alimentada por um gerador de radiofrequência, que produz de 500 a 2000 W de potência com 27 ou 41 MHz de frequência; a ionização do argônio é iniciada a partir de uma centelha gerada por uma bobina Tesla e esta interação faz com que íons e elétrons dentro da bobina se espalhem pelos tubos concêntricos da tocha. Como ocorre o

aquecimento do sistema, é necessária a presença constante de um fluxo tangencial de argônio em torno das paredes internas da tocha, auxiliando também na centralização do plasma formado (Skoog *et al.*, 2002).

A interface entre a tocha, que opera à pressão atmosférica (1 atm ou 760 torr), e o espectrômetro de massas, que emprega pressões inferiores a 10^{-4} torr, é feita através de dois cones de orifícios diminutos (constituídos por níquel ou platina) e mantidos a pressão de 1 a 2 torr, com resfriamento constante. Os íons provenientes do plasma passam pelo primeiro cone, denominado cone de amostragem (ou *sampler*), que possui diâmetro interno de 0,8 a 1,2 mm. Neste estágio ocorre a rápida expansão do gás e seu consequente resfriamento. A seguir, a fração do gás passa através do segundo cone (*skimmer*), que possui orifício de diâmetro interno ainda menor (0,4 – 0,8 mm), sendo levada para as lentes iônicas, mantidas a pressão de 10^{-3} torr por uma bomba turbomolecular (Skoog *et al.*, 2002 e Thomas, 2008).

Nestas lentes, os íons positivos são separados dos elétrons e das espécies moleculares pelo emprego de potenciais negativos sendo, deste modo, focalizados para a entrada do analisador de massas. Uma estratégia utilizada para a correção de efeitos de deriva ou de instabilidade do instrumento é a padronização interna. Nesta, a escolha do padrão interno é feita a partir de um elemento ausente nas amostras e que possua massa atômica e potencial de ionização próximo ao dos analitos (Skoog *et al.*, 2002).

O analisador de massas é responsável pela separação dos íons de acordo com sua razão massa/carga (m/z), sendo quatro tipos os mais comumente encontrados: analisadores de massa de tempo de voo, quadrupolar, setor magnético de dupla focalização e aprisionamento de íons (*ICP-ion-trap-MS*) (Becker, 2007). Destes, o mais comum é o analisador do tipo quadrupolar de baixa resolução (*ICP-QMS*), em razão de seu menor custo em relação aos demais, maior robustez e alta velocidade de varredura, tornando-o aplicável às análises de rotina (Thomas, 2008).

Um quadrupolo (ou quadripolo) consiste em quatro hastes cilíndricas paralelas, com funcionamento semelhante ao de um eletrodo: as hastes opostas são conectadas eletricamente, sendo um par ligado ao lado positivo e o outro ao negativo. Para a obtenção do espectro de massas, os íons são acelerados no espaço entre as hastes (com potencial de 5 a 10 V), enquanto aumentam-se proporcionalmente as voltagens nas hastes, até que apenas os íons com a m/z selecionada atinja o detector (sendo o multiplicador de elétrons, o mais utilizado) (Skoog *et al.*, 2002). Este sistema é, em geral, limitado ao intervalo compreendido pelas massas 6 u (^6Li) e 238 u (^{238}U), sendo sua resolução de 1 u (Becker, 2007). Para obter as melhores condições de análise, os equipamentos atuais possuem etapas obrigatórias de verificação (*tunning*) que utilizam soluções contendo íons com baixa, média e alta massa atômica, e monitoram a formação de compostos com dupla carga e óxidos.

3.1.1 - Técnicas hífenadas

A sensibilidade associada às medidas por ICP-MS permitiram sua utilização conjunta a outras técnicas como, por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-ICP-MS), cromatografia gasosa (GC-ICP-MS), cromatografia por exclusão (SEC-ICP-MS), entre outras (Thomas, 2008 e Cornelis *et al.*, 2005).

Com o uso de técnicas hífenadas é possível a obtenção de informações relacionadas a diferentes estados de oxidação, como As (III) e As (V); Cr (III) e Cr (VI), diferentes formas alquiladas, como os ácidos mono e dimetilarsônicos, e biomoléculas ligadas a metais como, por exemplo, a vitamina B12 (cianocobalamina) (Thomas, 2008 e Cornelis *et al.*, 2005). Nesta configuração, o ICP-MS atua como detector do sistema cromatográfico: na análise de especiação de arsênio, por exemplo, o ICP-MS monitora apenas o sinal transiente do isótopo ^{75}As , enquanto que toda a informação sobre a separação das espécies é decorrente do sistema cromatográfico (Thomas, 2008).

Em relação à separação cromatográfica, para análises de especiação são comumente utilizadas a cromatografia de troca iônica e a cromatografia de fase reversa com par iônico. Na primeira, a separação é baseada na troca de íons (ânions ou cátions) entre a fase estacionária (coluna) e a fase móvel, tipicamente constituída por uma solução tampão. Na segunda, a fase estacionária é uma coluna de fase reversa C8 ou C18 enquanto que a fase móvel é constituída por um solvente orgânico (metanol ou acetonitrila) e um par iônico como, por exemplo, o hidróxido de tetrabutilamônio. Em ambas, a interação dos analitos com a fase móvel é determinante para a eluição, sendo o controle do pH e da concentração da fase móvel imprescindíveis para a correta separação das espécies (Thomas, 2008 e Collins & Braga, 1987).

3.1.2 - Interferências isobáricas e poliatômicas

Apesar da técnica de ICP-MS ser reconhecida por sua sensibilidade e baixos limites de detecção (Krejčová & Černohorský, 2003 e Sahan *et al.*, 2007), um de seus principais limitantes é a possibilidade de interferências espectroscópicas (isobárica, poliatômica, íons com dupla carga e por espécies de óxido e hidróxido) (Skoog *et al.*, 2002).

- Interferência isobárica: isótopos de massa atômica muito próxima como, por exemplo, $^{54}\text{Fe}^+$ e $^{54}\text{Cr}^+$, $^{40}\text{Ar}^+$ e $^{40}\text{Ca}^+$;
- Interferência por íon poliatômico: íons formados pela interação entre as espécies no plasma e espécies contidas no extrato, como $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, que podem interferir na quantificação do isótopo ^{75}As , e o dímero $^{40}\text{Ar}_2^+$ na quantificação de ^{80}Se ;
- Interferência por espécies de óxido e hidróxido: íons formados pelo analito ou outros componentes do extrato como, por exemplo, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, na quantificação de $^{57}\text{Fe}^+$.

Na Tabela 3.1 são apresentados os principais interferentes isobáricos e poliatômicos para os elementos Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn.

Tabela 3.1: Principais interferências isobáricas e poliatômicas para Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn.

Elemento	Isótopo (abundância, %)	Interferentes
Al	^{27}Al (100)	$^{12}\text{C}^{15}\text{N}^+$, $^{13}\text{C}^{14}\text{N}^+$, $^1\text{H}^{12}\text{C}^{14}\text{N}^+$
As	^{75}As (100)	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, $^{59}\text{Co}^{16}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}_2$, $^{23}\text{Na}^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}$
Ba	^{130}Ba (0,106)	$^{98}\text{Ru}^{16}\text{O}_2^+$
	^{132}Ba (0,101)	$^{100}\text{Ru}^{16}\text{O}_2^+$
	^{134}Ba (2,417)	$^{102}\text{Ru}^{16}\text{O}_2^+$
	^{136}Ba (7,854)	$^{104}\text{Ru}^{16}\text{O}_2^+$
	^{138}Ba (71,7)	$^{69}\text{Ga}_2^+$, $^{103}\text{Rh}^{35}\text{Cl}^+$, $^{98}\text{Mo}^{40}\text{Ar}^+$, $^{137}\text{Ba}^1\text{H}^+$
Cd	^{110}Cd (12,5)	$^{39}\text{K}_2^{16}\text{O}^+$
	^{111}Cd (12,8)	$^{95}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$, $^{94}\text{Zr}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{39}\text{K}_2^{16}\text{O}_2^1\text{H}^+$
	^{112}Cd (24,1)	$^{40}\text{Ca}_2^{16}\text{O}_2$, $^{40}\text{Ar}_2^{16}\text{O}_2$, $^{96}\text{Ru}^{16}\text{O}^+$
	^{113}Cd (12,22)	$^{96}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ca}_2^{16}\text{O}_2^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}_2^{16}\text{O}_2^1\text{H}$, $^{96}\text{Ru}^{17}\text{O}^+$
	^{114}Cd (28,7)	$^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$, $^{98}\text{Ru}^{16}\text{O}^+$
	^{116}Cd (7,49)	$^{100}\text{Ru}^{16}\text{O}^+$
Cr	^{50}Cr (4,35)	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}^+$, $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$, $^{35}\text{Cl}^{15}\text{N}^+$, $^{36}\text{S}^{14}\text{N}^+$, $^{33}\text{S}^{17}\text{O}^+$
	^{52}Cr (83,79)	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{37}\text{Cl}^{15}\text{N}^+$, $^{36}\text{S}^{16}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$, $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^+$
	^{53}Cr (9,51)	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$, $^{38}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{36}\text{S}^{17}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$
	^{54}Cr (2,38)	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$, $^{38}\text{Ar}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}^+$, $^{19}\text{F}_2^{16}\text{O}^+$
Cu	^{63}Cu (69,15)	$^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$, $^{47}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$, $^{23}\text{Na}^{40}\text{Ca}^+$, $^{46}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{14}\text{N}^{12}\text{C}^{37}\text{Cl}^+$, $^{16}\text{O}^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^+$
	^{65}Cu (30,9)	$^{49}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{25}\text{Mg}^+$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{32}\text{S}^{33}\text{S}^+$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{37}\text{Cl}^+$
Fe	^{54}Fe (5,82)	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}$, $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}$, $^{38}\text{Ar}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, $^{36}\text{S}^{18}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}$
	^{56}Fe (91,75)	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{38}\text{Ar}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$
	^{57}Fe (2,19)	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{40}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{19}\text{F}^+$
	^{58}Fe (0,33)	$^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$
Mn	^{55}Mn (100)	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$, $^{39}\text{K}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$, $^{38}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$, $^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{37}\text{Cl}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{23}\text{Na}^{32}\text{S}^+$

Ni	^{58}Ni (67,77)	$^{23}\text{Na}^{35}\text{Cl}^+$, $^{40}\text{Ca}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{29}\text{Si}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{17}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{23}\text{Na}^{35}\text{Cl}^+$
	^{60}Ni (26,22)	$^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{23}\text{Na}^{37}\text{Cl}^+$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$
	^{61}Ni (1,25)	$^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$, $^{45}\text{Sc}^{16}\text{O}^+$
	^{62}Ni (3,66)	$^{46}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$, $^{23}\text{Na}^{39}\text{K}^+$, $^{46}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$
	^{64}Ni (1,16)	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$, $^{32}\text{S}_2^+$
Pb	^{206}Pb (24,1)	$^{190}\text{Pt}^{16}\text{O}^+$
	^{207}Pb (22,1)	$^{191}\text{Ir}^{16}\text{O}^+$
	^{208}Pb (52,4)	$^{192}\text{Pt}^{16}\text{O}^+$
Se	^{74}Se (0,87)	$^{37}\text{Cl}^{37}\text{Cl}^+$, $^{38}\text{Ar}^{36}\text{S}^+$, $^{40}\text{Ar}^{34}\text{S}^+$
	^{76}Se (9,02)	$^{38}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$
	^{77}Se (7,58)	$^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$, $^{38}\text{Ar}_2^1\text{H}^+$, $^{12}\text{C}^{19}\text{F}^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2^+$
	^{78}Se (23,52)	$^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}^+$, $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ca}^+$
	^{80}Se (49,61)	$^{40}\text{Ar}_2^+$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_3^+$
	^{82}Se (9,19)	$^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_2$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_3^+$, $^{40}\text{Ar}_2^1\text{H}_2^+$
Zn	^{64}Zn (48,89)	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$, $^{48}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$, $^{31}\text{P}^{16}\text{O}_2^1\text{H}^+$, $^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}_2^+$, $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$
	^{66}Zn (27,98)	$^{50}\text{Ti}^{16}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{P}_2^+$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}_2^1\text{H}^+$, $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}^{17}\text{O}_2^+$, $^{33}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{32}\text{S}^{34}\text{S}^+$, $^{33}\text{S}_2^+$
	^{67}Zn (4,11)	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}_2^+$, $^{33}\text{S}^{34}\text{S}^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2^1\text{H}^+$, $^{33}\text{S}^{34}\text{S}^+$, $^{34}\text{S}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{33}\text{S}^{17}\text{O}_2^+$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}_2^+$
	^{68}Zn (18,57)	$^{36}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$, $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}_2^+$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}_2^+$, $^{34}\text{S}^{17}\text{O}_2^+$, $^{32}\text{S}^{36}\text{S}^+$
	^{70}Zn (0,62)	$^{35}\text{Cl}^{35}\text{Cl}^+$, $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$, $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^+$, $^{36}\text{S}^{17}\text{O}_2^+$, $^{34}\text{S}^{36}\text{S}^+$, $^{38}\text{Ar}^{32}\text{S}^+$

Adaptado de: May & Wiedmeyer (1998) e Software MassHunter Workstation, versão B.01.02 (Agilent Technologies Inc., 2013)

No caso de analisadores de massa quadrupolares, apenas equipamentos com alta resolução conseguem solucionar estas interferências. A espécie poliatômica $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ (74,9311u) e o isótopo $^{75}\text{As}^+$ (74,9216u), por exemplo, são satisfatoriamente quantificados nestes equipamentos, enquanto que em quadrupolos de baixa resolução apresentam-se sobrepostos.

Algumas estratégias para solucionar estes problemas são conhecidas, tais como a utilização de isótopos livres de interferência, equações matemáticas de correção,

utilização de plasma frio (*cool plasma*) e/ou células de colisão/reação. A escolha de um isótopo livre de interferências é, sem sombra de dúvidas, o procedimento mais simples a ser realizado. No entanto, esta alternativa torna-se inviável para elementos monoisotópicos ou para a utilização de isótopos de baixa abundância que levam à perda de sensibilidade do método (Becker, 2007). A utilização de plasma frio é bastante restrita, pois também leva à perda de sensibilidade do método (Thomas, 2008).

Equações matemáticas de correção para alguns isótopos são encontradas nos softwares dos equipamentos, sendo necessário o monitoramento de outros isótopos para sua correta aplicação. Um exemplo bastante usual é a quantificação de ^{114}Cd , que possui interferência do isótopo ^{114}Sn : para a correção, é necessário o monitoramento de outro isótopo do elemento estanho (^{118}Sn , por exemplo) e a correlação entre suas abundâncias (0.65%/24.23%) para que sua interferência seja “descontada” do valor encontrado para ^{114}Cd (Thomas, 2008).

A utilização de célula de colisão/reação é uma estratégia versátil às análises de rotina que permite eliminar as interferências através da discriminação de energia cinética ou massa atômica, dependendo do arranjo ou do gás utilizado (Tanner *et al.*, 2002). As células consistem em um multipolo (quadrupolo, hexapolo ou octapolo), posicionado no interior de uma interface entre as lentes iônicas e o analisador de massas. O gás hélio é comumente utilizado como gás de colisão enquanto os gases hidrogênio e amônia são recorrentes para reações (Thomas, 2008).

3.1.3 – Elementos com alto potencial de ionização

Elementos com potencial de ionização inferior a 9,0 eV são considerados 100% ionizados no plasma (Thomas, 2008). Para elementos com alto potencial de ionização como, por exemplo, o As ($P_i=9,8$ eV), alguns trabalhos na literatura descrevem que a introdução de pequena quantidade de solvente orgânico volátil aumenta sua ionização e,

consequentemente, seu sinal analítico (Kovačević & Goessler, 2005). Pettine *et al.* (2007) sugeriram em seu estudo que a presença de carbono ($P_i=11,36$ eV) aumenta o sinal analítico de arsênio (cerca de 52%) através de reações de transferência de carga:



Alguns trabalhos também atribuem este efeito à volatilidade do solvente orgânico, que melhora o transporte e a nebulização da amostra e, sob altas temperaturas (plasma), se decompõe facilmente (Kovačević & Goessler, 2005). A diminuição do íon poliatômico ($^{35}Cl^{40}Ar$) através da formação da espécie $^{12}C^{35}Cl^+$ (mais estável) com o carbono presente no solvente orgânico, também foi apontada como uma possível explicação para este fenômeno (Larsen & Stürup, 1994).

3.2 - Chá: variedades existentes

No Brasil, o chá é definido através da resolução RDC 277 (22/09/2005) como “o produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não, constantes de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. O produto pode ser adicionado de aroma e ou especiaria para conferir aroma e ou sabor.” (Brasil, 2005)

É notório o aumento das variedades de chá presente nos mercados. Se anteriormente apenas chás constituídos por uma variedade de erva eram encontrados, hoje é cada vez mais recorrente a presença de chás constituídos por misturas de ervas, flores ou mesmo frutos. Cada variedade de chá tem seu sabor definido de acordo com o processamento utilizado: oxidação, fermentação, contato com outras ervas, frutos ou mesmo especiarias (ABIR, 2010).

Um exemplo bastante conhecido são os chás branco, preto e verde constituídos apenas pela *Camellia sinensis* e diferenciados pelo tipo de processamento a que são submetidos e/ou pela idade das folhas. O chá branco é produzido a partir das folhas jovens, geralmente retiradas antes que as flores desabrochem. Em seguida, são secos de modo que não sofram quaisquer efeitos de oxidação (Silva *et al.*, 2010). Seu processo de produção é milenar, sendo que na China antiga este chá era exposto ao sol para secagem, adquirindo coloração prateada que lhe confere o título de *Yin Zhen*, em português “agulha de prata” (Dattner, 2011). O chá verde, que corresponde a 75% dos chás produzidos na China, também não é fermentado, sendo suas folhas expostas a vapor d’água com a finalidade de inativar enzimas reduzindo, assim, o processo de oxidação da folha (Silva *et al.*, 2010, Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012). O chá preto, por sua vez, passa por um extenso processo de fermentação. Primeiramente, é realizada uma etapa de desidratação das folhas e caules; em seguida, é realizada a fermentação e oxidação, com duração de cerca de 3 horas, e que permite que as folhas adquiram coloração escura. Após isto, as folhas são torradas por cerca de 20 minutos, peneiradas e acondicionadas nas embalagens (Balentine *et al.*, 1997, Dattner, 2011).

O mate, bastante difundido no sul do país e originário do Paraguai, é consumido em duas formas distintas: infusão (tostado) e chimarrão (natural). Na primeira forma, o processo de infusão é realizado apenas uma vez, enquanto que na segunda a infusão com água quente é realizada sucessivas vezes (Preedy, 2013).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através das RDC 219 (22/12/2006) e RDC 267 (22/09/2005) regulamenta as partes das plantas que são permitidas na produção do chá. Na Tabela 1.2 são apresentadas as informações relativas às variedades estudadas.

Tabela 3.2: Vegetais e suas partes aprovadas para a produção de chá

Nome comum	Nome científico	Parte do vegetal aprovada
Boldo	<i>Pneumus boldus Molina</i>	Folhas
Camomila ou Maçanilha	<i>Matricaria recutita L. e Chamomilla recutita (L.) Rauscher</i>	Capítulos florais
Capim-limão ou capim-santo ou capim-cidreira ou capim-cidró ou chá de Estrada	<i>Cymbopogon citratus Stapf</i>	Folhas
Groselha	<i>Ribes rubrum L.</i>	Frutos
Chá preto ou chá verde ou chá branco	<i>Camellia sinensis (L.) Kuntze</i>	Folhas e talos
Chicória*	<i>Cichorium intybus L.</i>	Folhas, talos e raízes
Erva-mate ou mate verde ou mate tostado	<i>Ilex paraguariensis St. Hil.</i>	Folhas e talos
Hibisco	<i>Hibiscus sabdariffa L.</i>	Flores
Hortelã ou Hortelã Pimenta ou Menta	<i>Mentha piperita L</i>	Folhas e ramos
Hortelã ou Menta ou Hortelã doce ou Menta doce	<i>Mentha arvensis L</i>	Folhas e ramos
Maçã	<i>Pyrus malus L.</i>	Frutos
Mirtilo	<i>Vaccinium myrtillus L.</i>	Frutos
Morango	<i>Fragaria spp.</i>	Frutos
Rosa silvestre ou mosqueta	<i>Rosa canina L.</i>	Frutos e flores

* Esta espécie deve ser usada de forma complementar às demais espécies vegetais previstas em Regulamento Técnico específico. Adaptado de: Resoluções RDC 219 (22/12/2006) e RDC 267 (22/09/2005) da ANVISA.

3.3 – Características dos elementos traço que podem ser encontrados em chás

Alguns elementos traço podem ser encontrados em chás, sendo que alguns possuem importância nutricional, denominados micronutrientes, como cobre, ferro, manganês e zinco; alguns não possuem caráter essencial, sendo comumente denominados contaminantes inorgânicos como alumínio, arsênio, bário, cádmio, chumbo e níquel e alguns outros apresentam comportamento dual, como o cromo e o selênio: em níveis aceitáveis são essenciais ao organismo, porém doses mais elevadas os tornam tóxicos.

A composição química típica de chá apresenta valores de até 10% para teores de resíduo mineral fixo (cinzas), sendo os minerais e os contaminantes inorgânicos seus constituintes (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012). A composição inorgânica de cada variedade é relacionada às plantas utilizadas em seu preparo, bem como à idade das folhas utilizadas: estudos apontam que folhas mais jovens possuem menores teores de alumínio e chumbo, enquanto para folhas mais velhas são relatados menores níveis de cobre e zinco (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012).

A presença de elementos traço em chás pode ser atribuída ao caráter acidófilo destas plantas, uma vez que a dissolução de metais em solos ácidos é maior quando comparada com a dissolução em solos neutros ou alcalinos (Karak *et al.*, 2010). A adsorção de alumínio, por exemplo, ocorre através de difusão passiva durante toda a vida da planta, sendo relatados maiores teores deste elemento em folhas mais velhas (Hayacibara *et al.*, 2004 e Ruan & Wong, 2001).

Em relação aos contaminantes inorgânicos, sua ocorrência é relacionada às ações antrópicas, como contaminação do solo por fertilizantes, águas poluídas pela ação industrial ou mineração, ar atmosférico próximo às grandes indústrias (WHO, 2009; Liu *et*

al., 2013). Equipamentos utilizados no processamento de chás também são apontados como fonte de contaminação das ervas (Yuan *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 1997).

As principais características dos elementos traço avaliados neste estudo são relacionadas a seguir:

Alumínio: É um dos elementos mais abundantes da crosta terrestre. Não possui caráter essencial na dieta e tem sido objeto de vários estudos, muitos em razão de sua possível associação ao desenvolvimento de doenças neurológicas, como o mal de Alzheimer (FAO/WHO, 2015).

Arsênio: É um contaminante inorgânico largamente estudado em razão de sua alta toxidez. A exposição prolongada a este elemento pode ocasionar desde conjuntivite e hiperpigmentação a doenças cardiovasculares, distúrbios no sistema nervoso e câncer de pele. (Barra *et al.*, 2000) Foi classificado pelo IARC como carcinógeno humano e sua toxicidade está relacionada a forma química em que se encontra no alimento: espécies inorgânicas (AsH₃, As (III) e As (V) são mais tóxicas em até 100x que as espécies orgânicas (MMA, DMA, arsenobetaina e arsenocolina) (FAO/WHO, 2015).

Bário: É um elemento presente em mais de 20 isótopos conhecidos, sendo em sua maioria, radioativos. No organismo humano é distribuído majoritariamente nos ossos e tecidos moles como pâncreas, cérebro, coração, rim, pulmão, etc. Alguns sintomas de exposição aguda são gastroenterite, hipertensão e arritmia cardíaca. Ainda não há dados conclusivos sobre seu caráter carcinogênico (US EPA, 2005).

Cádmio: Assim como o arsênio, o cádmio também é considerado pelo IARC um carcinógeno humano, sendo o trato gastrointestinal, o fígado e os rins suas principais vias de acumulação. Deste modo, disfunções renais são um dos principais sintomas de sua exposição prolongada (FAO/WHO, 2015).

Chumbo: Outro contaminante bastante conhecido, o chumbo encontrado em alimentos possui suas fontes principais na deposição de partículas ricas no metal no solo e nas plantas, sendo que a acumulação nestas ocorre através de águas contaminadas. É classificado pelo IARC como possível carcinógeno em humanos e tem comprovado efeito na diminuição do quociente de inteligência (QI) em crianças e aumento da pressão arterial sistólica em adultos (FAO/WHO, 2015; Liu *et al.*, 2013).

Cobre: Na forma Cu^{2+} é encontrado em plantas, onde compõe a proteína platocianina presente nos cloroplastos (essenciais em funções bioquímicas) (Cornelis *et al.*, 2005). Nos alimentos, é encontrado especialmente em fígado, pescados e crustáceos, grãos e cereais e não parece ter efeito cumulativo. Seu excesso causa vômito, diarreia, pressão baixa e alterações nos eritrócitos (FAO/WHO, 2015).

Crômio: Este elemento, assim como o selênio, apresenta comportamento dual: quando em sua forma Cr^{3+} , é classificado como micronutriente, sendo importante na síntese de proteínas, no controle dos níveis de colesterol e no metabolismo da glicose. Seu valor diário de referência definido pelo FDA é de $120\mu\text{g}/100\text{g}$ (FDA, 2013). Quando em sua forma hexavalente, é tóxico e considerado carcinógeno humano (Mandiwana *et al.*, 2011).

Ferro: É um dos quatro elementos mais abundantes (atrás apenas do oxigênio, do silício e do alumínio) e o segundo metal mais abundante na face da Terra. Seus estados de oxidação mais importantes são Fe^{2+} e Fe^{3+} e possui notória importância sobre a hemoglobina, em enzimas como citocromo (Cornelis *et al.*, 2005).

Manganês: É um micronutriente presente em alimentos, em especial de origem vegetal como arroz, farinha e chá (Cornelis *et al.*, 2005). Atua como co-fator de várias enzimas como piruvato-quinase, superóxido dismutase e xantina oxidase, importantes no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Seu excesso pode afetar o sistema

nervoso, e seu acúmulo ocorre na mesma região cerebral afetada pela doença de Parkinson (Preedy, 2013).

Níquel: É um metal presente em águas potável, por lixiviação de tubulações, e em águas naturais, por dissolução de rochas. Quando inalado, na sua forma metálica, é considerado como possível carcinógeno humano pelo IARC. No entanto, poucos dados associados à sua exposição oral estão disponíveis, sendo que alguns indicam que a exposição prolongada leva ao aumento do rim, diminuição da fertilidade e aumento na incidência de tumores (WHO, 2005).

Selênio: É um elemento de comportamento dual: em níveis aceitáveis possui importante atividade biológica, como sua associação à vitamina E (tocoferol) e à enzima GPX, porém, em altos níveis, apresenta elevada toxidez. Assim como o arsênio, sua toxidez é associada à forma química na qual se apresenta: as espécies inorgânicas são mais tóxicas em relação às espécies orgânicas (ligadas a aminoácidos como, por exemplo, a selenometionina e a selenocisteína) (Preedy, 2013).

Zinco: É encontrado principalmente em alimentos ricos em proteína, ostras, castanhas e cereais integrais. O zinco é constituinte de algumas enzimas, como peptidases, anidrase carbônica e fosfatase alcalina. Níveis elevados causam irritação gastrointestinal, como náusea, vômito e diarreia (FAO/WHO, 2015).

3.4 – Determinação dos elementos traço em chás (ervas e bebidas)

Diversos estudos sobre a presença de elementos traço em chás têm sido realizados em várias regiões do mundo. No entanto, a maioria dos estudos versa sobre amostras de chás branco, preto e verde (provenientes de *Camellia sinensis*) e, deste modo, ainda são escassos os dados para chás herbais, como boldo, camomila e hortelã,

sobretudo para amostras nacionais. Dentre estes estudos, os que foram considerados mais relevantes são relacionados a seguir.

Mehra & Baker (2007) estudaram cerca de 80 amostras produzidas em diferentes localidades (Índia, Sri Lanka e China) e algumas constituídas por misturas de ervas (*blends*) provenientes de até 35 diferentes países. Os maiores valores de alumínio e manganês foram observados para amostras provenientes da China, enquanto que nas amostras do Sri Lanka foram obtidos os maiores valores de cobre.

Tokaloğlu (2012) analisou alguns elementos traço (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Rb, Sr e Pb) por ICP-MS em amostras de ervas medicinais consumidas em Kayseri (Turquia). Neste trabalho não foram consideradas as bebidas preparadas e os valores observados mostraram a predominância dos elementos Fe, Sr e Mn.

Özcan *et al.* (2008) analisaram amostras provenientes de comércios locais da Turquia e suas bebidas preparadas pelos processos de infusão e decocção e verificaram que a extração dos elementos, em geral, foi máxima no tempo de dez minutos para ambos os processos considerados.

Em relação a amostras de chás brasileiros, destacam-se os trabalhos de Vulcano *et al.*(2008), que avaliaram níveis de Cd e Pb em amostras comercializadas na região metropolitana de Belo Horizonte, e o de Campos & Lima Filho (1996) que avaliaram vários tipos de chás utilizando a técnica de espectrometria de absorção atômica. Neste estudo, os autores estudaram tanto os teores dos metais na infusão como no resíduo formado após o preparo da mesma, verificando maior transferência quantitativa de cádmio em relação ao chumbo.

Em relação ao emprego da análise multivariada, Fernández *et al.* (2002) avaliaram elementos inorgânicos em chás preto e verde (infusões e instantâneos), usando análise de componentes principais e de discriminante linear, discriminando as bebidas comerciais (*soft drink*) das demais amostras. Kara (2009) estudou 18 amostras de variedades

diferentes de chás e usando os mesmos métodos classificou as amostras em cinco grupos.

Embora a avaliação de espécies de arsênio seja recorrente para amostras de arroz, ainda são poucos os estudos encontrados para chá. Yuan *et al.* (2007) analisaram 18 amostras de chá chinês e verificaram que as espécies inorgânicas, em especial o As (V), predominam nas bebidas de chá enquanto que para algumas amostras de ervas foi detectada a presença de espécies orgânicas (DMA e MMA). Para esta avaliação foi utilizada a técnica de cromatografia líquida hifenada a espectrometria de fluorescência atômica com geração de hidretos (LC–HG-AFS). No trabalho de Salgado *et al.* (2008), através da hifenação das técnicas de cromatografia líquida e espectrometria de emissão atômica com plasma com acoplamento indutivo (HPLC-ICP-OES), foi feita a especificação de arsênio em poucas amostras de algas, sendo que apenas a amostra de *Chlorella* apresentou a espécie DMA em sua composição.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 - Instrumentação

A quantificação dos elementos traço (Al, As total, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn) foi realizada em um espectrômetro de massas com plasma com acoplamento indutivo (ICP-MS, modelo 7700x, Agilent Technologies, Tóquio, Japão) equipado com autoamostrador integrado (I-AS), câmara de nebulização com resfriamento, detector sequencial multielementar de massas tipo octopolar e bomba peristáltica de baixa pulsação equipada com sistema *online* de introdução de padrão interno. As condições de operação otimizadas encontram-se descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Condições experimentais utilizadas na quantificação dos elementos inorgânicos nas amostras de chá.

ICP-MS	
Gerador de radio frequência (MHz)	27
Potência aplicada (W)	1550
Vazão de Ar e Ar auxiliar (L min ⁻¹)	15 e 0,9
Vazão de He (L min ⁻¹)	5 para modo <i>He</i> e 10 para modo <i>HEHe</i> *
Distância entre o plasma e o cone de Ni (mm)	10,0
Nebulizador e vazão (L min ⁻¹)	<i>Micromist</i> , 1,07
Câmara de nebulização	Quartzo, duplo passo
Temperatura da câmara de nebulização	2°C
Introdução da amostra e padrão interno	0,1 rps (0,25 e 0,04 mL min ⁻¹)
Número de réplicas	3
Tempo de integração (s)	0,3-1,0
Padrões internos	⁴⁵ Sc; ⁷² Ge; ⁸⁹ Y
Isótopos monitorados	²⁷ Al; ⁵² Cr; ⁵⁵ Mn; ⁵⁶ Fe; ⁶⁰ Ni; ⁶³ Cu; ⁶⁶ Zn; ⁷⁵ As; ⁸⁰ Se; ¹¹¹ Cd; ¹³⁸ Ba; ²⁰⁶ Pb

* modo *HEHe*, do inglês *High Energy Helium*

Para a determinação dos elementos inorgânicos Al, As (total), Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn nas bebidas preparadas pela infusão das amostras comerciais foi utilizado o método direto usando o acessório para amostragem discreta, ISIS-DS, do inglês *Integrated Sample Introduction System and Discrete Sampling* (Agilent Technologies, Tóquio, Japão) que consiste na análise em fluxo de pequena quantidade das amostras utilizando solução de HNO₃ 0,5% (v/v) como solução de limpeza do sistema. As condições de operação do ICP-MS encontram-se descritas na Tabela 4.1 e as condições utilizadas para o ISIS-DS são apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Condições utilizadas para a amostragem discreta (ISIS-DS).

ISIS-DS	
Volume do <i>loop</i> (µL)	150
Tempo para introdução da amostra (s)	20
Tempo para aquisição dos dados (s)	20
Tempo para limpeza	Durante a aquisição dos dados

A avaliação das espécies de arsênio nas amostras de chá foi feita utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência aliada à técnica de espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (HPLC-ICP-MS) sendo que, nesta configuração, o ICP-MS atua como detector do cromatógrafo. Deste modo, foi necessário otimizar as condições da separação cromatográfica (HPLC) e da aquisição dos dados (ICP-MS), as quais são apresentadas nas tabelas 4.3 e 4.4. O cromatógrafo utilizado foi o modelo 1260 Infinity LC (Agilent, Tóquio, Japão), que possui bomba binária, faixa de trabalho de até 600 bar, autoamostrador e compartimento de coluna com temperatura controlada.

Tabela 4.3: Condições otimizadas para a separação cromatográfica das espécies de arsênio

HPLC	
Coluna	PRP-X100 (Hamilton, Nevada, EUA)
Dimensões	4,1x250 mm com partícula de 10 µm
Fase móvel (FM)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (98,0%, Synth, Brasil) 20 mmol L ⁻¹ e pH 6,0
Vazão de fase móvel	1,5 mL min ⁻¹
Separação	Isocrática
Volume de injeção	100 µL
Lavagem da agulha	Automática após cada injeção
Temperatura do compartimento de coluna	Constante a 27°C
Tempo total de corrida (min)	4,0
Tempo para aquisição dos dados (s)	4,5

Tabela 4.4: Condições experimentais utilizadas para a aquisição dos dados de arsênio durante a especiação.

ICP-MS	
Gerador de radio frequência (MHz)	27
Potência aplicada (W)	1600
Vazão de Ar e Ar auxiliar (L min ⁻¹)	15 e 0,9
Vazão de He (L min ⁻¹)	10,0 (modo <i>HEHe</i>)
Distância entre o plasma e cone de Pt (mm)	4,0
Nebulizador e vazão (L min ⁻¹)	<i>Micromist</i> , 1,00
Câmara de nebulização	Quartzo, duplo passo
Temperatura da câmara de nebulização	2°C
Introdução da amostra	1,5 mL min ⁻¹ (coluna HPLC)
Aquisição dos dados	Sinal transiente
Isótopos	⁷⁵ As
Solvente orgânico (introdução <i>online</i>)	Acetona 2% (v/v)

* modo *HEHe*, do inglês *High Energy Helium*

4.2 - Reagentes

As curvas analíticas utilizadas para calibração do ICP-MS consistiram em diluições sucessivas de soluções-padrão certificadas contendo 1000 mg L^{-1} dos analitos (Merck, Darmstadt, Alemanha). Foram utilizadas duas faixas de concentração: $0,1 - 100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Se e $10-2000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para Al, Ba, Fe, Mn e Zn, ambas em meio de ácido nítrico destilado 0,2% (v/v) (destilador sub-boiling, Distillacid, Berghof, Eningen, Alemanha).

A solução de padrão interno contendo $250 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Sc, Ge e Y foi preparada pela diluição de soluções-padrão certificadas contendo 100 mg L^{-1} destes elementos (Specsol, São Paulo, Brasil), sendo utilizado o meio isopropanólico 2,5% (v/v) para As total nas amostras de ervas e meio nítrico 0,2% (v/v) para os demais elementos.

As soluções das espécies de arsênio foram preparadas a partir da dissolução dos sais: óxido de arsênio (III) (As_2O_3 99,995%, Sigma-Aldrich, Milwaukee, EUA) em solução de HCl 2% (v/v); óxido de arsênio (V) (As_2O_5 99%, Sigma-Aldrich, Milwaukee, EUA), ácido dimetil-arsínico (DMA, $\text{C}_2\text{H}_7\text{AsO}_2$ 99,0%, Sigma-Aldrich, Buchs, Suíça) e metilarsonato dissódico hexahidratado (ácido monometil-arsônico, MMA, $\text{CH}_3\text{AsNa}_2\text{O}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 99,5%, ChemService, West Chester, EUA) em água desionizada. Após o preparo, a concentração de As destas soluções foi aferida em ICP-MS.

Todas as soluções preparadas utilizaram água desionizada obtida por sistema de osmose reversa (Gehaka, São Paulo, Brasil) com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$.

4.3- Limpeza e descontaminação dos materiais utilizados

Todos os materiais utilizados nas análises deste estudo foram limpos utilizando solução detergente Extran® (Merck, Darmstadt, Alemanha). Após imersão nesta solução,

os materiais foram enxaguados em água corrente e imersos em solução de ácido nítrico 20% (v/v) por cerca de 1,5 h; sendo enxaguados com água desionizada em seguida.

Um segundo procedimento de descontaminação foi utilizado antes da realização das análises: os materiais foram mantidos em contato com solução de ácido nítrico 5% (v/v) por cerca de 2h e, em seguida, enxaguados com água desionizada. Estes procedimentos foram indispensáveis na obtenção de baixos valores de brancos analíticos.

Para as análises de espécies de arsênio, o segundo procedimento de descontaminação foi feito apenas com água desionizada, pois foi verificado que a mínima presença de ácido nítrico nos materiais causava alterações no pH final dos extratos das amostras de chá.

4.4 - Aquisição das amostras de chá

As amostras selecionadas para este estudo contemplaram algumas das variedades encontradas no comércio das regiões Sul e Sudeste do país. Para obter uma amostragem abrangente, foram adquiridas amostras de três lotes de três marcas distintas (total de 09 amostras) por variedade. As variedades escolhidas foram: chá branco, chá de boldo, chá de camomila, chá de capim cidreira, chá de hortelã, chá mate, chá misto de flores e frutos (flores de hibisco, flores e frutos de rosa silvestre, frutos de maçã, groselha e mirtilo e chicória) e chá misto com morango (frutos de morango e maçã e flores de hibisco), chá preto e chá verde.

Estas 90 amostras foram escolhidas de modo que contemplassem chás que contêm apenas ervas em sua composição como, por exemplo, camomila e capim cidreira, e outros que contêm misturas de flores e frutos, como o chá misto com morango.

4.5 - Procedimento experimental

A parte experimental deste projeto utilizou a estrutura do Laboratório de Inorgânicos do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) onde um equipamento de HPLC-ICP-MS encontra-se instalado. As determinações dos elementos inorgânicos foram divididas em três etapas principais: i) análises das amostras comerciais de chá (ervas ou sachê); ii) análises nas bebidas preparadas pela infusão destas amostras e iii) análise das espécies de arsênio nas bebidas em que o teor de arsênio total foi superior ao limite de quantificação. Em todas estas etapas, foi feita a otimização das condições de leitura, avaliação de métodos de preparo de amostra, determinação das figuras de mérito e aplicação analítica nas amostras de chá.

4.5.1 – Determinação dos elementos inorgânicos nas amostras comerciais de chá (ervas ou sachês)

4.5.1.1 – Avaliação das condições de leitura dos elementos traço no ICP-MS

Inicialmente, as leituras dos elementos foram realizadas nos três modos de operação disponíveis: sem a introdução de gás na célula de colisão/reação (modo *No Gas*), com introdução de 5,0 mL min⁻¹ de He (modo *He*) e com introdução de fluxo de He de 10,0 mL min⁻¹ (modo *HEHe*, do inglês *High Energy Helium*). As condições de análise foram selecionadas com base nos resultados obtidos para material de referência certificado (MRC) de folhas de pêssego (*Peach leaves* SRM 1547) do NIST (National Institute of Standards & Technology, Maryland, EUA).

4.5.1.2 – Avaliação das condições de preparo de amostra

Para a determinação dos elementos inorgânicos Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn nas amostras comerciais de chá foram avaliados três métodos para o preparo de amostras mediante a análise de material de referência certificado (MRC). As condições utilizadas encontram-se na Tabela 4.5. A massa de amostra utilizada foi de 200 mg e para as misturas oxidantes foi utilizado ácido nítrico concentrado (Merck, Darmstadt, Alemanha) e água desionizada.

Tabela 4.5: Condições experimentais utilizadas na avaliação dos métodos para determinação dos elementos inorgânicos nas amostras de chá.

Método	Etapa	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Mistura oxidante
A) Digestão ácida em sistema fechado com uso de micro-ondas	1	5	120	5 mL HNO ₃ + 3 mL H ₂ O
	2	2	120	
	3	10	170	
	4	15	170	
B) Digestão ácida em sistema de alta pressão	1	5	200	5 mL HNO ₃ + 3 mL H ₂ O
	2	5	200	
	3	10	320	
	4	30	320	
C) Digestão ácida em bloco digestor	1	600	100	10 mL HNO ₃

Após a digestão ácida, a solução resultante foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL, com água desionizada. As análises foram realizadas em triplicata analítica e brancos analíticos foram preparados seguindo todo o procedimento, na ausência da amostra.

A introdução *online* da solução de padrão interno foi realizada por meio da bomba peristáltica de três canais do ICP-MS em conjunto com um misturador tipo “T”: o

misturador recebe o conteúdo dos canais que contêm a amostra e a solução de padrão interno e introduz a mistura no nebulizador *Micromist*. Nesta configuração são utilizados capilares de diâmetros diferentes (1,02 mm e 0,25 mm para introdução da amostra e solução padrão, respectivamente) que resultam na diluição em cerca de 20x da solução de padrão interno e substituem a adição dos padrões internos em cada um dos extratos individualmente.

4.5.1.3 – Avaliação das figuras de mérito do método otimizado para determinação dos elementos traço nas amostras de chá

As figuras de mérito foram avaliadas conforme recomendações do INMETRO (2011).

- Sensibilidade: avaliada através dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Foram preparados 10 brancos analíticos (segundo o procedimento na ausência da amostra) e, a partir dos resultados obtidos, foram calculados $LOD=3s$ e $LOQ=10s$, onde s é a estimativa de desvio-padrão dos valores de concentração observados. Os valores obtidos foram multiplicados pelo fator de diluição utilizado no preparo da amostra (125x);
- Exatidão: avaliada através dos valores de recuperação obtidos na análise de oito repetições analíticas, em dois dias distintos, dos materiais de referência de folhas de pêssego e folhas de chá (INCT-TL-1, *Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa, Polônia*);
- Precisão: Avaliada através dos valores de coeficiente de variação (CV) obtidos na análise de oito repetições analíticas dos MRCs de folhas de pêssego e chá, em dois dias distintos.

4.5.2 – Determinação dos elementos nas bebidas preparadas pela infusão destas amostras

4.5.2.1 – Avaliação das condições de leitura das bebidas no ICP-MS

Como no método para análise das ervas, inicialmente as leituras dos elementos foram realizadas nos três modos de operação disponíveis, sendo que as condições experimentais foram selecionadas com base nos resultados obtidos em análise de amostra de infusão fortificada com os analitos. O efeito da presença da matriz foi avaliado pela comparação de curvas obtidas por adição de padrão e calibração externa.

4.5.2.2 – Avaliação das condições de preparo das infusões

As bebidas de chá foram preparadas pela infusão das amostras comerciais utilizando procedimento recomendado pela ANVISA (2010) e pelos fabricantes, considerando a proporção de consumo de um sachê de chá (cerca de 1,5 g) para 1 xícara de chá (200 mL) de água. As amostras foram pesadas em béquer, mantidas em contato com água fervente pelos tempos de 3, 5, 10 e 15 minutos, cobertas com vidro de relógio. Após este tempo, as amostras foram filtradas utilizando membrana polimérica com poro de 250 μm (doadas pelo Cereal Chocotec, do ITAL) e, após resfriamento, foram acidificadas a 0,2% com ácido nítrico concentrado. As análises foram realizadas em triplicata analítica. Avaliou-se ainda o preparo da infusão com e sem o uso do sachê.

4.5.2.3 – Avaliação das condições do método de preparo de amostras

Para a determinação dos elementos inorgânicos Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn nas amostras de infusão foram avaliados três métodos distintos para o

preparo de amostras mediante a análise de uma amostra de chá verde fortificada com os analitos ($20 \mu\text{g L}^{-1}$): análise direta (método A), diluição ácida (método B) e digestão ácida em sistema fechado com o uso de radiação micro-ondas (método C).

Para o método A, as amostras de infusão foram introduzidas diretamente no equipamento sem a utilização de etapas de preparo de amostra. No método B, as amostras foram diluídas na proporção 1:1 com solução diluída de ácido nítrico (HNO_3 0,2% v/v) e analisadas em seguida. O método C consistiu na digestão ácida da amostra em sistema fechado com uso de microondas sendo que 2,5 mL da amostra foram transferidos aos tubos de digestão (PTFE – politetrafluoroetileno) onde foram adicionados 10 mL de uma solução HNO_3 50% (v/v). O programa utilizado consistiu no aquecimento de temperatura ambiente à 160°C por 15 min, sendo mantidos nesta temperatura por 10 minutos. Após a digestão ácida, a solução resultante foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 25 mL, com água desionizada. Em todos os métodos foram preparados brancos analíticos seguindo os procedimentos com omissão da amostra e a avaliação do método de preparo de amostras foi realizada com 15 repetições analíticas.

As curvas analíticas utilizadas para calibração foram preparadas por diluições sucessivas de soluções-padrão certificadas contendo 1000 mg L^{-1} dos elementos de interesse, sendo utilizadas faixas de concentração semelhantes às da análise nas amostras de chá. A solução de padrão interno *online* contendo $250 \mu\text{g L}^{-1}$ de Sc, Ge e Y foi preparada pela diluição de soluções-padrão certificadas contendo 100 mg L^{-1} destes elementos em ácido nítrico 0,2% (v/v).

4.5.2.4 – Avaliação das figuras de mérito do método otimizado para determinação dos elementos traço nas bebidas de chá

A validação do método foi realizada baseando-se nas diretrizes do INMETRO (2011) sendo avaliados:

- Sensibilidade: avaliada através dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Foram preparados 10 brancos analíticos (para alguns elementos como Al, As, Cd e Zn, foi realizada adição dos analitos em concentração inferior à menor concentração empregada na construção da curva analítica de modo a promover resposta do equipamento) e, a partir dos resultados obtidos foram calculados $LOD=3s$ e $LOQ=10s$, onde “s” corresponde à estimativa de desvio-padrão dos valores de concentração observados. Os valores obtidos foram multiplicados pelo fator de diluição utilizado no preparo da amostra (neste caso, igual a 1 visto que a análise direta foi selecionada);
- Exatidão: Avaliada através da análise de recuperação dos analitos utilizando infusões fortificadas em três níveis de concentração: As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Se em 10, 25 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e Al, Ba, Fe, Mn e Zn em 50, 250 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$;
- Precisão: Avaliada através do coeficiente de variação obtido na análise de oito repetições analíticas da infusão de chá de morango em dois dias distintos. De modo a promover resposta analítica para todos os elementos, as infusões foram fortificadas com 25 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.5.3 – Determinação das espécies de arsênio nas infusões de chá

4.5.3.1 – Avaliação das condições de leitura de As no ICP-MS

Nesta etapa, a potência foi fixada em 1600 W, sendo escolhida a potência nominal do equipamento conforme orientações do fabricante para maximizar a resposta ao isótopo ^{75}As . Adicionalmente, foram avaliados alguns outros parâmetros permitidos pelo software do equipamento: a distância entre a tocha e o cone, a vazão do gás de nebulização e o modo de operação da cela de colisão/reação. Para esta avaliação foram escolhidas condições que apresentassem aumento da contagem de ^{75}As e que atenuassem interferências isobáricas. A avaliação do sinal analítico para ^{75}As frente ao uso de solventes orgânicos voláteis foi realizada utilizando uma solução $50\ \mu\text{g L}^{-1}$ e considerou os solventes acetona (Synth, São Paulo, Brasil) e isopropanol (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil).

4.5.3.2 – Avaliação das condições de separação cromatográfica

Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna de troca aniônica PRP-X100, com $10\ \mu\text{m}$ de tamanho de partícula e dimensões de $4,1 \times 250\ \text{mm}$ (Hamilton, Nevada, EUA) e fase móvel constituída de fosfato de amônio dibásico p.a. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (98,0%, Synth, Brasil). A separação foi avaliada utilizando uma solução contendo $5\ \mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie de arsênio, considerando-se as seguintes condições:

- Concentração da fase móvel: $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 15, 20 e $25\ \text{mmol L}^{-1}$
- pH: 5,5; 6,0 e 6,5
- Vazão da FM: 1,0 e $1,5\ \text{mL min}^{-1}$.

4.5.3.3 – Avaliação das condições de preparo de amostra para determinação das espécies de As

O preparo das infusões foi realizado como descrito anteriormente sendo mantida a proporção de 1 sachê (~1,5 g) para uma xícara de chá (200 mL). O preparo de amostras consistiu na diluição das bebidas de chá na proporção de 1:1 em fase móvel (fosfato de amônio bibásico 20 mmol L⁻¹; pH 6,0), filtração em membrana de celulose regenerada (Sartorius, Goettingen, Alemanha) de 0,2 µm e injeção no cromatógrafo a líquido.

O método proposto foi avaliado para a presença de efeito de matriz através da comparação de curvas analíticas obtidas pelo método de calibração externa e em presença de matriz.

4.5.3.4 – Avaliação das figuras de mérito do método para espécies de As

Após serem definidas as condições de análise, foram avaliadas as figuras de mérito: seletividade, sensibilidade, exatidão e precisão.

- Seletividade: avaliada utilizando os cromatogramas obtidos para soluções contendo 2,5 µg L⁻¹ de cada espécie de arsênio;
- Sensibilidade: avaliada através dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ). Foram preparados 10 brancos analíticos com adição das espécies de arsênio em concentração inferior à menor concentração empregada na construção da curva analítica, de modo a promover resposta do equipamento. A partir dos resultados obtidos foram calculados LOD=3s e LOQ=10s (sendo “s” a estimativa de desvio-padrão das concentrações calculadas para os brancos) e, então, multiplicados pelo fator de diluição utilizado no preparo da amostra (neste caso, igual a 2);

- Exatidão: Avaliada através da análise de recuperação (em triplicata analítica) para infusões fortificadas em três níveis de concentração: 0,25; 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$;
- Precisão: Avaliada através do coeficiente de variação obtido na análise de oito repetições analíticas da infusão preparada a partir do chá de flores e frutos, em dois dias distintos. De modo a promover uma resposta analítica mensurável, as infusões foram fortificadas com 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie.

5. RESULTADOS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS INORGÂNICOS NAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE CHÁ

5.1 – Avaliação das condições de leitura no equipamento de ICP-MS

Considerando todas as particularidades inerentes à técnica, a escolha dos modos de leitura e dos padrões internos foi realizada a partir da análise de uma amostra de referência de composição similar à matriz chá. O material de referência disponível foi o material certificado de folhas de pêssigo (*Peach leaves*). As condições definidas encontram-se descritas na Tabela 5.1 e os dados obtidos são apresentados nas Tabelas 5.2 e 5.3 (Método A).

Tabela 5.1: Condições definidas para a quantificação dos elementos nas amostras comerciais de chá.

Elemento	Isótopo (abundância, %)	Modo de leitura	Padrão interno	Meio
Al	²⁷ Al (100)	He	-	HNO ₃ 0,2% (v/v)
As	⁷⁵ As (100)	HEHe	⁸⁹ Y	Isopropanol 2,5% (v/v)
Ba	¹³⁸ Ba (71,7)	No Gas	-	HNO ₃ 0,2% (v/v)
Cd	¹¹¹ Cd (12,8)	No Gas	-	HNO ₃ 0,2% (v/v)
Cr	⁵² Cr (83,79)	HEHe	⁴⁵ Sc	HNO ₃ 0,2% (v/v)
Cu	⁶³ Cu (69,15)	HEHe	-	HNO ₃ 0,2% (v/v)
Fe	⁵⁶ Fe (91,75)	HEHe	⁴⁵ Sc	HNO ₃ 0,2% (v/v)
Mn	⁵⁵ Mn (100)	No Gas	⁴⁵ Sc	HNO ₃ 0,2% (v/v)
Ni	⁶⁰ Ni (26,22)	No Gas	⁴⁵ Sc	HNO ₃ 0,2% (v/v)
Pb	²⁰⁶ Pb (24,1)	No Gas	-	HNO ₃ 0,2% (v/v)
Se	⁸⁰ Se (49,61)	HEHe	⁸⁹ Y	HNO ₃ 0,2% (v/v)
Zn	⁶⁶ Zn (27,98)	No Gas	⁴⁵ Sc	HNO ₃ 0,2% (v/v)

No Gas: sem a introdução de gás na célula de colisão/reação; **He:** introdução de fluxo de 5,0 mL min⁻¹; **HEHe:** introdução de fluxo de 10,0 mL min⁻¹.

Para o elemento arsênio foi observado valor inferior ao descrito no certificado do material de referência, como pode ser verificado na Tabela 5.2. Considerando as abordagens de Kovačević & Goessler (2005), que indicam que a introdução de pequena quantidade de solvente orgânico promove o aumento do sinal analítico para elementos com alto potencial de ionização, e de Pettine *et al.* (2007), que atribuem este aumento (em cerca de 52% para As) às reações de transferência de carga entre carbono e arsênio, foi feita a avaliação do efeito da introdução de isopropanol nas leituras de arsênio. De modo a simplificar o preparo dos extratos para leitura, a introdução deste solvente foi realizada *online*, estando presente na mesma solução que contém os padrões internos.

Tabela 5.2: Avaliação da introdução de solução contendo isopropanol na quantificação de ⁷⁵As no CRM de folhas de pêssego.

	Valor CRM	Leitura em HNO ₃ 0,2% (v/v)	Leitura em isopropanol 2,5% (v/v)
As (mg kg ⁻¹)	0,060 ± 0,018	0,043±0,001	0,071±0,002
Recuperação (%)	----	71±2	118±3

Como apresentado na Tabela 5.2, foi possível verificar uma melhora significativa na recuperação de arsênio na amostra certificada, sendo observado aumento de cerca de 65% no sinal analítico. Deste modo, esta condição foi estabelecida para a leitura deste elemento.

5.2 – Avaliação do método para o preparo de amostra

A avaliação do método de preparo de amostra baseou-se na estrutura disponível no laboratório, bem como em trabalhos descritos na literatura que demonstram que a decomposição por via úmida é adequada para a determinação de elementos inorgânicos em matrizes vegetais (Vulcano *et al.*, 2008; McKenzie, *et al.*, 2010; Lv *et al.*, 2013). Deste

modo, para este trabalho foram avaliadas a digestão assistida por micro-ondas (método A), a digestão em sistema de alta pressão (método B) e a digestão em bloco digestor (método C). Na Tabela 5.3 são apresentados os resultados obtidos, usando o material de referência de folhas de pêsego. A resposta escolhida para a comparação foi o cálculo da recuperação, que consiste na razão, em porcentagem, entre o valor obtido pelo método e o valor de referência fornecido no certificado.

Tabela 5.3: Comparação de métodos para a digestão das amostras de chá utilizando o material de referência certificado *Peach Leaves* (n=3)

Resultados (mg kg ⁻¹)							
Elemento	Valor de referência	Método A	Rec*(%)	Método B	Rec*(%)	Método C	Rec*(%)
Al	249±8	268±27	108±11	212±4	97±20	182±7	73±4
As	0,060±0,018	0,071±0,002	118±3	0,0641±0,0003	107±1	0,024±0,005	40±8
Ba	124±4	127±5	102±4	119±1	96±1	133±2	107±2
Cd	0,026±0,003	0,025±0,001	97±5	0,022±0,001	83±4	0,024±0,001	92±4
Cr	1*	1,25±0,07	125±7	1,04±0,04	104±4	0,91±0,03	91±3
Cu	3,7±0,4	3,6±0,2	98±5	3,09±0,01	91±13	3,6±0,1	96±4
Fe	218±14	197±9	90±4	184±1	84±1	171±2	78±1
Mn	98±3	89±4	91±4	84±1	86±1	82±1	84±1
Ni	0,69±0,09	0,63±0,03	92±4	1,02±0,15	148±21	0,59±0,02	87±3
Pb	0,87±0,03	0,89±0,03	102±4	1,05±0,08	121±10	0,89±0,10	109±20
Se	0,120±0,009	0,112±0,007	93±6	0,083±0,002	70±2	0,094±0,004	78±3
Zn	17,9 ± 0,4	16,7 ± 1,5	94 ± 9	14,7 ± 1,1	82 ± 6	17,3±1,1	97±6

*Rec=Recuperação (razão em porcentagem entre o valor obtido e o certificado) **Método A:** Digestão ácida em sistema fechado assistido por micro-ondas; **Método B:** Digestão ácida em sistema de alta pressão (HPA); **Método C:** Digestão ácida em bloco digestor

A partir dos dados da Tabela 5.3 é possível verificar que o método A apresentou recuperações quantitativas, enquanto os métodos B e C apresentaram valores de recuperação fora da faixa de 75 a 120% considerada satisfatória por AOAC (2013) A utilização do sistema aberto (método C) levou à perda por volatilização do elemento As e

à baixa recuperação dos elementos Al e Fe. Deste modo, foi possível concluir que, para a quantificação de todos os elementos de interesse, é necessário o emprego de sistema fechado, com uso de alta temperatura e pressão (método A).

5.3 – Avaliação das figuras de mérito do método

Definidas as condições de preparo de amostra e de quantificação dos analitos, o método para a análise das amostras de chá foi validado, sendo avaliados os limites de detecção e de quantificação, a exatidão e a precisão com o uso de dois materiais de referência certificados (*Peach leaves* e *Tea leaves*), em dois dias distintos. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 5.4.

O método mostrou-se adequado para a determinação dos doze elementos traço, sendo obtidos valores próximos ao apresentado no certificado de ambos os materiais de referência. Os valores de recuperação (razão, em porcentagem, entre o valor obtido e o apresentado no certificado) foram de 77 a 118% sendo considerada satisfatória a faixa de 75 a 120% definida por AOAC (2013). A precisão (expressa em porcentagem) foi verificada através do coeficiente de variação de oito réplicas, em dias distintos. Foram observados valores inferiores a 11% para todos os elementos, sendo, em geral, inferiores a 6%, com exceção do Al, Cr e Zn. Os valores obtidos foram considerados adequados, visto que o coeficiente de variação máximo de 11% (AOAC, 2013) foi atendido. Os limites de detecção e de quantificação obtidos foram considerados adequados, sendo inferiores aos limites máximos permitidos pela legislação brasileira em chás, erva mate e outros vegetais para infusão [(As e Pb = 0,60 mg kg⁻¹; Cd = 0,40 mg kg⁻¹) (Brasil, 2013) e Cr e Ni em qualquer alimento (Cr = 0,10 mg kg⁻¹ e Ni = 5,00 mg kg⁻¹) (Brasil, 1965)].

Tabela 5.4: Resultados obtidos para as figuras de mérito do método para análise nas amostras comerciais de chá.

Elemento	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	MRC de folhas de pêsego				MRC de folhas de chá			
			Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Valor encontrado (mg kg ⁻¹)	Rec (%)	CV (%)	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Valor encontrado (mg kg ⁻¹)	Rec (%)	CV (%)
Al	2,0	6,7	249±8	268±27	108±11	10%	2290±28	2196±62	96±3	3%
As	0,005	0,018	0,060±0,018	0,071±0,002	118±3	3%	0,106±0,021	0,125±0,013	118±13	10%
Ba	0,042	0,14	124±4	127±5	102±4	4%	43,2±3,9	44,8±1,6	104±4	4%
Cd	0,001	0,004	0,026±0,003	0,025±0,001	97±5	4%	0,0302±0,0040	0,0242±0,0011	80±4	4%
Cr	0,031	0,10	1*	0,84±0,09	84±9	11%	1,94±0,22	1,48±0,04	77±2	3%
Cu	0,051	0,17	3,7±0,4	3,6±0,2	98±5	5%	20,4±1,5	21,9±1,4	107±7	6%
Fe	1,1	3,7	218±4	191±5	88±2	3%	432*	418±6	97±1	1%
Pb	0,013	0,042	0,87±0,03	0,89±0,03	102±4	3%	1,78±0,24	1,42±0,15	80±8	11%
Mn	0,032	0,11	98±3	82±4	83±4	5%	1570±11	1482±57	94±4	4%
Ni	0,019	0,064	0,69±0,09	0,63±0,03	92±4	5%	6,12±0,52	4,87±0,16	80±3	3%
Se	0,006	0,021	0,120±0,009	0,112±0,007	93±6	6%	0,076 ^d	0,087±0,006	114±8	7%
Zn	1,4	4,8	17,9±0,4	15,3±1,4	86±8	9%	34,7±2,7	27,3±1,8	79±5	7%

*Valor de referência. LOD = Limite de detecção; LOQ = Limite de quantificação; MRC = Material de referência certificado; Rec= Recuperação (valor, em porcentagem, da razão entre o valor obtido e o certificado); CV = Coeficiente de variação.

5.4 – Aplicação do método para análise das amostras comerciais de chá

Após a avaliação, o método foi aplicado às 90 amostras de chá adquiridas em comércios locais das regiões Sul e Sudeste do país. Estas amostras representam os dez tipos de chá mais consumidos no país, sendo nove amostras para cada variedade de chá (três lotes de três marcas diferentes).

Os resultados obtidos mostram grande variação dos teores desses elementos para amostras de diferentes variedades e/ou diferentes processos industriais, como no caso dos chás de *Camellia sinensis*. Os valores médios e a faixa de concentração observada são apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5: Média e faixa de concentração obtidas para os elementos traços nas amostras de chá (ervas ou sachês). Os valores referem-se a três lotes de três marcas diferentes, para cada variedade de chá.

Elemento	Chá (mg kg ⁻¹)				
	Boldo	Branco	Camomila	Capim Cidreira	Flores e frutos
Al	153 (53-254) ^c	1702 (1305-2063) ^a	513 (174-1268) ^{bc}	157 (79-450) ^c	412 (71-829) ^{bc}
As	0,064 (0,025-0,108) ^c	0,151 (0,086-0,270) ^{bc}	0,107 (0,027-0,228) ^c	0,162 (0,024-0,633) ^{bc}	0,368 (0,030-0,685) ^{ab}
Ba	30,9 (20,3-42,8) ^{def}	38,1 (25,2-48,7) ^{ode}	13,7 (5,30-25,1) ^f	20,1 (6,80-89,0) ^{ef}	66,0 (36,4-118,0) ^{ab}
Cd	0,018 (0,006-0,045) ^{cd}	0,054 (0,020-0,089) ^{bcd}	0,14 (0,090-0,251) ^b	0,12 (0,027-0,348) ^{bc}	0,062 (0,049-0,085) ^{bcd}
Cr	1,34 (0,04-2,82) ^b	1,19 (0,35-2,92) ^b	1,77 (1,23-2,98) ^b	1,58 (0,52-4,20) ^b	8,73 (0,88-24,22) ^a
Cu	3,1 (2,6-3,5) ^e	19,3 (14,1-34,5) ^a	9,2 (7,7-11,6) ^{cd}	6,2 (3,5-13,3) ^{de}	6,8 (5,3-8,8) ^{de}
Fe	139 (60-283) ^d	231 (134-426) ^{bcd}	356 (164-565) ^{bc}	153 (87-422) ^{cd}	431 (121-766) ^b
Mn	111 (83-140) ^b	1169 (1007-1264) ^a	57 (46-73) ^b	88 (33-216) ^b	225 (118-554) ^b
Ni	0,66 (0,50-1,06) ^d	4,22 (3,65-4,72) ^{ab}	0,96 (0,40-1,78) ^d	0,44 (0,24-0,64) ^d	1,72 (0,44-3,37) ^{cd}
Pb	0,15 (0,06-0,25) ^c	1,45 (0,29-2,85) ^a	0,35 (0,16-0,62) ^c	0,50 (0,13-1,17) ^{bc}	1,18 (0,12-2,49) ^{ab}
Se	0,032 (0,024-0,051) ^c	0,105 (0,040-0,183) ^{ab}	0,047 (0,026-0,066) ^{bc}	0,060 (<0,021-0,214) ^{bc}	0,12 (0,023-0,236) ^a
Zn	15 (11-16) ^d	30 (25-34) ^c	24 (18-36) ^{cd}	20 (15-29) ^{cd}	23 (19-30) ^{cd}
Elemento	Hortelã	Mate	Morango	Preto	Verde
Al	990 (681-1451) ^b	542 (367-690) ^{bc}	250 (144-483) ^c	1872 (750-3937) ^a	2219 (1613-3468) ^a
As	0,160 (0,088-0,199) ^{bc}	0,062 (0,026-0,100) ^c	0,250 (0,030-1,041) ^{abc}	0,021 (<0,018-0,048) ^c	0,042 (0,029-0,063) ^c
Ba	25,5 (22,0-30,6) ^{def}	75,2 (60,9-89,3) ^a	46,0 (24,5-73,5) ^{bcd}	56,9 (28,7-87,4) ^{abc}	68,0 (53,8-101,0) ^{ab}
Cd	0,039 (0,027-0,077) ^{cd}	0,572 (0,246-0,774) ^a	0,039 (0,024-0,053) ^{cd}	0,013 (0,010-0,020) ^d	0,013 (<0,004-0,019) ^d
Cr	3,31 (2,37-4,59) ^b	1,87 (0,80-3,91) ^b	3,79 (0,86-16,89) ^{ab}	1,46 (0,16-3,38) ^b	1,67 (1,02-2,33) ^b
Cu	14,8 (13,1-19,9) ^b	11,0 (9,5-12,2) ^{bc}	4,1 (3,4-4,9) ^e	12,1 (11,2-12,8) ^{bc}	12,4 (11,0-15,7) ^{bc}
Fe	995 (799-1198) ^a	280 (103-437) ^{bcd}	217 (135-465) ^{cd}	94 (72-136) ^d	151 (61-252) ^d
Mn	90 (72-112) ^b	1405 (1155-1811) ^a	131 (108-151) ^b	1123 (108-1960) ^a	1323 (1118-1642) ^d
Ni	1,79 (1,30-2,18) ^{cd}	2,98 (2,14-4,12) ^{bc}	1,22 (0,92-1,51) ^d	3,53 (0,88-6,04) ^{ab}	4,64 (3,09-8,02) ^a
Pb	0,71 (0,54-0,95) ^{bc}	0,39 (0,14-0,82) ^c	0,57 (0,14-1,87) ^{bc}	0,16 (0,13-0,20) ^c	0,20 (0,05-0,37) ^c
Se	0,064 (0,048-0,108) ^{bc}	0,053 (0,025-0,113) ^{bc}	0,059 (0,025-0,150) ^{bc}	0,075 (0,046-0,145) ^{abc}	0,069 (0,051-0,107) ^{abc}
Zn	24 (21-26) ^{cd}	81 (40-105) ^a	15 (12-18) ^d	21 (17-25) ^{cd}	20 (17-22) ^{cd}

^{a,b,c,d,e,f} Médias com a mesma letra entre diferentes colunas não diferem significativamente ao nível de confiança de 95%, de acordo com o teste de Tukey.

A partir da análise de variância e do teste de Tukey, percebe-se que há variação significativa ao nível de 95% de confiança entre os teores observados para os elementos traço nas diferentes variedades de chá. Em relação aos chás provenientes de *Camellia sinensis*, percebe-se uma nítida diferença entre os chás que possuem um número maior de etapas em seu processamento (verde e preto) e o chá branco, que possui um número menor de etapas e não inclui fermentações em sua produção. Ainda para esta variedade, foi observada uma baixa variação entre as amostras de chá preto e verde, comportamento também verificado por McKenzie *et al.* (2010) em seu estudo com amostras provenientes da Espanha.

A concentração de Al nas amostras comerciais variou de 53 a 3937 mg kg⁻¹. Os maiores valores foram observados nas amostras de chá verde (3468 mg kg⁻¹) e preto (3937 mg kg⁻¹), os quais não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança. Este elemento tem sido objeto de alguns estudos em razão de sua possível contribuição ao desenvolvimento da doença de Alzheimer, como reportado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011). Os valores observados neste estudo foram superiores aos descritos nos trabalhos de Cao *et al.* (2010), que reportaram valores entre 390 e 980 mg kg⁻¹ em amostras de chá chinês, e de Mehra & Baker (2007), que em amostras de *Camellia sinensis* relataram níveis entre 458 e 605 mg kg⁻¹; 712 e 1092 mg kg⁻¹; 1053 e 1307 mg kg⁻¹ para amostras provenientes da Índia, Sri Lanka e China, respectivamente.

Os níveis observados para níquel nas amostras de chás branco, verde e preto foram similares aos observados por Malik *et al.* (2008) que analisaram amostras provenientes da República Tcheca e encontraram valores de até 9,35 mg kg⁻¹ em amostras de chá verde. No entanto, para os elementos ferro e manganês, observou-se valores maiores neste estudo, variando de 61 a 987 para Fe e 108 a 1960 mg kg⁻¹ para Mn.

Os níveis de Ba em chás branco, preto e verde (*Camellia sinensis*) foram ligeiramente superiores aos verificados por Nookabkaew *et al.* (2006), com valores médios variando entre 35,3 a 68,0 mg kg⁻¹. Por outro lado, os valores observados para Se foram menores, variando de 0,040 a 0,18 mg kg⁻¹.

Por outro lado, poucos estudos reportados na literatura abordaram as demais variedades. Malik *et al.* (2008) quantificaram macro e micronutrientes em mate e outras plantas estimulantes da República Tcheca e observaram valores concordantes com os deste estudo como Fe (83,4 - 88,1 mg kg⁻¹), Cu (7,98 - 12,7 mg kg⁻¹), Mn (309 - 114 mg kg⁻¹) e Ni (1,95 - 3,10 mg kg⁻¹), para outros elementos, como Al e Zn, maiores níveis (em cerca de 2,5x) foram observados neste estudo. Arpadjan *et al.* (2008) determinaram os contaminantes As, Cd e Pb em amostras de camomila e hortelã comercializadas na Bulgária e verificaram níveis superiores aos deste estudo. Foram reportados níveis de até 2,580 e 0,256 mg kg⁻¹ de Pb e Cd, respectivamente em amostras de hortelã e 0,124 mg kg⁻¹ de As em amostras de camomila. Aldars-García *et al.* (2013) estudaram amostras de chás comercializadas em Madri (Espanha) e obtiveram valores próximos aos deste estudo para Fe (133,8 mg kg⁻¹), Cu (20,3 mg kg⁻¹), Mn (47,8 mg kg⁻¹) e Zn (30,8 mg kg⁻¹) em amostras de capim cidreira.

É digna de nota a predominância dos elementos bário e manganês nas amostras de chás que contêm frutos em sua composição (flores e frutos e morango). Para estes elementos, foram observados valores de até 66 mg kg⁻¹ para Ba e 225 mg kg⁻¹ para Mn. Estes valores concordam com o estudo de Khan *et al.* (2010), que revelou a presença de altos valores de Mn em morangos provenientes do Paquistão, com média de 3,39 mg kg⁻¹. Estes elementos também foram decisivos na classificação destas variedades de chá, abordada com maiores detalhes na seção 5.6.

As diferenças observadas entre as amostras provenientes do Brasil e de outros países pode ser resultado da diferença da idade das folhas (novas ou velhas),

composição do solo, incidência de chuvas ou mesmo altitude (Malik *et al.*, 2008). Infelizmente, a informação sobre a origem das ervas é muitas vezes desconhecida uma vez que amostras comerciais são constituídas de mistura de ervas de diferentes localidades.

Em relação aos contaminantes cujos limites são estabelecidos pelas legislações Brasileiras e do MERCOSUL: As ($0,6 \text{ mg kg}^{-1}$), Cd ($0,4 \text{ mg kg}^{-1}$), e Pb ($0,6 \text{ mg kg}^{-1}$) em chá, erva mate e outros vegetais para infusão (Brasil, 2013), algumas amostras destes estudo apresentaram níveis acima do permitido (Tabela 5.5).

Valores acima do permitido para Pb foram verificados em praticamente todas as variedades de chá: branco (67%), camomila (11%), capim cidreira (33%), flores e frutos (66%), hortelã (78%), mate (11%) e morango (33%). Valores altos de Pb também foram encontrados no estudo realizado por Nookabkaew *et al.* (2006) em amostras de *Camellia sinensis* provenientes da Tailândia, China, Japão, Sri Lanka, Índia e Indonésia, onde foram verificados valores de até $53,89 \text{ mg kg}^{-1}$. Os níveis deste estudo são compatíveis como o reportado por Seenivasan *et al.* (2008) em amostras de chá preto da Índia, sendo verificados valores de $0,04$ a $1,36 \text{ mg kg}^{-1}$.

Em relação aos níveis observados para arsênio, apenas as amostras de chás de capim cidreira (11%), flores e frutos (33%) e morango (22%) apresentaram valores acima do permitido pelas legislações do Brasil e MERCOSUL (Brasil, 2013). Em geral, os níveis foram superiores aos encontrados por Nookabkaew *et al.* (2006), sendo seu valor máximo reportado em chás de *Camellia sinensis* ($0,238 \text{ mg kg}^{-1}$). Para cádmio, apenas as amostras de chá mate (89%) apresentaram valores acima do permitido por estas legislações. No entanto, no estudo de Seenivasan *et al.* (2008) valores de até $0,69 \text{ mg kg}^{-1}$ foram observados em chás preto.

Em relação aos níveis obtidos para Ni, apenas as variedades preto (22%) e verde (33%) apresentaram valores superiores ao estabelecido pelo Decreto 55871 (Brasil,

1965). Valores superiores para cromo, no entanto, foram observados para praticamente todas as amostras (98%) visto que o limite previsto para qualquer alimento é de 0,10 mg kg⁻¹ (Brasil, 1965). Sendo cromo também considerado um micronutriente (Brasil, 2003), este valor estabelecido em 1965 pode estar desatualizado. No entanto, valores superiores a este limite são encontrados na literatura. Mandiwana *et al.* (2011) estudando espécies de cromo em chás da África do Sul, reportaram níveis de até 10,30 mg kg⁻¹ na variedade chá preto.

A toxicidade destes elementos, em especial arsênio, cádmio e chumbo, é bastante conhecida, sendo seus principais efeitos associados ao sistema nervoso central (FAO/WHO, 2015). Deste modo, é importante o monitoramento e ações que visem à diminuição de seus níveis nas amostras de chá.

5.5 – Análise multivariada

A análise multivariada, pertencente à quimiometria, consiste em uma área de estudo dedicada à análise de dados provenientes de medidas químicas de natureza multivariada. Dentre os diferentes métodos existentes, destaca-se a análise de componentes principais (PCA). Neste método, algoritmos matemáticos são aplicados à matriz contendo os dados originais, modificando seu sistema de coordenadas (denominadas componentes principais), o que propicia a visualização da natureza das amostras utilizando poucas dimensões (Ferreira *et al.*, 1999). Nesta etapa do trabalho, o principal objetivo foi aplicar a PCA aos resultados obtidos para os elementos inorgânicos presentes nas amostras de chás (ervas ou sachês), comercializados no Brasil, avaliando a classificação das amostras com base em sua composição inorgânica.

Para a PCA foi utilizado o software Pirouette (Infometrix, Woodinville, WA, EUA) e os resultados obtidos foram dispostos em uma matriz (90x12) sendo as linhas

correspondentes aos valores médios dos elementos inorgânicos nas amostras de chá (erva ou sachê) e as colunas, aos elementos inorgânicos. O autoescalamento foi a técnica de pré-processamento escolhida de modo que todas as variáveis tivessem a mesma contribuição (peso) na construção do modelo. Os gráficos de *escores* (amostras) e *loadings* ou pesos (elementos inorgânicos) são apresentados na Figura 5.1.

As componentes principais (PC ou *factor*) PC1 (30,8%) e PC3 (16,1%) foram as que melhor classificaram as amostras de chás e juntas explicam 46,9% da variância total. A PC1 está relacionada aos elementos Mn (0,4973), Ni (0,4755), Al (0,3901), Ba (0,3554) e Cu (0,3379) enquanto que a PC3 é relacionada a Cd (0,6382), Zn (0,5744) e Al (-0,3781) sendo os valores dos *loadings* informados entre parêntesis. O resíduo e a distância de *Mahalanobis* foram avaliados e nenhuma das amostras foi considerada *outlier*.

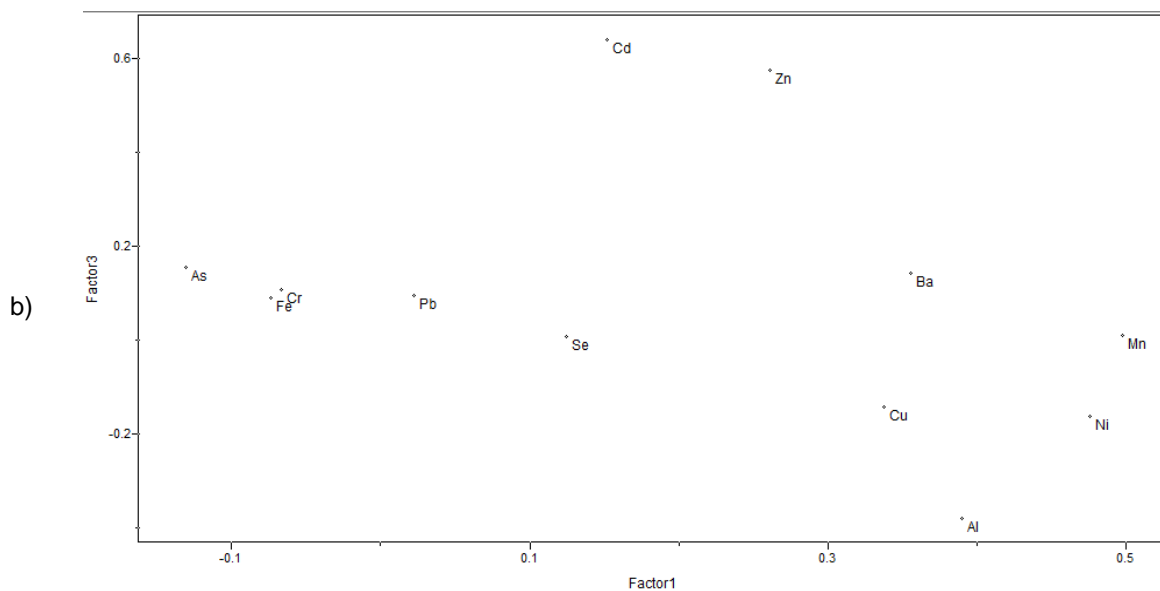
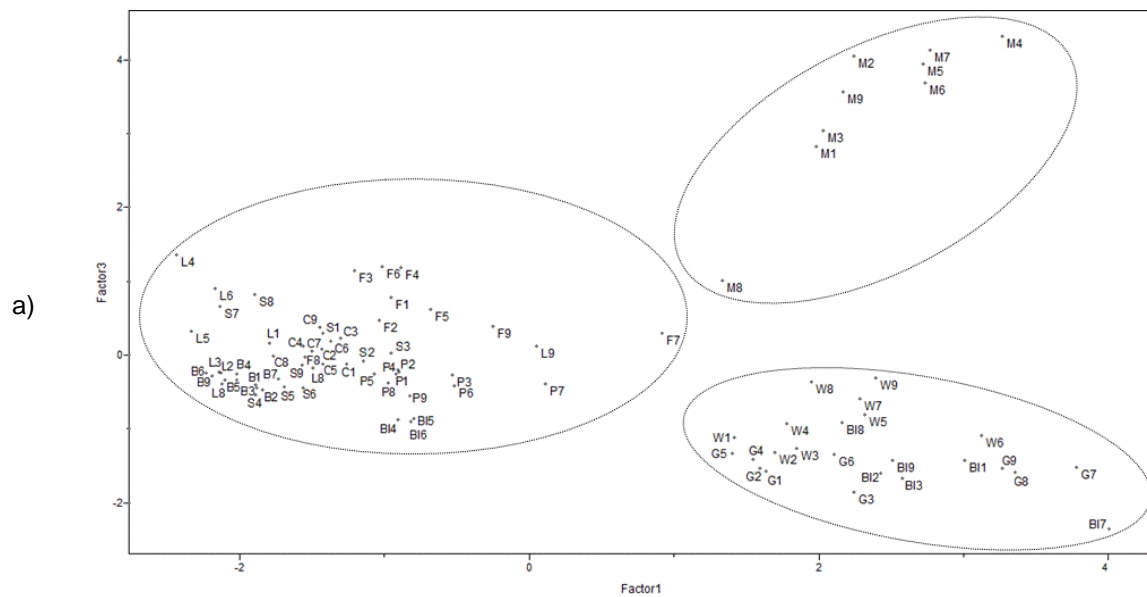


Figura 5.1: Gráficos de *escores* (a) e de *loadings* (b) para as amostras de chá analisadas. Letras diferentes indicam variedades diferentes de chá: BI=preto, B=boldo, C=camomila, F=Flores e frutos, G=verde, L=capim cidreira, M=mate, P=hortelã, S=morango, W=branco

Através da Figura 5.1, observa-se que a PCA permitiu a classificação de três grupos distintos de amostras: um grupo constituído apenas pelas amostras de chás de

Camellia sinensis (preto, verde e branco), que apresentaram maiores valores de Al, Cu, Ni e Mn (elementos que apresentam altos *loadings* na PC1); outro contendo apenas as amostras de chá mate, que apresentaram os mais altos valores para Cd e Zn (*loadings* positivos em PC3) e os baixos valores de Al (*loading* negativo em PC3); e um último que contém as demais amostras que, em relação ao número total de variedades analisadas, apresentam composição inorgânica similar.

A partir destas informações, duas novas classificações foram propostas: uma contendo apenas as amostras de chás provenientes de *Camellia sinensis* (preto, verde e branco) e outra contendo os chás que apresentaram composição similar quando comparados ao todo: boldo, camomila, capim cidreira, flores e frutos, hortelã e morango. Os dados obtidos são apresentados nas Figuras 5.2 e 5.3. Para estas classificações, o autoescalamamento foi utilizado como método de pré-processamento dos dados, o resíduo e a distância de *Mahalanobis* foram avaliados e, novamente, nenhuma das amostras foi considerada *outlier*.

Para a classificação apresentada na Figura 5.2, foram utilizadas duas componentes principais, PC1 (46,3%) e PC2 (29,4%) que juntas explicam 75,7% da variância total. Nesta classificação a PC1 é relacionada aos elementos Cd (0,4120), Pb (0,4074), As (0,3967), Zn (0,3420), Cu (0,3425) e Fe (0,3298), enquanto que a PC2 é relacionada a Mn (0,4876), Cr (0,4559), Ni (0,4384), Al (0,3925) e Ba (0,3949) sendo os *loadings* informados entre parêntesis. Dois grupos distintos foram observados: um composto apenas pelas amostras de chá branco, que apresentou maiores valores de As, Cd, Cu, Fe, Pb e Zn (elementos que apresentam altos *loadings* na PC1) e outro contendo as amostras de chá verde e preto, com maiores valores de Mn, Cr e Ni (elementos que apresentaram altos *loadings* na PC3). Esta observação é concordante com o estudo de McKenzie *et al.* (2010). Neste estudo, que considerou amostras de chás provenientes da

Espanha, tampouco foi observada distinção entre estes dois tipos de chá através da sua composição de elementos inorgânicos.

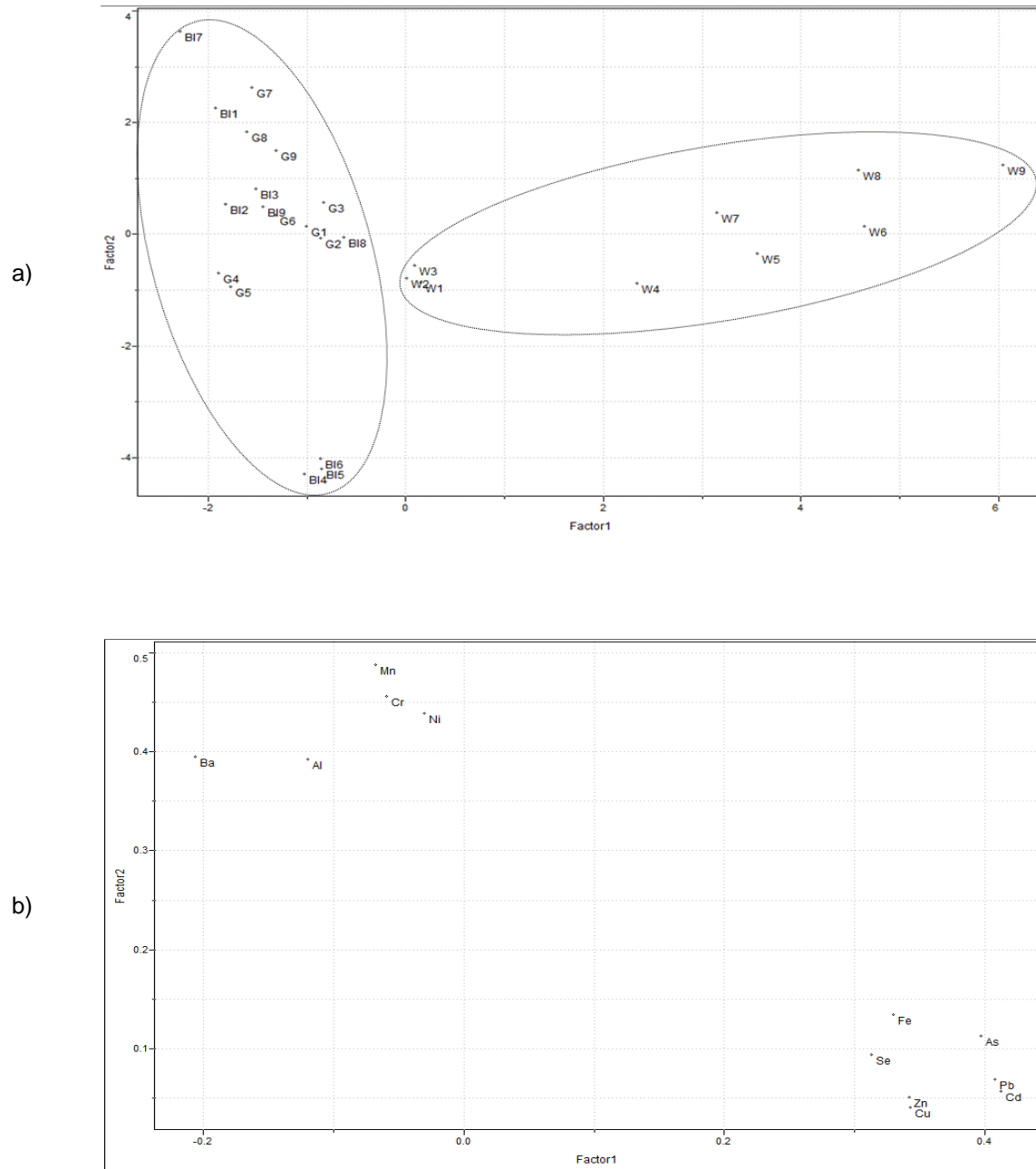


Figura 5.2: Gráficos de escores (a) e de loadings (b) para as amostras analisadas de *Camellia sinensis*. Letras diferentes indicam variedades diferentes de chá: BI=preto, G=verde e W=branco

Na Figura 5.3 é possível observar a classificação das variedades dos chás flores e frutos, morango, boldo, capim cidreira, camomila e hortelã em cinco grupos distintos. Nesta classificação foram utilizadas duas componentes principais, PC1 (35,2%) e PC2 (21,7%) que juntas explicam 56,8% da variância total dos dados. A PC1 é relacionada aos elementos Fe (0,3818), Ni (0,3588), Se (0,3519), Al (0,3458), Pb (0,3404), Cu (0,3081) e Cr (0,3003) enquanto que a PC2 é relacionada a Cu (-0,4312), Ba (0,4149), Mn (0,3856), Al (-0,3552) e Fe (-0,3209) sendo os *loadings* informados entre parêntesis.

No primeiro grupo são observadas, majoritariamente, as amostras de chás que contêm frutos em sua composição (flores e frutos e morango), as quais apresentaram os maiores valores dos elementos traço As, Ba e Mn, cujos valores de *loading* são altamente positivos em PC2.

As amostras de chá de hortelã constituem um segundo grupo, onde predominam os elementos Al, Cu e Fe, que possuem *loadings* altamente positivos em PC1, enquanto que as amostras de camomila apresentam predominância do elemento Zn, de *loading* também positivo em PC1.

As amostras de chá de boldo, camomila e capim cidreira constituem, majoritariamente, os três outros grupos. Nestes três grupos predominam a influência do baixo teor do elemento Cd (escore negativo -0,0690, em PC1) e, embora estejam satisfatoriamente separados, não é possível atribuir precisamente a qual(is) elemento(s) a classificação se deve, uma vez que estes grupos se encontram próximos à origem das componentes principais. (Morgano *et al.*, 1999)

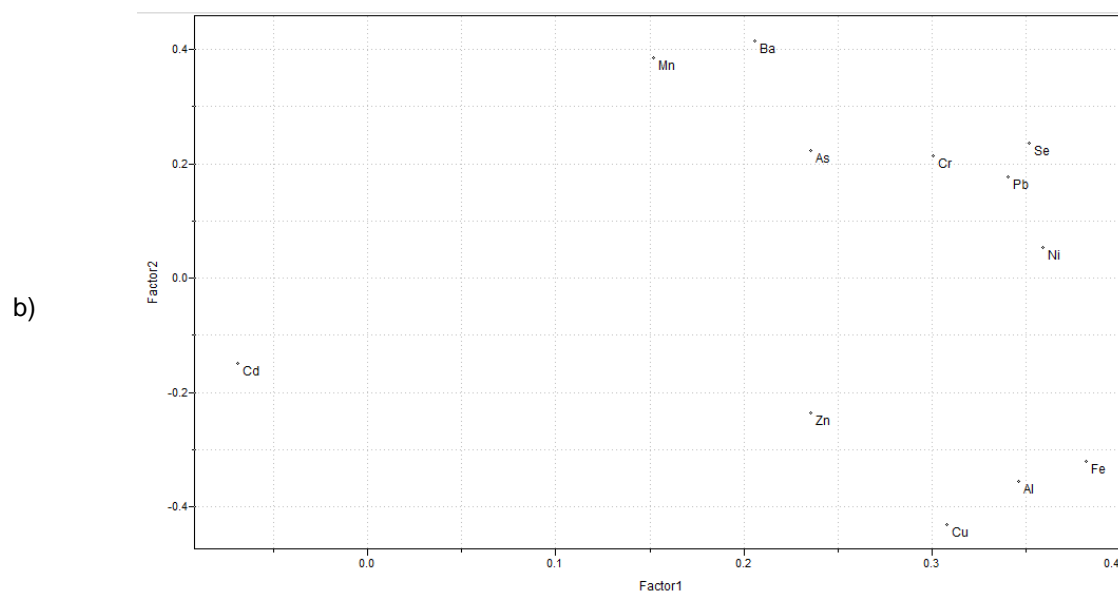
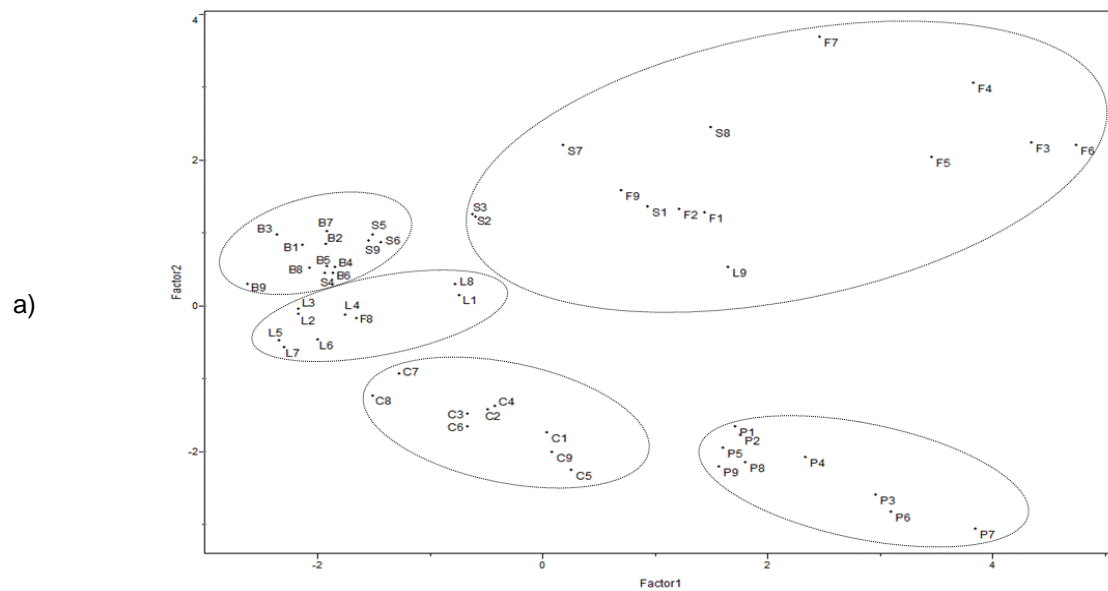


Figura 5.3: Gráficos de *escores* (a) e de *loadings* (b) para as amostras das demais variedades analisadas. Letras diferentes indicam variedades diferentes de chá: B=boldo, C=camomila, F=Flores e frutos, L=capim cidreira, M=mate, P=hortelã e S=morango

6. RESULTADOS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DOS ELEMENTOS NAS BEBIDAS PREPARADAS PELA INFUSÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS.

6.1 – Otimização das condições de quantificação dos elementos traço

A análise das bebidas preparadas pela infusão das amostras comerciais possui algumas particularidades que as diferencia da análise nas ervas:

- A possibilidade do uso de um método sem etapas de preparo de amostra é vantajosa no que tange o tempo de análise e o baixo uso de reagentes químicos, porém, a presença da matriz pode ocasionar interferências isobáricas uma vez que a matéria orgânica não é eliminada (Nardi, 2009);
- Os teores esperados para os elementos traço são muito inferiores ao presente nas folhas. Deste modo, é necessária a utilização de condições que levam a um método de alta sensibilidade.

Levando em consideração o exposto no item 3.1, as condições para quantificação priorizaram os isótopos abundantes e modos que eliminassem possíveis interferências como, por exemplo, de carbono ($^{12}\text{C}^{40}\text{Ar}^+$ em $^{52}\text{Cr}^+$), oxigênio ($^{16}\text{O}^{40}\text{Ar}^+$ em $^{56}\text{Fe}^+$) e cloreto ($^{35}\text{Cl}^{40}\text{Ar}^+$ em $^{75}\text{As}^+$) (Tanner *et al.*, 2002 e Skoog *et al.*, 2002). A escolha dos modos de leitura e padrões internos foi feita a partir da análise de uma amostra de bebida de chá fortificada ($20 \mu\text{g L}^{-1}$), de modo a fornecer sinal analítico para todos os elementos. As condições definidas encontram-se descritas na Tabela 6.1.

Tabela 6.1: Condições definidas para a quantificação dos elementos nas infusões de chá.

Elemento	Isótopo (abundância, %)	Modo de leitura	Padrão interno
Al	²⁷ Al (100)	He	⁷² Ge
As	⁷⁵ As (100)	HEHe	⁸⁹ Y
Ba	¹³⁸ Ba (71,7)	He	⁷² Ge
Cd	¹¹¹ Cd (12,8)	No Gas	⁷² Ge
Cr	⁵² Cr (83,79)	He	-
Cu	⁶³ Cu (69,15)	No Gas	⁷² Ge
Fe	⁵⁶ Fe (91,75)	HEHe	⁷² Ge
Mn	⁵⁵ Mn (100)	He	⁷² Ge
Ni	⁶⁰ Ni (26,22)	He	-
Pb	²⁰⁶ Pb (24,1)	HEHe	⁷² Ge
Se	⁸⁰ Se (49,61)	HEHe	-
Zn	⁶⁶ Zn (27,98)	He	⁷² Ge

No Gas: sem a introdução de gás na célula de colisão/reação; **He:** introdução de fluxo de 5,0 mL min⁻¹; **HEHe:** introdução de fluxo de 10,0 mL min⁻¹.

6.2 – Avaliação do modo de preparo da infusão

Na literatura são encontrados estudos de bebidas de chá utilizando variados procedimentos de preparo. Yuan *et al.* (2007) determinaram espécies de arsênio em amostras de chá a partir de infusões de 1,0 g de erva em 10mL de água fervente pelo tempo de 30 minutos. Gomez *et al.* (2007) em seu estudo com amostras provenientes da Argentina, utilizaram a proporção de 5,0 g de erva em 200 mL de água fervente, também por 30 minutos, enquanto Emekli-Alturfan *et al.* (2009) prepararam a bebida a partir de um sachê de chá em 100 mL de água fervente, por 5 minutos. No Brasil, algumas recomendações para o preparo são fornecidas pela ANVISA (2010) e pela maioria dos fabricantes de chá: preparo da bebida considerando a proporção de um sachê de chá (cerca de 1,5 g) para uma xícara de chá (200 mL) de água fervente, pelo período de 2-3 minutos.

No entanto, alguns trabalhos relatam que as maiores taxas de extração de elementos inorgânicos ocorrem nos primeiros 5 minutos de infusão (Szymczycha-Madera *et al.*, 2012). A fim de verificar este comportamento, foram avaliadas infusões de três tipos de chá (chá branco, verde e flores e frutos) em diferentes tempos de infusão (3, 5, 10 e 15 minutos). Os resultados obtidos encontram-se na Figura 6.1.

A partir dos gráficos obtidos, observa-se um comportamento aproximadamente linear para a maior parte dos analitos, sendo que para os elementos As, Cd, Pb e Se não são apresentados os gráficos em função da sua baixa porcentagem de extração (abaixo do limite de quantificação do método). Os tempos de três e cinco minutos, em geral, apresentam o máximo de extração dos elementos, demonstrando que o tempo de 3 minutos recomendado pela ANVISA é adequado ao preparo da bebida.

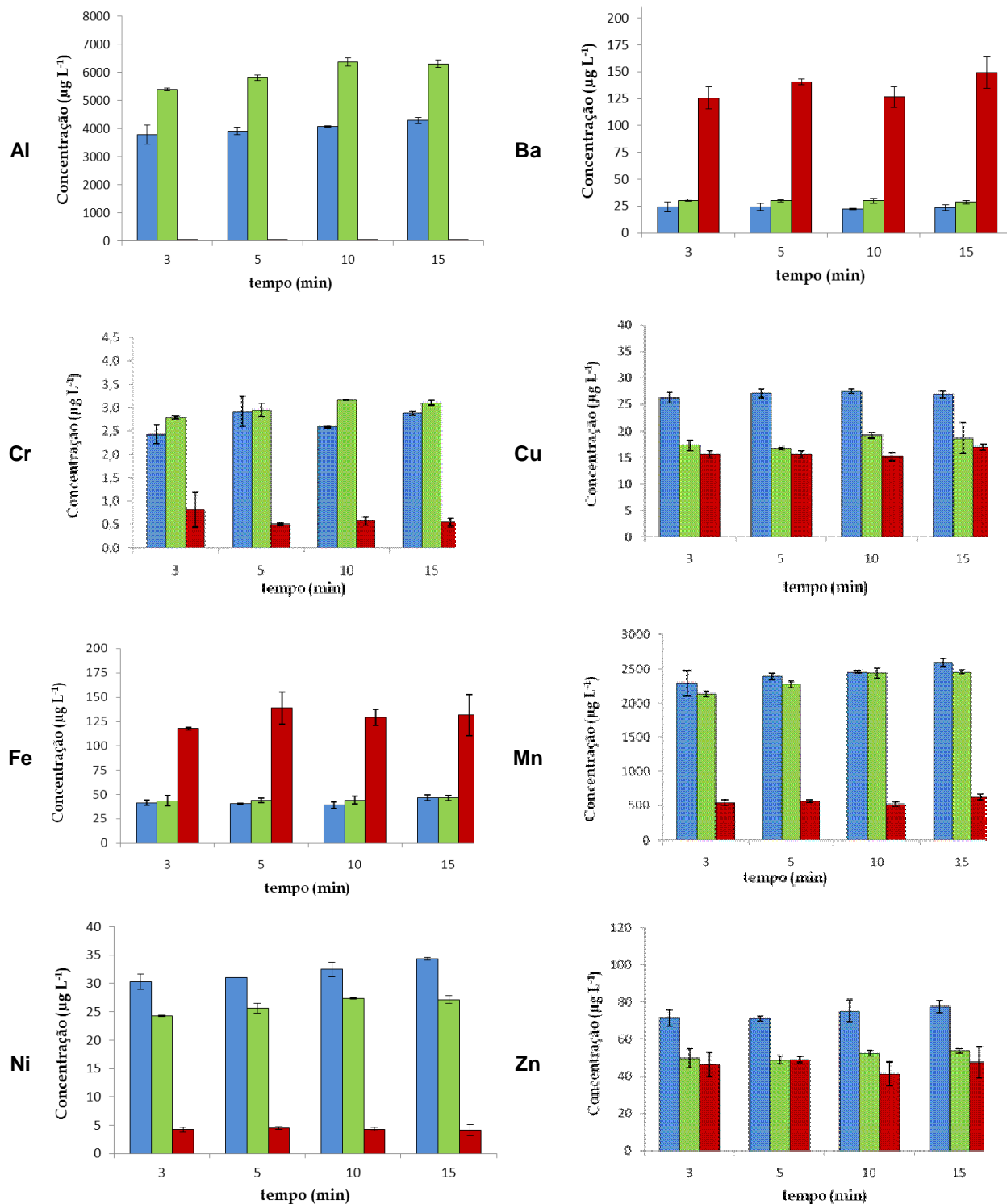


Figura 6.1: Efeito do tempo de contato entre a água desionizada fervente e as amostras de chá branco (em azul), verde (em verde) e flores e frutos (em vermelho) no preparo das infusões.

Ainda em relação ao modo de preparo das infusões de chá, algumas variedades apresentam duas formas de comercialização: ervas (sem a presença de sachês) e sachês, que contêm em média 1,5 g. De modo a verificar a influência do sachê no preparo da bebida, foram preparadas infusões de chá preto (constituído apenas por *Camellia sinensis*) e chá de flores e frutos (mix que contém flores e frutos em sua composição) na presença e na ausência do sachê. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.2.

Tabela 6.2: Avaliação do efeito do uso do sachê no preparo das infusões de chá

Elemento	Chá preto		Chá flores e frutos	
	Preparo sem sachê	Preparo com sachê	Preparo sem sachê	Preparo com sachê
Al	2374±167	2319±223	119±11	110±1
As	<0,46	<0,46	1,55±0,04	1,83±0,04
Ba	12,1±1,1	10,6±2,1	96,0±13,7	92,2±3,5
Cd	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05
Cr	<0,29	<0,29	0,87±0,07	0,99±0,07
Cu	17,0±2,3	11,9±1,5	3,98±1,13	5,02±1,18
Fe	4,88±1,29	3,68±1,64	297±22	348±27
Mn	213±21	236±25	559±55	560±8
Ni	4,05±0,45	4,94±0,31	5,88±0,25	6,47±0,40
Pb	<0,39	<0,39	2,45±0,04	2,38±0,07
Se	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50
Zn	50,7±6,3	54,5±9,3	40,7±2,4	48,9±9,3

A partir da Tabela 6.2 verifica-se que os valores obtidos para o preparo das bebidas na presença e na ausência dos sachês são equivalentes. Deste modo, pode-se concluir que, utilizando procedimento adotado, a influência do sachê no preparo das infusões de chá é praticamente nula no que se refere à extração dos constituintes inorgânicos. De modo a padronizar o preparo das infusões, adotou-se o procedimento sem o uso do sachê.

6.3 – Avaliação do método para o preparo de amostra utilizado para a análise das bebidas de chá

Para o método de preparo das amostras, priorizou-se a escolha de um método simples, rápido e com a mínima utilização de reagentes químicos. A escolha recaiu sobre a análise direta das bebidas após a adição de uma mínima quantidade de ácido, com concentração final de 0,2% v/v necessária para que o meio fosse o mesmo daquele utilizado nas curvas analíticas. No entanto, como na análise direta podem ocorrer efeitos indesejáveis decorrentes da presença da matriz (Nardi, 2009), utilizou-se o acessório de amostragem discreta do equipamento (ISIS-DS), que permite a análise de pequena quantidade de amostra em um sistema em fluxo controlado pelo software do equipamento.

A fim de verificar a influência da presença da matriz, foram feitas duas abordagens. Primeiramente, o método proposto foi comparado a outros descritos para a análise de bebidas (Nookabkaew *et al.*, 2006; Flaten & Lund, 1997 e Mossion *et al.*, 2008): análise após mínima etapa de preparo de amostra (diluição ácida) e análise após destruição da matéria orgânica (digestão ácida assistida por micro-ondas). Para esta avaliação, foram realizadas 15 repetições analíticas de chá verde fortificadas com $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para que a resposta de todos os elementos pudesse ser avaliada.

Na Tabela 6.3 são apresentados os valores obtidos para os métodos avaliados: análise direta (método A), diluição ácida (método B) e digestão ácida assistida por micro-ondas (método C).

Tabela 6.3: Comparação da análise direta (método A), diluição ácida (método B) e análise após digestão ácida assistida por micro-ondas (método C) utilizando amostra de chá verde fortificada com 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos.

Elemento	Resultado, $\mu\text{g L}^{-1}$		
	(média \pm estimativa de desvio padrão)		
	Método A	Método B	Método C
Al	8250 \pm 1111	9428 \pm 979	7855 \pm 170
As	20,5 \pm 2,1	21,6 \pm 1,4	18,0 \pm 1,2
Ba	67,0 \pm 9,2	71,5 \pm 7,7	63,8 \pm 1,8
Cd	19,4 \pm 7,3	23,4 \pm 4,5	19,7 \pm 0,6
Cr	19,0 \pm 0,8	19,9 \pm 0,9	22,2 \pm 0,9
Cu	39,4 \pm 16,2	44,6 \pm 12,4	41,2 \pm 5,9
Fe	61,5 \pm 7,8	68,4 \pm 4,5	50,2 \pm 16,2
Mn	3905 \pm 528	4343 \pm 436	3560 \pm 66
Ni	45,5 \pm 2,1	47,2 \pm 1,6	47,5 \pm 1,4
Pb	20,1 \pm 2,8	22,9 \pm 1,8	19,3 \pm 1,1
Se	17,9 \pm 0,8	17,8 \pm 0,9	17,2 \pm 0,9
Zn	94,4 \pm 16,5	92,2 \pm 13,4	93,5 \pm 36,4

Os dados da Tabela 6.3 foram analisados estatisticamente de modo a verificar diferenças ao nível de 99% de confiança. Para isto, primeiramente a variância dos resultados obtidos pelos métodos A, B e C foi avaliada utilizando o teste F. Para alguns elementos, foi verificada diferença significativa nestes testes ($F_{\text{calc}} > F_{99\%}$) sendo observada a necessidade do uso de um teste não paramétrico para a avaliação das respostas.

O teste escolhido foi o teste pareado de Wilcoxon, equivalente ao teste t-pareado para dados paramétricos. Este teste foi feito com o auxílio do software *Statística* (StatSoft, Tulsa, OK, EUA) e consistiu em comparar os valores de mediana obtidos pelo método A com os obtidos pelos métodos B e C. Para todos os analitos, não foi observada diferença estatística ao nível de 99% de confiança ($p > 0,01$) e, deste modo, pode-se afirmar que os resultados obtidos utilizando a análise direta da amostra são equivalentes aos obtidos por

métodos que incluem etapas de preparo de amostra. O efeito da matriz também foi avaliado pela construção de curvas analíticas por adição de analito. As curvas obtidas encontram-se na Tabela 6.4.

Tabela 6.4: Comparação do coeficiente angular e da correlação linear obtidos para as curvas analíticas de calibração externa (meio HNO₃ 0,2%) e por adição de padrão em chás preto e de boldo (meio chá preto e meio chá boldo).

Elemento	Meio HNO ₃ 0,2%		Meio Chá Preto		Meio Chá Boldo	
	Coeficiente angular (L µg ⁻¹)	r ²	Coeficiente angular (L µg ⁻¹)	r ²	Coeficiente angular (L µg ⁻¹)	r ²
Al	0,0029	0,9999	0,0028	0,9874	0,0029	0,9994
As	0,0021	1,0000	0,0022	1,0000	0,0022	1,0000
Ba	0,3275	0,9999	0,3089	0,9958	0,3118	0,9997
Cd	0,0215	1,0000	0,0221	1,0000	0,0230	1,0000
Cu	0,0857	1,0000	0,0896	0,9997	0,0928	1,0000
Cr	7975,8	1,0000	8828,8	1,0000	8615,6	1,0000
Fe	0,1888	0,9999	0,1808	0,9986	0,1925	0,9989
Mn	0,0909	0,9998	0,0837	0,9956	0,0871	0,9994
Ni	4613,9	1,0000	4994,0	1,0000	4919,7	1,0000
Pb	0,2996	0,9999	0,2732	0,9999	0,3028	0,9999
Se	397,1	1,0000	461,8	1,0000	456,6	1,0000
Zn	0,0486	0,9998	0,0436	0,9954	0,0464	0,9994

Observando os dados da Tabela 6.4 é possível verificar que os coeficientes angulares de ambas as curvas possuem valores próximos, indicando ausência de efeito de interferência provocado pela presença de matriz. Observa-se, ainda, que as curvas preparadas em meio de ácido nítrico possuem valores de coeficiente de regressão (r) superiores às demais, sendo maiores que 0,9998, para todos os elementos. Deste modo, procedeu-se a validação do método utilizando análise direta e curvas analíticas em meio nítrico 0,2% (método de calibração externa).

6.4 – Avaliação das figuras de mérito

A validação foi realizada baseando-se no disposto em INMETRO, 2011, tendo sido avaliados os seguintes parâmetros: sensibilidade (limites de detecção e de quantificação), exatidão, através de ensaio de adição e recuperação e precisão, em dois dias distintos. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 6.5.

As amostras de bebidas foram escolhidas de modo a avaliar uma amostra constituída basicamente de folhas (chá capim cidreira) e outra contendo flores e frutos em sua composição (morango). Através dos dados da Tabela 6.5 verificou-se exatidão e precisão adequadas para o método. Foram obtidos valores inferiores a 17% para o coeficiente de variação da análise de 16 bebidas de chá em dois dias distintos e para a exatidão, foram obtidos valores entre 82 e 120% para todos os analitos nos três níveis de fortificação, ambos considerados satisfatórios (AOAC, 2002). Os limites de detecção e de quantificação demonstram a sensibilidade da técnica aliada a baixos fatores de diluição decorrentes do preparo de amostra, sendo obtidos limites de quantificação inferiores a 2,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos os analitos, com exceção de Al e Zn (20 e 35 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente). Estes níveis são muito inferiores aos limites máximos permitidos pelas legislações brasileiras em vigência: As e Pb em bebidas analcólicas (excluídos sucos), de 0,05 mg kg^{-1} ; Cd, de 0,02 mg kg^{-1} (Brasil, 2013), Se para alimentos líquidos, de 0,05 mg kg^{-1} e Cr e Ni para qualquer alimento, de 0,10 mg kg^{-1} e 5,00 mg kg^{-1} , respectivamente (Brasil, 1965).

Tabela 6.5: Resultados para a validação do método para análise dos elementos traço nas bebidas de chá.

Elemento	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisão (%)	Recuperação* (%)					
				Chá com morango			Chá Capim cidreira		
				Nível 1 ^a	Nível 2 ^b	Nível 3 ^c	Nível 1 ^a	Nível 2 ^b	Nível 3 ^c
Al	6	20	13	107±17	103±5	99±3	112±22	107±7	112±5
As	0,14	0,46	4	96±2	100±4	104±2	97±4	97±2	99±1
Ba	0,60	2,0	12	93±4	110±8	111±3	118±8	120±9	118±3
Cd	0,02	0,05	4	99±1	100±1	100±1	102±1	102±1	101±3
Cr	0,09	0,29	17	85±1	88±2	91±1	86±4	94±1	97±1
Cu	0,51	1,7	2	95±5	92±1	92±1	97±2	97,7±0,3	95±4
Fe	0,66	2,2	8	93±11	93±4	96±3	95±2	98±1	94±1
Mn	0,11	0,38	11	101±23	89±4	90±6	93±14	105±8	108±3
Ni	0,63	2,1	10	82±1	86±2	89±1	87±3	93±1	96±1
Pb	0,12	0,39	6	112±3	118±9	113±2	110±1	90±3	106±2
Se	0,15	0,50	3	106±2	107±3	110,5±0,4	95±4	101±3	104±1
Zn	10	35	15	89±12	95±6	95±3	103±10	102±7	103±3

^aNível 1: As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Se - 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ e Al, Ba, Fe, Mn, Zn - 50 $\mu\text{g L}^{-1}$;

^bNível 2: As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Se - 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ e Al, Ba, Fe, Mn, Zn - 250 $\mu\text{g L}^{-1}$;

^cNível 3: As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Se - 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e Al, Ba, Fe, Mn, Zn - 500 $\mu\text{g L}^{-1}$

6.5 – Aplicação do método para análise das infusões de chá

Os resultados obtidos para a análise das 90 bebidas resultantes das infusões das amostras comerciais também mostraram grande variação dos teores destes elementos em amostras de diferentes variedades e/ou diferentes processos industriais. Os resultados obtidos (média e faixa de concentração) são apresentados na Tabela 6.6.

De modo geral, foi observada redução nos níveis presentes nas amostras comerciais após o preparo da bebida, exemplificado pela não quantificação de Se nas bebidas, embora este elemento tenha sido quantificado em mais de 90% das amostras de ervas.

Tabela 6.6: Média e faixa de concentração observada para os elementos traços nas amostras de infusões de diferentes tipos de chá

Elemento	Chá ($\mu\text{g L}^{-1}$)				
	Boldo	Branco	Camomila	Capim Cidreira	Flores e frutos
Al	<20 ^c	3216 (2168-4468) ^b	33 (<20-87) ^c	18 (<20-41) ^c	125 (45-185) ^c
As	<0,46 ^a	<0,46 ^a	<0,46 ^a	0,20 (<0,46-1,36) ^a	1,1 (<0,46-2,30) ^a
Ba	11 (6-17) ^d	17 (10-24) ^d	13 (4-26) ^d	30 (14-98) ^{cd}	215 (140-445) ^a
Cd	<0,05 ^b	<0,05 ^b	0,11 (<0,05-0,24) ^b	0,10 (<0,05-0,43) ^b	0,26 (0,14-0,60) ^a
Cr	<0,29 ^b	1,11 (0,40-2,49) ^b	<0,29 ^b	<0,29 ^b	0,56 (<0,29-0,94) ^b
Cu	6,4 (4,6-7,9) ^{ef}	31,8 (18,8-47,7) ^a	30,8 (19,4-39,1) ^a	12,6 (5,1-39,0) ^{de}	17,7 (12,6-24,0) ^{bcd}
Fe	12,2 (4,2-19,0) ^c	35,8 (21,8-54,6) ^c	32,4 (8,8-57,4) ^c	27,9 (9,0-45,0) ^c	273 (58,0-368) ^a
Mn	122 (91-183) ^e	1828 (1433-2464) ^{abc}	106 (69-153) ^e	251 (105-617) ^e	1138 (577-2694) ^{cd}
Ni	2,4 (<2,1-4,8) ^{cd}	28,9 (24,4-34,6) ^a	2,7 (<2,1-8,6) ^{cd}	0,3 (<2,1-2,4) ^d	7,2 (<2,1-4,5) ^{bcd}
Pb	<0,39 ^b	0,61 (<0,39-1,50) ^b	0,15 (<0,39-0,88) ^b	0,14 (<0,39-0,73) ^b	<0,39 ^a
Se	<0,50 ^a	<0,50 ^a	<0,50 ^a	<0,50 ^a	<0,50 ^a
Zn	<35 ^d	70 (61-79) ^{ab}	38 (<35-58) ^{bc}	<35 ^d	93 (70-144) ^a
Elemento	Hortelã	Mate	Morango	Preto	Verde
Al	11 (<20-52) ^c	163 (85-334) ^c	64 (<20-127) ^c	5085 (2061-9647) ^a	5103 (3823-6222) ^a
As	<0,46 ^a	<0,46 ^a	1,05 (<0,46-5,32) ^a	<0,46 ^a	<0,46 ^a
Ba	23 (15-36) ^d	80 (58-110) ^c	150 (98-211) ^b	36 (8-62) ^{cd}	32 (20-54) ^{cd}
Cd	<0,05 ^b	0,28 (0,07-0,60) ^a	0,09 (<0,05-0,13) ^b	<0,05 ^b	<0,05 ^b
Cr	0,31 (<0,29-0,83) ^b	1,02 (0,29-2,34) ^b	0,51 (0,34-0,73) ^b	4,01 (<0,29-10,60) ^a	3,94 (2,01-6,65) ^a
Cu	26,1 (21,1-32,3) ^{ab}	1,7 (<1,7-2,7) ^f	11,2 (6,9-13,9) ^{de}	21,5 (16,8-28,3) ^{bc}	16,8 (9,5-27,3) ^{cd}
Fe	36,9 (19,1-63,2) ^c	16,8 (9,2-29,4) ^c	151 (65,0-275) ^b	8,1 (6,1-10,0) ^c	22,6 (11,0-34,0) ^c
Mn	141 (96-231) ^e	2312 (1551-3651) ^{ab}	649 (512-750) ^{de}	1651 (173-3111) ^{bc}	2409 (1612-3223) ^a
Ni	6,3 (4,4-8,3) ^{bcd}	11,3 (9,1-19,1) ^{bc}	4,9 (3,1-7,0) ^{cd}	18,1 (2,5-42,1) ^b	32,9 (19,8-57,3) ^a
Pb	0,39 (<0,39-0,76) ^b	0,25 (<0,39-0,73) ^b	0,40 (<0,39-1,7) ^b	0,35 (<0,39-0,70) ^b	<0,39 ^b
Se	<0,50 ^a	<0,50 ^a	<0,50 ^a	<0,50 ^a	<0,50 ^a
Zn	35 (<35-49) ^{cd}	70 (<35-171) ^{ab}	30 (<35-51) ^{cd}	22 (<35-50) ^{cd}	45 (<35-62) ^{bc}

a,b,c,d,e,f Médias com a mesma letra entre diferentes colunas não diferem significativamente ao nível de confiança de 95%, de acordo com o teste de Tukey.

Os resultados obtidos para amostras de chá branco, verde e preto foram próximos aos observados em amostras da República Tcheca (Malik *et al.*, 2008) e da Espanha (Fernández *et al.*, 2002), exceto para os elementos Cu e Zn. Para estes elementos, verificou-se que os valores obtidos para este estudo são, aproximadamente, 10 vezes maiores que os dados reportados por Malik *et al.* (2008). Elevados valores também foram reportados no estudo de Görür *et al.* (2011) em amostras provenientes da Turquia: 368,57 e 9,17 $\mu\text{g kg}^{-1}$ para Mn e Cu, respectivamente. Merece ainda destaque o elemento Al que foi predominante nas amostras de chás de *Camellia sinensis* (branco, preto e verde) enquanto que nos chás contendo frutos em sua composição (flores e frutos e chá de morango) os elementos com maior teor foram Ba, Fe e Zn.

Assim como para os teores dos elementos traço nas amostras de ervas, os dados presentes na literatura para bebidas das demais variedades de chá são bastante escassos. Malik *et al.* (2008) determinaram alguns micronutrientes em amostras de chá mate e camomila comercializadas na República Tcheca e observou valores de Al, Cu, Fe e Ni superiores aos valores obtidos neste estudo. Para Al, os níveis encontrados são cerca de 10x superiores para as amostras de camomila e 2x para as amostras de chá mate. Os níveis de Zn, no entanto, foram bastante próximos aos deste estudo: 418 e 235 $\mu\text{g L}^{-1}$ para chá mate e camomila, respectivamente. Recentemente, Malik *et al.* (2013) estudaram algumas amostras de chás herbais locais e encontrou valores superiores em amostras de chá de capim cidreira. Vale destacar os níveis de Al (189 $\mu\text{g L}^{-1}$), que foram cerca de 10x superiores para as amostras comercializadas no Brasil e os níveis de Mn que foram muito próximos às amostras nacionais (230 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Estas diferenças nos níveis observados podem ser resultado de origens diferentes das ervas ou mesmo de diferentes procedimentos de preparo da bebida, como o modo de

preparo em si (decoção ou infusão), proporção entre massa de ervas e volume de água fervente ou mesmo no tempo de infusão.

Em relação aos limites máximos estabelecidos pelas legislações brasileiras e do MERCOSUL (Brasil, 1965 e 2013), os níveis verificados nas amostras de infusões de chás mostraram-se em conformidade. Nenhum dos analitos foi encontrado em níveis acima do permitido por estas legislações.

Os maiores níveis de cádmio foram observados nas amostras de chá de flores e frutos ($0,14$ a $0,60 \mu\text{g L}^{-1}$) e mate ($0,07$ a $0,60 \mu\text{g L}^{-1}$), enquanto que para Pb os maiores níveis foram observados nas amostras de chá branco (média de $0,61 \mu\text{g L}^{-1}$) e morango (média de $0,40 \mu\text{g L}^{-1}$). Para crômio e níquel, os maiores níveis foram observados em amostras de chá branco, preto e verde, sendo os maiores valores encontrados: $10,60 \mu\text{g L}^{-1}$ em chá preto para Cr e $57,3 \mu\text{g L}^{-1}$ em chá verde para Ni.

Os maiores níveis encontrados para As total foram verificados nas amostras de chá de capim cidreira, flores e frutos e morango, sendo encontrado em nível não-quantificável nas demais amostras. Estas amostras foram selecionadas para a análise de especiação, melhor detalhada no capítulo 7.

A extração dos elementos traço foi avaliada através da razão, em porcentagem, entre o valor obtido na análise das infusões de chá e o valor teórico esperado para a completa extração. Este valor teórico foi calculado considerando a proporção de $1,5 \text{ g}$ de erva para o volume de 200 mL de chá e o valor obtido na análise das ervas. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 6.7.

Tabela 6.7: Média e faixa de extração observada no preparo das bebidas de chá pelo procedimento de infusão

Elemento	Extração (%)				
	Boldo	Branco	Camomila	Capim Cidreira	Flores e frutos
Al	0 ^c	23(0-37) ^b	0,71 (0-1,6) ^c	1,6 (0-5,1) ^c	6,3 (3,0-27) ^c
As	0 ^b	0 ^b	0 ^b	6,1 (0-29) ^{ab}	27 (0-46) ^a
Ba	4,7 (3,2-6,0) ^e	5,9(3,8-8,2) ^{de}	13 (6,2-19) ^{cd}	26 (8,0-39) ^b	43 (34-52) ^a
Cd	0 ^c	0 ^c	11 (0-14) ^c	8,5 (0-18) ^c	53 (34-93) ^a
Cr	0 ^d	17(2,2-41) ^{bc}	0 ^d	0 ^d	1,0 (0-2,9) ^d
Cu	28 (20-35) ^{bc}	22(15-30) ^c	45 (27-50) ^a	24 (14-39) ^c	37 (20-58) ^{ab}
Fe	1,3 (0,71-1,9) ^b	2,3(1,1-4,0) ^b	1,3 (0,50-2,1)	2,8 (1,3-5,2) ^b	10 (5,1-26) ^a
Mn	15 (12-17) ^d	21(17-27) ^{cd}	24 (17-30) ^c	37 (19-47) ^b	68 (65-73) ^a
Ni	46 (0-68) ^{bc}	92(77-105) ^a	26 (0-81) ^{cd}	5,6 (0-50) ^d	50 (0-67) ^{bc}
Pb	0 ^c	3,8(0-8,7) ^{bc}	5,2 (0-31) ^{bc}	1,8 (0-10) ^c	19 (0-43) ^{ab}
Se	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Zn	0 ^d	31(28-34) ^b	22 (0-28) ^{bc}	0 ^d	54 (38-64) ^a
Elemento	Hortelã	Mate	Morango	Preto	Verde
Al	0,14 (0-0,49) ^c	4,0 (2,2-6,5) ^c	3,6 (0-9,7) ^c	37 (24-45) ^a	32(20-51) ^a
As	0 ^b	0 ^b	14 (0-68) ^{ab}	0 ^b	0 ^b
Ba	12 (7,2-21) ^{cde}	14(9,2-24) ^c	45 (35-59) ^{ab}	7,7(3,7-13) ^{cde}	6,3(4,3-7,1) ^{de}
Cd	0 ^c	6,7 (1,7-13) ^c	30 (0-44) ^b	0 ^c	0 ^c
Cr	1,3 (0-3,3) ^d	8,3(0-17) ^{cd}	3,5 (0,57-7,3) ^{cd}	27(0-55) ^{ab}	31(24-38) ^a
Cu	24 (19-30) ^c	2,0 (0-3,1) ^d	37 (23-44) ^a	24(18-34) ^c	18(11-23) ^c
Fe	0,49 (0,24-0,79) ^b	0,88 (0,45-1,2) ^b	9,3 (6,1-14) ^{ab}	1,2(0,8-1,9) ^b	2,2(1,2-3,4) ^b
Mn	20 (15-28) ^{cd}	22 (16-30) ^{cd}	66 (54-80) ^a	21(14-26) ^{cd}	24(16-33) ^c
Ni	47 (38-56) ^{bc}	51 (40-70) ^{bc}	55 (31-76) ^{bc}	61(38-93) ^b	95(65-111) ^a
Pb	7,3 (0-19) ^{bc}	7,2 (0-27) ^{bc}	6,6 (0-36) ^{bc}	31(0-53) ^a	0 ^c
Se	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Zn	19 (0-29) ^{bc}	12 (0-22) ^{cd}	28 (0-49) ^b	14(0-35) ^{bcd}	30(0-43) ^b

^{a,b,c,d} Médias com a mesma letra entre diferentes colunas não diferem significativamente ao nível de confiança de 95%, de acordo com o teste de Tukey.

A extração de elementos traço das ervas para a infusão depende de alguns aspectos, tais como a presença de fortes ligações com a matriz orgânica ou sua solubilidade na bebida. Szymczycha-Madeja *et al.* (2012) e Rostagno *et al.* (2011) sugerem a complexação dos metais com compostos antioxidantes, como flavonóides, catequinas, cafeína, taninos e polifenóis, como um dos principais aspectos. Pinto (2013) em seu trabalho afirma que cerca 30% das folhas de chá são constituídas por flavonóides, sendo que em chá verde o composto mais abundante é EGCG (epigallocatechin 3-gallate).

Szymczycha-Madeja *et al.* (2012) relatam ainda que alguns elementos (como níquel e zinco) apresentam melhor extração no preparo de chá verde em relação aos outros chás provenientes de *Camellia sinensis* (branco e preto), resultado que é compatível ao observado neste estudo, sendo que as porcentagens de extração são diferentes ao nível de 95% de confiança.

Outro aspecto também relacionado à extração dos elementos traço no preparo da bebida é relacionado à água utilizada no preparo. A utilização de temperaturas acima de 60°C tem sido associada à diminuição da transferência de Cu e Fe para a bebida em razão dos complexos contendo estes elementos serem insolúveis nesta temperatura (Szymczycha-Madeja *et al.*, 2012). Os valores obtidos para estes elementos em amostras de chá branco, verde e preto são concordantes com os verificados por Nookabkaew *et al.* (2006) que reportaram extrações de 2,39% e 12,96% para Fe e Cu, respectivamente.

Os valores observados para a extração de Al em amostras de chás de *Camellia sinensis* foram similares ao observado por Mehra & Baker (2007), que reportaram o valor de 29,7% na infusão do chá. Estes pesquisadores demonstraram ainda que infusões subsequentes das ervas levam ao aumento deste elemento no chá – um procedimento pouco usual no consumo da bebida. Extrações moderadas (20-55%) foram observadas para Al, Cr, Cu, Mn e Zn nestas variedades, em concordância com o estabelecido por Szymczycha-Madeja *et al.* (2012), que atribuem este fato à

presença de ligações fortes entre estes elementos e taninos presentes no chá. Deste modo, pode-se supor que há uma maior presença destes compostos nos chás constituídos apenas por ervas (por exemplo, camomila e capim cidreira) do que nos possuem frutos em sua composição, visto que os valores de extração para estas últimas variedades são superiores às demais. Alta extração de Ni foi verificada para praticamente todas as amostras enquanto a baixa extração dos elementos As, Cd, Pb e Se foi confirmada por este estudo, uma vez que estes elementos foram encontrados próximos ao limite de quantificação do método.

6.6 - Avaliação da estimativa de ingestão e exposição aos elementos traço

As avaliações das estimativas de ingestão e exposição aos elementos traço decorrentes do consumo diário de uma xícara de chá por um adulto de 70 kg (pc = peso corpóreo) são apresentadas nas Tabelas 6.8 e 6.9. Este consumo foi assumido com base no estudo realizado por Camargo & Toledo (2002), que determinaram o consumo médio de 263,34 mL de chá (aproximadamente 1 xícara) por dia, a partir de entrevista com 600 pessoas na cidade de Campinas, SP.

Tabela 6.8: Avaliação da estimativa de exposição aos elementos traço pelo consumo diário de uma xícara de chá (200 mL) por um adulto (peso corpóreo, pc, 70 kg) (WHO, 2005 e 2015)

Elemento		Boldo	Branco	Camomila	Capim-cidreira	Flores e frutos
Estimativa de consumo mensal						
Cd	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	<0,021	<0,021	0,047 (<0,021-0,103)	0,043 (<0,021-0,184)	0,11 (0,060-0,257)
	% PTMI	<0,09	<0,09	0,19 (<0,09-0,41)	0,17 (<0,09-0,74)	0,45 (0,24-1,03)
Estimativa de consumo semanal						
Al	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	<2,0	322 (217-447)	3,3 (<2,0-8,7)	1,8 (<2,0-4,1)	12,5 (4,5-18,5)
	% PTWI	<0,10	16 (11-22)	0,16 (<0,10-0,43)	0,09 (<0,10-0,21)	0,63 (0,23-0,93)
Ba	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	1,1 (0,6-1,7)	1,7 (1,0-2,4)	1,3 (0,4-2,6)	3,0 (1,4-9,8)	21,5 (14,0-44,5)
	% PTWI	-	-	-	-	-
Pb	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	<0,039	0,061 (<0,039-0,150)	0,015 (<0,039-0,088)	0,014 (<0,039-0,073)	<0,039
	% PTWI	-	-	-	-	-
Estimativa de consumo diário						
Ni	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	0,03 (<0,03-0,07)	0,41 (0,35-0,49)	0,04 (<0,03-0,12)	0,004 (<0,03-0,03)	0,10 (<0,03-0,06)
	% TDI	0,29 (<0,25-0,57)	3,4 (2,9-4,1)	0,32 (<0,25-1,0)	0,03 (<0,25-0,29)	0,86 (<0,25-0,54)
Cu	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	0,09 (0,07-0,11)	0,45 (0,27-0,68)	0,44 (0,28-0,56)	0,18 (0,07-0,56)	0,25 (0,18-0,34)
	% PMTDI	0,02 (0,01-0,02)	0,09 (0,05-0,14)	0,09 (0,06-0,11)	0,04 (0,01-0,11)	0,05 (0,04-0,07)
Fe	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	0,17 (0,06-0,27)	0,51 (0,31-0,78)	0,46 (0,13-0,82)	0,20 (0,13-0,64)	3,90 (0,08-5,3)
	% PMTDI	0,02 (0,01-0,03)	0,06 (0,04-0,10)	0,06 (0,02-0,10)	0,05 (0,02-0,08)	0,49 (0,10-0,66)
Zn	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	<0,50	1,00 (0,87-1,13)	0,54 (<0,50-0,83)	<0,50	1,33 (1,00-2,06)
	% PMTDI	<0,05	0,10 (0,09-0,11)	0,05 (<0,05-0,08)	<0,05	0,13 (0,10-0,21)

PTMI: Cd = 25 $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$; **PTWI:** Al = 2 $\text{mg kg}^{-1}\text{pc}$; Pb = retirado in 2010; Ba: não estabelecido; **PMTDI:** Cu = 0.5 $\text{mg kg}^{-1}\text{pc}$; Fe=0.8 $\text{mg kg}^{-1}\text{pc}$; Zn=1.0 $\text{mg kg}^{-1}\text{pc}$; **TDI:** Ni = 12 $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$.

Tabela 6.8 continuação

Elemento		Hortelã	Mate	Morango	Preto	Verde
Estimativa de consumo mensal						
Cd	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	<0,021	0,12 (0,030-0,257)	0,039 (<0,021-0,056)	<0,021	<0,021
	% PTMI	<0,09	0,48 (0,12-1,03)	0,15 (<0,09-0,22)	<0,09	<0,09
Estimativa de consumo semanal						
Al	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	1,1 (<2,0-5,2)	16,3 (8,5-33,4)	6,4 (<2,0-12,7)	509 (206–965)	510 (382-622)
	% PTWI	0,06 (<0,10-0,26)	0,82 (0,43-1,67)	0,32 (<0,10-0,64)	25 (10-48)	26 (19-31)
Ba	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	2,3 (1,5-3,7)	8,0 (5,8-11,0)	15,0 (9,8-21,1)	3,6 (0,8-6,2)	3,3 (2,0-5,4)
	% PTWI	-	-	-	-	-
Pb	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	0,039 (<0,039-0,076)	0,025 (<0,039-0,073)	0,040 (<0,039-0,17)	0,035 (<0,039-0,070)	<0,039
	% PTWI	-	-	-	-	-
Estimativa de consumo diário						
Ni	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	0,09 (0,06-0,12)	0,16 (0,13-0,27)	0,07 (0,04-0,10)	0,26 (0,04-0,60)	0,47 (0,28-0,82)
	% TDI	0,75 (0,52-0,99)	1,35 (1,08-2,27)	0,58 (0,33-0,83)	2,15 (0,30-5,01)	3,92 (2,36-6,82)
Cu	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	0,37 (0,30-0,46)	0,02 (<0,02-0,04)	0,16 (0,10-0,20)	0,31 (0,24-0,40)	0,24 (0,14-0,39)
	% PMTDI	0,07 (0,06-0,09)	0,01 (<0,01-0,01)	0,03 (0,02-0,04)	0,06 (0,05-0,08)	0,05 (0,03-0,08)
Fe	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	0,53 (0,27-0,90)	0,24 (0,13-0,42)	2,16 (0,93-3,93)	0,12 (0,09-0,14)	0,32 (0,16-0,49)
	% PMTDI	0,07 (0,03-0,11)	0,03 (0,02-0,05)	0,27 (0,12-0,49)	0,01 (0,01-0,02)	0,04 (0,02-0,06)
Zn	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$	0,49 (<0,50-0,71)	1,00 (<0,50-2,44)	0,43 (<0,50-0,73)	0,31 (<0,50-0,71)	0,64 (<0,50-0,89)
	% PMTDI	0,05 (<0,05-0,07)	0,10 (<0,05-0,24)	0,04 (<0,05-0,07)	0,03 (<0,05-0,07)	0,06 (<0,05-0,09)

PTMI: Cd = 25 $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$; **PTWI:** Al = 2 $\text{mg kg}^{-1}\text{pc}$; Pb = retirado in 2010; Ba: não estabelecido; **PMTDI:** Cu =0,5 $\text{mg kg}^{-1}\text{pc}$; Fe=0,8 $\text{mg kg}^{-1}\text{pc}$; Zn=1,0 $\text{mg kg}^{-1}\text{pc}$; **TDI:** Ni = 12 $\mu\text{g kg}^{-1}\text{pc}$.

Na Tabela 6.8 é apresentada a estimativa de exposição aos elementos traço considerando este consumo. Os valores foram comparados aos limites estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005 e FAO/WHO 2015). A estimativa mostrou que, considerando apenas os níveis dos contaminantes inorgânicos, o consumo de uma xícara de chá por dia não representa riscos à saúde. Vale destacar, no entanto, que para o Al, valores de até 48% da ingestão semanal tolerável provisória são estimados para o consumo de apenas uma xícara de chá preto. Se considerado o consumo de duas xícaras, o valor estimado é de quase 100%.

Estas informações, embora bastante úteis, devem ser consideradas com cautela. Alguns trabalhos, como o de Silva *et al.* (2015) têm abordado que a presença de alguns componentes (polifenóis, por exemplo) pode influenciar na fração absorvida pelo organismo. Em razão disto, recentes trabalhos (Silva *et al.*, 2015 e Peixoto *et al.*, 2013) têm sido desenvolvidos de modo a verificar a bioacessibilidade e a biodisponibilidade de elementos traço em alimentos. No trabalho de Silva *et al.* (2015), foram realizados estudos em amostras de alface e couve e demonstrou-se que a fração bioacessível de Al corresponde a apenas 11% do teor de Al presente neste vegetais.

Neste trabalho, o consumo diário de uma xícara de chá verde mostrou que para Cd os valores encontram-se abaixo de 1,0% do PTMI estabelecido, enquanto para Ni a contribuição chega a 6,8% para a ingestão diária tolerável (TDI). Para Ba, as maiores contribuições provêm das variedades morango (9,8 a 21,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pc) e flores e frutos (14,0 a 44,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pc) enquanto que para Pb, são estimados maiores teores médios para os chás branco (0,061 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pc) e morango (0,040 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pc). Estes elementos, no entanto, não possuem valores estabelecidos de PTWI.

Muito embora cobre, ferro e zinco sejam considerados micronutrientes, FAO/WHO (2015) estabeleceu alguns limites máximos de modo a prevenir uma superdosagem destes nutrientes. Os níveis estimados para estes elementos não chegam ao valor de 1% de seus respectivos PTMDI (Cu =0,5 mg kg^{-1} pc; Fe=0,8 mg

kg⁻¹ pc e Zn=1,0 mg kg⁻¹ pc) sendo que os maiores níveis de Fe foram estimados para as variedades morango e flores e frutos, cuja contribuição da ingestão diária de uma xícara de chá chega a 0,49% e 0,66% do PTMDI, respectivamente.

Na Tabela 6.9 é apresentada a estimativa de ingestão dos micronutrientes estudados e os valores obtidos foram comparados com a ingestão diária recomendada pela ANVISA (Brasil, 2003) e pelo FDA (2013).

Tabela 6.9: Estimativa de ingestão diária pelo consumo de uma xícara de chá (200 mL) baseada em uma dieta de 2000 calorias*

Elemento		Boldo	Branco	Camomila	Capim-cidreira	Flores e frutos
Cr	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}$	<0,29	1,11 (0,40-2,49)	<0,29	<0,29	0,56 (<0,29-0,94)
	% IDR	<0,08	0,32 (0,11-0,71)	<0,08	<0,08	0,16 (<0,08-0,27)
	% VD	<0,02	0,09 (0,03-0,21)	<0,02	<0,02	0,05 (<0,02-0,08)
Cu	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}$	6,4 (4,6-7,9)	31,8 (18,8-47,7)	30,8 (19,4-39,1)	12,6 (5,1-39,0)	17,7 (12,6-24,0)
	% IDR	0,07 (0,05-0,09)	0,35 (0,21-0,53)	0,34 (0,22-0,43)	0,14 (0,06-0,43)	0,20 (0,14-0,27)
	% VD	0,03 (0,02-0,04)	0,16 (0,09-0,24)	0,15 (0,10-0,20)	0,06 (0,03-0,20)	0,09 (0,06-0,12)
Fe	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}$	12,2 (4,2-19,0)	35,8 (21,8-54,6)	32,4 (8,8-57,4)	27,9 (9,0-45,0)	273 (58-368)
	% IDR	0,01 (0,003-0,01)	0,03 (0,02-0,04)	0,02 (0,01-0,04)	0,02 (0,01-0,03)	0,20 (0,04-0,26)
	% VD	0,01 (0,002-0,01)	0,02 (0,01-0,03)	0,02 (0,01-0,03)	0,02 (0,01-0,03)	0,15 (0,03-0,20)
Mn	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}$	122 (91-183)	1828 (1433-2464)	106 (69-153)	251 (105-617)	1138 (577-2694)
	% IDR	0,5 (0,4-0,8)	7,9 (6,2-10,7)	0,5 (0,3-0,7)	1,1 (0,5-2,7)	4,9 (2,5-11,7)
	% VD	0,6 (0,5-0,9)	9,1 (7,2-12,3)	0,5 (0,4-0,8)	1,3 (0,5-3,1)	5,7 (2,9-13,5)
Se	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}$	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50
	% IDR	<0,15	<0,15	<0,15	<0,15	<0,15
	% VD	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07
Zn	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}$	<35	70 (61-79)	38 (<35-58)	<35	93 (70-144)
	% IDR	<0,05	0,10 (0,09-0,11)	0,05 (<0,05-0,08)	<0,05	0,13 (0,10-0,21)
	% VD	<0,02	0,05 (0,04-0,05)	0,03 (<0,02-0,04)	<0,02	0,06 (0,05-0,10)

* **IDR**=Ingestão diária recomendada (Brasil, 2003): Cr = 35 $\mu\text{g}/100\text{g}$; Cu=900 $\mu\text{g}/100\text{g}$; Fe=14 $\text{mg}/100\text{g}$; Mn=2,3 $\text{mg}/100\text{g}$; Se=34 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e Zn=7 $\text{mg}/100\text{g}$ ***VD**=valor diário (FDA, 2013): Cr = 120 $\mu\text{g}/100\text{g}$; Cu=2 $\text{mg}/100\text{g}$; Fe=18 $\text{mg}/100\text{g}$; Mn=2 $\text{mg}/100\text{g}$; Se=70 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e Zn=15 $\text{mg}/100\text{g}$

Tabela 6.9 continuação

Elemento		Hortelã	Mate	Morango	Preto	Verde
Cr	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}$	0,31 (<0,29-0,83)	1,00 (0,29-2,30)	0,51 (0,34-0,73)	4,01 (0,29-10,60)	3,94 (2,01-6,65)
	% IDR	0,09 (<0,08-0,24)	0,29 (0,08-0,66)	0,15 (0,10-0,21)	1,15 (0,08-3,03)	1,13 (0,57-1,90)
	% VD	0,03 (<0,02-0,07)	0,08 (0,02-0,19)	0,04 (0,03-0,06)	0,33 (0,02-0,88)	0,33 (0,17-0,55)
Cu	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}$	26,1 (21,1-32,3)	1,7 (<1,7-2,7)	11,2 (6,9-13,9)	21,5 (16,8-28,3)	16,8 (9,5-27,3)
	% IDR	0,29 (0,23-0,36)	0,02 (<0,02-0,03)	0,12 (0,08-0,15)	0,24 (0,19-0,31)	0,19 (0,11-0,30)
	% VD	0,13 (0,11-0,16)	0,01 (<0,01-0,01)	0,06 (0,03-0,07)	0,11 (0,08-0,14)	0,08 (0,05-0,14)
Fe	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}$	36,9 (19,1-63,2)	16,8 (9,2-29,4)	151 (65-275)	8,1 (6,1-10,0)	22,6 (11,0-34,0)
	% IDR	0,03 (0,01-0,05)	0,01 (0,01-0,02)	0,11 (0,05-0,20)	0,01 (0,004-0,01)	0,02 (0,01-0,02)
	% VD	0,02 (0,01-0,04)	0,01 (0,01-0,02)	0,08 (0,04-0,15)	0,01 (0,003-0,01)	0,01 (0,01-0,02)
Mn	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}$	141 (96-231)	2312 (1551-3651)	649 (512-750)	1651 (173-3111)	2409 (1612-3223)
	% IDR	0,6 (0,4-1,0)	10,1 (6,7-15,9)	2,8 (2,2-3,3)	7,2 (0,8-13,5)	10,5 (7,0-14,0)
	% VD	0,7 (0,5-1,2)	11,6 (7,8-18,3)	3,2 (2,6-3,8)	8,3 (0,9-15,6)	12,0 (8,1-16,1)
Se	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}$	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50	<0,50
	% IDR	<0,15	<0,15	<0,15	<0,15	<0,15
	% VD	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07	<0,07
Zn	Média (faixa), $\mu\text{g kg}^{-1}$	35 (<35-49)	70 (<35-171)	30 (<35-51)	22 (<35-50)	45 (<35-62)
	% IDR	0,05 (<0,05-0,07)	0,10 (<0,05-0,24)	0,04 (<0,05-0,07)	0,03 (<0,05-0,07)	0,06 (<0,05-0,09)
	% VD	0,02 (<0,02-0,03)	0,05 (<0,02-0,11)	0,02 (<0,02-0,03)	0,01 (<0,02-0,03)	0,03 (<0,02-0,04)

* **IDR**= Ingestão diária recomendada (Brasil, 2003): Cr = 35 $\mu\text{g}/100\text{g}$; Cu=900 $\mu\text{g}/100\text{g}$; Fe=14 $\text{mg}/100\text{g}$; Mn=2,3 $\text{mg}/100\text{g}$; Se=34 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e Zn=7 $\text{mg}/100\text{g}$ ***VD**=valor diário (FDA, 2013): Cr = 120 $\mu\text{g}/100\text{g}$; Cu=2 $\text{mg}/100\text{g}$; Fe=18 $\text{mg}/100\text{g}$; Mn=2 $\text{mg}/100\text{g}$; Se=70 $\mu\text{g}/100\text{g}$ e Zn=15 $\text{mg}/100\text{g}$

Considerando ambas as recomendações, verifica-se que a contribuição da ingestão de uma xícara de chá para os elementos Fe, Se e Zn é baixa, sendo inferior a 0,30% do valor diário recomendado pelo FDA e 0,25% pela ANVISA. Os maiores valores de Fe são observados nos chás contendo frutos, com médias de 273 e 151 $\mu\text{g kg}^{-1}$, para os chás de flores e frutos e de morango, respectivamente. Para Zn, os maiores valores foram estimados para o consumo de uma xícara diária dos chás de flores e frutos e de mate (144 e 171 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente).

Para Cr, valores maiores foram observados, sendo a contribuição máxima da ingestão diária deste micronutriente de 3,0% da IDR (ANVISA) e 0,9% do VD estabelecido pelo FDA, ambas verificadas na estimativa do consumo de uma xícara de chá preto. Para Cu, entretanto, valores máximos foram observados no chá branco (0,5% da IDR e 0,2% do VD).

Para Mn, no entanto, é observada uma relevante contribuição para a ingestão diária deste elemento: para o consumo de uma xícara de chá de mate, estima-se que até 18% do VD e 16% da IDR são atingidos. Para os chás provenientes de *Camellia sinensis*, valores próximos a 15% também são observados: até 10,7% da IDR e 12,3% do VD para chá branco; 13,5% da IDR e 15,6% do VD para chá preto e 14,0% da IDR e 16,1% do VD para chá verde.

7. RESULTADOS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DAS ESPÉCIES DE ARSÊNIO PRESENTES NAS AMOSTRAS DE CHÁ

7.1 – Otimização das condições de quantificação de As

Para a determinação das espécies de arsênio foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência hifenada à técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma com acoplamento indutivo (HPLC-ICP-MS). Nesta técnica, a separação das espécies inorgânicas e orgânicas de arsênio é realizada através da eluição destes analitos por uma coluna de troca aniônica, sendo que a detecção e a quantificação é realizada pelo monitoramento do sinal transiente de arsênio (^{75}As) pelo ICP-MS. Para a otimização das condições de detecção, foram avaliados alguns parâmetros permitidos pelo software do equipamento e que afetam a sensibilidade do isótopo ^{75}As .

Os parâmetros escolhidos foram: i) o modo de operação da célula de colisão/reação; ii) a distância entre a tocha e o cone de platina e iii) a vazão do gás de nebulização. Para estas avaliações, utilizou-se uma solução contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de arsênio total.

A potência do plasma utilizada foi de 1600 W, sendo recomendada pelo fabricante para esta aplicação. Esta recomendação tem por fundamento a relação diretamente proporcional entre potência do plasma e sinal do equipamento (Becker, 2007). Fixada a potência de trabalho em 1600 W, avaliaram-se os diferentes modos da célula de colisão/reação disponíveis no equipamento: sem gás de colisão/reação (*No gas*), com fluxo de He de 5 mL min^{-1} (modo *He*) e com fluxo de He de 10 mL min^{-1} (modo *HEHe*).

A utilização de gás hélio tem por objetivo atenuar a formação de interferências poliatômicas, através de colisões com este gás na célula de colisão/reação e por discriminação de energia cinética (Thomas, 2008). No entanto, como se busca um método

com elevada sensibilidade, é necessário avaliar a resposta do equipamento frente a introdução deste gás. Dos três modos disponíveis, o modo *HEHe* apresentou, em média, valores de contagem para o isótopo de As próximos ao modo *No gas*. Adicionalmente, neste modo a possível interferência isobárica decorrente da presença de cloreto nas infusões (entre a espécie formada no plasma $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ e a espécie de interesse ^{75}As) é minimizada.

A vazão do gás de nebulização foi otimizada utilizando valores próximos à condição pré-estabelecida pelo fabricante (1,00 L min⁻¹). Percebeu-se que para valores inferiores e superiores, há decréscimos sensíveis no sinal analítico. Estas variações podem ser explicadas pela quantidade insuficiente de amostra chegando ao detector (para vazões menores) e pela diluição do fluxo de amostra em razão do aumento do fluxo do gás de nebulização (Becker, 2007). Como não foram encontradas outras condições que apresentassem ganhos em termos de sensibilidade, manteve-se a vazão do gás de nebulização em 1,00 L min⁻¹.

Estabelecidas estas condições, procedeu-se a otimização da distância entre a tocha e o cone de platina, avaliando distâncias entre 4,0 e 6,0 mm. Observou-se o aumento do sinal analítico para o isótopo ^{75}As com a diminuição da distância entre a tocha e o cone de platina. Este fato é explicado pela reação inversamente proporcional entre esta distância e o sinal analítico: com a diminuição da distância, maior quantidade de analito é transportada até o quadrupolo e, conseqüentemente, o sinal analítico aumenta (Becker, 2007). No entanto, com o aumento na quantidade de amostra ocorre também o aumento do volume de fase móvel que chega ao detector. Embora a fase móvel avaliada para esta aplicação seja constituída apenas por um sal de fosfato de amônio em concentração diminuta (cujá escolha será discutida posteriormente), deve-se minimizar esta quantidade de sal de modo a evitar o acúmulo de partículas em todo o sistema (Moreira *et al.*, 2011). Deste modo, apesar do equipamento permitir a distância mínima de

3,0 mm, optou-se pela distância de 4,0 mm. Aliada a isto, uma cuidadosa avaliação da separação cromatográfica foi realizada de modo que empregasse uma fase móvel com concentração diminuta de sal e baixo tempo de análise.

Após definir uma condição satisfatória, foi avaliada a introdução de pequena quantidade de solvente orgânico volátil (Kovačević & Goessler, 2005) para o aumento da contagem do isótopo monitorado pelo ICP-MS. Para a avaliação foi utilizada uma solução contendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de As e os solventes disponíveis, acetona e isopropanol. De modo a simplificar a introdução deste solvente, optou-se por sua introdução *online*: nesta configuração, o misturador tipo “T” combina os conteúdos do canal que contém a amostra (saída da coluna cromatográfica) e do canal que contém a solução de solvente orgânico (tubo presente na bomba peristáltica do ICP-MS, com 0,25 mm de diâmetro interno) e introduz a mistura no nebulizador *Micromist*. Os dados obtidos encontram-se descritos na Tabela 7.1.

Tabela 7.1: Avaliação da introdução de solvente orgânico frente ao sinal obtido para ^{75}As de uma solução $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de As.

Isótopo	^{75}As (cps)		
	Sem solvente orgânico	Isopropanol 2,0% (v/v)	Acetona 2,0% (v/v)
^{75}As	1760	3218	6374
^{35}Cl	8053	4697	4652

cps = Contagem por segundo.

Através dos dados obtidos na Tabela 7.1, foi possível verificar que a introdução de solvente orgânico produz melhora significativa na contagem do isótopo ^{75}As e decréscimo da leitura para ^{35}Cl . Alguns trabalhos atribuíram a diminuição da contagem de ^{35}Cl à formação de um íon poliatômico com carbono presente no solvente orgânico ($^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^+$), que compete com a formação do íon poliatômico ($^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$) (Larsen & Stürup, 1994). De

modo a verificar esta hipótese, monitorou-se durante o teste o isótopo ^{47}Ti , que sofre interferência isobárica do íon poliatômico ($^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^+$). No entanto, não foi observado aumento significativo na contagem do isótopo ^{47}Ti durante o teste. Apesar desta observação não ser, aparentemente, concordante com o proposto por Larsen & Stürup (1994), deve-se considerar que o uso de célula de reação atenua a presença de espécies poliatômicas e, deste modo, pode atenuar a presença do íon poliatômico de cloreto e carbono, fornecendo um falso negativo para o teste.

Em relação ao aumento da contagem do isótopo ^{75}As , conforme abordado anteriormente, duas hipóteses são atualmente aceitas: a primeira reside na volatilidade do solvente orgânico, que promove melhora do transporte e da nebulização da amostra (Kovačević & Goessler, 2005) e nas reações de transferência de carga entre carbono e elementos com baixo potencial de ionização, como o arsênio (Pettine *et al.*, 2007).

Deste modo, para os próximos testes foi estabelecida a condição que proporcionou a maior contagem para o elemento arsênio: a introdução *online* da solução de acetona 2,0% (v/v). Definidas as melhores condições de quantificação de As, foram avaliadas as melhores condições de separação das quatro espécies de interesse: MMA, DMA, As (III) e As (V). Nesta etapa, o principal objetivo foi a obtenção de uma condição cromatográfica que permitisse a separação satisfatória das quatro espécies de As, com baixo tempo de análise e com a menor concentração possível de fase móvel.

A separação das espécies de arsênio é realizada, em sua grande maioria, utilizando colunas de troca aniônica. Estas colunas tradicionalmente trazem em sua fase estacionária partículas poliméricas, como o copolímero poliestireno-divinilbenzeno, que contém em sua superfície grupos trocadores de íons como o grupo quaternário de amônio. Estes materiais possuem características como a resistência a elevadas pressões e a necessidade de controle térmico em razão do processo de separação por troca iônica ser dependente da temperatura (Collins & Braga, 1987). Adotando-se como ponto de

partida as condições apresentadas nos trabalhos de Moreira *et al.* (2011) e Paproski & Le (2004), avaliou-se a separação das espécies utilizando as seguintes condições: fase móvel de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ em três concentrações (15, 20 e 25 mmol L^{-1}), em três pHs (5,5; 6,0 e 6,5) e em duas vazões diferentes (1,0 e 1,5 mL min^{-1}).

A escolha destas condições baseou-se em características das infusões de chá: pH aproximadamente neutro em razão da elevada concentração de elementos que sofrem precipitação em meio alcalino, como Fe e Mn; concentrações baixas da fase móvel, de modo a prevenir formação e acúmulo de cristais de fosfato no cromatógrafo e em peças do ICP-MS, e a vazão de fase móvel de modo a reduzir o tempo de análise. Foi utilizada uma coluna de troca aniônica PRP-X100, com 10 μm de tamanho de partícula e dimensões de 4,1x250 mm (Hamilton, Nevada, USA), largamente utilizada em análises de especiação. O volume de injeção foi de 100 μL e a temperatura do forno foi mantida constante em 27°C. Para a avaliação, foi utilizada uma solução contendo 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie e monitorado o isótopo ^{75}As . Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 7.2.

Tabela 7.2: Avaliação das condições da separação cromatográfica para as espécies de arsênio.

Condição cromatográfica	Conc. FM (mmol L ⁻¹)	pH	Vazão FM (mL min ⁻¹)	Resultado	
				Tempo de análise (s)	Principais observações
1	15	5,5	1,0	360	Picos definidos, compostos apresentam sinais analíticos (cps) próximos.
2			1,5	240	Baixa resolução para As (III) e DMA
3		6,0	1,0	400	Picos definidos. Pico As (III) apresentou sinal analítico inferior às demais espécies
4			1,5	260	
5		6,5	1,0	560	Co-eluição dos picos DMA e MMA.
6			1,5	360	
7	20	5,5	1,0	320	Picos definidos, ligeira diminuição do sinal analítico para o pico As (III).
8			1,5	220	
9		6,0	1,0	360	Picos definidos, compostos apresentam sinais analíticos próximos.
10			1,5	250	
11		6,5	1,0	420	Co-eluição dos picos DMA e MMA.
12			1,5	300	
13	25	5,5	1,0	250	Baixa resolução para As (III) e DMA
14			1,5	180	
15		6,0	1,0	300	Baixa resolução para DMA e MMA. Pico As (III) apresentou sinal analítico inferior às demais espécies
16			1,5	250	
17		6,5	1,0	360	Co-eluição dos picos DMA e MMA.
18			1,5	250	

cps = contagens por segundo; **DMA** = ácido dimetil-arsínico; **MMA** = ácido monometil-arsônico

A partir dos resultados obtidos, optou-se pela utilização da condição 10 (em destaque) em razão da obtenção de uma condição de separação satisfatória das quatro espécies de arsênio que permitisse sinais analíticos próximos para todas as espécies, importantes na obtenção de um método com a mesma sensibilidade para todos os analitos, e menor tempo de análise, que está diretamente relacionado ao menor consumo de argônio e maior produtividade analítica. Na Figura 7.1 é apresentado o cromatograma obtido para a condição selecionada.

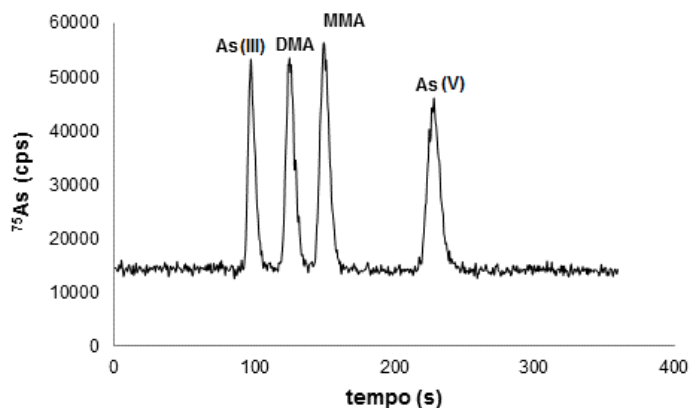


Figura 7.1: Cromatograma obtido para as espécies de As ($5 \mu\text{g L}^{-1}$). Condição cromatográfica: FM 20 mmol L^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pH 6,0; vazão de FM de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$; coluna PRP-X100, partícula de $10 \mu\text{m}$, dimensões de $4,1 \times 250 \text{ mm}$, volume de injeção de $100 \mu\text{L}$; temperatura do forno 27°C . MMA = ácido monometil-arsônico e DMA = ácido dimetil-arsínico.

Após a definição das condições otimizadas para a separação das quatro espécies de As foram avaliados procedimentos analíticos para a análise destas espécies nas infusões que tiveram seu teor de As total quantificável, ou seja, As total $>0,46 \mu\text{g L}^{-1}$. Estes procedimentos priorizaram condições de análise que permitissem a adequada quantificação destas espécies, com poucas etapas de preparo de amostra, baixo uso de reagentes químicos (em acordo com os conceitos de “química verde”) e alta produtividade analítica.

7.2 - Avaliação do método de preparo de amostra e efeito de matriz

Para as análises de especiação são utilizados métodos brandos que, em geral, não eliminam a matriz. No estudo de espécies de arsênio em amostras de vinhos realizado por Moreira *et al.* (2013), o método de preparo de amostras consistiu na diluição (10x) das amostras em fase móvel. No método estabelecido pelo FDA (2013) para análise em amostras de sucos de frutas, a diluição sugerida é de 5x para sucos prontos para o consumo e para sucos concentrados é recomendada uma diluição de 30x.

Deste modo, para as infusões de chá buscou-se um método no qual o fator de diluição fosse o menor possível, impactando em menores limites de detecção e de quantificação para o método. Levando isto em consideração, inicialmente testou-se a utilização da infusão de chá sem diluição em fase móvel. Sendo a etapa de filtração do extrato em membrana com 0,2 µm de tamanho de poro indispensável à injeção nesta coluna cromatográfica, este procedimento mostrou-se inviável, pois as infusões de chá causaram saturação desta membrana muito rapidamente.

Avaliou-se, então, a diluição na proporção 1:1 que se mostrou bastante satisfatória no que tange a filtração. No entanto, como a matriz não é eliminada, foi necessário avaliar o efeito de sua presença na correta quantificação das espécies de As. Este efeito foi avaliado mediante o preparo de curvas analíticas em meio de fase móvel ((NH₄)₂HPO₄, 20 mmol L⁻¹, pH 6,0) e em presença de matriz, já diluída em fase móvel. Para o preparo da curva analítica em presença de matriz foi utilizada uma infusão de chá de flores e frutos cujo teor de arsênio total não foi quantificável, ou seja, As total <0,46µg L⁻¹. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 7.3.

Tabela 7.3: Avaliação do efeito de matriz através de curvas de calibração externa (em meio de fase móvel) e em presença de matriz (infusão de chá de flores e frutos com As total $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$)

Espécie	Curva em meio de fase móvel		Curva em presença de matriz	
	Equação	r^2	Equação	r^2
As (III)	$y=87902x-3155$	0,9999	$y=113223x+9973$	0,9996
As (V)	$y=117047+3862$	0,9988	$y=104734x+4651$	0,9997
DMA	$y=102399x-585$	0,9999	$y=101039x+9544$	0,9996
MMA	$y=125914x+3222$	1,0000	$y=142570x+5352$	0,9999

Como observado na Tabela 7.3, os valores dos coeficientes angulares obtidos para a curva em meio de fase móvel são próximos aos valores obtidos para a curva preparada em presença de matriz, com exceção da espécie inorgânica As^{3+} , onde a diferença é de 22%. De modo a obter um método rápido e adequado à quantificação das quatro espécies, optou-se pela realização da curva analítica em presença de matriz. A faixa utilizada foi de 0,25 a 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

7.3 – Avaliação das figuras de mérito do método para espécies de As

Definidas as condições de análise e da construção da curva analítica, o método foi validado baseando-se em recomendações de INMETRO (2011), sendo avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, sensibilidade, exatidão e precisão.

A seletividade foi verificada através da análise dos cromatogramas obtidos para soluções padrão contendo 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie de arsênio. A sensibilidade foi avaliada através dos limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ), obtidos pela análise de 10 brancos analíticos. Para as quatro espécies foram realizadas adição dos analitos em concentração inferior à curva analítica de modo a promover resposta do equipamento. A partir dos desvios-padrão dos resultados (expressos em concentração)

calcularam-se os limites de detecção e de quantificação (LOD=3s e LOQ=10s). Para a obtenção dos limites para o método, multiplicou-se o valor obtido pelo fator de diluição decorrente do preparo de amostras (neste caso, igual a 2). Para avaliar a exatidão do método foram empregados ensaios de recuperação (em triplicata) em três níveis: 0,25; 1,0 e 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para a precisão foram avaliadas infusões do chá de flores e frutos fortificadas com 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada espécie (n=8), em dois dias distintos. Os resultados são apresentados na Tabela 7.4 e Figura 7.2.

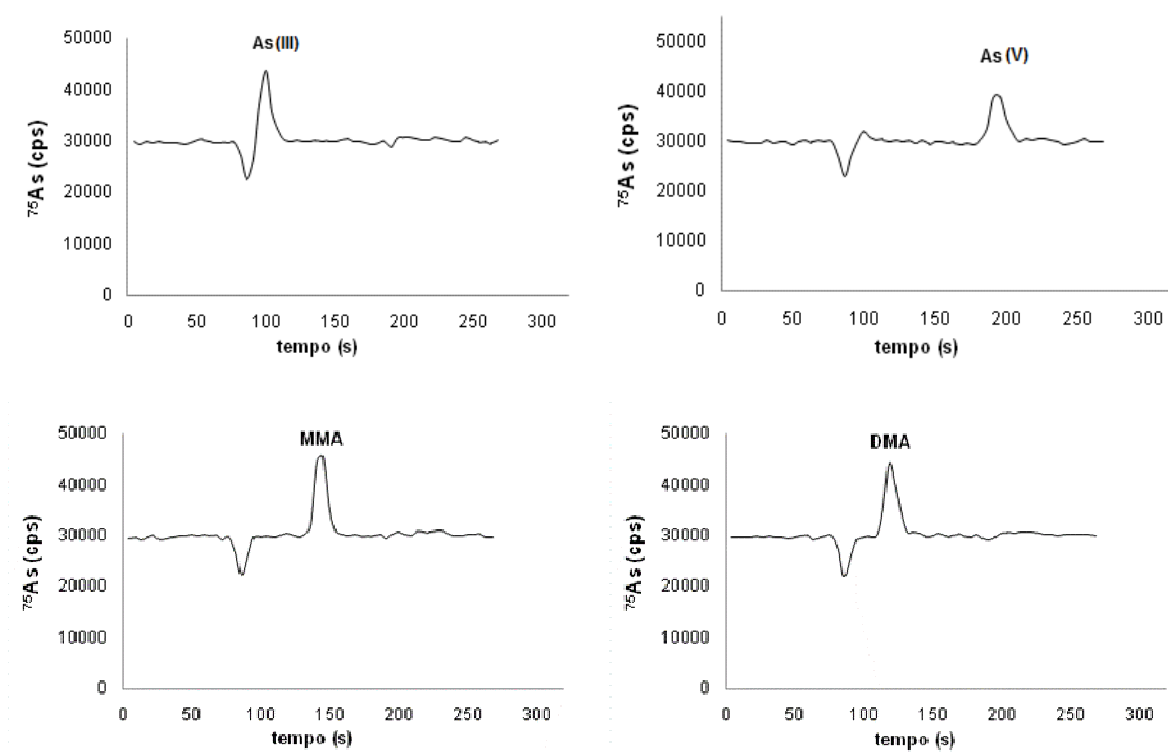


Figura 7.2: Cromatogramas obtidos para extratos fortificados com 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ das espécies de arsênio. Condição cromatográfica: FM 20 mmol L^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, pH 6,0; vazão de FM de 1,5 mL min^{-1} ; coluna PRP-X100, partícula de 10 μm , dimensões de 4,1 x 250 mm, volume de injeção de 100 μL ; temperatura do forno 27°C. MMA = ácido monometil-arsênico e DMA = ácido dimetil-arsênico.

Na Figura 7.2 é possível verificar através dos cromatogramas que o método proposto possui seletividade e ausência de interconversão para todas as espécies de interesse. A baixa contagem apresentada em $t_r=90$ s é decorrente da presença de cloreto na bebida de chá, verificada através de ensaios de adição de HCl. Este fato ratifica a necessidade da utilização da cela de colisão com gás hélio de modo a minimizar a interferência isobárica da espécie poliatômica $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ ao isótopo monoatômico de As ($^{75}\text{As}^+$).

Tabela 7.4: Avaliação das figuras de mérito de sensibilidade (limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão para o método de determinação de espécies de arsênio em infusões de chá.

Espécie	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	CV (%) [*]	Recuperação (%)		
				Nível 1 [*]	Nível 2 [*]	Nível 3 [*]
As (III)	0,16	0,53	3	66±4	115±6	119±3
As (V)	0,20	0,66	5	87±13	115±9	117±2
MMA	0,13	0,44	7	109±5	107±5	110±2
DMA	0,15	0,49	4	85±14	104±8	108±2

^{*}CV = Coeficiente de variação; **Nível 1:** $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$; **Nível 2:** $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$; **Nível 3:** $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$

Os valores obtidos para LOD e LOQ foram considerados satisfatórios e são próximos aos reportados na literatura. Moreira *et al.* (2011) em seu estudo com amostras de vinho obtiveram limites de quantificação de 0,30; 0,69; 0,39 e $0,45 \mu\text{g L}^{-1}$ para As (III), As (V), MMA e DMA, respectivamente enquanto FDA (2013) reporta em seu método para estas espécies em suco de maçã, LOQ de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para As^{3+} , As^{5+} ; MMA e DMA.

Os valores de exatidão e precisão foram considerados adequados visto que se encontram dentro das faixas consideradas aceitáveis pela AOAC (2013) que define limites de recuperação entre 50-120% para concentrações inferiores a 1 ppb e de 70 a 125% para concentrações inferiores a 10 ppb. Para a precisão em dias distintos, os valores

obtidos são cerca de 8x inferiores ao máximo estabelecido: 32% para concentrações próximas a 10 ppb. Deste modo, o método estabelecido foi considerado adequado para a análise das espécies de As nas infusões de chá.

7.4 – Aplicação do método para análise das infusões de chá e avaliação da estimativa de exposição às espécies de arsênio

Após a avaliação das figuras de mérito do método, este foi aplicado às amostras cujo teor de arsênio total foi quantificado, ou seja, amostras nas quais o teor de As total foi superior a $0,46 \mu\text{g L}^{-1}$. Os resultados encontram-se na Tabela 7.5 e na Figura 7.3 é apresentado um cromatograma típico para os tipos de chá analisados.

Tabela 7.5: Resultados obtidos para as amostras de infusões de chá cujo teor de As total foi quantificado (As total $>0,46 \mu\text{g L}^{-1}$)

Chá	Marca	Espécies de arsênio ($\mu\text{g L}^{-1}$)					As total ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rec (%)*
		As (III)	As (V)	DMA	MMA	Soma		
Flores e frutos	A1	<0,53	$0,83 \pm 0,05$	<0,49	<0,44	0,83	$0,83 \pm 0,15$	100
	A2	<0,53	$0,78 \pm 0,05$	<0,49	<0,44	0,78	$0,85 \pm 0,02$	92
	A3	$0,96 \pm 0,15$	$0,86 \pm 0,05$	<0,49	<0,44	1,83	$1,44 \pm 0,05$	127
	B1	$1,40 \pm 0,21$	$1,46 \pm 0,16$	<0,49	<0,44	2,86	$2,30 \pm 0,13$	124
	B2	$1,34 \pm 0,04$	$1,21 \pm 0,02$	<0,49	<0,44	2,55	$2,12 \pm 0,20$	120
	B3	$1,21 \pm 0,25$	$1,14 \pm 0,23$	<0,49	<0,44	2,35	$2,29 \pm 0,22$	102
Morango	C1	$2,69 \pm 0,24$	$2,12 \pm 0,08$	<0,49	<0,44	4,81	$4,17 \pm 0,18$	115
	C2	$3,43 \pm 0,05$	$2,73 \pm 0,21$	<0,49	<0,44	6,16	$5,32 \pm 0,09$	116
Capim cidreira	B1	<0,53	$1,19 \pm 0,12$	<0,49	<0,44	1,19	$1,36 \pm 0,05$	87

* **Recuperação** = razão, em porcentagem, da soma das espécies de arsênio em relação ao valor de As total.

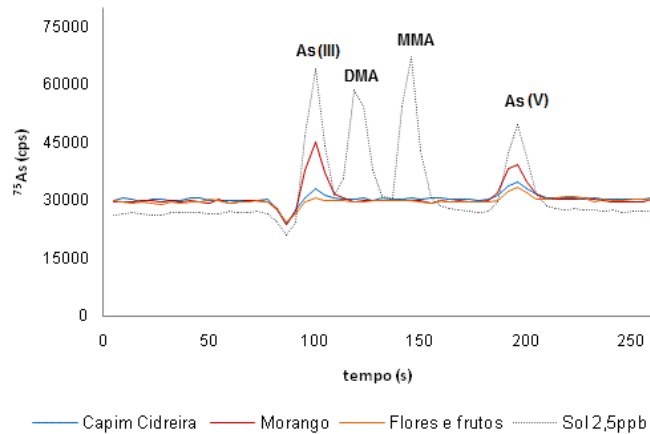


Figura 7.3: Cromatogramas obtidos para amostras de infusões de chá de capim cidreira, morango e flores e frutos. Condição cromatográfica: FM 20 mmol L⁻¹ (NH₄)₂HPO₄, pH 6,0; vazão de FM de 1,5 mL min⁻¹; coluna PRP-X100, partícula de 10 µm, dimensões de 4,1 x 250 mm, volume de injeção de 100 µL; temperatura do forno 27°C. MMA = ácido monometil-arsônico e DMA = ácido dimetil-arsínico.

Os resultados mostraram que é mínima a presença de espécies de As em infusões de chá, mesmo quando são encontrados níveis de As total nas folhas acima do estabelecido pela legislação nacional e do MERCOSUL (0,6 mg kg⁻¹) (Brasil, 2013), indicando que nas infusões de chás é mínima a transferência do As presente nas folhas (ervas). Através da Tabela 7.5 observa-se a predominância das espécies inorgânicas nas infusões de chá estudadas, em especial a espécie As (V). Yuan *et al.* (2007), em seu estudo com amostras provenientes da China, obtiveram resultados semelhantes: todas as amostras com nível quantificável de As apresentaram As (V) e em algumas poucas foram observadas espécies orgânicas (DMA e MMA).

Espécies inorgânicas são mais comumente encontradas em amostras de vegetais. Bohari *et al.* (2002) em seu estudo com plantas de arroz, feijão e pimenta verificaram predominância de arsênio inorgânico nestas amostras, em especial em suas raízes. Sun *et al.* (2009), em seu estudo com produtos derivados de arroz, observaram predominância

de espécies inorgânicas, sendo que a soma das espécies inorgânicas foi superior em cerca de 4x às espécies orgânicas. Ainda em relação a derivados de arroz, Signes-Pastor *et al.* (2009) em seu estudo com produtos fermentados de arroz observaram teores das espécies inorgânicas cerca de 2x superiores aos de espécies orgânicas, em especial DMA. Moreira *et al.* (2011) em seu estudo com amostras de vinhos da Argentina, Brasil e Chile verificaram majoritária presença das espécies inorgânicas: das 14 amostras analisadas, apenas 2 apresentaram teores quantificáveis de DMA.

Alguns estudos têm verificado a estabilidade das espécies de arsênio utilizando ensaios em sistema modelo e em amostras de vegetais. Em sua maioria, não é verificada a interconversão das espécies (Devesa *et al.*, 2008), exceto a decomposição de arsenoaçúcares à DMA em presença de pH alcalino e temperatura de 60°C (Gamble *et al.*, 2002, 2003), algo pouco usual no preparo de alimentos. Um consenso, no entanto, é observado para o cozimento: Díaz *et al.* (2004), em seu estudo com amostras de vegetais e cereais provenientes do Chile, observaram diminuição dos níveis de As após o cozimento com água destilada. No entanto, quando água contaminada com arsênio inorgânico é utilizada, os níveis crescem proporcionalmente. Laparra *et al.* (2005) observaram aumento de 5 a 17x na concentração de arsênio inorgânico em arroz cozido com águas contaminadas em diferentes níveis de concentração de As (V).

Ainda através da Tabela 7.5 é possível verificar a concordância do valor da soma das quatro espécies de arsênio com o valor determinado para arsênio total, variando entre 87 e 127%. Embora este intervalo possa ser amplo, é importante ressaltar que o cálculo considerou apenas os valores médios e não os intervalos de concentração.

A toxidez de arsênio é dependente majoritariamente de sua forma química e estado de oxidação, além de fatores como estado físico, taxa de absorção e eliminação (Barra *et al.*, 2000). Isto é evidenciado pelo diferentes valores de DL₅₀ (dose letal para 50% da população) observados (Cornelis *et al.* 2005): Arsina (AsH₃) = 3 mg kg⁻¹; As (III)

(As₂O₃, HAsO₂, AsO₃, AsCl₃, As₂S₃) = 14 mg kg⁻¹; As (V) (As₂O₅, H₃AsO₄, HAsO₃, AsO₄³⁻) = 20 mg kg⁻¹; MMA = 1800 mg kg⁻¹; DMA = 2600 mg kg⁻¹; arsenobetaína e arsenocolina >10000 mg kg⁻¹. Sendo o menor valor de DL₅₀ relacionado às espécies mais tóxicas, pode-se verificar que as espécies inorgânicas possuem maior toxicidade em relação às espécies orgânicas. Diante disto, a FAO/WHO define para as espécies inorgânicas um limite inferior da dose de referência para aumentar em 0,5% a incidência de câncer de pulmão (3,0 µg kg⁻¹ de peso corpóreo) (FAO/WHO, 2015).

Para estimar a exposição ao arsênio, foi considerado novamente o consumo diário de uma xícara de chá por um adulto de 70 kg. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 7.6.

Tabela 7.6: Avaliação da estimativa de exposição à arsênio decorrente do consumo diário de uma xícara de chá por um adulto de 70 kg.

Chá	Marca	i-As* (µg L ⁻¹)	% BMDL _{0,5}
Flores e frutos	A1	0,83	0,4
	A2	0,78	0,4
	A3	1,83	0,9
	B1	2,86	1,4
	B2	2,55	1,2
	B3	2,35	1,1
Morango	C1	4,81	2,3
	C2	6,16	2,9
Capim cidreira	B1	1,19	0,6

*i-As = soma das espécies inorgânicas As (III) e As (V)

Através da Tabela 7.6 é possível observar que para o consumo considerado, os níveis encontrados correspondem a menos de 3% da BMDL_{0,5}, sendo os maiores valores obtidos para o chá de morango (2,3 e 2,9%).

8. CONCLUSÕES

No presente estudo foram avaliados métodos para a determinação dos elementos inorgânicos Al, As, Ba, Cd, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Se e Zn em amostras comerciais de chá (ervas ou sachês) e nas bebidas preparadas a partir da sua infusão com o uso de água fervente. Após a avaliação – que incluiu comparações com outros métodos e avaliações de interferentes presentes na matriz, os métodos foram validados e aplicados a 90 amostras comerciais de chá adquiridos nos comércios do Sul e do Sudeste do país.

Em relação às amostras comerciais (ervas ou sachês), verificou-se que o método avaliado (digestão ácida assistida por micro-ondas) foi adequado para a quantificação destes elementos, obtendo-se concordância entre 77 e 118% com os valores fornecidos para dois materiais de referência certificados. Na aplicação às amostras comerciais, observou-se grande variabilidade dos teores destes elementos, sendo este fato atribuído à variabilidade dos lotes analisados (quantidade de folhas, galhos, etc) e/ou à utilização de chás de diversas origens. Algumas amostras apresentaram teores acima do permitido pela legislação do país e do MERCOSUL para os elementos As, Cd e Pb, sendo importante incentivar esforços para a diminuição destes níveis.

Em relação às amostras de infusão, comprovou-se que a extração dos elementos de interesse é máxima no período de até 5 minutos do contato entre as folhas de chá e a água fervente. Verificou-se ainda que o método direto aliado a análise em fluxo é adequado à análise das infusões, sendo obtida concordância de 82 a 120% em ensaios de recuperação em três níveis de concentração. De forma geral, observou-se a redução da concentração dos analitos nas amostras comerciais analisadas, após o preparo da bebida, exemplificado pela não quantificação de Se nas bebidas, embora este elemento tenha sido quantificado em 99% das amostras de chá. Em relação à adequação à legislação nacional, não foram observados níveis acima do permitido para nenhum dos elementos avaliados.

A avaliação da estimativa de ingestão demonstrou a relevância do consumo da bebida, uma vez que apenas uma xícara de chá diária pode contribuir com até 14% da ingestão diária recomendada pela ANVISA para Mn, por exemplo. A avaliação de exposição aos contaminantes inorgânicos mostrou baixa contribuição destes elementos traços para atingir os valores estabelecidos pelo CODEX. A exceção se faz ao elemento Al nas amostras provenientes da *Camellia sinensis*. Se considerada a ingestão diária de uma xícara de chá preto por um adulto de 70 kg, a contribuição pode alcançar até 48% do PTWI. No entanto, é necessário ressaltar que esta estimativa não considerou outros alimentos na dieta diária nem a bioacessibilidade e a biodisponibilidade deste elemento no organismo.

A avaliação das espécies de arsênio foi realizada utilizando a técnica hifenada HPLC-ICP-MS, que permitiu a separação e a quantificação de espécies orgânicas (DMA e MMA) e espécies inorgânicas (As (III) e As (V)). O método proposto apresentou seletividade para as espécies (ausência de interconversão das espécies), concordância com os valores encontrados para o teor de As total (87 a 127%) e limites de quantificação menores que os reportados na literatura. As espécies inorgânicas predominaram nas amostras analisadas, sendo observados níveis de até 3,43 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As^{+3} na infusão de chá de morango. No entanto, estes valores são baixos e correspondem a, no máximo, 2,9% da $\text{BMDL}_{0,5}$ estabelecida pelo CODEX, considerando o consumo de uma xícara de chá diária por um adulto de 70 kg.

Por fim, a análise multivariada permitiu a classificação das variedades de chá através de sua composição inorgânica. Observou-se que as dez variedades são classificadas em três grupos distintos (amostras provenientes de *Camellia sinensis*, amostras de chá mate e demais) de acordo com os teores dos elementos traço. A classificação foi possível embora as amostras fossem constituídas por misturas de ervas provenientes de diferentes localidades.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR. Chá gelado: consumo 2004-2008. **Associação Brasileira das Indústrias de Refrigerantes e de Bebidas Não-Alcoólicas**, 2010. Disponível em: <<http://www.abir.org.br/IMG/pdf/doc-205.pdf>>. Acesso em: 16 de abril de 2015.

Aldars-García, L.; Zapata-Revilla, M.A.; Tenorio-Sanz, M.D. Characterization and study of the essential mineral components of Spanish commercial herbal products and their infusions. **Journal of Food and Nutrition Research**, 52(3), 172-180, 2013.

AOAC – Association of Official Agricultural Chemists. **Guidelines for dietary supplements and botanicals**, 2013.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico n.45, de 28 de dezembro de 2010. **Esclarecimentos sobre a regulamentação de chás**.

Arpadjan, S.; Çelik, G.; Taşkesen, S.; Güçer, Ş. Arsenic, cadmium and lead in medicinal herbs and their fractionation. **Food and Chemical Toxicology**, 46, 2871–2875, 2008.

Balentine, D.A.; Wiseman, S.A.; Bouwens, L.C. The chemistry of tea flavonoids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 37, 693-694, 1997.

Barshick, C.M.; Duckworth, D.C.; Smith, D.H. (editores) **Inorganic Mass Spectrometry: Fundamentals and Applications**. Marcel Dekker, Nova Iorque, 2000, 512p.

Barra, C.M.; Santelli, R.E.; Abrão, J.J.; de la Guardia, M. Especificação de arsênio - uma revisão. **Química Nova**, 23(1), 58-70, 2000.

Becker, J.S. **Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications**. John Wiley & Sons, Chichester, Inglaterra, 1st ed., 2007, p.518.

Bohari, Y.; Lobos, G.; Pinochet, H.; Pannier, F.; Astruc, A.; Potin-Gautier, M. Speciation of arsenic in plants by HPLC-HG-AFS: extraction optimisation on CRM materials and application to cultivated samples. **Journal of Environmental Monitoring**, 4, 596–602, 2002.

BRASIL. Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 09 de abril de 1965.

BRASIL. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 26 de dezembro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para Café, Cevada, Chá, Erva-Mate e Produtos Solúveis. Diário Oficial da União, de 23 de agosto de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 219, de 22 de dezembro de 2006. Aprova a inclusão do uso das espécies vegetais e parte(s) de espécies vegetais para o preparo de chás constante da Tabela 1 do Anexo desta Resolução em complementação as espécies aprovadas pela Resolução ANVISA RDC nº. 267, de 22 de setembro de 2005. Diário Oficial da União, de 26 de dezembro de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. Diário Oficial da União, de 23 de setembro de 2005.

BRASIL. Resolução RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 30 de agosto de 2013.

Camargo, M.C.R.; Toledo, M.C.F. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) na dieta da população de Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 22(1), 49-53, 2002.

Campos, R.C.; Lima Verde Filho, A.M. Avaliação do conteúdo de metais em plantas de uso na medicina popular e em seus extratos aquosos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 16, 184-187, 1996.

Cao, H.; Qiao, L.; Zhang, H.; Chen, J. Exposure and risk assessment for aluminium and heavy metals in Puerh tea. **Science of the Total Environment**, 408, 2777–2784, 2010.

Collins, C.H. e Braga, G. L. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Editora da Unicamp, Campinas, 2ª ed., 202, 1987.

Commission Regulation (EC) N.º 629/2008 amending Regulation (EC) N.º 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Official Journal of the European Communities, 2008, L 173, 6-9.

Cornelis, R.; Crews, H.; Caruso, J; Heumann, K.G. (editores). **Handbook of Elemental Speciation II: Species in the Environment, Food, Medicine & Occupational Health**. John Wiley & Sons, Chichester, Inglaterra, 2005, 69-85.

Dattner, C. **Chá: rituais e benefícios**. Editora Senac, São Paulo, 2011, p.158.

Devesa, V.; Vélez, D.; Montoro, R. Effect of thermal treatments on arsenic species contents in food. **Food and Chemical Toxicology**, 46, 1-8, 2008.

Díaz, O.P.; Leyton, I.; Muñoz, O.; Núñez, N.; Devesa, V.; Súñer, M.A.; Vélez, D.; Montoro, R. Contribution of water, bread, and vegetables (raw and cooked) to dietary intake of inorganic arsenic in a rural village of Northern Chile. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 1773–1779, 2004.

Emekli-Alturfan, E.; Yarat, A.; Akyuz, S. Fluoride levels in various black tea, herbal and fruit infusions consumed in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, 47, 1495-1498, 2009.

FAO / Committee on Commodity Problems. Report of the twentieth session of the intergovernmental group on tea. Current situation and medium outlook retrieved. Colombo, Sri Lanka, 2012.

FAO/WHO Summary Evaluation Performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Ninth Session. New Delhi, India, 2015.

FDA. **Elemental Analysis Manual: Section 4.10: High Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric determination of four arsenic species in fruit juice**. Versão 1.0, 2013.

Fernández, P.L.; Pablos, F.; Martín, M.J.; González, A.G. Multi-element analysis of tea beverages by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Food Chemistry**, 76, 483-489, 2002.

Ferreira, M.M.C.; Antunes, A.M.; Melgo, M.S.; Volpe, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, 22(5), 724-731, 1999.

Flaten, A.-K.; Lund, W. Speciation of aluminum in tea infusions studied by size exclusion chromatography with detection by post-column reaction. **The Science of the Total Environment**, 207, 21-28, 1997.

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

Gallaher, R. N.; Gallaher, K.; Marshall, A. J.; Marshall, A. C. Mineral analysis of ten types of commercially available tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, 19, S53-S57, 2006.

Gamble, B.M.; Gallagher, P.A.; Shoemaker, J.A.; Weis, X.; Schwegel, C.A.; Creed, J.T. An investigation of the chemical stability of arsenosugars in simulated gastric juice and acidic environments using IC-ICP-MS and IC-ESI-MS/MS. **Analyst**, 127, 781–785, 2002.

Gamble, B.M.; Gallagher, P.A.; Shoemaker, J.A.; Parks, A.N.; Freeman, D.M.; Schwegel, C.A.; Creed, J.T. An investigation of the chemical stability of arsenosugars in basic environments using IC-ICPMS and IC-ESI-MS/MS. **Analyst** 128, 1458–1461, 2003.

Garcia, R.V.; Basualdo, I.; de Herebia, M.; Caballero, S. Minerals content of paraguayan yerba mate. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, 47, 77-80, 1997.

Gomez, M.R.; Cerutti, S.; Sombra, L.L.; Silva, M.F.; Martínez, L.D. Determination of heavy metals for the quality control in argentinian herbal medicines by ETAAS and ICP-OES. **Food and Chemical Toxicology**, 45, 1060-1064, 2007.

Görür, F.K.; Keser, R.; Akçay, N.; Dizman, S.; Okumuşoğlu, N.T. Radionuclides and heavy metals concentrations in Turkish market tea. **Food Control**, 22, 2065–2070, 2011.

Hayacibara, M. F.; Queiroz, C.S.; Tabchoury, C.P.M.; Cury, J.A. Fluoride and aluminum in teas and tea-based beverages. **Revista de Saúde Pública**, 28(1), 100-105, 2004.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQ-CGCRE-008. Rev.: 04, 1-20, julho de 2011.

Kara, D. Evaluation of trace metal concentrations in some herbal and herbal teas by principal component analysis. **Food Chemistry**, 114, 347-354, 2009.

Karak, T.; Bhagat, R.M. Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. **Food Research International**, 43, 2234-2252, 2010.

Khan, M.N.; Sarwar, A.; Bhutto, S.; Wahab, M.F. Physicochemical characterization of the strawberry samples on regional basis using multivariate analysis. **International Journal of Food Properties**, 13, 789-799, 2010.

Kovačević, M.; Goessler, W. Direct introduction of volatile carbon compounds into the spray chamber of an inductively coupled plasma mass spectrometer: Sensitivity enhancement for selenium. **Spectrochimica Acta Part B**, 60, 1357-1362, 2005.

Krejčová, A.; Černohorský, T. The determination of boron in tea and coffee by ICP–AES method. **Food Chemistry**, 82, 303-308, 2003.

Jin, C.W.; He, Y.F.; Zhang, K.; Zhou, G.D.; Shi, J.L.; Zheng, S.J. Lead contamination in tea leaves and non-edaphic factors affecting it. **Chemosphere**, 61, 726-732, 2005.

Laparra, J.M.; Vélez, D.; Barberá, R.; Farré, R.; Montoro, R. Bioavailability of inorganic arsenic in cooked rice: practical aspects for human risk assessments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 8829–8833, 2005.

Larsen, E.H.; Stürup, S. Carbon-enhanced inductively coupled plasma mass spectrometric detection of arsenic and selenium and its application to arsenic speciation. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 9, 1099-1105, 1994.

Liu X.; Zhao Q.; Sun, G.; Williams P.; Lu, X.; Cai J.; Liu, W. Arsenic speciation in Chinese Herbal Medicines and human health implication for inorganic arsenic. **Environmental Pollution**, 172, 149-154, 2013.

Llorente-Mirandes, T.; Barbero, M.; Rubio, R.; López-Sánchez, J.F. Occurrence of inorganic arsenic in edible Shiitake (*Lentinula edodes*) products. **Food Chemistry**, 158, 207-215, 2014.

Łozak, A.; Sołtyk, K.; Ostapczuk, P.; Fijałek, Z. Determination of selected trace elements in herbs and their infusions. **The Science of the Total Environment**, 289, 33-40, 2002.

Ly, H.-P.; Lin, Z.; Tan, J.-F.; Guo, L. Contents of fluoride, lead, copper, chromium, arsenic and cadmium in Chinese Pu-erb tea. **Food Research International**, 53, 938-944, 2013.

Malik, J.; Szakova, J.; Drabek, O.; Balik, J.; Kokoska, L. Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions. **Food Chemistry**, 111, S20-S25, 2008.

Malik, J.; Frankova, A.; Drabek, O.; Szakova, J.; Ash, C.; Kokoska, L. Aluminium and other elements in selected herbal tea plant species and their infusions. **Food Chemistry**, 139, 728-734, 2013.

Mandiwana, K. L.; Panichev, N.; Panicheva, S.; Determination of chromium(VI) in black, green and herbal teas. **Food Chemistry**, 129, 1839-1843, 2011.

May, T.W. & Wiedmeyer, R.H.A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. **Atomic Spectroscopy**, 19(5), 150-155, 1998.

McKenzie, J.S.; Jurado, J.M.; de Pablos, F. Characterization of tea leaves according to their total mineral content by means of probabilistic neural networks. **Food Chemistry**, 123, 859-864, 2010.

McSheehy, S; Szpunar, J. Speciation of arsenic in edible algae by bi-dimensional size-exclusion anion exchange HPLC with dual ICP-MS and electrospray MS/MS detection. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 15, 79-87, 2000.

Mehra, A.; Baker, C.L. Leaching and bioavailability of aluminium, copper and manganese from tea (*Camellia sinensis*). **Food Chemistry**, 100, 1456-1463, 2007.

MERCOSUL. Resolução GMC n. 12/2011. Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos.

Moreira, C.M.; Duarte, F.A.; Lebherz, J.; Pozebon, D.; Flores, E.M.M.; Dressler, V.L. Arsenic speciation in white wine by LC-ICP-MS. **Food Chemistry**, 126, 1406-1411, 2011.

Morgano, M.A.; Queiroz, S.C.N.; Ferreira, M.M.C. Determinação dos teores de minerais em sucos de frutas por espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 19(3), 344-348, 1999.

Mossion, A.; Potin-Gautier, M.; Delerue, S.; Le Hécho, I.; Behra, P. Effect of water composition on aluminium, calcium and organic carbon extraction in tea infusions. **Food Chemistry**, 106, 1467-1475, 2008

Nardi, E. P.; Evangelista, F. S.; Tormen, L.; Saint´Pierre, T. D.; Curtius, A. J.; Souza, S. S.; Barbosa Jr., F.; **Food Chemistry**, 112, 727-, 2009.

Nookabkaew, S.; Rangkadilok, N.; Satayavivad, J. Determination of trace elements in herbal tea products and their infusions consumed in Thailand. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 54(18), 6939-6944, 2006.

Özcan, M. M.; Ünver, A.; Uçar, T.; Arslan, D. Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction. **Food Chemistry**, 106, 1120-1127, 2008.

Paproski, R.E.; Le, S.C. Boric acid-assisted anion-exchange chromatography for separating arsenic species. **Analytica Chimica Acta**, 526, 69-76, 2004.

Peixoto, R.R.A.; Mazon, E.A.M.; Cadore, S. Estimation of the bioaccessibility of metallic elements in chocolate drink powder using an *in vitro* digestion method and spectrometric techniques. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 24(5), 884-890, 2013.

Pettine, M.; Casentini, B.; Mastroianni, D.; Capri, S. Dissolved inorganic carbon effect in the determination of arsenic and chromium in mineral waters by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, 599, 191-198, 2007.

Pinto, M. Tea: A new perspective on health benefits. **Food Research International**, 53, 558–567, 2013.

Pohl, P.; Prusisz, B. Fractionation of calcium and magnesium in honeys, juices and tea infusions by ion exchange and flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, 69(5), 1227-1233, 2006.

Preedy, V.R. (editor) **Tea in Health and Disease Prevention**. Academic Press, Londres, 2013.

Rostagno, M.A.; Manchón, N.; D'Arrigo, M.; Guillamón, E.; Vilares, A.; García-Lafuente, A.; Ramos, A.; Martínez, J.A. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. **Analytica Chimica Acta**, 685, 204-211, 2011.

Ruan, J. & Wong, M.H. Accumulation of fluoride and aluminium related to different varieties of tea plant. **Environmental Geochemistry and Health**, 23, 53-63, 2001.

Şahan, Y.; Basoglu, F.; Gücer, S. ICP-MS analysis of a series of metals (Namely: Mg, Cr, Co, Ni, Fe, Cu, Zn, Sn, Cd and Pb) in black and green olive samples from Bursa, Turkey. **Food Chemistry**, 105, 395-399, 2007.

Salgado, S.G.; Quijano Neto, M.A.; Simón, M.M.B. Assessment of total arsenic and arsenic species stability in alga samples and their aqueous extracts. **Talanta**, 75, 897-903, 2008.

Seenivasan, S., Manikandan, N., Muraleedharan, N.N.; Selvasundaram, R. Heavy metal content of black teas from south India. **Food Control**, 19, 746–749, 2008.

Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A. **Princípios de Análise Instrumental**. Bookman, Porto Alegre, 5^a ed., 2002, 235-251.

Signes-Pastor, A.J.; Deacon, C.; Jenkins, R.O.; Haris, P.I.; Carbonell-Barrachian, A.A.; Meharg, A.A. Arsenic speciation in Japanese rice drinks and condiments. **Journal of Environmental Monitoring**, 11, 1930-1934, 2009.

Silva, S.R.S.; Oliveira, T.T.; Nagem, T.J. Uso do chá preto (*Camellia sinensis*) no controle do diabetes mellitus. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, 31(3), 133-142, 2010.

Silva, E. N.; Heerdt, G.; Cidade, M.; Pereira, C. D.; Morgon, N. H.; Cadore, S. Use of *in vitro* digestion method and theoretical calculations to evaluate the bioaccessibility of Al, Cd, Fe and Zn in lettuce and cole by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Microchemical Journal**, 119, 152-158, 2015.

Sun, G-X.; Williams, P.N.; Zhu, Y-G.; Deacon, C.; Carey, A-M.; Raab, A.; Feldmann, J.; Meharg, A.A. Survey of arsenic and its speciation in rice products such as breakfast cereals, rice crackers and Japanese rice condiments. **Environment International**, 35, 473–475, 2009.

Szymczycha-Madeja, A.; Welna, M.; Pohl, P. Elemental analysis of teas and their infusions by spectrometric methods. **Trends in Analytical Chemistry**, 35, 165-181, 2012.

US EPA. Toxicological Review of Barium and Compounds, Washington, DC, 2005.

Tanner, S.D.; Baranov, V.I.; Bandura, D.R. Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. **Spectrochimica Acta Part B**, 57, 1361-1452, 2002.

Thomas, R. **Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners**. CRC Press, Boca Raton, EUA, 2.ed., 2008, 347p.

Tokaloğlu, Ş. Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and multivariate analysis. **Food Chemistry**, 134, 2504-2508, 2012.

Villa, J.E.L.; Peixoto, R.R.A.; Cadore, S. Cadmium and Lead in chocolates commercialized in Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62, 8759-8763, 2014.

Vulcano, I.R.C.; Silveira, J.N.; Alvarez-Leite, E.M. Teores de chumbo e cádmio em chás comercializados na região metropolitana de Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 44(3), 425–431, 2008.

Welna, M.; Szymczycha-Madeja, A.; Pohl, P. A comparison of samples preparation strategies in the multi-elemental analysis of tea by spectrometric methods. **Food Research International**, 53, 922-930, 2013.

WHO – World Health Organization (2005). **Nickel in drinking-water**. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. 30p.

WHO - World Health Organization (2009). Exposure of children to chemical hazards in food.<<http://www.euro.who.int/en/data-and-evidence/environment-and-health-information-system-enhis>> Acesso em 19 de outubro de 2014.

WHO - World Health Organization (2011). Evaluation of certain food additives and contaminants: seventy-fourth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 136p.

Yuan, C.; Jiang, G.; He, B. Evaluation of the extraction methods for arsenic speciation in rice straw, *Oryza sativa* L., and analysis by HPLC-HG-AFS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, 20, 103-110, 2005.

Yuan, C.; Gao, E.; He, B.; Jiang, G. Arsenic species and leaching characters in tea (*Camellia sinensis*). **Food and Chemical Toxicology**, 45(3), 2381-2389, 2007.