

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE - UNICENTRO

**AVALIAÇÃO DA LABILIDADE DO ALUMÍNIO EM
INFUSÕES DE ERVA-MATE (*Ilexparaguariensis St. Hil.*)
EMPREGANDO VOLTAMETRIA ADSORTIVA DE
REDISSOLUÇÃO CATÓDICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRUNA KAUELY DE CAMPOS

GUARAPUAVA-PR

2013

BRUNA KAUELY DE CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA LABILIDADE DO ALUMÍNIO EM INFUSÕES DE ERVA-MATE
(*Ilexparaguariensis St. Hil.*) EMPREGANDO VOLTAMETRIA ADSORTIVA DE
REDISSOLUÇÃO CATÓDICA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, área de concentração em Metodologias Analíticas e Aplicações, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia

Orientadora

Dra. Vanessa Egéa dos Anjos

Co-orientadora

GUARAPUAVA-PR

2013

“Se não puder se destacar pelo talento,
Vença pelo esforço.”

Dave Weinbaum

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me permitir chegar até aqui com seu infinito amor.

Ao programa de pós-graduação em química da Unicentro, especialmente aos mestres, por estarem disponíveis sempre que necessário.

À CAPES pela bolsa concedida.

Às orientadoras: Profa. Dra. Sueli PércioQuináia e carinhosamente a Dra. Vanessa Egéa dos Anjos, as quais me proporcionaram momentos de aprendizagem não só na vida científica como também na vida pessoal, demonstrando cuidado e amizade nos momentos difíceis.

À profa. Dra. Yohandra Reyes Torres que gentilmente cedeu espaço em seu laboratório para a realização do trabalho.

À profa. Dra. Maria Lurdes Felsner pela ajuda com as análises estatísticas.

Ao Karlos Eduardo Pianoski pela ajuda com o espectrofotômetro UV-Vis.

Aos colegas do LABGATI e CRONAT pela paciência e amizade, especialmente a Ms. Daiane Finger e ao João BenhurMokochinski, sem vocês as manhãs de trabalho ficariam silenciosas.

Agradeço ao Rodrigo Zampieri, diretor responsável pela empresa onde as coletas de erva-mate foram realizadas.

Aos professores Drs. Edgard M. Ganzarolli e Mauro C. Lopes pela ajuda no desenvolvimento e entendimento do trabalho.

Agradeço a minha família, especialmente minha mãe ElkePatricia, avó Mirna e dinda Lô, pelas brigas, cobranças, apoio e principalmente ao amor e confiança em mim depositados.

Ao amado Ms. Eduardo M. Schmidt pela presença como namorado, noivo, amigo, homem e pesquisador, agradeço por não ter me deixado desistir nas horas de desânimo, você foi a força necessária pra que eu buscasse vida nova todos os dias.

Aos meus amigos externos a esse projeto, principalmente a querida Juliana Moleta.

À banca examinadora pela disposição e contribuição.

Ao “polarógrafo”.

RESUMO

Bruna Kaueley de Campos. Avaliação da Labilidade do Alumínio em Infusões de Erva-Mate (*Ilexparaguariensis* St. Hil.) Empregando Voltametria Adsorptiva de Redissolução Catódica.

A erva-mate é uma planta muito consumida através de suas infusões quente e fria, conhecidas como chimarrão e tererê, respectivamente. Estudos indicam que apesar da erva-mate apresentar várias propriedades benéficas para a saúde humana, pode conter elevados teores de alumínio. O alumínio é um metal que não apresenta função biológica conhecida e pode estar relacionado com doenças neurológicas e comportamentais. Estudos de especiação desse elemento possibilitam estimar a disponibilidade biológica desse elemento e conseqüentemente a sua toxicidade. Neste trabalho foi desenvolvido um protocolo analítico para a análise de especiação de alumínio empregando voltametria adsorptiva de redissolução catódica (VAdsRC) aliado ao uso de um agente complexante, o vermelho de alizarina S (DASA). Nesse procedimento, o alumínio total presente na fração dissolvida de uma infusão foi determinado através da formação de um complexo com o DASA em pH 8. Nessa condição, o DASA é capaz de sequestrar o Al ligado aos complexos orgânicos da erva-mate, ou seja, compostos fenólicos ou ácidos orgânicos. Em pH 5, o DASA é capaz de complexar a fração lábil do alumínio, ou seja, íons monoméricos livres (Al^{3+}) e os complexos cineticamente reversíveis do Al. Assim, o alumínio complexado aos ligantes orgânicos das infusões foi obtido pela diferença entre os teores de alumínio total dissolvido (Al-Total) e alumínio lábil (Al-Lábil). Os parâmetros voltamétricos empregados nas determinações do Al-Total e do Al-Lábil foram otimizados e validados através de testes de linearidade, sensibilidade, precisão, exatidão e interferência. O procedimento analítico proposto se mostrou adequado para a análise de especiação de Al nas infusões de erva-mate, apresentando elevada sensibilidade e baixo custo. O alumínio nas infusões de erva-mate obtidas nas diferentes etapas do processo industrial e comerciais encontra-se majoritariamente complexado aos compostos orgânicos naturais da planta. Contudo o Al-Lábil em algumas amostras de infusão ultrapassou as recomendações de ingestão semanal da organização mundial da saúde (OMS) nas amostras de erva-mate de chimarrão e chá-mate. Os compostos orgânicos dissolvidos nas infusões foram determinados qualitativamente e quantitativamente por espectrofotometria de absorção molecular. Avaliou-se uma possível correlação entre a labilidade do alumínio com os compostos orgânicos presentes nas infusões de erva-mate através de ferramentas estatísticas. Acredita-se que a tendência de complexação do alumínio esteja relacionada com as melanoidinas.

Palavras-Chave: Especiação, Alumínio, Voltametria, Erva-Mate.

ABSTRACT

Bruna Kaueley de Campos. Evaluation of the Labilityof Aluminium in Yerba Mate Infusions (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)Employing AdsorptiveCathodic Stripping Voltammetry.

Yerba mate is a plant widely consumed as hot and cold infusions, known as mate and tererê, respectively. Studies show that although mate presents several beneficial properties for human health, it may contain high levels of aluminium. Aluminium is anelemental that doesn't have known biological functions and can be associated with behavioral and neurological diseases. Speciation studies allow to estimate the bioavailability of this element and hence to its toxicity. In this study, an analytical protocol for the speciation of aluminium in infusion employing adsortivecathodic stripping voltammetry (AdsCSV) using alizarin red S (DASA) as ligand agent was developed. In this procedure, the total dissolved monomeric aluminium in infusions was determined by AdsCSV through on the formation of a complex with DASA at pH 8.0. DASA was able to sequester the Al organically bound by phenolic compounds and organic acids. At pH 5.0, the complexes were formed between DASA and labile Al fractions. Therefore, theconcentrationsof aluminiumcomplexed with organic ligands in infusions wascalculated by the difference between the concentrations of total dissolved aluminum and labile dissolved aluminium. The parameters operational employed in speciation analysis we optimized. The method optimized was validated bytests of linearity, sensitivity, precision, accuracy and interference. The proposed analytical procedure was adequate for speciation analysis of Al in infusions of yerba mate, showing high sensitivity and low cost. It was possible to verify that,aluminium in infusions of commercial yerba mate and in samples from different stages of the industrial process is mostly complexed to natural organic compounds from the plant. However the Al-Labile in some samples of infusion exceeds the recommended weekly intake of world health organization (WHO) in samples of mate and mate tea. The dissolved organic compounds in infusions were determined qualitative and quantitatively by molecular absorption spectrophotometry. A possible correlation between the lability of aluminiumand organic compounds in infusions of yerba mate was evaluated through statistical tools. In general, it was observed the lability of aluminium depends on the concentrations of melanoidins in infusions.

Keywords: Speciation, Aluminum, Voltammetry, Yerba Mate.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	4
3. REFERENCIAL TEÓRICO	5
3.1. Erva-Mate	5
3.2. Processamento Industrial da Erva-Mate	6
3.3. Composição Química da Erva-Mate	8
3.3.1. <i>Compostos Fenólicos e Flavonoides</i>	8
3.3.2. <i>Melanoidinas</i>	11
3.3.3. <i>Espécies Metálicas na Erva-Mate</i>	13
3.3.3.1. Alumínio	14
3.4. Especificação de Alumínio	16
3.4.1. Especificação de Alumínio por Voltametria	18
3.4.1.1. Voltametria Adsorviva de Redissolução	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1. Reagentes	25
4.2. Equipamentos	25
4.3. Técnicas Limpas	26
4.4. Desenvolvimento do Protocolo Analítico Voltado a Análise de Especificação do Alumínio Utilizando Voltametria	26
4.4.1. <i>Voltametria Cíclica</i>	27
4.4.2. <i>Otimização dos Parâmetros Voltamétricos Utilizados na VAdsRC por Pulso Diferencial</i>	28
4.4.3. <i>Otimização do Tempo Utilizado na Complexação do Al pelo DASA</i>	28
4.5. Avaliação do Procedimento Analítico Proposto	28
4.5.1. <i>Calibração Instrumental</i>	29
4.5.2. <i>Limite de Detecção e Quantificação</i>	29
4.5.3. <i>Avaliação da Precisão e Exatidão do Método Proposto</i>	29
4.5.4. <i>Testes de Interferência</i>	30
4.6. Aplicação do Protocolo Analítico em Infusões de Erva-Mate	30
4.6.1. <i>Amostras de Erva-Mate</i>	30
4.6.2. <i>Preparo das Infusões de Erva-Mate</i>	32
4.6.3. <i>Análise de Especificação de Al nas Infusões de Erva-Mate</i>	33
4.7. Determinação da Umidade	33
4.8. Caracterização de Alguns Compostos Orgânicos Extraídos nas Infusões de	

Erva-Mate	34
4.8.1. <i>Preparo das Infusões de Erva-Mate Utilizadas na Caracterização dos Compostos Orgânicos</i>	34
4.8.2. <i>Quantificação dos Fenóis Totais pelo Método de Folin-Ciocalteu</i>	34
4.8.3. <i>Quantificação de Flavonoides por Complexação com Cloreto de Alumínio</i>	35
4.8.4. <i>Determinação da Capacidade Antioxidante por Ensaio de DPPH..</i>	36
4.8.5. <i>Avaliação Qualitativa da Presença de: Melanoidinas, Aromáticos e Ácidos Clorogênicos</i>	36
4.9. <i>Análise Estatística</i>	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. <i>Otimização do Protocolo Analítico</i>	38
5.1.1. <i>Avaliação do Comportamento Eletroquímico do DASA e do Complexo Al-DASA</i>	39
5.1.2. <i>Análise de Especificação de Al Empregando VAdSRC</i>	41
5.1.3. <i>Otimização dos Parâmetros Voltamétricos a Serem Empregados na Análise de Especificação do Al</i>	44
5.1.3.1. <i>Potencial de Acumulação (E_{ac})</i>	44
5.1.3.2. <i>Tempo de Acumulação (T_{ac})</i>	47
5.1.3.3. <i>Tempo de Equilíbrio (T_{eq})</i>	49
5.1.3.4. <i>Tempo de Complexação do Al pelo Ligante DASA</i>	50
5.2. <i>Avaliação das Características do Método Proposto</i>	52
5.2.1. <i>Linearidade e Sensibilidade</i>	52
5.2.2. <i>Limites de Detecção e Quantificação</i>	53
5.2.3. <i>Avaliação da Precisão</i>	54
5.2.4. <i>Estudos de Interferência</i>	55
5.2.5. <i>Avaliação da Exatidão</i>	57
5.3. <i>Especificação de Alumínio em Infusões de Erva-Mate do Estado do Paraná</i>	58
5.4. <i>Quantificação de Compostos Fenólicos e Flavonoides</i>	69
5.5. <i>Avaliação da Atividade Antioxidante das Infusões Preparadas com Erva-Mate</i>	73
5.6. <i>Avaliação Qualitativa da Presença dos Compostos Orgânicos Melanoidinas, Ácidos Clorogênicos e Aromáticos nas Infusões de Erva-Mate</i>	76
5.7. <i>Relação Entre a Labilidade do Alumínio com Compostos Orgânicos em Infusões de Erva-Mate</i>	79
6. CONCLUSÕES	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros instrumentais utilizados nas análises por voltametria cíclica.	27
Tabela 2. Dados das amostras comerciais de erva-mate coletadas	31
Tabela 3. Dados das amostras de erva-mate obtidas nas diferentes etapas do processo industrial	31
Tabela 4. Parâmetros instrumentais empregados na análise de especiação de Al por VAdSRC e DASA como agente de complexação	33
Tabela 5: Características dos procedimentos utilizados na determinação de Al ³⁺ após complexação com o DASA por VAdSRC, usando o HMDE	44
Tabela 6. Resultados dos limites de quantificação e detecção obtidos para a determinação de alumínio por VAdSRC e DASA como complexante e comparação com valores presentes na literatura	54
Tabela 7. Resultados dos testes de repetibilidade e reprodutibilidade	55
Tabela 8: Resultado do teste de adição e recuperação de Al em infusão de erva-mate	58
Tabela 9. Resultado da quantificação de Al nas infusões das amostras de erva-mate obtidas nas diferentes etapas do processo industrial	60
Tabela 10. Resultado da distribuição do Al nas infusões das amostras obtidas nas diferentes etapas do processamento industrial de erva-mate	62
Tabela 11. Resultado da especiação e distribuição de Al em infusão de erva-mate por VAdSRC utilizando como ligante o DASA	64
Tabela 12. Concentrações semanais ingeridas de alumínio lábil através das infusões de erva-mate considerando um adulto de 70 Kg	68
Tabela 13. Concentrações de compostos fenólicos e flavonoides obtidas nas amostras de infusão de erva-mate obtidas nas diferentes etapas do processamento industrial	70
Tabela 14. Concentrações obtidas de compostos fenólicos e flavonoides para as amostras de infusão de erva-mate comercial	72
Tabela 15. Avaliação da atividade antioxidante das infusões de erva-mate obtidas nas diferentes etapas do processo industrial	74
Tabela 16. Avaliação da atividade antioxidante das amostras de infusão de erva-mate comerciais	75
Tabela 17. Medidas espectrofotométricas para as infusões de erva-mate obtidas nas diferentes etapas do processo industrial	76
Tabela 18. Medidas espectrofotométricas para as infusões de erva-mate destinadas	

ao preparo do chimarrão, tererê e chá-mate	77
Tabela 19. Avaliação da correlação entre o Al-Lábil com os compostos orgânicos.	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore da <i>Ilexparaguariensis</i> St. Hil. (erva-mate)	5
Figura 2. Estrutura química do mais simples composto fenólico	9
Figura 3. Estruturas dos ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico e ácido cinâmico. (A) ácido p-hidróxi-benzóico; (B) ácido protocatéquico; (C) ácido gálico; (D) ácido o-hidroxi-benzóico; (E) ácido vanílico; (F) ácido siríngico....	9
Figura 4. Estrutura molecular do ácido clorogênico	10
Figura 5. Estrutura química mais simples de um flavonoide. Adaptado de Simões <i>et al.</i> (2004). A e B representam os grupos fenilas	10
Figura 6. Proposta estrutural das melanoidinas. Adaptado de Wang <i>et al.</i> (2001).	12
Figura 7. Esquema representativo da aplicação do potencial em função do tempo em voltametria de pulso diferencial	22
Figura 8. Esquema representativo de um voltamograma resultante de pulso diferencial	22
Figura 9. Fórmula estrutural do vermelho de alizarina S	23
Figura 10. Proposta estrutural do complexo formado entre o Al e o DASA	24
Figura 11. Amostras de erva-mate das etapas do (A) Sapeco e (B) Cancheamento	32
Figura 12. Fórmulas estruturais para (A) DASA e (B) Complexo Al-DASA	38
Figura 13. Estudo realizado por voltametria cíclica no comportamento do DASA em meio de eletrólito suporte em pH 8,0	39
Figura 14. Estudos realizados por voltametria cíclica no comportamento do DASA em meio de eletrólito suporte (NH ₄ Cl) e controle analítico* em pH 8,0.....	40
Figura 15. Estudos realizados por voltametria cíclica no comportamento do DASA e do complexo Al-DASA em pH 8,0. (A) Voltamograma cíclico do DASA em meio de NH ₄ Cl e Al ³⁺ , controle analítico* e solução de trabalho** (B) Região de interesse	41
Figura 16. Determinação de alumínio por VAdSRC e pulso diferencial empregando DASA como agente complexante. (A) Voltamograma referente as medidas voltamétricas realizadas com controle analítico (branco) e com adição de 10,0 µg L ⁻¹ de Al ³⁺ em pH 8,0. (B) Voltamograma da determinação de Al ³⁺ em água de torneira através de adição de padrão em pH 8,0. (C) Voltamograma da determinação de Al ³⁺ em água de torneira através da adição de padrão em pH 5,0	42
Figura 17. Estudo da influência do potencial de acumulação na determinação de Al por VAdSRC em pH 8,0. (A) Voltamogramas obtidos nos testes e (B) Gráfico da relação entre intensidade de pico do complexo Al-DASA em função do E _{ac} com desvio padrão	45
Figura 18. Estudo da influência do potencial de acumulação na determinação de Al por VAdSRC em pH 5,0. (A) Voltamogramas obtidos nos testes e (B) Gráfico da relação entre intensidade de pico do complexo Al-DASA em função do E _{ac}	

com desvio padrão	45
Figura 19. Voltamogramas obtidos no estudo do tempo de acumulação na determinação de Al por VAdsRC de pulso diferencial em (A) pH 8,0 e (B) pH 5,0	47
Figura 20. Estudo da influência do tempo de equilíbrio na determinação de Al por VAdsRC em pH 8,0 (A) Voltamogramas obtidos nos testes e (B) Gráfico da relação entre intensidade de pico do complexo Al-DASA em função do T_{ac} e desvio padrão	49
Figura 21. Estudo da influência do tempo de equilíbrio na determinação de Al por VAdsRC em pH 5,0. (A) Voltamogramas obtidos nos testes e (B) Gráfico da relação entre intensidade de pico do complexo Al-DASA em função do T_{eq} e desvio padrão	50
Figura 22. Voltamogramas obtidos para o estudo do tempo de complexação entre o Al e o DASA na determinação de Al^{3+} por VAdsRC e pulso diferencial em (A) pH 8,0 e (B) pH 5,0	51
Figura 23. Curvas analíticas obtidas na determinação de alumínio empregando VAdsRC em pH 8,0(●) e em pH 5,0(▲).....	52
Figura 24. Voltamogramas obtidos para o estudo de interferência utilizando íons metálicos na determinação de Al por VAdsRC e DASA como agente complexante em (A) pH 8,0 e (B) pH 5,0	56
Figura 25. Voltamogramas típicos obtidos na especiação de alumínio em infusões de erva-mate diluídas empregando VAdsRC e DASA como agente complexante (A) Determinação do alumínio presente na fração lábil, pH 5,0 e (B) Determinação do alumínio total dissolvido, pH 8,0	59
Figura 26. Gráficos de adição de padrão obtidos na determinação voltamétrica de Al-Lábil (A) e do Al-total (B) em amostras de infusão de erva-mate	60
Figura 27. Gráfico representativo das determinações do Al-Total e Lábil nas amostras obtidas nas diferentes etapas do processo industrial	62
Figura 28. Gráfico representativo da distribuição do Al em infusão das amostras do processamento industrial de erva-mate	63
Figura 29. Amostras de chá-mate comercial com granulometria (A) grossa e (B) fina	65
Figura 30. Distribuição do alumínio presente nas amostras de infusão de erva-mate	67
Figura 31. (A) Curva analítica obtida na quantificação dos compostos fenólicos e (B) curva analítica obtida na quantificação de flavonóides. Ambas para amostras de infusão de erva-mate	69
Figura 32. Teor de fenólicos totais e flavonoides quantificados nas infusões de erva-mate obtidas nas diferentes etapas do processamento industrial	71
Figura 33. Gráfico representativo da concentração dos compostos fenólicos totais em (A) e flavonoides em (B) nas infusões de erva-mate comerciais	72

Figura 34. Foto representativa da mudança de coloração provocada pela reação das substâncias antirradicais presentes nas infusões de erva mate com o radical livre DPPH	74
Figura 35. Avaliação da atividade antioxidante das infusões de erva-mate do processamento industrial em (A) e comerciais em (B)	75
Figura 36. Avaliação entre a porcentagem de alumínio lábil com fenólicos, flavonoides e melanoidinas nas infusões de erva-mate	80

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

VAsdRC	Voltametria Adsorviva de Redissolução Catódica
DASA	Vermelho de Alizarina S
DME	<i>Dropping Mercury Electrode</i> – Eletrodo Gotejante de Mercúrio
HMDE	<i>Hanging Mercury Drop Electrode</i> – Eletrodo de Gota Pendente de Mercúrio
SMDE	<i>Static Mercury Drop Electrode</i> – Eletrodo de Gota Estática de Mercúrio
MTFE	<i>Mercury Thin Film Electrode</i> – Eletrodo de Filme Fino de Mercúrio
i_d	Corrente de Difusão
Al-Total	Alumínio Total Dissolvido
Al-Lábil	Alumínio Lábil Dissolvido
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
DPPH	<i>2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazil</i> - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
VC	Voltametria Cíclica
BES	<i>N,N'-bis-(2-hidroxyethyl-2-amino-ethane-sulphonic acid)</i> – Ácido N,N-Bis(2-hidróxietil)-2-aminoetanosulfônico
E_{ac}	Potencial de Acumulação
T_{ac}	Tempo de Acumulação
T_{eq}	Tempo de Equilíbrio
PC	Primeira Coleta
NC	Nova Coleta
PIXE	<i>Particle Induced X-ray Emission</i> – Emissão de Partículas Induzidas por Raio-X
E.M.C.	Erva-Mate de Chimarrão
E.M.T.	Erva-Mate de Tererê
C.M.	Chá-Mate
OMS	Organização Mundial da Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária

1. INTRODUÇÃO

A erva-mate é um produto de origem natural muito consumido na forma de infusão quente ou fria obtida através de suas folhas. Bebidas conhecidas como chimarrão e tererê, respectivamente. Outra forma de consumo é como chá, conhecido também por chá-mate, obtido através da infusão quente da erva-mate tostada (Furgeri *et al.*, 2009). A erva-mate é conhecida cientificamente por *Ilex paraguariensis* St. Hil., pertencente à família Aquifoliaceae. Este produto tem grande papel na economia da região sul do Brasil, onde são produzidos anualmente cerca de 430 mil toneladas (IBGE, 2010).

O processamento industrial da planta pode variar dependendo da indústria. É constituído basicamente por quatro etapas, sendo elas: colheita, sapeco, cancheamento e envelhecimento. As características das próprias plantas, condições climáticas e as diferenças no sistema de produção determinam a qualidade do produto (Giulian *et al.*, 2009). Portanto os produtos comerciais de erva-mate podem ser bastante variáveis com relação à composição química e faz-se necessário conhecer a influência do processo industrial em sua composição.

A composição química da erva-mate é bastante complexa e caracteriza-se por uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Diversos fitoquímicos com funções biológicas diferentes tem sido estudados. Dentre eles, destacam-se os polifenóis, metilxantinas (cafeína e teobromina), seguidas pelos minerais e vitaminas (Linares *et al.*, 2010). Os compostos fenólicos apresentam uma grande diversidade de estruturas simples e complexas, dentre os quais se têm os flavonoides.

No que diz respeito aos componentes inorgânicos da erva-mate, é reconhecido uma importante fonte de minerais, tais como o Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , entre outros (Dias *et al.*, 2009; Ducat e Quináia, 2004; Giulian *et al.*, 2007). Portanto, efeitos benéficos à saúde humana podem ser associados ao consumo de erva-mate através de suas infusões devido à presença de inúmeros compostos orgânicos, vitaminas e elementos essenciais. Porém, alguns micronutrientes essenciais dependendo da sua forma e concentração podem se tornar tóxicos ao organismo humano. Contrariando os efeitos benéficos da erva-mate, alguns estudos indicam a presença de elevados teores de alumínio em folhas e infusões de erva-mate (da Costa *et al.*, 2009; Ducat e Quináia, 2004).

O alumínio é um elemento que não apresenta função biológica conhecida e é considerado um potente agente neurotóxico que pode estar relacionado com doenças como Parkinson, Alzheimer e encefalopatia por diálise (Alberti *et al.*, 2003; da Costa *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 1996). Ainda não são conhecidos e estabelecidos os mecanismos envolvidos na toxicidade do alumínio (Alberti *et al.*, 2003). Dessa forma, o conhecimento da composição

química da erva-mate e suas infusões é um aspecto relevante do ponto de vista econômico, toxicológico e nutricional.

A avaliação da concentração total de alumínio em uma amostra de interesse nutricional não indica a disponibilidade biológica do mesmo e conseqüentemente não estima ou determina a sua toxicidade. Estudos que possibilitam realizar estimativas da toxicidade devem ser baseados em especiação. Portanto, deve-se investigar a distribuição do alumínio entre suas formas e espécies químicas (Templeton *et al.*, 2000).

Nem todas as espécies de alumínio se mostram biodisponíveis e tóxicas. As espécies de maior labilidade, e conseqüentemente, maior toxicidade são as formas monoméricas do alumínio, tanto os íons hidratados livres (Al^{3+}) quanto os complexos cineticamente reversíveis, normalmente o alumínio complexado por alguns ligantes inorgânicos (Street *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2001). Entre as formas poliméricas do Al, o $\text{AlO}_4\text{Al}_{12}(\text{OH})_{24}(\text{H}_2\text{O})_{12}^{7+}$ parece ser a única forma tóxica. Em plantas, as espécies de Al mononucleares, como os complexos de Al com sulfato (SO_4^-) e fluoreto (F^-) e os complexos formados com ligantes orgânicos são considerados não labéis ou pouco lábeis (Flaten *et al.*, 2002; Street *et al.*, 2007).

Os ligantes orgânicos naturais presentes na erva-mate, principalmente os compostos fenólicos possuem um grande número de sítios de complexação, representados por hidroxilas capazes de complexar o alumínio, reduzindo assim sua toxicidade (da Costa *et al.*, 2009; Flaten *et al.*, 2002, Street *et al.*, 2007).

Mesmo nos dias atuais, a análise de especiação ainda é considerada um desafio analítico devido à dificuldade de quantificar concentrações traço e ultra-traço de todas as formas e espécies de um elemento em uma matriz em particular (dos Anjos *et al.*, 2010). Os procedimentos mais utilizados baseiam-se nos métodos espectrométricos e eletroanalíticos.

Os métodos eletroanalíticos, voltamétricos e potenciométricos, são procedimentos adequados para análise de especiação de metais, dado que possibilitam determinar uma espécie em particular do metal. Além disso, a voltametria, por exemplo, proporciona vantagens tais como baixo custo, elevada sensibilidade, seletividade e consumo mínimo de reagentes (Bi, 2001; dos Anjos *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2001).

Nesse contexto, desenvolveu-se neste trabalho um protocolo analítico para a análise de especiação do alumínio utilizando a voltametria adsorptiva de redissolução catódica (VAdSRC) em diferentes infusões preparadas com erva-mate. Uma avaliação qualitativa e quantitativa de compostos orgânicos nas infusões de erva-mate também foi estudada. Além disso, aplicou-se uma ferramenta estatística aos dados obtidos a fim de avaliar uma possível correlação entre a labilidade do alumínio com os compostos orgânicos.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como proposta desenvolver um protocolo analítico voltado à análise de especiação de alumínio em infusões preparadas com erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) empregando a voltametria adsorptiva de redissolução catódica (VAdsRC). Além disso, avaliou-se o comportamento do alumínio em infusões preparadas com erva-mate, simulando bebidas amplamente consumidas na região sul do Brasil, tais como chimarrão, tererê e chá mate. Como objetivos específicos teve-se:

- i. Implantação e validação de um protocolo analítico voltado à análise de especiação de alumínio empregando a VAdsRC aliada ao uso de um agente complexante;
- ii. Avaliação da especiação do alumínio em diferentes infusões preparadas com amostras de erva-mate obtidas em diferentes etapas do processamento industrial;
- iii. Especiação do alumínio em diferentes infusões preparadas com erva-mate comercial de chimarrão, tererê e chá mate;
- iv. Caracterização da matéria orgânica dissolvida em infusões de erva-mate.
- v. Avaliação da influência da matéria orgânica na labilidade do alumínio em infusões de erva-mate.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Erva-Mate

Tendo sua origem na América do Sul, a *Ilex paraguariensis* St. Hil., (Figura 1) pertencente a família das Aquifoliaceae, é uma árvore que pode atingir até 18 metros de altura conhecida popularmente como mate ou erva-mate (Jaques *et al.*, 2007). É encontrada principalmente no Paraguai, Argentina e Brasil. No Brasil 80% de sua ocorrência nacional pertence aos estados brasileiros do Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná (Esmelindro *et al.*, 2002).



Figura 1. Árvore da *Ilex paraguariensis* St. Hil. (erva-mate).

A maior parte da erva-mate produzida é consumida na América do Sul. Em termos de mercado brasileiro, 596 municípios da região sul desenvolvem a atividade ervateira envolvendo aproximadamente 710 mil pessoas, com uma produção de 430 mil toneladas (Esmelindro *et al.*, 2002; IBGE, 2010). O estado do Paraná é responsável por 65% da produção anual brasileira. Desde o ano de 2003, a cidade de Guarapuava-PR vem se destacando como a terceira maior produtora de erva-mate no estado, chegando a uma produção de mais de 22 mil toneladas por ano (SEAB, 2012).

Consumida tradicionalmente sob sua forma de infusão quente chamada de chimarrão, a erva-mate faz até hoje parte da cultura, relações comerciais e caracterização política dos estados da região sul do Brasil (Mendes, 2005). É importante destacar que a erva-mate já fazia parte dos costumes dos índios brasileiros, que a utilizavam como tônico e estimulante em sua

região de ocorrência (Ducat e Quináia, 2004).

No entanto, ainda hoje o consumo de erva-mate apresenta mercado limitado apenas nas regiões onde é produzida, além do uso dessa matéria-prima se dar apenas nas formas de produtos tradicionais como o chimarrão e tererê, por exemplo (Esmelindro *et al.*, 2002). Apesar disto, no final da última década do século passado, países como Estados Unidos, Alemanha e Japão, começaram a importar erva-mate em uma taxa de aproximadamente 1000 toneladas por ano (da Costa *etal.*, 2009).

A erva-mate destinada ao preparo de bebidas não é consumida na sua forma natural, tal como obtida após a colheita. Ao invés disso é submetida a várias etapas de processamento antes de ser empacotada e disponibilizada ao comércio e consumo.

3.2. Processamento Industrial da Erva-Mate

O produto comercial da erva-mate é definido tecnicamente como constituído exclusivamente pelas folhas e ramos secos na forma inteira ou moída, que podem ser ligeiramente tostados (ANVISA, 2002). A erva-mate comercial pode apresentar variações na qualidade e características físico-químicas devido a influência de alguns fatores como idade das folhas e ramos, tempo de colheita, sistema de produção, processamento e também o tipo de erva, que pode ser nativa ou cultivada. A erva-mate nativa é aquela qual está presente nas produções mais antigas sem ser reflorestada, já a erva-mate cultivada é aquela qual o produtor planta em uma região de interesse, ou seja, considera-se uma erva-mate reflorestada (Streit *et al.*, 2008).

O processamento industrial da erva-mate se faz geralmente por quatro etapas que são a colheita, branqueamento, secagem e envelhecimento. Na primeira etapa é realizado o corte das folhas e ramos da árvore e o transporte até a indústria. Posteriormente, tem-se o branqueamento, também chamado de sapeco, que consiste na pré-secagem da matéria-prima à 500 °C de 10 a 180 segundos. Essa etapa pode ser realizada em um sapecador aquecido com auxílio de chama produzida pela queima de madeira ou por gás propano. Além da retirada da umidade superficial, essa etapa tem como finalidade a inativação de enzimas da erva-mate que causam a oxidação do produto, que são a peroxidase e polifenoloxidase. Na terceira etapa, as folhas e ramos são secos à temperatura média de 100°C em estufa de 1 a 24 horas. Após a secagem, inicia-se a etapa de cancheamento, que consiste em separar as folhas dos ramos para trituração em tamanho desejado e o peneiramento. O material coletado passa a ser definido como erva cancheada que pode ser beneficiada através do soque para ajuste da

granulometria. A mistura entre os ramos e folhas é realizada em diferentes proporções para compor o tipo de erva-mate comercialmente desejada, e posteriormente tem-se o seu empacotamento (Esmelindro *et al.*, 2002).

O mate processado após a etapa do cancheamento é empregado para o preparo do chimarrão (infusão quente) e tererê (infusão fria). Posteriormente, também pode ser tostado sendo destinado ao preparo do chá-mate (Esmelindro *et al.*, 2002).

A erva-mate depois de processada e empacotada pode ser encaminhada para comercialização. No mercado o tempo útil de prateleira pode chegar à 6 meses sem a utilização de conservantes. Porém, a indústria costuma recolher essas ervas antes desse período, pois a umidade do ar faz com que o produto perca suas características. Existem diversos produtos comerciais oriundos da erva-mate destinados ao consumo de chimarrão, tererê ou chá-mate. Muitos desses produtos contêm aromatizantes artificiais com sabor limão, canela, laranja, geralmente nas ervas de tererê e no chá-mate.

As etapas do processamento podem ser diferentes para cada indústria em função do tempo e das temperaturas utilizadas. As características das próprias plantas, condições climáticas e as diferenças no sistema de produção e beneficiamento determinam a qualidade do produto (Giulian *et al.*, 2009). A competitividade entre as indústrias ervateiras brasileiras tem estimulado uma melhoria no sistema de produção e beneficiamento (da Costa, 2008).

Portanto se faz necessário conhecer os efeitos do processamento industrial sobre as características químicas da erva-mate, visto que existem poucos estudos envolvidos nessa temática. O processamento da erva-mate inclui etapas que podem modificar e alterar sua composição química e o sabor do produto final. A etapa de armazenamento, por exemplo, visa a formação de compostos aromáticos e à transformação da cor verde da erva-mate para amarelada, em períodos que variam de 6 meses a 2 anos, podendo ser mantida sob condições ambientais ou acelerada em câmaras que mantem a umidade e temperatura controlada (Dutrae Ribani, 2010).

Além disso, Giulian *et al.* (2009) observaram diferenças significativas entre os teores de alguns minerais (Mn, Al e Si) logo após as principais etapas do processo industrial, como o sapeco e a secagem. Provavelmente ocorreu uma contaminação devido a contaminantes presentes na fumaça da madeira utilizada no processo de queima da erva-mate. Alguns estudos indicam também, que a forma de preparo da bebida de erva-mate beneficiada interfere na quantidade dos constituintes presentes (Flaten, 2002).

Assim, fica evidente que se faz necessário analisar a erva-mate, bem como suas infusões, para se conhecer sua composição química.

3.3. Composição Química da Erva-Mate

A erva-mate após ser processada, deve obedecer alguns parâmetros segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2002) para seu beneficiamento e comercialização, sendo eles as características físico-químicas e microbiológicas.

Com relação às características físico-químicas, a erva-mate deve ser analisada de acordo com sua umidade, resíduo mineral, extrato aquoso e teor de cafeína. Porém aspectos como teor de metais não são contemplados de acordo com a ANVISA. As características microbiológicas devem obedecer a quantidade de bolores e leveduras, bactérias de origem fecal, salmonelas e outros microrganismos tóxicos de origem microbiana.

No que diz respeito a sua composição química, não é conhecido e estabelecido uma normativa qual estabeleça os teores máximos de minerais e/ou de compostos orgânicos. Porém a erva-mate caracteriza-se por apresentar uma composição química complexa. De uma forma geral, os principais constituintes são a água, celulose, glicose, substâncias aromáticas, albumina, cafeína, ácido fólico, ácido caféico, entre outros (Rodrigues, 2009; Cardozo *et al.*, 2007). Apresenta também elevada concentração de compostos fenólicos, flavonoides. É uma rica fonte em minerais essenciais, os quais dependendo da sua forma e/ou concentração podem ser considerados tóxicos (Cardozo *et al.*, 2007; da Costa, 2008; da Costa *et al.*, 2009; Gnoatto *et al.*, 2005).

3.3.1. Compostos Fenólicos e Flavonoides

Estudos indicam que a erva-mate apresenta efeitos benéficos para a saúde humana quando consumida sob sua forma de infusão. Isto se dá, devido a erva-mate apresentar em sua composição a presença de alguns compostos químicos orgânicos como os compostos fenólicos e flavonoides, por exemplo, que agem no combate a doenças tais como obesidade, ação cardioprotetora e cancerígena (Cardozo *et al.*, 2007; da Costa, 2008; da Costa *et al.*, 2009; Dutra e Ribani, 2010; Gnoatto *et al.*, 2005).

Quimicamente, os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas simples e complexas. Caracterizam-se por apresentar em sua estrutura pelo menos um núcleo aromático contendo substituintes hidroxilados e seus derivados funcionais (Simões *et al.*, 2004). A Figura 2 apresenta a estrutura mais simples de um composto fenólico.

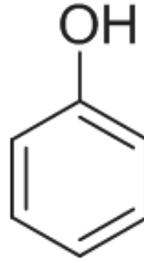


Figura 2. Estrutura química do mais simples composto fenólico.

Os compostos fenólicos ocorrem amplamente na flora vegetal e nos microorganismos. Nas plantas esses compostos se enquadram em diversas categorias tais como os fenóis simples (Figura 2), ácidos fenólicos, derivados de ácidos benzóico e cinâmico, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (Sousa *et al.*, 2007; Simões *et al.*, 2004). A Figura 3 mostra a estrutura dos ácidos fenólicos e seus derivados.

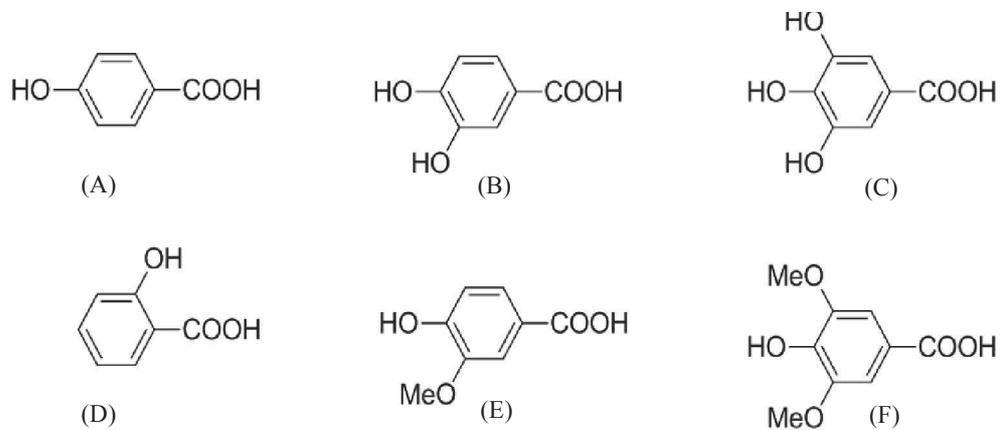


Figura 3. Estruturas dos ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico e ácido cinâmico. (A) ácido p-hidróxi-benzóico; (B) ácido protocatéquico; (C) ácido gálico; (D) ácido o-hidroxi-benzóico; (E) ácido vanílico; (F) ácido siríngico. Adaptado de Simões *et al.* (2004).

Dentre os compostos fenólicos encontrados na erva-mate, o mais conhecido é o ácido clorogênico, o qual apresenta forte atividade antioxidante e propriedades hipocolesterolêmicas (Cardozo Jr. *et al.*, 2007). O ácido clorogênico pode ser hidrolisado a ácido caféico e quínico em plantas (Cardozo *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2001). A Figura 4 mostra a estrutura química de um ácido clorogênico.

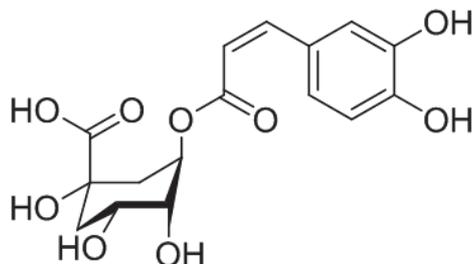


Figura 4. Estrutura molecular do ácido clorogênico. Adaptado de Simões *et al.* (2004).

Em estudo realizado por Cardozo Jr (2007) e colaboradores, os valores médios em porcentagem de ácido clorogênico atribuído a quatro diferentes ervas-mate da região sul do Brasil chegaram à 0,87 %. Outro estudo revela, que a concentração média de ácido clorogênico em massa seca de erva-mate dos estados brasileiros de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, variaram de 0,73 à 1,27 % (Streit *et al.*, 2008).

Os compostos fenólicos são os compostos mais abundantes em folhas de chá, entre eles, os flavonoides juntamente com os ácidos clorogênicos constituem acima de 30% (Streit *et al.*, 2008).

Os flavonoides também representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre produtos de origem natural. São amplamente distribuídos nas plantas medicinais, hortaliças, sucos de frutas e em uma variedade de bebidas tais como chás, café, vinhos, etc. Esses compostos apresentam em sua estrutura química quinze átomos de carbono em seu núcleo fundamental, sendo duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos. Geralmente tem sua fórmula representada por C₆-C₃-C₆. Flavonoides podem ter em sua estrutura, substituintes hidroxilados (Ducat, 2009; Finger, 2009; Simões *et al.*, 2004). A Figura 5 representa a estrutura química de um flavonoide.

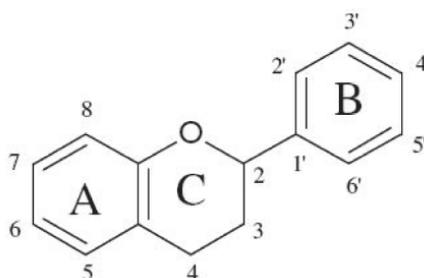


Figura 5. Estrutura química mais simples de um flavonoide. Adaptado de Simões *et al.* (2004). A e B representam os grupos fenilas.

Diversas funções podem ser atribuídas aos flavonoides nas plantas, dentre as quais se destacam a proteção vegetal contra raios ultravioleta e visível, proteção contra insetos e fungos, ação antioxidante, inibição de enzimas, etc (Simões *et al.*, 2004).

Devido às etapas do processamento industrial ou idade da planta, modificações físicas e químicas importantes podem ocorrer em produtos de origem vegetal devido à degradação térmica. Por exemplo, no beneficiamento da erva-mate que envolve a torrefação para a obtenção do chá-mate, devido à temperatura utilizada de 50^oC por aproximadamente 30 minutos, dependendo da indústria, pode ocorrer a degradação dos compostos orgânicos bem como a possível diminuição dos teores de compostos fenólicos. Contudo, esse efeito pode ser minimizado pela formação de produtos antioxidantes originados da reação de Maillard, tais como as melanoidinas, que podem atuar como complexantes de espécies metálicas. A cor marrom apresentada pela erva-mate depois da etapa de torrefação caracteriza a presença das melanoidinas (da Costa, 2008; Rodrigues, 2009).

3.3.2. Melanoidinas

As melanoidinas são originadas pela reação de Maillard responsáveis pela cor marrom característica de alimentos como: cacau, café, malte e mel. A reação de Maillard é uma reação química que ocorre entre os grupos de açúcares redutores e aminoácidos, peptídeos ou proteínas, sob condições de elevada temperatura. Desde a sua descoberta em 1912, a indústria alimentícia vem mostrando interesse nesses compostos devido estar associado à textura e ao sabor dos alimentos em questão.

A caracterização química das melanoidinas e sua ação sobre a saúde humana vêm sendo fonte de pesquisa para a indústria de alimentos. Embora estudos venham sendo realizados a mais de 20 anos, seu efeito sobre a saúde ainda não é bem estabelecido (Wang *et al.*, 2011). Contudo, sabe-se que as melanoidinas apresentam potente atividade antioxidante (Rodrigues, 2009).

Apesar de inúmeras tentativas de isolar e purificar as melanoidinas a partir de alimentos como crosta de pão e café, pouco se sabe sobre as propriedades estruturais das mesmas. A Figura 6 apresenta propostas de estruturas das melanoidinas.

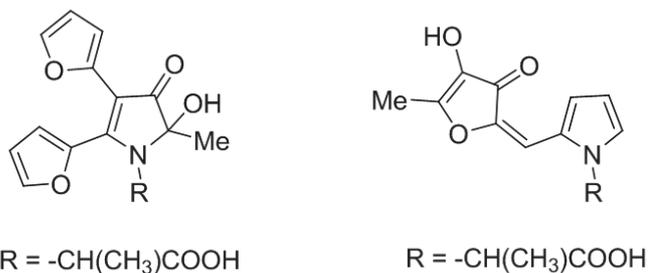


Figura 6. Proposta estrutural das melanoidinas. Adaptado de Wang *et al.* (2011).

Portanto, as melanoidinas podem apresentar na sua estrutura química grupos funcionais como amina, éter, cetona, álcool, etc. A presença das estruturas como as carbonilas das cetonas e hidroxila dos álcoois nas melanoidinas, são as responsáveis pela sua capacidade de complexar íons metálicos como o alumínio, por exemplo. O meio reacional é muito importante, pois em meio alcalino pode ser mais favorável a desprotonação da hidroxila para posterior complexação do íon metálico e em meio ácido a complexação é favorecida através da carbonila.

As melanoidinas são encontradas principalmente em alimentos que demandem de elevadas temperaturas para sua produção, como exemplo o café, o qual necessita do processo de torrefação para sua produção, bem como o chá-mate (Rodrigues, 2009). As melanoidinas também podem ser encontradas na erva-mate destinada ao consumo de chimarrão, porém em baixas concentrações. Em estudo realizado por da Costa (2009), observou-se que as melanoidinas solúveis em conjunto com os compostos fenólicos solúveis têm influência significativa sobre a porcentagem de alumínio solúvel em infusões preparadas com chá-mate.

Portanto, os compostos orgânicos como os fenólicos, flavonoides, ácidos clorogênicos, melanoidinas, entre outros, fazem com que a erva-mate apresente um valor terapêutico, agindo como anti-inflamatório, tônico, estimulante, diurético, antioxidante, etc (Filip *et al.*, 2001; Gnoatto *et al.*, 2005; Streit *et al.*, 2008; Sun e Tanumihardjo, 2007).

Estudos experimentais recentes demonstram que os compostos fenólicos e flavonoides possuem efeitos benéficos a saúde humana, devido principalmente a sua atividade antioxidante. Bastos *et al.*, (2005) analisaram o teor de fenólicos totais através do método do Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante através do método do tiocianato férrico em infusões preparadas com erva-mate e chá-mate. As infusões foram preparadas através de 3,0 g de mate em 250 mL de água ultra pura à 95°C durante um período de 5 minutos. Foi observado que tanto a erva-mate quanto o chá-mate tem a mesma eficácia antioxidante, através principalmente de um composto fenólico conhecido como BTH de acordo com as

condições utilizadas em tal estudo. Esse resultado pode estimular o consumo de bebidas tais como o mate.

A atividade antioxidante possui características que desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, incluindo também a propriedade de proteção cardiovascular, atividade antineoplásica, antiúlcera, antialérgicas, antivirais e anti-inflamatórias (Hanasaki *et al.*, 1994; Shaghaghiet *al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2007).

Além dos compostos orgânicos presentes na erva-mate é importante conhecer a composição inorgânica da mesma.

3.3.3. Espécies Metálicas em Erva-Mate

Dentre os nutrientes necessários à saúde humana, os minerais não podem ser sintetizados pelo organismo, e por isso devem ser obtidos através da alimentação.

No que diz respeito aos componentes inorgânicos da erva-mate, é reconhecido uma importante fonte de minerais essenciais aos seres humanos, tais como o Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , entre outros. Portanto, o consumo de bebidas obtidas através da erva-mate se torna uma importante fonte desses minerais (Ducat e Quináia, 2004; Malavolta e Henrichs, 2001).

Malavolta e Henrichs (2001) estudaram o teor de minerais totais presentes na massa seca de uma amostra de erva-mate. A amostra foi preparada por digestão ácida e a quantificação dos íons metálicos realizada por espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio. Os elementos que apresentaram elevada concentração foram Mg^{2+} e Ca^{2+} , chegando à 4,9 e 6,3 mg g^{-1} , respectivamente. Também avaliaram o teor de minerais em infusão de erva-mate preparada com 70 g da planta em 1 L de água fervente. A quantificação também foi realizada por espectrometria de emissão atômica. As maiores concentrações determinadas na infusão em ordem crescente foram Mg^{2+} , Na^+ , Al^{3+} e K^+ , que chegaram à 1,88; 3,23; 3,43 e 6,83 mg L^{-1} , respectivamente.

Em outro estudo a composição mineral da erva-mate comercializada e consumida na região sul Brasil foi estudada. Através das técnicas de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) e espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) foi realizada a quantificação de elementos metálicos essenciais e tóxicos como o cálcio, cádmio, cobalto, cromo, cobre, ferro, potássio, magnésio, sódio, níquel, chumbo, estrôncio, vanádio, zinco. Observou-se que a concentração média de

todos os metais analisados está dentro dos limites toleráveis, porém as concentrações encontradas diferem de acordo com a região de coleta da erva-mate (Bartz *et al.*, 2010).

Alguns elementos químicos apesar de serem considerados essenciais ao organismo humano, podem causar severos prejuízos para a saúde, apresentando potencial altamente tóxico dependendo da sua forma e concentração (Templeron, 2000).

A erva-mate também pode apresentar íons metálicos considerados tóxicos ao organismo humano. Marchisio *et al.* (2005) estudaram a concentração de chumbo na erva-mate. O chumbo, que é considerado um metal altamente tóxico, penetra no organismo através das vias alimentar e respiratória. As principais fontes de contaminação deste metal são ar, alimentos e bebidas. O estudo determinou uma concentração de $7,6 \mu\text{g L}^{-1}$ de chumbo em amostras de erva-mate.

Alguns estudos indicam também a presença de elevados teores de alumínio em folhas e infusões de erva-mate (da Costa *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2009; Ducat e Quináia, 2004; Giulian *et al.*, 2007). Uma infusão preparada com 5g de erva-mate em 150 mL de água ultra pura à 85°C durante 10 minutos apresentou 586 mg Kg^{-1} alumínio total dissolvido. Em outra infusão de chá-mate preparada da mesma maneira, determinou-se uma concentração de 612 mg Kg^{-1} alumínio total dissolvido (da Costa *et al.*, 2009).

3.3.3.1. Alumínio

O alumínio é um dos elementos mais abundantes da Terra compondo aproximadamente 8% da crosta terrestre. Pode estar presente no ambiente através de fontes naturais como a desagregação das rochas. Entre as fontes antropogênicas de contaminação por alumínio destacam-se a emissões atmosféricas, resíduo efluentes, água e resíduos sólidos, principalmente os associados com os processos industriais (ATSDR, 2012).

Um dos principais constituintes minerais do solo, o alumínio também está presente diariamente na vida dos organismos. Contudo, não apresenta qualquer função biológica para os seres humanos, caracterizando-se como um elemento não essencial (Poschenrieder *et al.*, 2008).

Em plantas, o alumínio solúvel presente em excesso em solos ácidos, normalmente limita seu crescimento devido a distúrbios causados sobre as células das raízes. Porém, muitas plantas são tolerantes ao alumínio em solos ácidos (da Costa, 2008). Segundo Ghanatiet *et al.* (2005), o alumínio atua sobre o crescimento das plantas de chá, porque aumenta a atividade das enzimas antioxidantes, melhorando a integridade das membranas celulares, e

proporcionando um atraso do processo de envelhecimento dessas plantas.

Portanto, o Al pode agir benéficamente sobre algumas plantas de chá. O chá que por sua vez é muito consumido pelos seres humanos pode transferir o Al para o organismo, não apresentando nenhuma função biológica conhecida. O alumínio é considerado um potente agente neurotóxico que pode estar relacionado com doenças como Parkinson, Alzheimer e encefalopatia por diálise (Alberti *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2005; da Costa *et al.*, 2008; da Silva *et al.*, 1996). Além disso, esse elemento pode exercer toxicidade sobre os sistemas esquelético e hematológico de pessoas com severos problemas renais (Zatta *et al.*, 2003), pois o rim é o principal órgão de eliminação do alumínio (Yokel e McNamara, 2001).

Ainda não são conhecidos e estabelecidos os mecanismos envolvidos na toxicidade do alumínio (Alberti, 2003). É importante ressaltar que uma fonte de exposição dos seres humanos ao alumínio é por via alimentar através do consumo de chás e também através do uso de utensílios domésticos no cozimento e preparo dos alimentos. De acordo com Yoke *et al.* (2006), os alimentos e a água potável contribuem com aproximadamente 95% e 1-2% da ingestão diária de alumínio na dieta humana, respectivamente.

Ducat e Quináia (2004) estudaram a presença de íons metálicos sobre os ramos e folhas de erva-mate. As amostras foram preparadas em meio ácido durante 10 minutos à 70°C com posterior determinação por espectrometria de absorção atômica com chama. Os autores observaram elevados teores de Al^{3+} nos ramos e folhas de erva-mate com relação aos outros elementos estudados como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , etc. Os teores encontrados variaram de 9,9 $mg\ g^{-1}$ e 10,7 $mg\ g^{-1}$ nos ramos e folhas, respectivamente.

da Costa *et al.* (2009) observaram que em infusões de erva-mate da região paranaense as concentrações de alumínio total dissolvido encontradas variaram de 370 à 586,0 $mg\ kg^{-1}$. Wrobel *et al.* (2000), determinaram Al e Mn em infusões de erva-mate e as concentrações obtidas foram de 369 $\mu g\ g^{-1}$ e 2223 $mg\ g^{-1}$, respectivamente.

Contudo, com a determinação da concentração total de alumínio em uma amostra de interesse nutricional não é possível conhecer ou obter dados sobre a disponibilidade biológica do elemento e conseqüentemente a sua toxicidade. Estudos que possibilitam realizar estimativas da toxicidade de um elemento químico devem ser baseados em estudos de especiação do elemento. Portanto, deve-se investigar a distribuição do elemento entre suas formas e espécies químicas (Templeton *et al.*, 2000).

3.4. Especificação de Alumínio

Alguns elementos em níveis traços apresentam importante papel e função biológica, desempenhando ação funcional e podendo ser considerado essencial ao organismo humano (Goldhaber, 2003). Contrariamente, outros elementos podem causar sérios danos para a saúde humana mesmo em concentrações baixas. Considerando-se a potencialidade de algumas bebidas como fontes de elementos traço essenciais e alguns outros considerados tóxicos, destaca-se o chimarrão e o chá-mate. Por isso, vale ressaltar a importância de estudar as infusões de erva-mate, devido ao grande consumo e aos poucos estudos envolvidos nessa temática.

O conhecimento da concentração total de um elemento até alguns anos parecia ser suficiente para qualquer conclusão química ou biológica. Embora a determinação da concentração total ainda seja muito válida, hoje, se faz necessário o conhecimento das formas químicas nas quais o elemento está distribuído (de la Guardia *et al.*, 2000).

Para estimar o risco envolvido, devido ao consumo de alimentos e bebidas com elevados teores de alumínio, é necessário avaliar a biodisponibilidade e consequente toxicidade, que são dependentes da forma química que o elemento se apresenta.

Nem todas as espécies de alumínio se mostram biodisponíveis e tóxicas. O alumínio pode estar presente nas infusões de erva-mate na forma de íon hidratado ou complexado a compostos orgânicos e inorgânicos. As espécies de maior labilidade, e consequentemente, maior toxicidade são as formas monoméricas do Al, tanto os íons hidratados livres (Al^{3+}) quanto os complexos cineticamente reversíveis, normalmente o Al complexado por alguns ligantes inorgânicos (Street *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2001). Entretanto, a toxicidade do alumínio não é totalmente esclarecida. Machado (1997) citado em Soares (2008) relatou que o $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ não causava toxicidade em plantas como o trigo, por exemplo. Neste mesmo estudo atribuiu-se a toxicidade ao Al^{3+} .

Entre as espécies de Al mononucleares nas plantas, os complexos de Al com sulfato (SO_4^-) e fluoreto (F^-) e os complexos formados com ligantes orgânicos são considerados não labéis ou pouco lábeis (Flaten *et al.*, 2002; Street *et al.*, 2007). Os ligantes orgânicos naturais da erva-mate, principalmente os compostos fenólicos que incluem os flavonoides possuem a propriedade de complexação com metais. Os polifenóis possuem um grande número de sítios de complexação, ou seja, hidroxilas capazes de complexar o alumínio, reduzindo assim sua toxicidade (da Costa *et al.*, 2009; Flaten *et al.*, 2002; Street *et al.*, 2007). Já entre as

formaspoliméricas do Al ($[Al_2(OH)_2(H_2O)_8]^{4+}$, $[Al_6(OH)_{12}]^{6+}$, $[Al(OH)_{22}]^{8+}$ e $[Al_{13}(OH)_{30}]^{9+}$, o $AlO_4Al_{12}(OH)_{24}(H_2O)_{12}^{7+}$ parece ser a única forma tóxica.

Portanto, estudos de especiação possibilitam determinar informações sobre a real essencialidade e toxicidade das diferentes espécies químicas do alumínio em amostras de infusão de erva-mate. Vale ressaltar que a coleta e a preservação da amostra, visando à especiação, requerem um planejamento cuidadoso. Pois é necessário manter o equilíbrio estabelecido entre as formas e espécies químicas do elemento na amostra (Pereira, 2005). Consequentemente, como uma forma de se ter acesso às diferentes espécies de um elemento, torna-se necessário a adoção e a utilização de procedimentos de preparação e separação mais leves, que não utilizem condições oxidantes fortes por exemplo, como geralmente faz-se nas determinações de concentrações totais (da Costa, 2008).

De acordo com Flaten (2002) em trabalho de revisão sobre a determinação de alumínio em amostras de infusão de chá, existe uma grande divergência com o preparo da infusão como: quantidade de chá e volume de água a serem utilizados, tempo de infusão, temperatura, origem da planta, solo, clima, entre outros. da Costa *et al.* (2009) prepararam infusões de erva-mate e chá-mate através de 5 g da planta em 150 mL de água em temperatura de 85°C durante 10 minutos, com posterior filtração em membrana de 0,45µm para separação do sobrenadante. Em outro trabalho, as infusões de 29 tipos de chá, sendo 13 chás preto, 13 verde, 1 branco e 2 semi-fermentados, foram preparadas através de 1 g da planta em 50 mL de água quente durante, 5 e 60 minutos (Street *et al.*, 2007). Alberti *et al.* (2003) estudaram infusões de chá preto e verde, preparados a partir de 10 g da planta em 1 L de água à 100°C durante 5 minutos, o sobrenadante foi separado em filtro nº 42 e diluído em 1 L. Em decorrência das diferentes condições de preparo das infusões, na literatura existem divergências em relação aos teores de minerais encontrado nos chás (Flaten, 2002).

Após o preparo das infusões, os estudos de especiação requerem que as diferentes formas químicas dos elementos sejam separadas, identificadas e quantificadas por técnicas específicas. Contudo, mesmo nos dias atuais, a análise de especiação ainda é considerada um desafio analítico devido à dificuldade de quantificar concentrações traço e ultra-traço de todas as formas e espécies de um elemento em uma matriz em particular. Além disso, buscam-se abordagens que minimizam etapas prévias de tratamento da amostra a fim reduzir alterações da amostra no momento de extrair e pré-concentrar o analito (dos Anjos *et al.*, 2010).

Várias abordagens analíticas têm sido empregadas na análise de especiação de espécies metálicas, e possuem a capacidade de detectar o analito de acordo com diferentes propriedades tais como, tamanho, mobilidade, labilidade, estabilidade, etc (dos Anjos, 2010;

Pesavento *et al.*, 2009). Os procedimentos mais utilizados baseiam-se nos métodos espectrométricos e eletroanalíticos.

Métodos espectrométricos de análise baseados em absorção atômica e emissão atômica são utilizados na análise de especiação de metais muitas vezes através do acoplamento com técnicas de separação, tais como os métodos cromatográficos, resinas de troca-iônica, troca de ligantes, ultrafiltração, diálise, etc (dos Anjos *et al.*, 2010). Apesar da seletividade e sensibilidade alcançada nesse tipo de abordagem, podem-se citar algumas desvantagens que incluem o elevado custo da análise e o grande número de etapas de pré-tratamento da amostra.

da Costa *et al.* (2009) realizaram a especiação de alumínio em diferentes infusões de erva-mate e chá-mate através do uso da resina quelante, Chelex-100, e determinação por espectrometria de absorção atômica em chama. Utilizando a resina, apenas íons hidratados (Al^{3+}) e complexos de alumínio mais reversíveis são adsorvidos pela mesma, enquanto que as formas não lábeis são inertes e permanecem em solução. Assim, os metais lábeis são extraídos da resina Chelex-100 e determinados por absorção atômica. Os autores relatam que cerca de 45% do alumínio nas infusões estudadas encontrava-se na forma lábil, e que possivelmente a maior parte do Al encontrava-se complexado a compostos polifenólicos.

Dentre as abordagens analíticas utilizadas na análise de especiação, os métodos voltamétricos são procedimentos considerados adequados. Além de proporcionar vantagens como baixo custo e elevada sensibilidade, também possibilitam determinar e quantificar diferentes espécies do metal de interesse (Bi, 2001; dos Anjos *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2001).

3.4.1. Especiação de Alumínio por Voltametria

A voltametria é um método eletroanalítico na qual as informações sobre o analito são obtidas através da medida de corrente em função de um potencial aplicado. A corrente gerada é monitorada em função de uma varredura de potencial, proporcionando uma curva (voltamograma). Historicamente, o campo da voltametria se desenvolveu a partir da polarografia, que foi descoberto por Jaroslav Heyrovsky em 1920. A polarografia se difere dos outros tipos de voltametria por utilizar o DME - do inglês dropping mercury electrode, como eletrodo de trabalho.

Com relação aos eletrodos de trabalho utilizados em voltametria existem vários tipos, variando o material empregado na sua construção, morfologia e dimensões (Silva, 2005). Para aumentar o efeito depolarização, os eletrodos de trabalho em voltametria

possuempequenasáreassuperficiais. Um eletrodo muito utilizado em voltametria é o eletrodo de mercúrio, podendo ser empregado como eletrodo de gotaestática de mercúrio (SMDE, do inglês Static Mercury Drop Electrode) ou como gotapendente de mercúrio (HMDE, do inglês Hanging Mercury Drop Electrode) na qual a gotapermanece imóvel na ponta do capilar e o voltamograma é registrado nessa única gota. Aindapode ser usado na forma de filme de mercúrio (MTFE, do inglês Mercury Thin FilmElectrode), sendo que, o filme édepositado eletroquimicamente em superfícies sólidas, como platina e carbono vítreo (Silva, 2005; Skoog, 2002; Soares, 2008).

O emprego do eletrodo de mercúrio é restrito à região catódica, nessa região de potencial ocorrem as reaçõeseletródicas da maioria dos íons metálicos e de grande número de espécies orgânicas, o que vemjustificar o seu amplo emprego como eletrodo de trabalho nas últimas décadas em diversas aplicações (Pereira, 2005).

Outros dois eletrodos compõem a cela voltamétrica, são eles: o eletrodo de referência e o contra-eletrodo ou eletrodo auxiliar. O potencial do eletrodo de referência permanece constante sob as condições de medida. A corrente é medida entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, que é fabricado com uma substância inerte tal como grafite ou platina e possui grande área superficial. Os três eletrodos ficam submersos em uma solução salina, chamada de eletrólito de suporte. O eletrólito de suporte é uma solução inerte ao analito e geralmente a sua concentração é cerca 100 vezes maior em relação à concentraçãodo mesmo, tendo por finalidade minimizar a corrente de migração(Skoog, 2002).

Quando se aplica uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar, a corrente que aparece é registrada em função desta diferença de potencial. Na presença de uma espécie eletroativa, a corrente aumenta e se a diferença de potencial for suficiente, o analito é reduzido ou oxidado. A concentração da espécie eletroativa é proporcional a corrente limite que é controlada por difusão e é obtida pela pela diferença entre a corrente residual e a corrente limite, representada por i_d . A relação entre a corrente de difusão (que é do tipo faradaica, ou seja, produzida por uma reação eletródica) e a concentração da espécie eletroativa em solução é dada pela equação de Ilkovic (Equação 1):

$$i_d = 607 nD^{1/2} m^{2/3} t^{1/6} C \quad \text{Equação (1)}$$

onde i_d representa a corrente de difusão (μA), n é a quantidade de matéria, m indica a velocidade da vazão de mercúrio ($mg s^{-1}$), t é o tempo de gota (s) e C é a concentração em $nmol L^{-1}$.

Além da difusão, existem outros dois processos de transferência de massa entre a solução e a superfície do eletrodo. Um desses processos é a migração de partículas carregadas em um campo elétrico. O outro é a convecção, que ocorre devido à movimentação da solução. O processo de migração em um campo elétrico é minimizado pela adição do eletrólito de suporte. O processo de convecção é eliminado mantendo-se a solução em repouso, sem agitação. Assim, apenas o processo de difusão será responsável pelo transporte de massa, e a corrente medida, pode ser efetivamente expressa como corrente de difusão (Aleixo, 2003; Repula, 2009; Soares, 2008).

As medidas voltamétricas podem ser afetadas pela corrente de fundo, conhecida também como corrente residual. Para minimizar esse problema, processos de pré-concentração do analito podem ser aplicados, chegando a limites de detecção inferiores a 10^{-7} – 10^{-8} mol L⁻¹ (Skoog, 2002). Um grande número de novos métodos voltamétricos tem sido desenvolvido para suplementar a corrente contínua convencional, são eles: pulso normal, pulso diferencial, onda quadrada.

Dentre os métodos voltamétricos, os de interesse para análise de concentrações traço de espécies metálicas são os de redissolução com o emprego do eletrodo de gota pendente de mercúrio como eletrodo de trabalho. Esse interesse baseia-se na elevada sensibilidade, pois uma etapa de pré-concentração é incluída seguida de uma etapa voltamétrica. Os métodos de redissolução podem ser anódico, catódico ou adsortivo.

Portanto, em uma primeira etapa conhecida por pré-concentração eletroquímica, o analito é depositado no eletrodo de trabalho durante um determinado período, nesse caso aplica-se um potencial capaz de oxidar ou reduzir a espécie de interesse. Após um período de eletrodeposição, tem-se a etapa de equilíbrio e realiza-se uma varredura de potencial no sentido anódico ou catódico. Durante a varredura o analito pode ser reoxidado ou sofre uma redução durante a redissolução, ou seja, a volta do analito eletrodepositado para a solução (Skoog, 2002; Soares, 2008). Nos métodos de redissolução catódicos, o eletrodo de trabalho comporta-se como o ânodo durante a etapa de deposição e como cátodo durante a etapa de redissolução, quando o analito é reduzido de volta à sua forma original (Skoog, 2002). Na redissolução adsortiva, o processo de pré-concentração do analito no eletrodo de trabalho ocorre por adsorção física e não eletrolítica.

3.4.1.1. Voltametria Adsorptiva de Redissolução

A voltametria adsorptiva de redissolução foi desenvolvida recentemente, para superar os limites impostos pela voltametria de redissolução convencional, anódica ou catódica (Skoog, 2002). A pré-concentração é feita pela adsorção da espécie eletroativa na superfície do eletrodo. No caso de metais isto é feito através de seus íons complexos. Adiciona-se à solução contendo o íon metálico um complexante adequado e o complexo formado (metal-ligante) é que será acumulado junto à superfície do eletrodo. Dessa maneira a pré-concentração não depende da solubilidade do metal no mercúrio, como no caso da voltametria de redissolução convencional, e metais pouco solúveis (no mercúrio) poderão ser determinados (Silva, 2007; Soares, 2008). A voltametria adsorptiva de redissolução também pode ser empregada na determinação de substâncias orgânicas, bastando que elas tenham superfície-ativa para que possam ser adsorvidos no eletrodo de trabalho.

Os métodos voltamétricos adsorptivos referente aos metais diferem entre si pela maneira de complexação e mecanismo de acumulação. No caso mais simples, o analito forma o complexo com o ligante e é adsorvido na superfície do eletrodo. Porém, em outros casos, o ligante é adsorvido na superfície do eletrodo e a formação do complexo ocorre na superfície do eletrodo. Até que a superfície do eletrodo de trabalho se torne saturada a corrente de pico aumenta linearmente com o tempo de acumulação e atinge um máximo.

O processo adsorptivo começa quando o complexo formado entre o metal e o ligante é adsorvido sob agitação na superfície do eletrodo de trabalho durante certo período de tempo. Após essa etapa a solução fica em repouso para que o complexo adsorvido seja também homogeneizado no eletrodo. Feito isso pode-se então ocorrer a redissolução, na qual o complexo, o metal ou o ligante serão reduzidos ou oxidados, e a corrente gerada será proporcional a concentração do analito.

A voltametria de pulso diferencial é um dos modos de varredura mais utilizados para os métodos adsorptivos de redissolução. Na voltametria de pulso diferencial, a corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (P_1) e outra ao final do pulso (P_2), representado pela Figura 7. A primeira corrente é diminuída da segunda, e a diferença entre os valores é colocada em um gráfico *versus* o potencial. O voltamograma resultante contém um pico cuja área é diretamente proporcional a concentração do analito, representado pela Figura 8 (Repula, 2009; Silva, 2007).

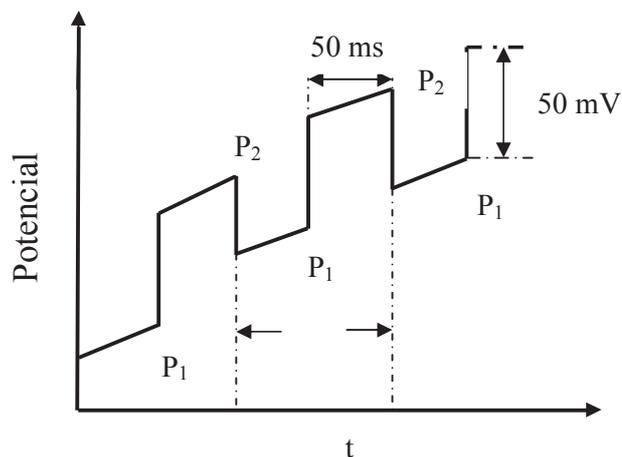


Figura 7. Esquema representativo da aplicação do potencial em função do tempo em voltametria de pulso diferencial (Repula, 2009; Skoog, 2002).

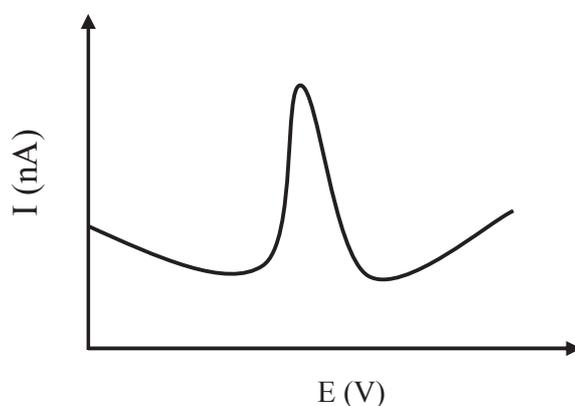


Figura 8. Esquema representativo de um voltamograma resultante de pulso diferencial (Repula, 2009).

O objetivo de se fazer duas leituras de corrente e de trabalhar a diferença entre elas é promover a correção da corrente capacitativa. A corrente capacitativa, é uma das principais componentes da corrente de fundo e pode limitar a sensibilidade do método. Essa correção de correntes permite atingir pelo modo de pulso diferencial limites de detecção da ordem de 10^{-8} mol L⁻¹.

No que diz respeito à determinação voltamétrica do alumínio empregando eletrodo de gota pendente de mercúrio como eletrodo de trabalho, sabe-se que a sua determinação direta é dificultada por interferências causadas por íons H⁺ e íons dos metais alcalinos e alcalinos terrosos (Downard *et al.*, 1996; Hernandez-Brito *et al.*, 1994; Soares, 2008; Van den Berg *et al.*, 1986).

Portanto, a determinação voltamétrica do Al utilizando eletrodo de mercúrio como eletrodo de trabalho necessita ser realizada de modo indireto, ou seja, através da sua complexação com um ligante de característica eletroativa através da voltametria adsortiva de redissolução. Os agentes complexantes que são utilizados na determinação do alumínio são o violeta de solocromo RS, catecol, hidroquinona, alizarina, entre outros (Brito *et al.*, 1994; Downard *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2001).

Dentre os inúmeros complexantes que podem ser utilizados na análise voltamétrica para determinação do alumínio, as alizarinas são corantes orgânicos que possuem substituintes ligados à estrutura central de uma antraquinona. O 1,2-Dihidroxiantraquinona-3-sulfonato de sódio, também denominado de Vermelho de Alizarina S ou DASA, é conhecido como reagente analítico há bastante tempo e pertence ao grupo dos corantes hidroxiantraquinonas.

O poder de complexação de alizarinas como o DASA está diretamente relacionado com a presença do grupo para-quinona e hidroxilas em sua fórmula molecular (Figura 9) (Filho e Chierice, 1998).

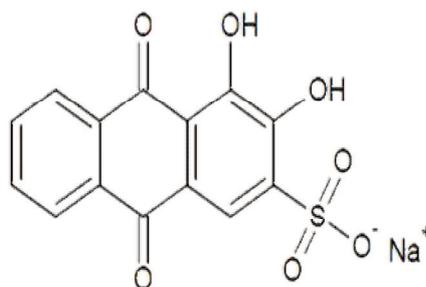


Figura 9. Fórmula estrutural do vermelho de alizarina S.

Alguns trabalhos na literatura indicam o uso do vermelho de alizarina S na determinação voltamétrica do alumínio com eletrodo de mercúrio, carbono e até mesmo grafite pirolítico. Downard *et al.* (1996) estudaram o comportamento voltamétrico de complexos de Al-DASA e Al-Catecol. Nesse estudo o DASA foi escolhido como agente complexante por ser um reagente que apresenta um comportamento eletroquímico limpo. Em outro estudo, determinou-se a concentração do alumínio em água do mar após complexação com DASA por voltametria adsortiva de redissolução. Observou-se que o DASA tem rápida complexação com o alumínio, dispensando o uso de aquecimento requerido por outros agentes complexantes (Hernandez-Brito *et al.*, 1994; Van den Berg *et al.*, 1986). Com isso, a Figura 10 representa uma proposta do complexo Al-DASA.

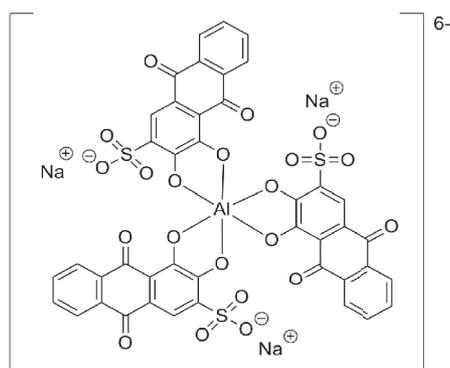


Figura 10. Proposta estrutural do complexo formado entre o Al e o DASA. Adaptado de Soares (2008).

Vale ressaltar que a determinação do alumínio através da voltametria adsortiva de redissolução através do uso de um agente de complexante já é descrito na literatura (Downard *et al.* 1996; Hernandez-Brito *et al.*, 1994; Van den Berg *et al.* 1986; Wang *et al.*, 2001). Contudo, até o momento, estudos envolvendo análise de especiação de alumínio por voltametria ainda são escassos.

Nesse contexto, van den Berg *et al.* (1986) descobriram que o DASA só poderia capturar alumínio lábil em água em pH 5.0, pois em pH 9.0 a capacidade complexação do DASA com o alumínio é aumentada e então o alumínio total é determinado. Em pH alcalino, a formação de complexos de Al-corantes é favorecida cineticamente e termodinamicamente (Wang *et al.*, 2001).

Wang *et al.* (2001) estudaram a especiação do alumínio em amostras de águas naturais por voltametria adsortiva de redissolução através do uso do agente complexante violeta de solocromo RS, o qual vai formar um complexo com o Al. Segundo Wang dois valores de pH são ótimos para a especiação de Al, ocorrendo em pH ácido (4 – 5) a determinação da fração lábil, ou seja, Al^{3+} , e formas monoméricas de Al inorgânico (complexos com F^- , OH^- , SO_4^{2-} , etc), e em pH alcalino (8 – 9) a fração monomérica total. Com o aumento do pH a capacidade do complexante em sequestrar Al é tão forte, que a complexação com a matéria orgânica da matriz torna-se fraca, predominando o produto de hidrólise $Al(OH)_4^-$.

O uso da voltametria adsortiva de redissolução aliada ao agente complexante DASA em estudos de especiação do alumínio ainda é escasso ou inédito na literatura. Apesar de estudos sobre a composição química e terapêutica da erva-mate já terem sido realizados, vale ressaltar que o estudo da especiação do alumínio estima a presença de espécies lábeis de elevada importância toxicológica. Portanto, a análise de especiação em matrizes de interesse econômico, nutricional e toxicológico torna-se interessante.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Na realização do trabalho foram utilizados reagentes de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água do tipo ultrapura obtida com sistema TKA-GenPure (Thermo Scientific, Alemanha).

As soluções dos íons metálicos (Ca^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Na^+ , Pb^{2+}) foram preparadas a partir da diluição de soluções padrão de 1000 mg L^{-1} (Biotec, Fluka Analytical). Uma série de soluções foram preparadas semanalmente e mantidas sob refrigeração à 4°C para serem empregadas nos ensaios voltamétricos. Soluções aquosas de $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de amônio - NH_4Cl (Vetec) em pH 5,0 e 8,0 foram preparadas para serem utilizadas como eletrólito de suporte. Soluções $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de bromato de potássio- KBrO_3 (Carlo Erba) também foram preparadas em meio aquoso. Soluções aquosas de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ do agente complexante vermelho de alizarina S ou 1,2-dihydroxiantraquinona-3-sulfato, do inglês 1,2-dihydroxyanthraquinone-3-sulfonic (DASA) (Reagen) também foram preparadas e permaneceram protegidas da luz. Utilizou-se soluções de NaOH e HCl (Biotec) no ajuste de pH das soluções.

Preparou-se no dia da medida espectrofotométrica, uma solução metanólica (Biotec) de 1 g L^{-1} de ácido gálico (Vetec, 99%), uma solução aquosa saturada de carbonato de sódio (20 g) e tartarato de sódio (1,2 g). Também foi preparada uma solução metanólica de quercetina 0,01% m/v (Sigma, 98%) e uma solução metanólica de cloreto de alumínio 5% m/v. Uma solução de $40 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, DPPH do inglês *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl* (Aldrich) foi utilizada e o reagente Folin-Ciocalteu (Biotec, 2N) foi utilizado sem diluição.

4.2. Equipamentos

Medidas voltamétricas envolvendo a análise de especiação do alumínio em amostras de infusão de erva-mate foram realizadas em um analisador voltamétrico 757 VA (Metrohm), controlado por microcomputador e software 757 VA Computrace. A célula eletroquímica utilizada foi a convencional de três eletrodos. O eletrodo de Ag/AgCl ($\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$) foi utilizado como referência, o eletrodo auxiliar foi um fio de platina e o eletrodo de trabalho foi o de gota pendente de mercúrio, do inglês *hanging mercury drop electrode* (HMDE). Em todas as medidas de pH foi empregado um eletrodo de vidro combinado com referência

interna Ag/AgCl conectado a um potenciômetro digital (Hamman, pH 21).

As medidas espectrofotométricas realizadas através da espectrofotometria de absorção molecular foram realizadas em um espectrofotômetro ultravioleta/vísivel(UV-Vis) Varian Cary 50 Bio. Cubetas de quartzo sem tampa, com caminho óptico de 1 cm foram utilizados nas medidas.

Os materiais normalmente utilizados foram uma balança analítica com precisão $\pm 0,0001$ (Crystal, 200 SMI), estufa (Fornos Magnus), micropipetas (Micropipette) com diversas capacidades e chapa de aquecimento (753 A, Fision).

4.3. Técnicas Limpas

Durante todo o trabalho, procedimentos baseados em técnicas limpas foram adotados visando minimizar possíveis processos de contaminação e adulteração das amostras (Campos *et al.*, 2002; dos Anjos *et al.*, 2010). Os materiais foram lavados com detergente comercial, esponja e água corrente. Em seguida, os mesmos foram deixados imersos em banho de HNO₃ 10% por no mínimo 48 horas. A próxima etapa consistiu em enxaguar os materiais por pelo menos três vezes com água ultrapura. Finalmente os materiais descontaminados foram armazenados em sacos plásticos até seu uso (Campos *et al.*, 2002; dos Anjos, 2006; dos Anjos *et al.*, 2010).

Uma solução 0,1 mol L⁻¹ de ácido etilenodiamino tetra-acético EDTA em pH 5, foi utilizada na limpeza das bancadas utilizadas na manipulação das amostras. Durante o processo de limpeza e manipulação dos materiais e vidraria, foram utilizadas bandejas plásticas previamente limpas e luvas descartáveis de procedimentos.

4.4. Desenvolvimento do Protocolo Analítico Voltado à Análise de Especificação de Alumínio Utilizando a Voltametria

Na análise de especificação de alumínio em infusões de erva-mate determinou-se as frações de Al total dissolvido (Al-Total) e Al lábil dissolvido (Al-Lábil) empregando voltametria adsorptiva de redissolução catódica (VAdsRC) por pulso diferencial com o uso do agente complexante vermelho de alizarina S (DASA). Na implantação do procedimento analítico foram realizados experimentos para otimizar as condições voltamétricas de análise em pH 8.0 e pH 5.0. Nestes ensaios foram avaliados nos voltamogramas o formato e altura do pico para a espécie de interesse.

A determinação do Al-Total empregando VAdSRC e curva de adição de padrão foram conduzidas utilizando 10,0 mL da amostra aquosa com pH ajustado para 8.0 em meio $8,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ca^{2+} ; $82,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NH_4Cl ; $8,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de KBrO_3 e $41,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DASA (Metrohn, 2009).

A determinação do Al-Lábil foi realizada de modo semelhante ao Al-Total, com exceção do pH ser 5.0. A concentração de Al complexado a ligantes orgânicos presentes nas amostras foi obtida pela diferença entre Al-Total e o Al-Lábil.

Determinações do Al-Total e Al-Lábil foram realizadas empregando VAdSRC utilizando DASA como agente complexante em diferentes amostras, tais como água ultrapura enriquecida com Al^{3+} , água de torneira e infusões de erva-mate de chimarrão, tererê e chá-mate.

4.4.1. Voltametria Cíclica

Estudos sobre o comportamento eletroquímico do ligante DASA e do complexo formado por Al-DASA foram realizados utilizando a voltametria cíclica (VC).

Em uma célula voltamétrica foram adicionados $41,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DASA e $82,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NH_4Cl . As medidas foram realizadas em triplicata por VC. As condições voltamétricas utilizadas estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros instrumentais utilizados nas análises por voltametria cíclica.

<i>Parâmetros</i>	<i>Valores</i>
Eletrodo	HMDE
Potencial de Acumulação (E_{ac})	-0,85 V
Potencial Inicial de Varredura (E_i)	0,0 V
Potencial Final de Varredura (E_f)	-1,2 V
Tempo de Equilíbrio (t_{eq})	5 s
Amplitude do Pulso	50 mV
Velocidade de Varredura	25 mV s^{-1}
Tamanho da gota	4
Modo	Cíclico

Posteriormente e separadamente, foram adicionados na mesma célula $8,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de KBrO_3 e $8,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ca^{2+} e as medidas foram novamente realizadas. Por fim, adicionou-se $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} e os voltamogramas cíclicos foram obtidos.

4.4.2. Otimização dos Parâmetros Voltamétricos Utilizados na VAdsRC por Pulso Diferencial.

Com relação aos parâmetros voltamétricos empregados na VAdsRC de pulso diferencial, estudou-se a influência do tempo de equilíbrio (T_{eq}), potencial e tempo de acumulação do complexo Al-DASA no eletrodo de trabalho para a determinação do Al-Total e Al-Lábil (Metrohm, 2009).

Nestes ensaios foram utilizadas uma solução aquosa de $24,4 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} em meio de $8,20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ca^{2+} , $82,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NH_4Cl , $8,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de KBrO_3 e $41,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DASA em pH 8.0 e 5.0. Os voltamogramas foram obtidos em triplicata e analisados. Na avaliação, foi analisado e aceito como ótimo a maior intensidade de corrente para o pico do complexo Al-DASA juntamente com o melhor formato do pico.

O tempo de equilíbrio estudado variou de 0 à 20 s nos dois valores de pH, 8.0 e 5.0. O potencial e o tempo de acumulação do complexo Al-DASA foi estudado entre os valores de -0,7 à -1,0 V e 0 à 60 s, respectivamente, também nos dois valores de pH.

4.4.3. Otimização do Tempo Utilizado na Complexação do Al pelo DASA

Um dos testes realizados na implantação do protocolo analítico utilizado na especiação de Al por VAdsRC consistiu em avaliar o tempo necessário para que a complexação do Al pelo ligante DASA fosse completa.

Inicialmente, realizou-se a determinação voltamétrica do controle analítico (meio complexante) sem a presença do analito. Posteriormente, $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} foram adicionados no meio complexante e realizou-se uma nova determinação. Nessa situação, considerou-se o tempo de complexação de 0s. A solução ficou sem agitação por 120s e realizou-se a determinação novamente. Após mais 120s (240s no total), realizou-se nova medida. Esse experimento foi realizado em pH 5.0 e 8.0, para os teores de Al-Lábil e Al-Total, respectivamente.

4.5. Avaliação do Procedimento Analítico Proposto

O desenvolvimento da metodologia analítica proposta e otimizada para a análise de especiação de Al em infusões de erva-mate foi avaliado através dos testes de linearidade, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), testes de interferência,

exatidão e precisão.

4.5.1. Calibração Instrumental

Para os testes de linearidade e sensibilidade foram construídas curvas analíticas de Al^{3+} através de adição de padrão. Para tal, foi sendo adicionado uma solução aquosa de Al^{3+} separadamente nos dois valores de pH (8.0 e 5.0) empregando as condições voltamétricas otimizadas. As curvas foram construídas em uma faixa que variou entre $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ e $200 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} .

A linearidade foi avaliada através do valor do coeficiente de correlação da curva analítica construída, o qual deve ser próximo de 1,0. Já a sensibilidade foi avaliada através do valor do coeficiente angular da curva analítica construída que, quanto mais próximo de 0,45, mais sensível será.

4.5.2. Limite de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram obtidos através de cálculos que consideram a estimativa do desvio padrão determinadas nas análises voltamétricas do controle analítico e do coeficiente angular de uma curva analítica.

O controle analítico para o pH 8,0 consistiu de $8,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ca^{2+} ; $82,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NH_4Cl ; $8,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de KBrO_3 e $41,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DASA. Para o pH 5.0 o controle analítico foi idêntico ao utilizado em pH 8.0. Foram realizadas dez medidas voltamétricas consecutivas do controle analítico em ambos os valores de pH.

4.5.3. Avaliação da Precisão e Exatidão do Método Proposto

Para a avaliação da precisão do método foram realizados testes de repetibilidade e precisão intermediária e para a avaliação da exatidão foram realizados testes de adição por recuperação de padrão.

Para os testes de repetibilidade foram preparadas em um mesmo dia cinco soluções aquosas diferentes contendo $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} em meio de $8,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ca^{2+} ; $82,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NH_4Cl ; $8,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de KBrO_3 e $41,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DASA. As análises foram realizadas por VAdSRC em pH 8.0 e 5.0 para a obtenção das intensidades de corrente do pico referente ao Al. Para os testes de precisão intermediária o mesmo ensaio foi conduzido, porém as

amostras foram preparadas e analisadas em cinco dias diferentes e consecutivos.

Os testes de adição por recuperação de padrão foram conduzidos em meio de uma solução aquosa de Al^{3+} com $8,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ca^{2+} ; $82,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NH_4Cl ; $8,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de KBrO_3 e $41,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DASA em pH 8.0 e 5.0 para as determinações de Al-Total e Al-Lábil, respectivamente. A solução aquosa foi enriquecida com $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} . Em infusões de erva-mate comercial preparadas com 2 g L^{-1} à $\pm 98^\circ\text{C}$ (10 min) o teste foi realizado apenas para Al-Total. As determinações de Al^{3+} por VAdsRC foram realizadas para cada pH através de adição de padrão.

Para a infusão de erva-mate, primeiramente determinou-se por VAdsRC através de adição de padrão o Al-Total, através da diluição da mesma em solução aquosa. Posteriormente, uma nova infusão da mesma amostra foi enriquecida com $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} , e realizou-se novamente a determinação do Al-Total. Todas as amostras e quantificações foram preparadas e realizadas em triplicata.

4.5.4. Testes de Interferência

Para avaliar a interferência de outros elementos metálicos na determinação Al-Total e Al-Lábil por VAdsRC utilizou-se uma solução aquosa contendo $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} . A amostra foi preparada nos dois valores de pH 8.0 e 5.0 e analisada por VAdsRC em meio de $8,2 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ca^{2+} ; $82,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NH_4Cl ; $8,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de KBrO_3 e $41,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DASA . Foi realizada a adição de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de uma solução aquosa de Na^+ e realizada a análise voltamétrica. Após a análise, foi adicionada outra alíquota de Na^+ de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e novamente realizada a análise por VAdsRC. Esse mesmo procedimento foi adotado para os íons de Pb^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} todos na mesma solução de trabalho.

4.6. Aplicação do Protocolo Analítico em Infusões de Erva-Mate

Após a otimização e validação da metodologia analítica voltada a especiação do Al empregando VAdsRC e agente complexante DASA , a mesma foi aplicada em infusões preparadas com 14 amostras de erva-mate.

4.6.1. Amostras de Erva-Mate

As amostras de erva-mate foram obtidas em uma empresa localizadas em Guarapuava-

PR ou no comércio local. As amostras foram: 4 produtos de marcas diferentes destinados ao preparo de chimarrão, 2 produtos destinados ao preparo do tererê e 2 produtos de chá-mate. A Tabela 2 apresenta dados das amostras de erva-mate utilizadas no trabalho.

Tabela 2. Dados das amostras comerciais de erva-mate coletadas.

Amostra	Bebida	Sigla	Cor	Granulometria	Folhas/Talos (%)
Erva-Mate 1	Chimarrão	E.M.C.1	Verde	Grossa	70 – 67 / 30 – 33
Erva-Mate 2	Chimarrão	E.M.C.2	Verde	Grossa	65 – 63 / 35 – 37
Erva-Mate 3	Chimarrão	E.M.C.3	Verde	Grossa	65 – 63 / 35 – 37
Erva-Mate 4	Chimarrão	E.M.C.4	Amarela	Grossa	65 / 35
Erva-Mate 1	Tererê	E.M.T.1	Verde	Grossa	60 / 40
Erva-Mate 2	Tererê	E.M.T.2	Verde	Grossa	60 / 40
Chá-Mate 1	Chá	C.M.1	Marrom	Grosso	Não Informado
Chá-Mate 2	Chá	C.M.2	Marrom	Fino	Somente folhas

Além das amostras comerciais de erva-mate, foram utilizadas no trabalho amostras obtidas em diferentes etapas do processo industrial coletadas em uma mesma indústria. As amostras obtidas foram a *in natura*, sapeco e cancheada, PC (primeira coleta) e NC (nova coleta). A Tabela 3 apresenta dados das amostras de erva-mate obtidas em diferentes etapas do processamento industrial utilizadas no trabalho.

Tabela 3. Dados das amostras de erva-mate obtidas nas diferentes etapas do processo industrial.

Amostra	Bebida	Sigla	Cor	Granulometria	Folhas/Talos (%)
<i>In natura</i>	Chimarrão/Tererê	PC	Verde	Muito grossa	90 / 10
<i>In natura</i>	Chimarrão/Tererê	NC	Verde	Muito grossa	90 / 10
Sapeco	Chimarrão/Tererê	PC	Verde	Muito grossa	90 / 10
Sapeco	Chimarrão/Tererê	NC	Verde	Muito grossa	90 / 10
Cancheada	Chimarrão/Tererê	PC	Verde	Grossa	70 / 30
Cancheada	Chimarrão/Tererê	NC	Verde	grossa	70 / 30

A Figura 11 mostra fotografias das folhas de erva-mate após a etapa do sapeco e posteriormente triturada manualmente em (A) e também as folhas após a etapa do cancheamento em (B). As amostras *in natura* e sapeco tem granulometria diferente (maior) da amostra cancheada como é mostrado na Figura 11, pois estas foram “trituradas” no laboratório enquanto a amostra cancheada é peneirada na indústria.



Figura 11. Amostras de erva-mate das etapas do (A) Sapeco e (B) Cancheamento.

As amostras foram coletas em duas diferentes épocas, sendo a primeira coleta descrita como PC (primeira coleta) e a segunda coleta descrita como NC (nova coleta). Foram realizadas duas coletas para avaliar se o tempo de colheita, solo e clima influenciam no resultado das análises.

Na indústria onde foram realizadas as coletas de erva-mate o processamento é caracterizado por 5 etapas. A primeira delas consiste da chegada da matéria prima (folhas e galhos da árvore de erva-mate *in natura*) na indústria, a qual dentro de 24 horas deve ser submetida a segunda etapa, que é o sapeco. A matéria prima é então encaminhada para um forno com temperaturas que chegam à 500⁰C por meio da queima de madeira durante 5 à 20 s. A terceira etapa é a secagem das folhas e ramos de erva-mate em temperatura média de 100⁰C num periodo de 1 h. Após a secagem, inicia-se a quarta etapa, que é o cancheamento, onde as folhas serão separadas dos ramos de erva-mate e serão trituradas e/ou quebradas para que na quinta etapa, chamada de moagem e erva-mate possa ser moída em granulometria desejada, sendo fina ou grossa. E por fim, se dará inicio ao empacotamento, no qual a erva-mate será embalada e destinada ao fim comercial. Para a produção do chá-mate, a erva cancheada passa por outro processo chamado de torra ou torrefação em temperatura de 70⁰C por mais 30 minutos.

4.6.2. *Preparo das Infusões de Erva-Mate*

As infusões de erva-mate foram obtidas com o uso de 50 mL de água ultra pura e 0,1 g de erva-mate. As infusões foram preparadas a quente (95 ± 5⁰C) e a frio (5 ± 3⁰C), simulando o preparo de bebidas como chimarrão etererê, respectivamente. Erva-mate torrada foi empregada no preparo do chá-mate, infusão a quente 95 ± 5⁰C.

As amostras foram pesadas e a água foi aquecida separadamente. Posteriormente

adicionou-se a água quente junto à amostra formando uma infusão. Essa infusão permaneceu durante 10 minutos sobre agitação natural (causada pela ebulição da água) em chapa de aquecimento. O mesmo procedimento foi adotado para a infusão fria, excetuando a agitação. A água foi resfriada em banho de gelo. A infusão também se manteve durante 10 minutos em banho de gelo.

Após o tempo de infusão, manualmente realizou-se a separação das folhas e da infusão. O sobrenadante das infusões foi utilizado na determinação de interesse.

4.6.3. Análise de Especificação de Al nas Infusões de Erva-Mate

As frações solúveis das infusões obtidas com as diversas amostras foram utilizadas no estudo da especificação de alumínio. As infusões de erva mate foram preparadas no mesmo dia da análise voltamétrica. Alíquotas (0,03 – 0,08 mL) das infusões foram utilizadas na determinação dos teores de Al-Total e Al-Lábil por VAdsRC.

Nas determinações as alíquotas foram adicionadas em meio de 0,1 mL de Ca^{2+} , 1 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ de KBrO_3 , 1 mL de solução 1,0 mol L⁻¹ de NH_4Cl e 0,1 mL de solução 5 mmol L⁻¹ de DASA. O pH da solução foi corrigido depois da mistura de reagentes.

Os parâmetros voltamétricos utilizados na determinação do Al-Total e Al-Lábil estão descritos na Tabela 4. As quantificações foram realizadas através do método de adição padrão. Antes das medidas voltamétricas, o oxigênio das soluções foi retirado através do uso da purga da solução com nitrogênio puro (99% pureza) durante 10 minutos.

Tabela 4. Parâmetros instrumentais empregados na análise de especificação de Al por VAdsRC e DASA como agente de complexação.

Parâmetros	Valores
Potencial de Acumulação (E_{ac})	-0,85 V
Tempo de Acumulação (t_{ac})	3 s
Potencial Inicial de Varredura (E_i)	-0,8 V
Potencial Final de Varredura (E_f)	-1,3 V
Tempo de Equilíbrio (t_{eq})	5 s
Amplitude do Pulso	50 mV
Velocidade de Varredura	25 mV s ⁻¹
Tamanho da gota	4
Modo	Pulso Diferencial

4.7. Determinação da Umidade

A determinação da umidade das amostras de erva-mate foi realizada para que os resultados das análises por VAdsRC e espectrofotometria fossem expressos por massa seca da

planta. Primeiramente as amostras foram pesadas (m_1) e deixadas em estufa à aproximadamente 60°C durante 8 h. As amostras então foram resfriadas em um dessecador até atingirem temperatura ambiente. Após esse processo, as amostras então foram pesadas novamente (m_2). Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem. O cálculo foi realizado de acordo com a equação 2.

$$umidade = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

4.8. Caracterização de Alguns Compostos Orgânicos Extraídos nas Infusões de Erva-Mate

Foram quantificados os teores de fenólicos e flavonoides nas infusões de erva-mate através da espectrofotometria de absorção molecular (UV-Vis). Além disso, análises qualitativas de melanoidinas, ácidos clorogênicos, compostos aromáticos e atividade antioxidante também foram realizadas por UV-Vis.

Todas as amostras coletadas foram utilizadas, tanto as amostras comerciais quanto as amostras obtidas nas diferentes etapas do processo industrial.

4.8.1. Preparo das Infusões de Erva-Mate Utilizadas na Caracterização dos Compostos Orgânicos.

As infusões de erva-mate foram obtidas com o uso de 100 mL de água ultra pura e 2 g de erva-mate. Para as ervas mate do processamento industrial, as destinadas ao preparo do chimarrão e ao chá-mate, as infusões foram preparadas a quente ($95 \pm 5^\circ\text{C}$). As ervas destinadas ao preparo do tererê foram preparadas a frio ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) (explicado no item 4.6.2).

4.8.2. Quantificação dos Fenóis Totais pelo Método de Folin-Ciocalteu

Para a determinação de fenólicos totais foi usado o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu que se baseia em uma reação de óxido-redução. Nessa reação, o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto reduz o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico na solução reagente para uma solução azul, que absorve a 760 nm (Rossi e Singleton, 1965).

Empregou-se uma solução estoque de 1 g L^{-1} de ácido gálico em metanol, usada como padrão, uma solução saturada de carbonato de sódio (20 g) e tartarato de sódio (1,2 g) em 100 mL de água em $\text{pH } 11.0 \pm 0.2$, usada como tampão e o reagente Folin-Ciocalteu.

Para a curva de calibração foram usadas soluções de concentração conhecida da solução metanólica de ácido gálico na faixa de 20 à 230 mg L^{-1} . Dessas soluções foram retiradas alíquotas de $300 \text{ }\mu\text{L}$ e misturaram-se em balões volumétricos de 5 mL. Nos balões foram adicionados $500 \text{ }\mu\text{L}$ do reagente Folin-Ciocalteu e $500 \text{ }\mu\text{L}$ de solução saturada do tampão. Ajustou-se o volume do balão volumétrico com água ultrapura. Após um período de 30 minutos, realizou-se a leitura da absorbância das soluções no espectrofotômetro de absorção molecular em comprimento de onda 760 nm . Todas as análises foram realizadas em triplicata. O controle analítico (branco) foi uma solução de metanol. A absorbância determinada para o branco foi descontada das absorbâncias das amostras.

Após realizar as medidas das soluções padrão contendo ácido gálico, realizou-se as determinações de fenóis totais nas infusões de erva-mate preparadas conforme item 4.8.1.

No preparo da solução da amostra, foram empregados volumes de $300 \text{ }\mu\text{L}$ da infusão, $500 \text{ }\mu\text{L}$ de solução saturada de carbonato de sódio e tartarato de sódio e $500 \text{ }\mu\text{L}$ do reagente Folin-Ciocalteu. O volume foi preenchido com água ultrapura até volume de 5 mL. As amostras precisaram ser diluídas de 10 a 40 vezes, afim dos teores dos compostos fenólicos ficarem dentro da faixa de concentração da curva analítica. Os resultados foram expressos como equivalente de ácido gálico por grama de erva-mate.

4.8.3. Quantificação de Flavonoides por Complexação com Cloreto de Alumínio

O método usado para a determinação de flavonoides foi através da complexação por cloreto de alumínio e determinação por espectrometria de absorção molecular. O princípio dessa reação baseia-se na formação de quelatos entre o alumínio e os flavonoides, levando a um efeito batocrômico do espectro de absorção dos flavonoides, com alteração da cor (Michel & Saran, 1990).

Utilizou-se uma solução estoque de quercetina $0,01\% \text{ m/v}$ em metanol como padrão. Uma solução de cloreto de alumínio $5\% \text{ m/v}$ em metanol também foi empregada.

Para a curva de calibração foram usadas soluções de concentração conhecida da solução de cloreto de alumínio na faixa de $1,0$ à $40,0 \text{ mg L}^{-1}$. Dessas soluções foram retiradas alíquotas de $250 \text{ }\mu\text{L}$ e foram misturada juntamente com $500 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de quercetina em

balões volumétricos de 5 mL. Após 30 minutos, fez-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro de absorção molecular em comprimento de onda de 425 nm.

No preparo da solução da amostra, foram empregados volumes de 500 µL da infusão junto a 250 µL de cloreto de alumínio em balão volumétrico de 5 mL. O volume foi preenchido com metanol. As amostras precisaram ser diluídas de 2 a 10 vezes, a fim dos teores dos flavonoides ficarem dentro da faixa de concentração da curva analítica. As amostras foram preparadas e analisadas em triplicata. A absorbância do controle analítico foi descontada da absorbância das amostras.

4.8.4. Determinação da Capacidade Antioxidante por Ensaio de DPPH

A atividade antirradicalar das infusões de erva-mate foi avaliada usando o 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) pelo método proposto por Blois (2002), com modificações. A partir de uma solução padrão estoque de DPPH (1000 mgL⁻¹) foi preparada uma solução de trabalho de concentração conhecida (40 mgL⁻¹). Dessa solução utilizou-se 500 µL e junto com alíquotas 500 µL das infusões diluídas o volume foi ajustado para 3 mL diretamente na cubeta de quartzo para determinação por UV-Vis. Metanol foi utilizado como branco e a absorbância foi medida em $\lambda = 515$ nm. A capacidade antirradicalar das infusões foi expressa através do percentual de inibição. Para tal, utilizou-se da equação da porcentagem de inibição, representada pela equação 3

$$(\%) = [(A_0 - A_1/A_0) \times 100] \quad \text{Equação (3)}$$

onde A_0 é a absorbância inicial da solução de trabalho de DPPH em metanol (40 mgL⁻¹) na ausência de amostra e A_1 é a absorbância final dessa solução na presença da amostra (Sanchez-Moreno *et. al.*, 1998).

4.8.5. Avaliação Qualitativa da Presença de: Melanoidinas, Aromáticos e Ácidos Clorogênicos.

As infusões foram preparadas conforme descrição no item 4.8.1. Posteriormente foram diluídas cerca de 100 vezes e foi realizada as leituras das absorbâncias das amostras utilizando espectrofotometria de absorção molecular nos comprimentos de onda 280, 323 e 420 nm, para os aromáticos, ácidos clorogênicos e melanoidinas, respectivamente.

Os resultados das análises foram expressos apenas pela absorbância encontrada para cada caso. Sem utilizar cálculos e fatores de diluição. O intuito desta análise foi

apenas realizar uma avaliação qualitativa dos compostos orgânicos em questão.

4.9. Análise Estatística

Os dados de todos os resultados obtidos neste trabalho são apresentados como média e a estimativa de desvio padrão. Uma análise de correlação entre os teores de Al-lábil e dos teores dos compostos fenólicos, flavonoides, ácidos clorogênicos, aromáticos e melanoidinas foi realizada. Para tal aplicou-se um *teste-t* no nível de 95% de confiança a fim de verificar se a correlação entre estas variáveis eram significativas. Todas as análises estatísticas dos dados foram realizadas usando o pacote estatístico Minitab for Windows v. 16.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização do Protocolo Analítico

Para a determinação voltamétrica do alumínio empregando eletrodo de gota pendente de mercúrio (HMDE) como eletrodo de trabalho é necessário o uso de um agente complexante. Isso se justifica, pelo fato de que o Al apresenta potencial de redução muito negativo e próximo aos metais alcalinos e alcalinos terrosos, impossibilitando sua determinação (Hernández-Brito *et al.*, 2004, Soares, 2008, van den Berg *et al.*, 1986). Com isso a determinação do Al é realizada de modo indireto através da voltametria adsorviva de redissolução catódica (VAdsRC) com o uso de agentes complexantes.

Um complexante utilizado para a determinação de Al por VAdsRC é o vermelho de alizarina S (DASA) (Almeida, 2000; Soares, 2008, van den Berg *et al.*, 1986). A fórmula estrutural do complexante DASA está representada pela Figura 12, bem como a proposta do complexo formado, Al com DASA (Soares, 2008).

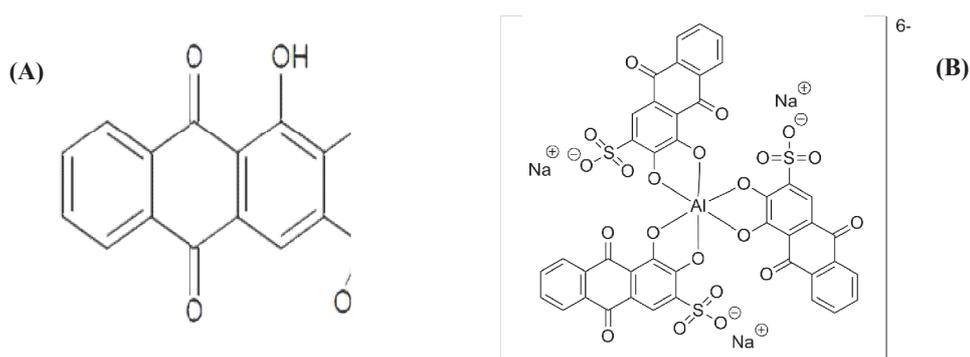


Figura 12. Fórmulas estruturais para (A) DASA e (B) Complexo Al-DASA. Adaptado de Soares, 2008.

O DASA é um corante pertencente à família das alizarinas e ao grupo hidroxiantraquinonas. Os corantes hidroxiantraquinônicos possuem duas hidroxilas ou dois grupos fenólicos e por isso são capazes de formar complexos com metais. A Figura 12 B mostra que a complexação ocorre de forma polidentada com o alumínio através dos grupos hidroxilas ou fenólicos. O grupamento sulfônico não apresenta reatividade para a molécula, apenas aumenta sua solubilidade (Almeida, 2000; Soares, 2008).

Com relação à determinação de Al por VAdsRC utilizando DASA como agente complexante, inicialmente o DASA é adicionado na solução contendo o alumínio. A solução fica sob agitação e o complexo formado é adsorvido na superfície do eletrodo de trabalho com

potencial de acumulação entre -0,3 à -0,9 V (Downard et al., 1996; Hernandez-Brito et al., 1994; van den Berg et al., 1986). A adsorção ocorre durante um certo período, chamado de tempo de acumulação ou tempo de pré-concentração, entre 0 s à 60s (Downard et al., 1996; Hernandez-Brito et al., 1994; van den Berg et al., 1986). Após a etapa de pré-concentração, a solução fica em repouso para que o complexo se homogeneize na superfície do HMDE durante um tempo de equilíbrio, geralmente entre 1 s à 20 s. Então pode-se proceder a etapa de redissolução na qual o ligante DASA que é eletroativo através do complexo Al-DASA será reduzido ou oxidado em sentido catódico ou anódico, respectivamente. A intensidade de corrente gerada no processo eletroquímico será proporcional à concentração do alumínio (van den Berg et al., 1986). Assim a pré-concentração não depende da solubilidade do metal na gota de mercúrio, e sim da adsorção do complexo metálico.

Para avaliar o comportamento voltamétrico do DASA e do complexo Al-DASA, foi realizado um estudo empregando voltametria cíclica.

5.1.1. Avaliação do Comportamento Eletroquímico do DASA e do Complexo Al-DASA

A voltametria cíclica (VC) não é utilizada com frequência na análise quantitativa de espécies de interesse, mas sim no acompanhamento de reações de oxidação e redução e também de produtos formados na superfície do eletrodo de trabalho (Skoog, 2002).

Neste trabalho, a VC foi empregada a fim de estudar o comportamento eletroativo do agente complexante do alumínio, DASA, e seu respectivo complexo, Al-DASA. A Figura 13 mostra um estudo inicial que foi realizado com o DASA em meio de eletrólito suporte (NH_4Cl) em pH 8. A varredura de potencial foi realizada em sentido catódico (0,0 à -1,2 V) e após a inversão em sentido anódico (0,0 à -1,2 V).

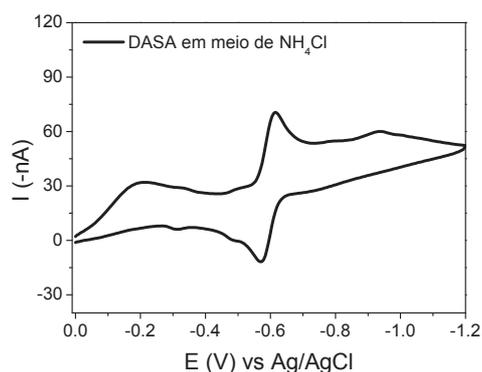


Figura 13. Estudo realizado por voltametria cíclica no comportamento do DASA em meio de eletrólito suporte em pH 8,0.

Através da Figura 13 nota-se que o DASA em meio de NH_4Cl apresenta pico de redução em potencial $-0,62\text{ V}$ sendo observado no sentido direto e em $-0,58\text{ V}$ no sentido inverso, mostrando reversibilidade. Esse fato está em concordância com o estudo realizado por Filho e Chierici (1998) e van den Berg (1986), os quais estudaram por voltametria cíclica o comportamento eletroquímico do DASA e observaram picos de redução e oxidação no sentido direto e inverso, respectivamente. Acredita-se que um segundo pico observado somente no sentido direto, em potencial $-0,95\text{ V}$ represente uma segunda redução do DASA. Outros trabalhos na literatura mostram que o complexo Al-DASA e o DASA livre têm potenciais de redução muito próximos, o que dificulta a determinação do alumínio (Downard *et al.*, 1996; van den Berg *et al.*, 1986). O complexo Al-DASA sofre redução em potencial $-1,07\text{ V}$ e como observa-se na Figura 13, o DASA livre sofre uma segunda redução em potencial $-0,95\text{ V}$. Com isso, na determinação do alumínio, poderá ocorrer uma sobreposição dos picos devido os potenciais serem muito próximos. Como alternativa a este problema, neste trabalho adicionou-se na solução de trabalho Ca^{2+} e KBrO_3 com o intuito de deslocar o sinal do DASA livre para potenciais mais anódicos, visto que Hernández-Brito *et al.* (1994) afirmam que o Ca^{2+} deve ser adicionado na solução de trabalho para a determinação de Al por voltmetria através da complexação com DASA, devido a uma melhor resolução do pico. A Figura 14 representa esse estudo.

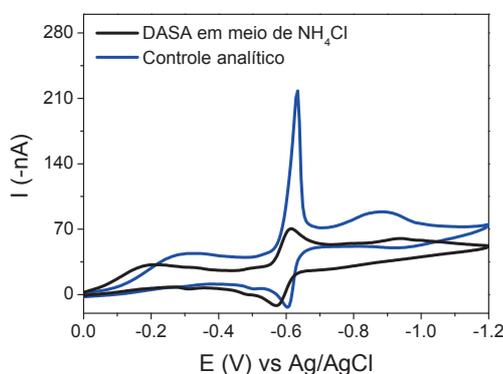


Figura 14. Estudos realizados por voltametria cíclica no comportamento do DASA em meio de eletrólito suporte (NH_4Cl) e controle analítico* em pH 8,0. *Controle analítico: DASA em meio de NH_4Cl , Ca^{2+} e KBrO_3 .

Através da Figura 14 observa-se que o controle analítico apresenta duas reduções do DASA, sendo a primeira em $-0,6\text{ V}$ e a segunda em $-0,9\text{ V}$, mostrando reversibilidade apenas para a primeira em $0,6\text{ V}$. Nota-se também no controle analítico um aumento da intensidade dos picos de redução do DASA. A segunda redução do DASA que agora está complexado ao Ca^{2+} foi deslocada para potenciais mais anódicos em $-0,9\text{ V}$, devido a adição das soluções de

Ca^{2+} e KBrO_3 . Com isso, a formação do complexo Al-DASA em potencial próximo a $-1,07$ V, não sofrerá interferências ou sobreposição de picos. Sendo assim adicionou-se $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} a solução de trabalho como mostra a Figura 15.

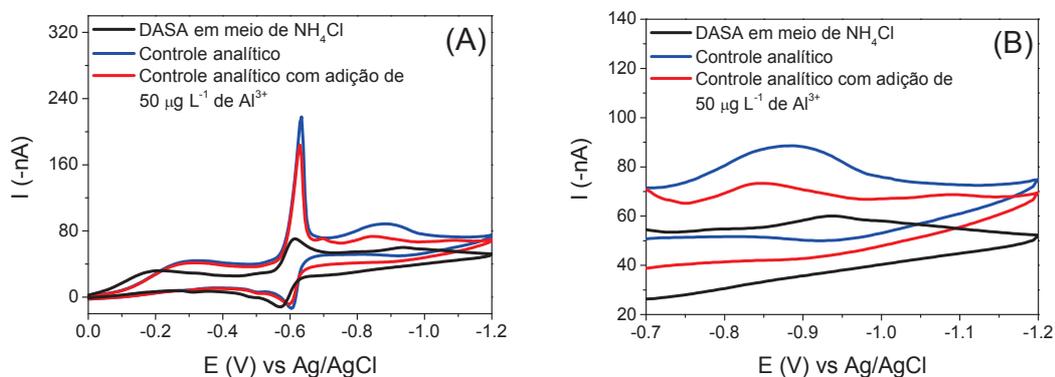


Figura 15. Estudos realizados por voltametria cíclica no comportamento do DASA e do complexo Al-DASA em pH 8.0. (A) Voltamograma cíclico do DASA em meio de NH_4Cl , Al^{3+} , controle analítico* e solução de trabalho** (B) Região de interesse. *Controle analítico: DASA em meio de NH_4Cl , Ca^{2+} e KBrO_3 . **Solução de trabalho: DASA em meio de NH_4Cl , Ca^{2+} , KBrO_3 e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} .

A Figura 15 A mostra que com a adição de Al^{3+} na solução para a formação do complexo, o pico referente a segunda redução do DASA que está complexado ao Ca^{2+} se torna menos intenso, pois provavelmente o Al^{3+} complexa mais facilmente com o DASA. Possivelmente ocorre uma “competição” entre o Al^{3+} e o Ca^{2+} na qual o Al^{3+} é favorecido para a formação do complexo. Por isso a intensidade do pico do complexo Ca-DASA diminui e ainda é deslocada para potenciais mais anódicos ($-0,85$ V). A intensidade do pico Al-DASA é observada em potencial $-1,07$ V. Contudo, o DASA adicionado em excesso ainda assim está complexado ao Ca^{2+} . A Figura 15 B representa a região de interesse ampliada, onde observa-se um discreto pico referente ao complexo Al-DASA em potencial $-1,07$ V, mostrando que o complexo foi formado, sem sobreposição de picos ou possíveis interferências. Esses resultados justificam a ação do Ca^{2+} e KBrO_3 , que agiram no sentido de separar o pico do DASA livre e do complexo Al-DASA. E ainda que o KBrO_3 pode ser considerado um reoxidante do DASA.

5.1.2. Análise de Especificação de Al Empregando VAdsRC

Wang *et al.* (2001) descreveu um procedimento para a especificação do alumínio utilizando voltametria adsorptiva de redissolução utilizando violeta de solocromo RS como

agente de complexação. Segundo o autor, as determinações devem ser realizadas em diferentes valores de pH 5,0 e 8,0 para Al-Lábil e Al-Total, respectivamente. A proposta do presente trabalho foi realizar a análise de especiação de alumínio através da voltametria adsorptiva de redissolução catódica (VAdsRC) com agente de complexação DASA. O DASA foi escolhido por ser um reagente orgânico com comportamento eletroquímico limpo e ainda por apresentarem vários sítios de complexação que podem complexar o alumínio. A Figura 16 mostra resultados da determinação de alumínio por VAdsRC na presença de Ca^{2+} , NH_4Cl , KBrO_3 e DASA em soluções aquosas em pH 8,0 e 5,0, respectivamente.

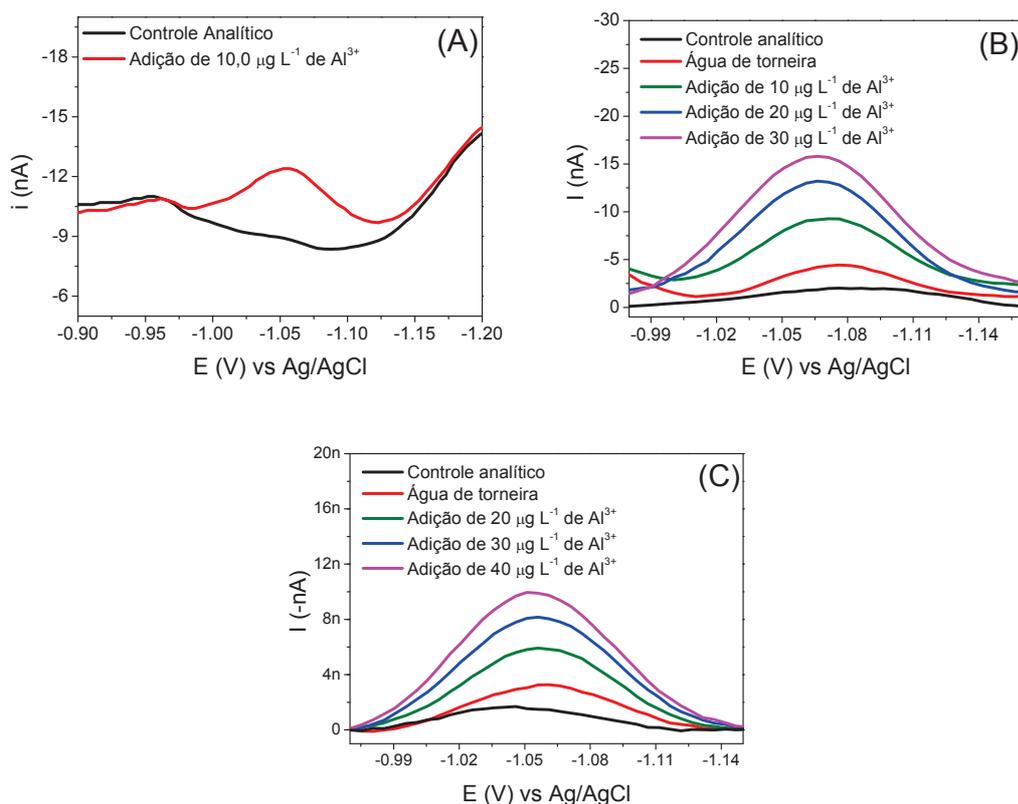


Figura 16. Determinação de alumínio por VAdsRCe pulso diferencial empregando DASA como agente complexante. (A) Voltamograma referente as medidas voltamétricas realizadas com controle analítico (branco) e com adição de $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} em pH 8,0. (B) Voltamograma da determinação de Al^{3+} em água de torneira através de adição de padrão em pH 8,0. (C) Voltamograma da determinação de Al^{3+} em água de torneira através da adição de padrão em pH 5,0. Os parâmetros voltamétricos utilizados estão de acordo com a Tabela 4.

A Figura 16 Amostra um voltamograma relativo ao controle analítico com pH ajustado em 8. O controle analítico refere-se à solução composta com todos os reagentes utilizados na determinação de alumínio, sem a presença do analito. Na Figura 16 A foi possível observar, um pico em -0,95 V referente ao complexo Ca-DASA. A mesma figura mostra um

voltamograma após adição de solução padrão de alumínio. Nota-se que a partir da adição de Al^{3+} surgiu um pico -1,07 V, potencial diferente ao do observado para o Ca-DASA. O pico em -1,07 V foi referente à presença do complexo formado Al-DASA. Além disso, nota-se uma leve diminuição do sinal do Ca-DASA em -0,95V.

É importante destacar a ausência de pico no controle analítico na região de interesse do complexo Al-DASA (-1,00 V à -1,10 V). Esse comportamento pode indicar que os reagentes utilizados Ca^{2+} e KBrO_3 agiram no sentido de separar o sinal do ligante (excesso em solução) do sinal do complexo Al-DASA. Outro aspecto a ser considerado, é a ausência de contaminação no controle (branco) com alumínio, o que indica que cuidados para minimizar possíveis contaminações foram efetivos.

A Figura 16 B mostra os voltamogramas obtidos para uma amostra real em pH 8.0. É possível notar um aumento crescente na intensidade de corrente do pico do Al-DASA ($E = -1,05$ V) em função de adições de concentrações crescentes de alumínio. Na mesma figura nota-se a ausência de um pico de Al-DASA na região de -1,07 V indicando a ausência de concentrações traço de alumínio no controle analítico.

A Figura 16 C apresenta os resultados obtidos a determinação de Al^{3+} para a mesma amostra em pH 5.0. De maneira similar ao pH 8.0, verifica-se que a intensidade de pico do Al-DASA aumenta em função da adição de alumínio. Esse comportamento já era esperado, pois com o aumento de alumínio na solução, formou-se uma maior concentração do complexo Al-DASA. Com isso, a intensidade do pico do complexo também sofre uma mudança crescente (van den Berg *et al.*, 1986).

Com esse resultado, pode-se concluir que os cuidados para isentar a amostra de qualquer tipo de contaminação por concentrações traço de alumínio estão sendo efetivos. As determinações em pH 8.0 e 5.0 foram satisfatórias, visto que os picos do complexo Al-DASA aumentaram com o aumento da concentração do alumínio devido a adição de padrão.

Na literatura existem alguns trabalhos que determinam alumínio em diferentes matrizes através da VAdRC e DASA, sem avaliar a especiação. As condições de trabalho e parâmetros voltamétricos variam, bem como o potencial de identificação do complexo Al-DASA (Almeida, 2000). A Tabela 5 exemplifica e resume esses resultados.

Tabela 5: Características dos procedimentos utilizados na determinação de Al^{3+} após complexação com o DASA por VAdSRC, usando o HMDE (Almeida, 2000).

Tampão	* E_{pico} (Al-DASA)	** E_{ac}/T_{ac}	Amostra	Referência
BES ¹ em pH 7	-1,16 V	-0,9V/45s	Salina	van den Berg et al., 1986
BES ¹ em pH 7 com Ca^{2+}	-1,25 V	-0,9V/40s	Salina	Brito et al., 1994
Amoniacal em pH 8;8,3	-1,01 V	-0,9V/60s	Hemodiálise	Carrera et al., 1993
	-0,87V	-0,7V/90s	Ramos de árvores	Opido, 1997
	-0,47V	-0,3V/40s	Plantas medicinais	Soares, 2008

¹ 0,01 mol L⁻¹ de BES = Ácido N,N-Bis(2-hidróxiethyl)-2-aminoetanosulfônico. * Potencial de identificação do pico; ** Potencial de acumulação/Tempo de acumulação.

A Tabela 5 mostra que a determinação de Al por VAdSRC pode ser realizada em várias condições experimentais. A literatura mostra diferentes formas para quantificar o alumínio total presente em uma amostra, descreve apenas em condições de pH alcalino ou neutro. Para a especiação do alumínio, é necessário realizar a quantificação em pH 8.0 e 5.0, ou seja, valores de pH alcalino e ácido, respectivamente (Wang *et al.*, 2011). Dessa forma, se faz necessário avaliar de forma sistemática os parâmetros voltamétricos empregados na análise por VAdSRC para a especiação de alumínio. Os parâmetros voltamétricos estudados foram o potencial de acumulação (E_{ac}), tempo de acumulação (T_{ac}) e tempo de equilíbrio (T_{eq}).

5.1.3. Otimização dos Parâmetros Voltamétricos a serem Empregados na Análise de Especiação do Al

5.1.3.1. Potencial de Acumulação (E_{ac})

O potencial de acumulação empregado na determinação de Al por VAdSRC foi otimizado afim de se obter um procedimento mais sensível e seletivo. O E_{ac} é aquele no qual irá ocorrer uma melhor condição de adsorção do complexo Al-DASA na gota do eletrodo de trabalho.

Uma solução aquosa contendo 24,4 $\mu g L^{-1}$ de Al^{3+} que teve seu pH ajustado em 5.0 e 8.0 foi empregada no estudo da influência do potencial de acumulação na determinação do alumínio. Os parâmetros voltamétricos utilizados estão descritos na Tabela 4. Com exceção do E_{ac} , que foi estudado na faixa de -0,7 V a -1,0 V para ambos os valores de pH. Essa faixa foi escolhida devido a evidências citadas na literatura (Hernández-Brito *et al.*, 1994; van den Berg *et al.*, 1986).

Para cada E_{ac} estudado, as medidas foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos nesses experimentos estão dispostos nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

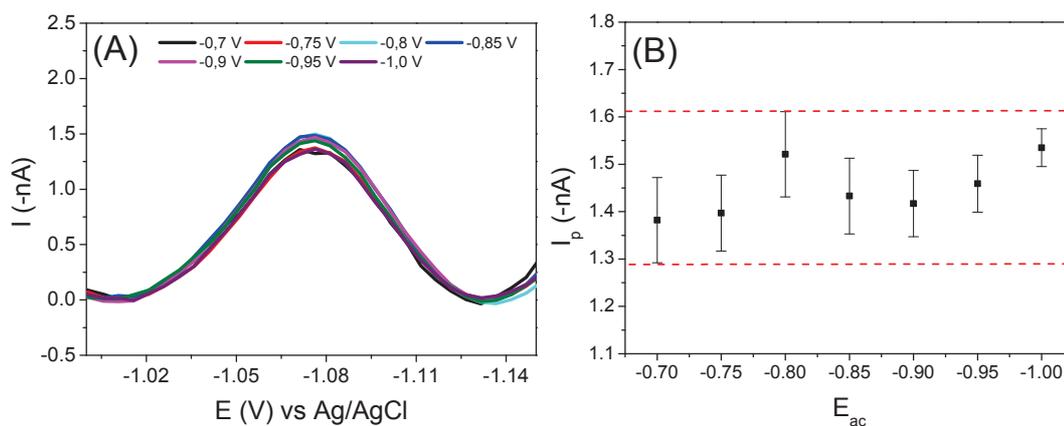


Figura 17. Estudo da influência do potencial de acumulação na determinação de Al por VAdSRC em pH 8.0. (A) Voltamogramas obtidos nos testes e (B) Gráfico da relação entre intensidade de pico do complexo Al-DASA em função do E_{ac} com desvio padrão.

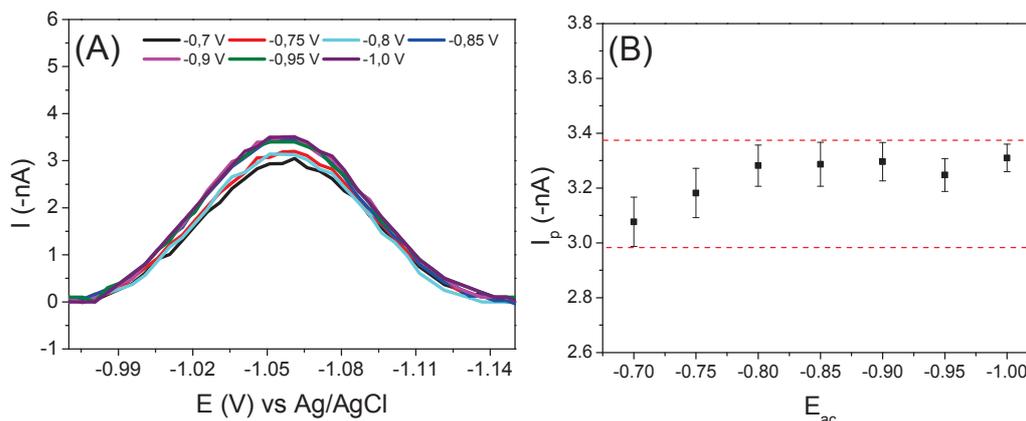


Figura 18. Estudo da influência do potencial de acumulação na determinação de Al por VAdSRC em pH 5.0. (A) Voltamogramas obtidos nos testes e (B) Gráfico da relação entre intensidade de pico do complexo Al-DASA em função do E_{ac} com desvio padrão.

Nas Figuras 17 A e 18 A observa-se que o potencial de acumulação não influenciou no pico relacionado ao complexo Al-DASA em pH 8.0 e 5.0, respectivamente, pois os picos foram semelhantes nos diferentes potenciais estudados. Para os dois casos, nota-se que não ocorreram alterações no formato do pico e nem deslocamento do pico para potenciais mais anódicos ou catódicos que -1,07V.

As Figuras 17 B e 18 B mostram a relação entre a intensidade de corrente de pico do complexo em função do potencial de acumulação empregado na determinação do Al por VAdSRC em pH 8.0 e 5.0, respectivamente. Para pH 8.0 a intensidade de corrente média

para Al-Total foi $-1,45 \pm 0,07 \text{ nA}$ e para pH 5.0, a intensidade de corrente média para Al-Lábil foi $-3,3 \pm 0,07 \text{ nA}$. É possível observar que os valores médios de corrente obtidos apresentaram intensidades similares e as pequenas variações observadas encontram-se na faixa da estimativa de desvio padrão.

Portanto, os resultados obtidos indicam que o potencial de acumulação não influencia de modo significativo na resposta voltamétrica do Al em pH 5.0 e 8.0. Esse comportamento já era esperado, pois muitas vezes o potencial de acumulação não é necessário em VAdsRC, por se tratar de um modo adsorptivo e não eletrolítico (Soares, 2008). Com esses resultados, atribuiu-se o valor de $-0,85 \text{ V}$ como potencial de acumulação em pH 5.0 e 8.0 por ser um valor intermediário.

Soares (2008) estudou o efeito do potencial de acumulação sobre a intensidade de corrente dos picos do complexo de Al-DASA na determinação voltamétrica do Al em plantas medicinais. As determinações foram realizadas usando $0,199 \text{ mg L}^{-1}$ de Al^{3+} , $0,4965 \text{ mg L}^{-1}$ de DASA e tampão amoniacal $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 8.30. O autor verificou que a corrente atingiu valor máximo em potencial $-0,3 \text{ V}$, sendo este escolhido como valor de trabalho. Esse valor foi escolhido, pois foi uma condição em que ocorreu uma maior acumulação do complexo no eletrodo de trabalho e conseqüentemente uma maior sensibilidade. van den Berg *et al.* (1986) também estudaram o efeito do potencial de acumulação sobre a determinação do Al em amostras de água de rio empregando DASA e VAdsRC. A intensidade de corrente em amostra de água de rio com 40 nmol L^{-1} de Al, $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de DASA e $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de BES foi superior quando utilizado $-0,9 \text{ V}$ como potencial de acumulação. Em outro estudo para a determinação de alumínio em água do mar utilizando DASA como agente complexante, verificou-se que o potencial de acumulação que obteve maior intensidade de corrente de pico também foi $-0,9 \text{ V}$ (Hernández-Brito *et al.*, 1994). Wang *et al.* (2001) determinaram a concentração de Al^{3+} em águas naturais através da voltametria adsorptiva de redissolução catódica utilizando como agente complexante vermelho de solocromo RS e como eletrólito de suporte acetato de amônio. Em pH 8.5 o potencial de acumulação utilizado foi de $-0,47 \text{ V}$.

Os resultados desse trabalho com relação ao potencial de acumulação diferem com os mencionados da literatura, isso se deve ao fato de que os reagentes como eletrólito de suporte e as concentrações utilizadas são diferentes em cada caso, além de que os trabalhos citados não usam como reagentes soluções de Ca^{2+} e KBrO_3 . Porém como o potencial de acumulação não influenciou o pico do complexo Al-DASA poderia ser escolhido valor similar aos mencionados na literatura.

5.1.3.2. Tempo de Acumulação (T_{ac})

O tempo de acumulação (T_{ac}) refere-se a etapa de pré-concentração do analito na análise voltamétrica empregando o método de redissolução. Portanto, é um parâmetro diretamente relacionado à sensibilidade do método.

Neste trabalho, o T_{ac} é o tempo no qual o complexo formado entre o Al e o DASA foi pré-concentrado através da adsorção do complexo na superfície do HMDE.

Portanto, para a determinação do alumínio por VAdSRC empregou-se uma solução aquosa contendo $24,4 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} que teve seu pH ajustado em 5.0 e 8.0 para o estudo da influência do tempo de acumulação. Os parâmetros voltamétricos utilizados estão descritos na Tabela 4. Com exceção do T_{ac} , que foi estudado na faixa de 3 à 63 s para ambos os valores de pH. Essa faixa foi escolhida devido a evidências citadas na literatura (Hernández-Brito *et. al.*, 1994; van den Berg *et. al.*, 1986). Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 19.

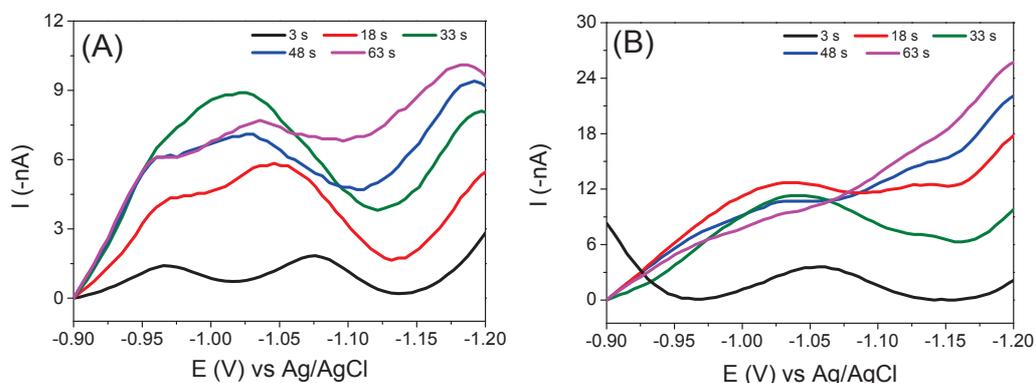


Figura 19. Voltamogramas obtidos no estudo do tempo de acumulação na determinação de Al por VAdSRC de pulso diferencial em (A) pH 8.0 e (B) pH 5.0.

Na Figura 19 A nota-se que conforme há aumento no tempo de acumulação do complexo Al-DASA no HMDE em pH 8.0 há uma minimização da resolução do pico referente ao complexo (E_{pico} : -1,07 V). Para valores superiores a 18 s, nota-se o deslocamento para potenciais mais anódicos ou a ausência do pico de interesse. Esse comportamento, pode estar relacionado com a saturação da superfície do eletrodo, com o aumento da concentração de espécies eletroativas em função do aumento do tempo de pré-concentração. Portanto, para o tempo de acumulação 3 s, nota-se que o pico do complexo Al-DASA apresenta adequada resolução. Este resultado indica que o processo de adsorção é bastante rápido. Portanto, a condição otimizada em pH 8.0 foi de 3 segundos.

Na Figura 19 B pode-se observar que no tempo de 3 segundos o pico do complexo Al-

DASA (-1,09 V) em pH 5.0 apresentou boa resolução. Nos tempos de acumulação superiores a 3 segundos observa-se um deslocamento do pico do complexo em sentido anódico ou ainda o mesmo não é formado, impossibilitando a medida. Portanto, em pH 5.0, também optou-se por utilizar como tempo de acumulação 3 segundos.

Soares (2009) estudou o tempo de acumulação de 0 a 80 s, do complexo Al-DASA através da VAdRC para determinação de alumínio em plantas medicinais em pH 8.0, e considerou como ótimo o tempo de 40 s, pois em tempos superiores o equilíbrio adsorptivo é atingido, ou seja, ocorre saturação da gota do eletrodo de trabalho. Também por VAdRC, van den Berg *et al.* (1986) avaliaram o tempo de acumulação de 0 até 600s para o complexo Al-DASA na determinação de alumínio em água de rio, em pH 7.0. O melhor resultado foi observado no tempo de acumulação de 3 min. Para a determinação de alumínio em água do mar utilizando voltametria e DASA como complexante, o tempo de acumulação requerido foi de 40 s (Hernández-Brito *et al.*, 1994).

Em outro estudo, o tempo de acumulação requerido para a determinação de Al com agente complexante violeta de solocromo RS por voltametria adsorptiva de redissolução foi de 10 min e a solução precisou ser aquecida, tornando o método de estudo lento e laborioso (J. Wang *et al.*, 1985). Almeida (2000) estudou o tempo de acumulação do complexo Al-DASA por voltametria adsorptiva de redissolução catódica por onda quadrada, e verificou que a intensidade de corrente de redução do complexo não é influenciada pelo aumento do tempo de acumulação, isso ocorre devido à saturação da gota no eletrodo de trabalho, pois quanto maior o tempo de acumulação, maior será a adsorção do complexo na gota.

Desse modo, a utilização do DASA como agente de complexação mostra que o método torna-se mais rápido do que se utilizado outro complexante. O resultado encontrado para o estudo da influência do tempo de acumulação é diferente aos resultados apresentados na literatura, pois alguns trabalhos indicam o uso do tempo de acumulação, excetuando Almeida (2000). Esse resultado pode indicar que a capacidade de detecção do método, ou seja, a intensidade de corrente do complexo Al-DASA, não pode ser aumentada com aumento do tempo de acumulação, pois há uma perda da resolução voltamétrica, pela saturação da superfície da gota do eletrodo de mercúrio. Vale ressaltar que até o momento não se encontram estudos descritos na literatura sobre o tempo de acumulação requerido para a determinação de Al por VAdRC em pH 5.0.

5.1.3.3. Tempo de Equilíbrio (T_{eq})

O tempo de equilíbrio é um parâmetro voltamétrico empregado na voltametria de redissolução. T_{eq} é um tempo requerido após a etapa de pré-concentração, na qual a solução contendo o analito fica em repouso para que o complexo adsorvido se homogeneíze na superfície do eletrodo de trabalho.

Para esse estudo empregou-se uma solução aquosa contendo $24,4 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} com pH corrigido para 5.0 e 8.0. A determinação foi realizada por VAdSRC e os parâmetros voltamétricos utilizados estão descritos na Tabela 4. Com exceção do T_{eq} , que foi estudado na faixa de 0 à 20 s para ambos os valores de pH. A Figura 20 mostra os resultados obtidos para o pH 8.0.

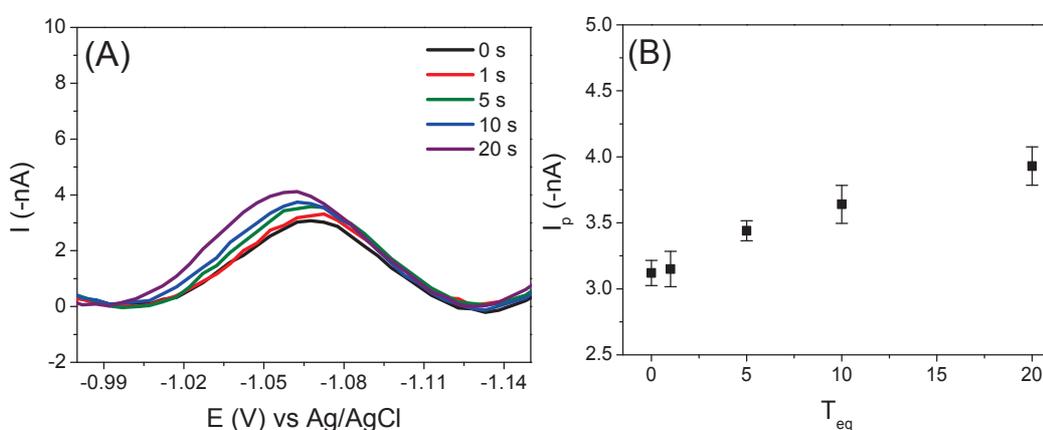


Figura 20. Estudo da influência do tempo de equilíbrio na determinação de Al por VAdSRC em pH 8.0(A) Voltamogramas obtidos nos testes e (B) Gráfico da relação entre intensidade de pico do complexo Al-DASA em função do T_{ac} e desvio padrão.

Através da Figura 20 Apode-se observar que diferentes tempos de equilíbrio não influenciaram a resolução e formato do pico do complexo Al-DASA em pH 8,0. Em tempos superiores a 5 s, observa-se um leve deslocamento para potenciais anódicos. A Figura 20 B mostra a relação entre a intensidade de corrente de pico do complexo em função do tempo de equilíbrio utilizado na determinação do alumínio por VAdSRC. Os valores médios de corrente obtidos apresentam intensidades similares para os tempos 0 e 1 s e as pequenas variações observadas encontram-se dentro da estimativa de desvio padrão. Os tempos de equilíbrio de 5, 10 e 20 s também foram similares e as variações encontram-se dentro da estimativa de desvio padrão. Devido os tempos equilíbrio de 5, 10 e 20 s apresentarem maior intensidade de corrente, o tempo de 5 s foi escolhido para ser o tempo de acumulação em pH 8.0. A Figura 21 apresenta os resultados obtidos para o pH 5.0.

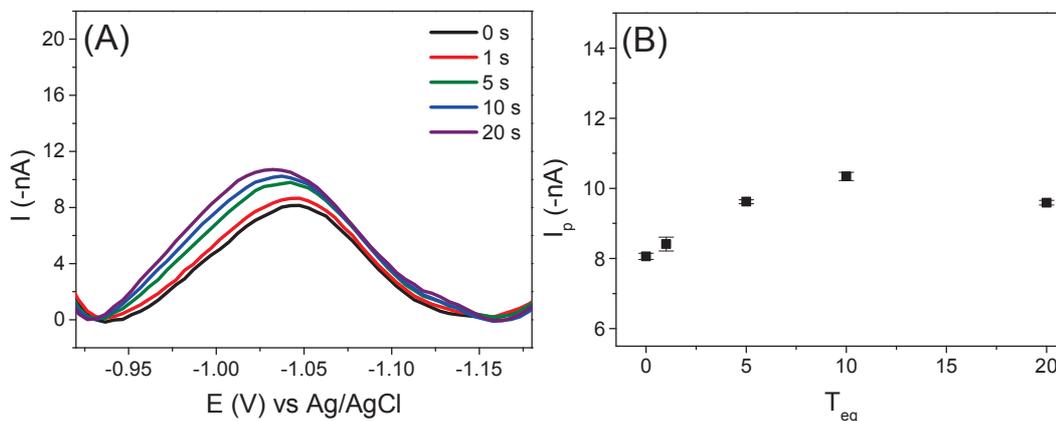


Figura 21. Estudo da influência do tempo de equilíbrio na determinação de Al por VAdsRC em pH 5.0. (A) Voltamogramas obtidos nos testes e (B) Gráfico da relação entre intensidade de pico do complexo Al-DASA em função do T_{eq} e desvio padrão.

Na Figura 21 A observa-se que o tempo de equilíbrio não influenciou no pico relacionado ao complexo Al-DASA em pH 5.0. Nota-se que não ocorreram alterações no formato do pico. Um leve deslocamento para potenciais anódicos é observado para tempos superiores à 5 s. A Figura 20 B mostra a relação entre a intensidade de corrente de pico do complexo em função do tempo de equilíbrio. É possível observar que a maior intensidade de corrente foi obtida em tempo de equilíbrio igual a 10 s. Entretanto, apesar do tempo de 10 s apresentar corrente de pico mais intensa, optou-se por utilizar o tempo de equilíbrio de 5 s para as análises para manter o mesmo padrão utilizado nas condições voltamétricas das análises em pH 8.0.

5.1.3.4. Tempo de Complexação do Al pelo ligante DASA

O tempo de complexação é aquele necessário para que o ligante DASA adicionado em excesso complexe o Al presente na solução antes da análise voltamétrica. Esse estudo foi realizado com o intuito de garantir a completa complexação do Al pelo DASA durante o tempo de complexação. Avaliou-se o sinal do complexo Al-DASA imediatamente após o contato do Al^{3+} com o DASA, e após 120 e 240 s. A Figura 22 mostra os resultados obtidos nestes ensaios.

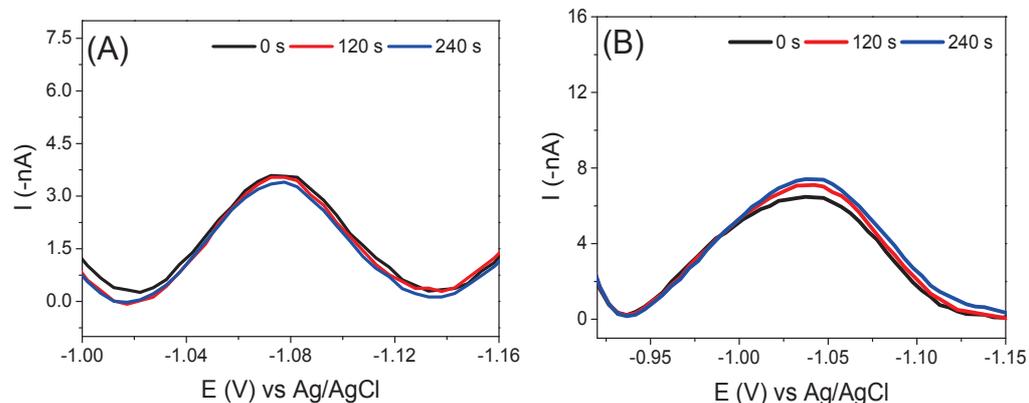


Figura 22. Voltamogramas obtidos para o estudo do tempo de complexação entre o Al e o DASA na determinação de Al^{3+} por VAdRC e pulso diferencial em (A) pH 8.0 e (B) pH 5.0.

Na Figura 22 A nota-se que as intensidades de correntes obtidas em diferentes tempos de complexação foram similares em pH 8.0. A intensidade média de corrente observada foi $-3,50 \text{ nA}$ com estimativa de desvio padrão de $0,09$. Os diferentes tempos de complexação empregados na análise voltamétrica da determinação do alumínio não influenciaram o formato do pico do complexo Al-DASA em pH 8.0, o qual se mostrou bem definido sem deslocamento para potenciais mais anódicos ou catódicos que $-1,07 \text{ V}$.

Na Figura 22 B observa-se que o tempo de complexação também não influenciou as intensidades de corrente para o complexo Al-DASA em pH 5.0, pois a intensidade média de corrente observada foi $-7,09 \pm 0,54 \text{ nA}$. Portanto, o tempo de 0 s foi escolhido para a realização das análises em ambos os valores de pH, ou seja, após adição do complexante imediatamente realizou-se a determinação voltamétrica do alumínio.

Um procedimento que é recomendado pela empresa que comercializa o equipamento indica que se espere 240 s para a complexação completa do Al pelo DASA em pH 9.2 (Metrohm, 2009). Com isso, os resultados obtidos para o tempo de complexação neste trabalho diferem com os dados encontrados na literatura. Porém considera-se adequado pois não é necessário esperar tempo algum e a análise se realiza de forma mais rápida. Vale lembrar que até o momento não se encontram dados na literatura para o tempo de complexação do Al pelo DASA em pH 5.0.

Até aqui pode-se concluir que os parâmetros voltamétricos avaliados para o método na determinação de Al com agente de complexação DASA por voltametria adsorptiva de redissolução catódica se mostraram adequados, apresentando baixo custo e rapidez.

Após a otimização dos parâmetros voltamétricos, foi avaliada as características do método proposto.

5.2. Avaliação das Características do Método Proposto

O presente trabalho envolveu a quantificação de metais traço, ou seja, em níveis $\mu\text{g L}^{-1}$. Assim é necessário avaliar a sensibilidade, linearidade, bem como a concentração mínima a ser detectada e/ou quantificada pelo método. Além da precisão e exatidão.

5.2.1. Linearidade e Sensibilidade

Inicialmente avaliou-se a linearidade e conseqüentemente a sensibilidade do método. Para tal, foram constuídas curvas analíticas empregando método de adição de padrão, VAdsRC e DASA como agente de complexação para alumínio em pH 5.0 e 8.0. Foi empregada uma solução aquosa contendo Al^{3+} e posterior adição de Al^{3+} . A faixa de concentração estudada variou de 0 a $200 \mu\text{g L}^{-1}$. A Figura 23 mostra os resultados obtidos nesse experimento.

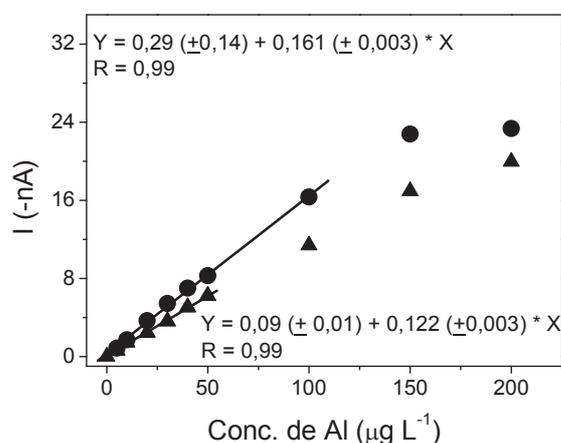


Figura 23. Curvas analíticas obtidas na determinação de alumínio empregando VAdsRC em pH 8.0) ● em pH 5.0). As condições voltamétricas estão de acordo com a Tabela 4.

Na Figura 23, é possível observar que conforme há aumento na concentração de Al^{3+} há um aumento na intensidade de corrente do complexo Al-DASA em ambos os valores de pH. A relação entre intensidade de corrente e concentração de alumínio foi linear em uma faixa de concentração, ou seja, a partir de certa concentração observa-se um desvio com valores de intensidade não proporcionais ao aumento de concentração. A faixa linear para pH 8.0 foi de 0 a $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Para pH 5.0, a faixa linear foi menor que pH 8.0, com valores na faixa de 0 a $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para a faixa linear, nota-se que a linearidade foi adequada com um coeficiente de correlação (R) igual ou superior a 0,99. Nota-se que a partir de 50 e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de alumínio em

pH 5.0 e em pH 8.0, respectivamente, as curvas analíticas perderam a linearidade devido à saturação da gota de mercúrio no eletrodo de trabalho com o complexo.

Na Figura 23 observa-se ainda diferenças na inclinação das curvas analíticas obtidas na faixa linear de trabalho, indicando que existem diferenças na sensibilidade. Para a determinação de Al^{3+} realizada em pH 5.0 o coeficiente angular da equação da reta obtido foi $0,122 \pm 0,003$, enquanto que para pH 8.0 foi de $0,161 \pm 0,003$. Portanto, como a inclinação da curva analítica obtida em pH 8.0 apresentou coeficiente angular estatisticamente superior nota-se que a determinação de Al^{3+} por VAdSRC em pH 8.0 é mais sensível em relação a determinação em pH 5.0. Essa diferença entre as sensibilidades obtidas na determinação de Al-Total e Al-Lábil nos diferentes valores de pH não influenciou a determinação do Al^{3+} . Acredita-se que a determinação em pH 5.0 seja menos sensível devido a matriz (meio químico). Ou seja, a determinação em pH 5.0 apresentou mais íons H^+ em solução modificando a resposta eletroquímica.

5.2.2. Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração que pode ser distinguida em certo nível de confiança para um dado método (Skoog, 2006). Para o cálculo do LD, experimentalmente pode ser realizada medidas do controle analítico (branco) cerca de 10 vezes. Os dados obtidos são tratados estatisticamente para obter a estimativa de desvio padrão. Além disso, é necessário utilizar o coeficiente angular da equação da reta de uma curva analítica. O cálculo do LD pode ser realizado através da equação 4

$$LD = 3 \cdot \frac{SD}{S} \text{Equação (4)}$$

onde SD é a estimativa de desvio padrão do controle analítico e S é o coeficiente angular da equação de reta obtida na parte linear da curva analítica para um dado tempo de pré-concentração quando é utilizado método voltamétrico de redissolução.

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração a ser quantificada pelo método com certo nível de confiança (ANVISA, 2003). Para calcular o LQ, os mesmos critérios utilizados no cálculo do LD foram adotados, com exceção do fator de multiplicação ser 10. A equação 5 representa o cálculo a ser realizado para o LQ

$$LQ = 10 \cdot \frac{sD}{S} \text{Equação (5)}$$

onde sD é a estimativa de desvio padrão do controle analítico e S é o coeficiente angular da equação de reta obtida na parte linear da curva analítica para um dado tempo de pré-concentração quando é utilizado método voltamétrico de redissolução.

Neste trabalho o controle analítico consistiu de uma solução aquosa contendo $8,20 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ca^{2+} , $82,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de NH_4Cl , $8,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de KBrO_3 e $41,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DASA . O pH do controle analítico foi ajustado para 8.0 e 5.0 separadamente, para serem realizadas 10 medidas voltamétricas consecutivas empregando os parâmetros descritos na Tabela 4. Os resultados obtidos nos cálculos de LD e LQ e a comparação com os dados da literatura encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados dos limites de quantificação e detecção obtidos para a determinação de alumínio por VAdsRC e DASA como complexante e comparação com valores presentes na literatura.

pH	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD – Literatura ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ – Literatura ($\mu\text{g L}^{-1}$)
5.0	1,5	Não encontrado	4,9	Não encontrado
8.0	0,5	1,0 * 0,03 **	1,7	3,0 *

*Metrohm, 2009; **van den Berg, et. al., 1986.

Os limites de quantificação, obtidos neste trabalho para a determinação de Al por VAdsRC em pH 5.0 e 8.0 foram $4,9$ e $1,7 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, indicando que o método proposto pode quantificar concentrações traço. Além disso, comparando-se com a literatura, nota-se que o LD e LQ encontrado neste trabalho foram menores, se comparado com Metrohm (2009). Isso indica que os valores obtidos no presente trabalho são satisfatórios. O LD encontrado por van den Berg *et. al.* (1986) foi mais baixo, porém as condições e os parâmetros voltamétricos utilizados diferem deste trabalho.

A partir dos valores de limite de quantificação, pode-se obter a faixa dinâmica de trabalho para a determinação de Al^{3+} por VAdsRC em pH 5.0 e 8.0. Para pH 5.0 a faixa variou entre $4,9$ à $50 \mu\text{g L}^{-1}$ enquanto que em pH 8.0 a faixa dinâmica de trabalho variou entre $1,7$ à $100 \mu\text{g L}^{-1}$.

5.2.3. Avaliação da Precisão

A precisão do método desenvolvido na análise de especiação do Al^{3+} por VAdsRC foi

avaliada através dos testes de repetibilidade e precisão intermediária.

A repetibilidade representa a concordância entre os dados de uma análise realizada em um mesmo dia, pelo mesmo analista e ainda pelo mesmo procedimento. Enquanto que a precisão intermediária é realizada pelo mesmo analista, mesmo procedimento, mas em dias diferentes (Skoog, 2002).

O estudo da repetibilidade e da precisão intermediária do método foi realizado através de 5 análises de uma solução aquosa contendo concentração conhecida de alumínio no mesmo dia e em 5 dias diferentes, respectivamente. As análises foram realizadas por VAdSRC. Com os valores de intensidade corrente obtidas nas determinações foram calculadas as estimativas de desvio padrão e coeficiente de variação (CV) que normalmente é chamado de desvio padrão relativo – RSD (%), ou também chamado de coeficiente de variância. Os valores de RSD foram obtidos através da equação 6

$$RSD\% = \frac{SD}{x} \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

onde sD representa a estimativa de desvio padrão das replicatas e x é a média das replicatas realizadas (DOQ-CGCRE-008,2011). Os resultados obtidos para os testes de precisão encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados dos testes de repetibilidade e reprodutibilidade.

pH	Repetibilidade (RSD %)	Precisão Intermediária (RSD %)
5	1,5	4,4
8	7,9	9,8

Os valores de RSD obtidos para a determinação de Al³⁺ por VAdSRC e DASA como agente complexante para ambos os valores de pH foram satisfatórios, pois ficaram abaixo de 10%. O limite de RSD recomendado para análise de traço é de 20% (Wood,1999). Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o método desenvolvido é reprodutível e preciso. A maioria dos trabalhos descritos na literatura que envolve o emprego da voltametria adsorbtiva de redissolução catódica para a determinação de alumínio não apresentam dados sobre a repetibilidade e reprodutibilidade.

5.2.4. Estudos de Interferência

Neste trabalho, foi realizado um estudo para avaliar a influência de alguns íons

metálicos na determinação de alumínio em infusões de erva-mate. Foram escolhidos alguns íons metálicos que normalmente encontram-se nas infusões sendo Na^+ , Pb^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} (Ducat e Quináia, 2004; Henrichs e Malavolta, 2001). Assim, determinações de Al foram realizadas em pH 5,0 e 8,0 com soluções aquosas através da VAdSRC. Posteriormente, foram adicionadas, individualmente, concentrações dos possíveis íons interferentes. Os resultados estão dispostos na Figura 24.

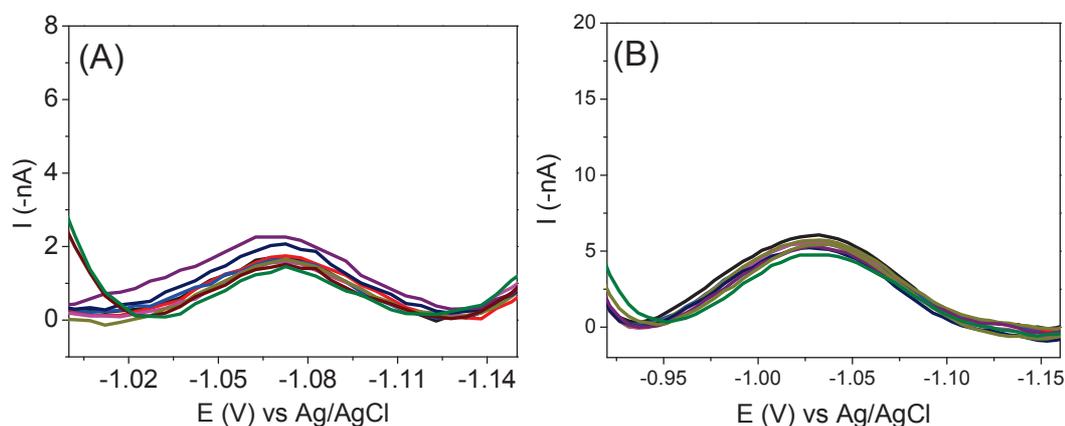


Figura 24. Voltamogramas obtidos para o estudo deinterferência utilizando íons metálicos na determinação de Al por VAdSRC e DASA como agente complexante em (A) pH 8,0 e (B) pH 5,0. () Solução aquosa $15 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} ; () Adição de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Na^+ ; () Adição de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Na^+ ; () Adição de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb^{2+} ; () Adição de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb^{2+} ; () Adição de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe^{2+} ; () Adição de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Fe^{2+} ; () Adição de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn^{2+} ; () Adição de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Zn^{2+} ;

A Figura 24 A mostra a intensidade de corrente de pico no estudo de interferentes metálicos com diferentes íons em solução. Nota-se que a adição de outros íons metálicos na solução de trabalho, não alterou ou modificou o formato do pico do complexo Al-DASA. Além disso, a intensidade de corrente gerada para o complexo Al-DASA em pH 8,0 foi similar para os diferentes íons metálicos estudados. O valor médio da intensidade de corrente gerada foi de $1,6 \pm 0,2 \text{ nA}$. A Figura 24 B mostra que a intensidade de corrente do pico Al-DASA também não foi influenciada pela adição de outros íons metálicos. O valor médio da intensidade de corrente foi calculado e é $5,4 \pm 0,3 \text{ nA}$.

Portanto, esses resultados mostram que a adição de outros íons metálicos na solução de trabalho com alumínio parecem não apresentar qualquer tipo de interferência na determinação do Al por VAdSRC, independente do pH.

Soares (2008) estudou possíveis interferências dos íons Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Fe^{3+} , na determinação voltamétrica do Al utilizando DASA como complexante. Os resultados obtidos mostram que o Mn mesmo em concentração 200 vezes superior ao do Al não apresenta

qualquer tipo de interferência na intensidade de corrente do complexo Al-DASA. Já o Zn, quando atinge uma concentração 162 vezes maior que a do Al, a intensidade de corrente para o Al começa a diminuir. O Fe e o Cu mostraram interferência na intensidade de corrente do Al em concentrações superiores a 20 e 60 vezes a do Al, respectivamente.

Carvalho *et al.* (2005) estudaram o efeito de interferentes metálicos na determinação voltamétrica de Al e DASA como agente complexante em concentrado de diálise. Quatro íons foram testados, sendo eles: Zn^{2+} , Sb^{2+} , Fe^{3+} e Mn^{2+} . Destes, apenas o Zn^{2+} foi considerado um possível interferente quando presente em concentrações acima de $300 \mu g L^{-1}$ frente a uma amostra de concentrado de diálise com $8,5 \mu g L^{-1}$ de Al.

A presença de íons metálicos nas infusões de erva-mate pode ser um aspecto relevante a se levar em consideração dependendo da sua forma e concentração.

Este resultado difere de forma positiva aos resultados encontrados na literatura, pois não apresentou interferência frente a outros elementos. Contudo, deve-se levar em consideração que as adições realizadas dos contaminantes metálicos foram inferiores aos valores apresentados pela literatura e com íons metálicos diferentes.

5.2.5. Avaliação da Exatidão

A utilização de um método analítico para a determinação de metais traço exige alto grau de confiabilidade. A exatidão de um método normalmente pode envolver três formas: teste de adição e recuperação, análise de uma amostra certificada e ainda a comparação com um segundo método de determinação (DOQ-CGCRE-008, 2011; Skoog, 2002).

Neste trabalho não era de interesse uma comparação com outro método já que para especificação não existe um método padrão. Também a falta de uma amostra certificada impossibilitou a realização desse teste. Então, foi realizado o teste de recuperação de alumínio em triplicata para avaliar a exatidão do método. Para tal, foram utilizadas soluções aquosas contendo concentrações conhecidas de Al^{3+} e também infusão de erva-mate. Uma amostra de solução aquosa contendo $10 \mu g L^{-1}$ de Al^{3+} foi preparada e analisada por VAdSRC e pulso diferencial, empregando o método de adição de padrão, em pH 5,0 e 8,0 e apenas em pH 8,0 para a infusão de erva-mate. Todas as amostras e análises foram realizadas em triplicata.

Uma amostra de erva-mate comercial foi adquirida e utilizada como modelo. Inicialmente foi preparada uma infusão $2,0 g L^{-1}$ a quente e uma alíquota de $30 \mu L$ foi utilizada na quantificação de Al total dissolvido (pH 8,0) por VAdSRC e pulso diferencial. Nessa determinação a infusão foi diluída devido aos teores elevados de alumínio.

Posteriormente, fez-se uma nova infusão de mesma concentração, porém enriquecida com $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Al^{3+} . A quantificação de alumínio por VAdsRC envolveu o uso de uma alíquota de $30 \mu\text{L}$ e foram realizadas em triplicata através do método de adição de padrão. Na infusão enriquecida não foi quantificado o Al-Lábil (pH 5,0), pois poderiam haver interações do Al adicionado com os compostos orgânicos naturais da amostra e acarretar em um erro sistemático no resultado. Os resultados dos testes de recuperação de Al^{3+} em solução aquosa e em infusão de erva-mate estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 8: Resultado do teste de adição e recuperação de Al em infusão de erva-mate.

Amostra	pH	Conc. Inicial da amostra ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Conc. Adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Conc. Total da amostra ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Conc. Determinada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperação (%)
<i>Solução aquosa</i>	5	0,0	10,0	10,0	$9,9 \pm 0,8$	99
	8	0,0	10,0	10,00	$11,2 \pm 0,3$	112
<i>Infusão de erva-mate</i>	8	$32,0 \pm 1,8$	10,0	42,0	$41,3 \pm 0,9$	98

As porcentagens de recuperação apresentadas na Tabela 8 variam entre 98,0 e 112 %, para os dois meios avaliados. Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois estão dentro de um limite aceitável de 100 ± 10 % em relação a grandeza da concentração estudada (Wood, 1999). Excetuando a solução aquosa em pH 8,0 a qual obteve 112 %, porém este resultado ainda assim foi considerado adequado devido executar apenas 2 % do aceitável. Esses resultados indicam que a diferença entre o valor de recuperação obtida está de acordo com o esperado.

O teste de recuperação de Al^{3+} em infusão de erva-mate apresentou resultados satisfatórios mostrando que o método pode ser considerado além de preciso, exato.

No que diz respeito à validação do método desenvolvido, pode-se concluir que os resultados apresentaram precisão, exatidão, linearidade e limites de detecção e quantificação satisfatórios, o que permite que o método para especiação de Al por VAdsRC com uso de DASA como agente complexante seja considerado válido para aplicação em diferentes amostras de interesse ambiental e erva-mate.

5.3. Especiação de Alumínio em Infusões de Erva-Mate do Estado do Paraná

A partir da definição do protocolo analítico desenvolvido para a análise de especiação de alumínio iniciou-se sua aplicação em amostras de erva-mate obtidas em diferentes etapas do processamento industrial e amostras comerciais da região de Guarapuava-PR. As

condições de análise empregada, bem como a forma de preparo das infusões estão apresentadas nos itens 4.6.1 à 4.6.3. Infusões foram preparadas em temperaturas $95^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ e $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para simular o chimarrão, chá-mate e do tererê, respectivamente. As infusões e a solução de trabalho tiveram o pH ajustado para 5.0 e 8.0, para as determinações do Al-Lábil e Al-Total, respectivamente. As infusões com pH adequado foram diluídas, devido ao elevado teor de alumínio e realizaram-se as determinações da fração de alumínio total dissolvido e lábil dissolvido por VAdSRC de pulso diferencial e DASA como agente complexante. A Figura 25 mostra voltamogramas típicos obtidos na análise de infusões de erva-mate.

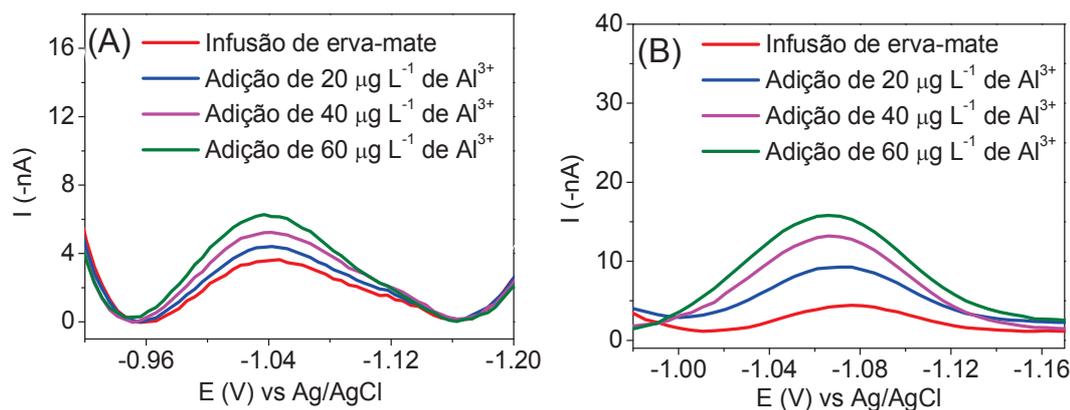


Figura 25. Voltamogramas típicos obtidos na especiação de alumínio em infusões de erva-mate diluídas empregando VAdSRC e DASA como agente complexante (A) Determinação do alumínio presente na fração lábil, pH 5.0 e (B) Determinação do alumínio total dissolvido, pH 8.0.

Nas Figuras 25A e B observa-se que quando se adiciona Al nas soluções de trabalho contendo a infusão de erva-mate tem um aumento proporcional da intensidade de corrente de pico do complexo Al-DASA, tanto para pH 5.0 quanto para o pH 8.0. Nota-se um comportamento similar dos voltamogramas com relação às soluções aquosas sintéticas utilizadas neste trabalho, dado que as infusões foram diluídas. A diluição foi necessária devido a alta concentração de alumínio presente na erva-mate, além disso também favorece a minimização de possíveis interferências devido ao efeito de matriz. Para a quantificação de Al^{3+} nas amostras de infusão foi utilizado o método de adição de padrão em pH 5.0 e 8.0. As Figuras 26 A e B mostram exemplos do método de adição de padrão utilizado na quantificação do Al em pH 5.0 e 8.0 por VAdSRC. É importante destacar que as curvas apresentadas são exemplo e não estão relacionadas com a Figura 26.

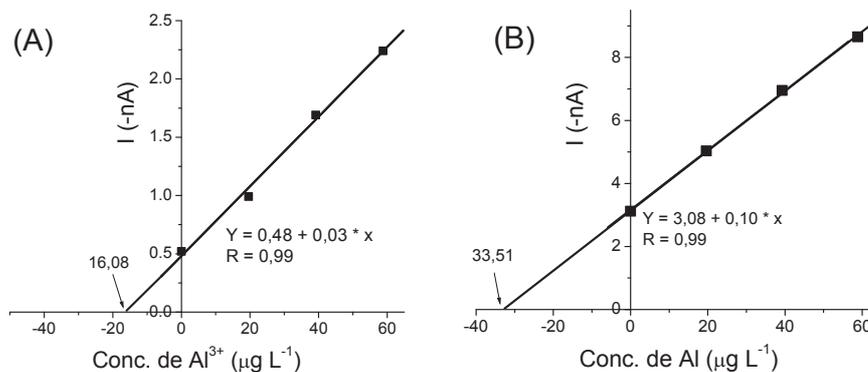


Figura 26. Gráficos de adição de padrão obtidos na determinação voltamétrica de Al-Lábil (A) e do Al-Total (B) em amostras de infusão de erva-mate.

Observa-se pela Figura 26 A e B que as curvas de adição padrão para pH 5.0 e 8.0, apresentaram um comportamento linear com coeficientes de correlação adequados (0,99). Além disso, nota-se que foram determinadas concentrações baixas, na faixa de $\mu\text{g L}^{-1}$ de alumínio. Os teores determinados de Al-Total dissolvido e Al-Lábil na infusão de erva-mate foram 33,51 e 16,08 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Considerando as diluições realizadas os teores de Al-Lábil e de Al-Total foram 1,61 e 3,35 mg L^{-1} , respectivamente. Além disso, considerando-se a massa seca de erva-mate utilizada no preparo das infusões as concentrações de Al-Lábil e Al-Total dissolvido foram 3,23 e 6,73 mg g^{-1} , respectivamente. Portanto, cerca de 48 % do alumínio encontra-se em uma forma lábil, aquela relacionada com a fração biodisponível do elemento.

Os teores determinados das diferentes frações de alumínio nas infusões preparadas com amostras obtidas nas diferentes etapas do processamento industrial estão mostrados na Tabela 9. É importante destacar que o teor de alumínio complexado a compostos orgânicos (fração inerte) foi obtido através da diferença entre os teores totais e lábeis.

Tabela 9. Resultado da quantificação de Al nas infusões das amostras de erva-mate obtidas nas diferentes etapas do processo industrial.

Amostras*	Al Total		Al Lábil		Al Complexado
	Média (mg g^{-1})	RSD (%)	Média (mg g^{-1})	RSD (%)	AIT - AIL (mg g^{-1})
In natura (PC)	3,3 ± 0,1	3,4	0,20 ± 0,02	10,0	3,1 ± 0,1
In natura (NC)	3,0 ± 0,3	8,7	0,120 ± 0,002	1,7	2,9 ± 0,2
Sapeco (PC)	3,58 ± 0,06	1,7	1,46 ± 0,04	2,7	2,1 ± 0,1
Sapeco (NC)	3,1 ± 0,1	3,6	1,3 ± 0,1	5,3	1,7 ± 0,1
Cancheada (PC)	4,1 ± 0,3	6,3	0,86 ± 0,03	3,5	3,2 ± 0,2
Cancheada (NC)	3,6 ± 0,2	4,5	0,48 ± 0,03	6,3	3,1 ± 0,1

*PC=Primeira Coleta; NC= Nova Coleta. RSD = Desvio Padrão Relativo.

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos na especiação do Al^{3+} em amostras erva-mate. É importante salientar que as concentrações são baseadas na massa seca das ervas-mate. A partir dos dados da Tabela 9, observa-se que as infusões de erva-mate estudadas apresentaram teores de Al-Total dissolvido que variaram de 3,0 à 4,1 $mg\ g^{-1}$.

As amostras utilizadas neste trabalho apresentaram teores diferentes de alumínio total, fato já esperado por se tratar de amostras com épocas de colheita, coletas e granulometria diferentes. Todas as amostras obtidas no processamento industrial em uma segunda coleta, apresentaram um teor inferior de Al-Total dissolvido com relação às amostras coletadas primeiramente. Com exceção da amostra *In natura*, pois se considerarmos o desvio padrão as amostras tem concentrações similares.

Na Tabela 9 também é possível observar que os teores de Al-Total dissolvido nas amostras seguiram a seguinte ordem: *in natura* < sapeco < cancheada. Portanto, nota-se que teores totais de Al foram extraídos em maiores concentrações nas infusões com as amostras de erva-mate que passaram pelas etapas de beneficiamento. Os dados sugerem um aumento no teor de Al-Total nas amostras beneficiadas industrialmente. Contudo, deve-se levar em consideração o fato que as amostras cancheadas apresentam uma granulometria menor, conseqüentemente sua superfície de contato é maior, e a extração do Al pode ser favorecida.

Os resultados obtidos estão em concordância com a literatura, pois as concentrações de Al-Total aumentaram após as etapas do processamento industrial (Giulian *et al.*, 2008). Giulian *et al.* (2008) estudaram a influência do processamento industrial sobre a composição elementar das folhas de erva-mate através da técnica PIXE do inglês *Particle-induced X-ray emission* (Emissão de partículas induzidas por Raio-X). As concentrações dos elementos tais como Al, Mn, P, S, Si, Mn e Rb aumentaram após o rápido contato das folhas de erva-mate com a chama durante a etapa do sapeco. Os autores justificam esse resultado, devido a presença de possíveis contaminantes presentes nos gases quentes utilizados no processo industrial para secagem, originado pela queima da madeira.

Pode-se dizer também, que a época da colheita, bem como o solo e o clima de onde a erva-mate é coletada influenciam no teor de alumínio, visto que os resultados diferem da primeira para a nova coleta.

A Tabela 9 mostra ainda que os teores de Al-Lábil dissolvido variaram de 0,120 à 1,46 $mg\ g^{-1}$. Esse resultado mostra uma concordância já que os teores de Al-Lábil foram inferiores aos teores determinados para o Al-Total. Por se tratar de amostras diferentes, a diferença nas concentrações de Al-Lábil entre as amostras já era esperada. Novamente, as amostras PC apresentam teores de Al-Lábil maior do que as amostras NC. É possível observar que os

teores de Al-Lábil nas amostras seguiram a seguinte ordem: in natura < cancheada < sapeco. A amostra do sapeco foi a qual apresentou maior teor de Al-Lábil, que chegou à 1,46 mg g⁻¹. Esse fato não era esperado com relação a amostra cancheada devido à granulometria da amostra do sapeco ser maior do que da amostra cancheada. Porém está em concordância com a amostra *in natura*. Acredita-se que à amostra *in natura* por não ter sido processada pela indústria apresente um teor de orgânicos naturais maior do que na amostra do sapeco e assim o Al esteja menos biodisponível, pois está complexado aos orgânicos. Com isso, a concentração de Al-Lábil obtida para a amostra do sapeco foi maior.

A Figura 27 apresenta um gráfico com os resultados discutidos sobre a determinação do Al-Total e Al-Lábil nas amostras obtidas nas diferentes etapas do processo industrial.

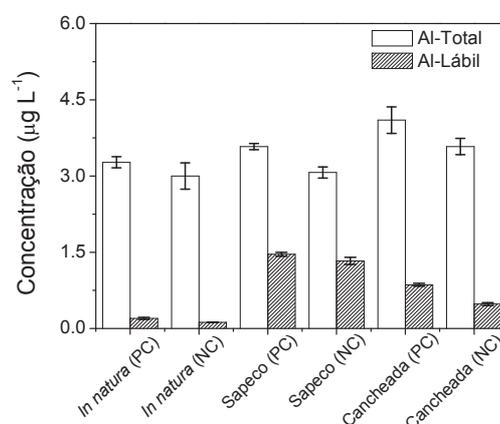


Figura 27. Gráfico representativo das determinações do Al-Total e Al-Lábil nas amostras obtidas nas diferentes etapas do processo industrial.

Através dos resultados apresentados na Tabela 9 pode-se estimar a distribuição do Al entre as diferentes infusões, que estão mostrados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultado da distribuição do Al nas infusões das amostras obtidas nas diferentes etapas do processamento industrial de erva-mate.

<i>Amostras</i>	<i>Distribuição</i>	
	<i>Al – Lábil (%)</i>	<i>Al – Complexado (%)</i>
In natura (PC)	6,0	94,0
In natura (NC)	4,0	96,0
Sapeco (PC)	41,0	59,0
Sapeco (NC)	43,0	56,0
Cancheada (PC)	21,0	79,0
Cancheada (NC)	13,0	86,0

Com os dados apresentados na Tabela 10 foi construído um gráfico para facilitar a

análise dos dados. O gráfico está apresentado na Figura 28.

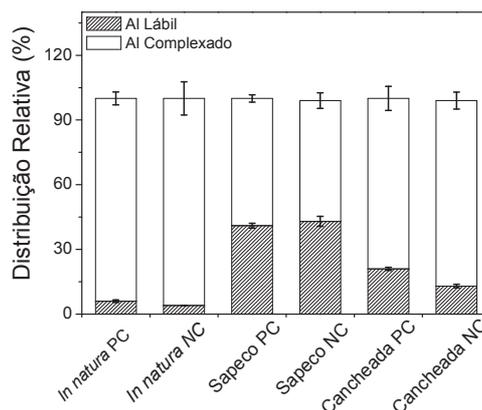


Figura 28. Gráfico representativo da distribuição do Al em infusão das amostras obtidas nas diferentes etapas do processamento industrial de erva-mate.

Através da Tabela 10 e Figura 28, pode-se observar que a distribuição do Al-Lábil nas amostras obtidas nas diferentes etapas do processamento industrial apresentou diferenças nas etapas estudadas. A distribuição do Al nas frações lábil e complexada foram diferentes quando compara-se os dados da primeira e segunda coleta. A diferença no clima, solo e região de coleta pode ter influenciado nessa diferença entre os teores de Al apresentados.

O Al-Lábil variou entre 4,0 e 43,0 % com relação ao Al-Complexado. Assim, o Al nestas amostras encontra-se majoritariamente complexado a ligantes orgânicos naturais da planta. As amostras *in natura* (PC e NC) apresentaram a menor porcentagem de Al-Lábil possivelmente porque nessa etapa a amostra ainda não passou por nenhum processo de queima. Sendo assim os orgânicos naturais da planta continuam preservados e possivelmente complexam o alumínio, deixando-o menos biodisponível. Já na etapa do sapeco o teor de Al-Lábil é maior com relação às amostras canheadas e *in natura*. Esse fato pode ser explicado devido a amostra do sapeco ser tostada e/ou queimada no processo industrial, possivelmente os orgânicos naturais que complexam o alumínio são degradados, disponibilizando assim o alumínio.

Usualmente a erva-mate não é consumida sob as condições das amostras estudadas das etapas do processamento industrial. O consumo da erva-mate é preferencialmente realizado com a erva processada pela indústria. Vale ressaltar que até o presente momento não foram encontrados trabalhos na literatura do estudo da influência do processamento industrial sobre a composição e especiação do Al^{3+} em infusões de erva-mate por voltametria.

Além das amostras de diferentes etapas do processo industrial da erva-mate, foram

analisadas quatro amostras comerciais de erva-mate destinada ao preparo do chimarrão, duas amostras de erva-mate destinadas ao preparo do tererê e duas amostras de chá-mate. Os resultados obtidos com relação aos teores de Al-Total e Al-Lábil juntamente com a distribuição do Al estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11. Resultado da distribuição de Al em infusão de erva-mate por VAdSRC utilizando como ligante o DASA (média \pm desvio padrão, n=3).

<i>Amostras*</i>	<i>Al-Total</i>		<i>Al-Lábil</i>		<i>Al-Comp</i> ($mg\ g^{-1}$)	<i>Distribuição (%)</i>	
	<i>Média</i> ($mg\ g^{-1}$)	<i>RSD</i> (%)	<i>Média</i> ($mg\ g^{-1}$)	<i>RSD</i> (%)		<i>Al-Lábil</i> (%)	<i>Al-Complex.</i> (%)
E.M.C. 1	6,9 \pm 0,4	5,2	2,0 \pm 0,1	4,0	4,9 \pm 0,3	29,0	71,0
E.M.C. 2	7,28 \pm 0,04	0,6	3,3 \pm 0,1	2,2	4,0 \pm 0,1	45,0	55,0
E.M.C. 3	9,0 \pm 0,4	4,2	2,4 \pm 0,2	7,2	6,6 \pm 0,3	26,0	74,0
E.M.C. 4	9,5 \pm 0,8	7,9	4,4 \pm 0,1	2,0	5,1 \pm 0,7	46,0	54,0
E.M.T. 1	0,32 \pm 0,02	6,3	0,120 \pm 0,001	0,8	0,20 \pm 0,02	39,0	61,0
E.M.T. 2	0,29 \pm 0,01	3,5	0,100 \pm 0,003	3,0	0,19 \pm 0,01	35,0	65,0
C.M. 1	3,3 \pm 0,2	4,8	0,90 \pm 0,02	2,2	2,4 \pm 0,1	27,0	73,0
C.M. 2	8,4 \pm 0,5	6,0	1,8 \pm 0,1	3,9	6,6 \pm 0,4	21,0	79,0

* E.M.C. = Erva-Mate destinada ao consumo de chimarrão; E.M.T. = Erva-Mate destinada ao consumo de tererê; C.M. = Chá-Mate

A Tabela 11 mostra que as infusões de erva-mate de chimarrão estudadas apresentaram elevados teores de Al-Total, variando de 6,9 à 9,5 $mg\ g^{-1}$. A amostra E.M.C. 1 foi a qual apresentou um menor teor de Al-Total entre as ervas estudadas, 6,90 $mg\ g^{-1}$, porém ainda assim elevado. Mas considerando os valores de desvio padrão a E.M.C. 1 é similar a E.M.C. 2 em termos de concentração de Al-Total. A amostra E.M.C. 4 apresenta o maior teor de Al-Total, sendo 9,5 $mg\ g^{-1}$. Essa amostra é considerada pela indústria “amarelada”, pois é uma erva que é processada pela indústria mais de uma vez, devido ao tempo de prateleira excedido. Com isso acredita-se que E.M.C. 4 sofra contaminação por ser submetida ao processo industrial mais de uma vez. A idade da planta (envelhecida) também pode levar a perda das suas características químicas. A ordem de concentração de Al-Total observado nas ervas destinadas ao preparo do chimarrão segue a seguinte ordem crescente: E.M.C. 1 < E.M.C. 2 < E.M.C. 3 < E.M.C. 4. As diferenças observadas teores de Al-Total entre as ervas destinadas ao preparo de chimarrão já era esperada. Apesar do preparo da extração ser realizado da mesma maneira para todas as amostras, a forma de extração difere pois a granulometria e a porcentagem de talos e folhas das mesmas são diferentes. As infusões de erva-mate de tererê apresentaram um teor de Al-Total de 0,32 e 0,29 $mg\ g^{-1}$, em E.M.T. 1 e E.M.T. 2, respectivamente. As infusões de chá-mate mostraram diferenças no teor de alumínio pois são amostras com granulometria diferentes, sendo C.M.1 considerada grossa e apresentando 3,3 $mg\ g^{-1}$ de Al-Total e a C.M.2 considerada fina apresentando 8,4 $mg\ g^{-1}$ de

Al-Total. A Figura 29 A e B representam essas diferenças. Com isso, a amostra considerada fina, apresenta maior superfície de contato, e obtêm uma extração mais efetiva, apresentando um maior teor de Al-Total. As amostras de erva-mate destinadas ao preparo do tererê foram as que apresentaram o menor teor de Al-Total dentre as amostras estudadas. Esse fato pode ser explicado devido à infusão ser preparada com água fria, ou seja, obtêm-se uma extração menos efetiva (Furgeri *et al.*, 2009).



Figura 29. Amostras de chá-mate comercial com granulometria (A) grossa e (B) fina.

Todas as amostras apresentaram teores diferentes de alumínio total, fato já esperado por se tratar de amostras diferentes. Cabe ressaltar, que os produtos comerciais de erva-mate possuem variações na sua composição, devido a quantidades diferentes de folhas e ramos. Além disso, pode ter uma diferença do tipo de erva-mate utilizada, ou seja, do local e do período de tempo de colheita (Street *et al.*, 2007).

Em estudo realizado anteriormente por Ducat e Quináia (2004), avaliou-se a concentração de Al em folhas de erva-mate através da extração com HCl 0,12 mol/L durante 10 min e os resultados encontrados variam de aproximadamente 1,3 à 1,87 mg g⁻¹. da Costa *et al.* (2009) determinaram a concentração de Al em infusões de erva-mate de chimarrão e chá-mate preparadas com 5 g de erva em 150 mL de água, durante 10 minutos em 85°C de temperatura. Os teores encontrados variam de 0,37 à 0,59 mg g⁻¹ de Al na erva-mate e 0,25 à 0,61 mg g⁻¹ no chá-mate. Em ambos os trabalho citados a erva-mate estudada é de origem brasileira da região Paranaense. O alumínio total foi determinado em 13 infusões de chá verde, oriundas de vários lugares do mundo. As amostras foram preparadas a partir de 1 g de planta em 50 mL de água durante 5 minutos com determinação por ICP-OES. As concentrações encontradas variaram de 284,0 à 9380,0 mg g⁻¹ (Street *et al.*, 2007).

Os resultados obtidos neste trabalho diferem dos resultados apresentados na literatura devido o modo de preparo da infusão, tempo de extração e as amostras serem diferentes.

Também deve-se levar em consideração a temperatura e o solvente utilizado na extração, bem como a época de colheita, solo, região da erva-mate, etc.

Vale lembrar, que apenas a concentração total do alumínio não indica os possíveis efeitos tóxicos do consumo do alimento e a ingestão do Al, pois nas infusões, o mesmo pode encontrar-se complexado a ligantes orgânicos e inorgânicos que minimizam sua biodisponibilidade.

Com isso, a Tabela 11 mostra ainda que as amostras estudadas também mostraram elevados teores de Al-Lábil, chegando de 0,9 à 4,4 mg g⁻¹, excetuando E.M.T 1 e 2, que apresentaram teores inferiores. As amostras de erva-mate de chimarrão apresentaram concentrações de Al-Lábil na seguinte ordem crescente: E.M.C. 1 < E.M.C. 3 < E.M.C. 2 < E.M.C. 4. Por se tratar de amostras diferentes, a diferença nas concentrações de Al-Lábil já era esperada. As amostras E.M.T. 1 e 2 apresentaram as menores concentrações de Al-Lábil, sendo 0,120 e 0,100 mg g⁻¹, respectivamente. Esse fato pode ser explicado devido sua extração ser realizada com água fria. As concentrações de Al-Lábil nas amostras de chá-mate foram 0,9 e 1,8mg g⁻¹ para C.M. 1 e C.M. 2, respectivamente. Novamente, a C.M. 2 apresentou um maior teor de Al-Lábil devido a sua granulometria ser considerada fina e conseqüentemente a extração ser favorecida. Todos os desvios padrão relativo (RSD) das análises realizadas em triplicata estão abaixo de 8 %, sendo 20% considerado adequado para análise traço (Wood, 2002).

da Costa *et al.* (2009) estudaram o fracionamento do alumínio em infusões preparadas com três amostras de erva-mate e três de chá-mate. O estudo foi realizado através da separação com resina quelante e quantificação por espectrometria de absorção atômica. As infusões foram preparadas com 5 g de erva em 150 mL de água ultra-pura durante 10 minutos em temperatura de 85^oC. Os resultados obtidos mostram que nas infusões de chá mate o alumínio solúvel chegou a 0,05 mg g⁻¹. Para as infusões de erva-mate a concentração de alumínio solúvel chegou a 0,08 mg g⁻¹. Os resultados obtidos para o Al-Lábil neste trabalho são maiores que os resultados reportados pela literatura. Vale lembrar, que as infusões foram preparadas de forma diferente.

A Figura 30 representa a distribuição do Al nas amostras de infusão de erva-mate estudadas, com os resultados apresentados pela Tabela 11.

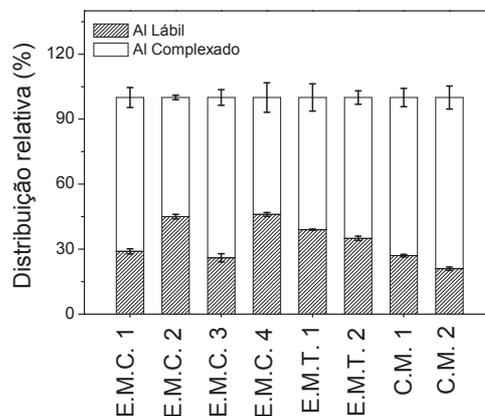


Figura 30. Distribuição do alumínio presente nas amostras de infusão de erva-mate. E.M.C. = Erva-Mate destinada ao consumo de chimarrão, E.M.T. = Erva-Mate destinada ao consumo de tererê, C.M. = Chá-Mate.

Com relação à distribuição do alumínio nas amostras de erva-mate estudadas, observa-se na Figura 30, que a porcentagem do Al-Complexado variou entre 54 e 74% em relação ao Al total dissolvido nas amostras E.M.C. A porcentagem de alumínio complexado observada nas amostras de E.M.T. 1 e 2 foram de 61 e 65 %, respectivamente. As amostras C.M. mostram que 73 % do alumínio encontra-se complexado para a amostra 1 e 79% para a amostra 2.

A similaridade observada entre as diferentes amostras pode estar relacionada com o teor de compostos orgânicos naturais que cada uma apresenta. Acredita-se que quanto maior o teor de compostos orgânicos, o alumínio esteja menos biodisponível. Em estudo realizado por da Costa *et al.* (2009), a especiação do Al em infusões de erva-mate mostra que a maior parte também está complexada a compostos orgânicos naturais, chegando a 55% na erva-mate de chimarrão e 45% no chá-mate, apesar das concentrações encontradas serem menores com relação a este trabalho.

A especiação de alumínio apresentada neste trabalho mostra que a distribuição é similar com a literatura, considerando-se o fato de que a maior parte do alumínio está complexada. Porém a média do alumínio complexado para as amostras de erva-mate de chimarrão estudadas neste trabalho foi de 64 % e para o chá-mate 76 %, diferindo dos resultados apresentados pela literatura.

Avaliando os resultados obtidos, pode-se acreditar que o consumo de infusões de erva-mate não representa nenhum risco à saúde humana, pois o Al encontra-se em formas pouco biodisponíveis (complexadas a ligantes orgânicos). Apesar das concentrações totais de alumínio serem elevadas para as infusões de erva-mate de chimarrão, apenas em média, 37% do metal apresenta-se biodisponível e possivelmente tem mais chance de ser absorvido.

Contudo, de acordo com a organização mundial da saúde (OMS) a ingestão tolerável

semanal de alumínio para adultos é de 2 mg Kg⁻¹ de peso corporal (FAO, 2011). Através dos valores de Al-Lábil apresentados na Tabela 11, calculou-se uma estimativa de ingestão semanal do alumínio das ervas-mate estudadas simulando o preparo de uma infusão em uma cuia de chimarrão (recipiente utilizado para o preparo do chimarrão). Os cálculos foram realizados de acordo com a equação 7

$$Estimativa = ALL (mg g^{-1}) \times m_{E.M.}(g) \quad \text{Equação 7}$$

onde ALL é a concentração de Al-Lábil e m_{E.M.} é a massa de erva-mate utilizada, nesse caso 20g. O resultado da equação 5 é multiplicado por 7, pois a ingestão é semanal, ou seja, 7 dias e dividido pelo peso corporal de um adulto, neste caso representado por 70 Kg. A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos para esse cálculo.

Tabela 12. Concentrações semanais ingeridas de alumínio lábil nas infusões de erva-mate considerando um adulto de 70 Kg.

Amostras *	Ingestão semanal (mg Kg ⁻¹)
E.M.C. 1	4,02
E.M.C. 2	6,52
E.M.C. 3	4,72
E.M.C. 4	8,84
E.M.T. 1	0,24
E.M.T. 2	0,20
C.M. 1	1,80
C.M. 2	3,58

* E.M.C. = Erva-mate destinada ao consumo de chimarrão, E.M.T. = Erva-mate destinada ao consumo de tererê, C.M. = Chá-Mate

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos para a ingestão semanal de alumínio lábil nas ervas-mate estudadas considerando um adulto de 70 Kg. Observa-se que a E.M.C. 4 foi a qual ultrapassou 4 vezes as recomendações indicadas da OMS. Apesar da E.M.C. 1 apresentar a menor concentração e alumínio dentre as ervas destinadas ao consumo de chimarrão, ainda assim o consumo ultrapassa 2 vezes o tolerável. Todas as ervas-mate de chimarrão estão com valores de ingestão semanal de alumínio acima do aceitável pela OMS. As ervas destinadas para o consumo de tererê estão dentro dos níveis aceitáveis. A amostra C.M. 1 apresenta concentração permitida e a C.M. 2 também está ultrapassando as recomendações da OMS (FAO, 2011).

As infusões de erva-mate destinadas ao preparo do chimarrão apresentam concentração de alumínio que varia de 3,80 à 9,20 mg L⁻¹ na fração lábil ou biodisponível.

De acordo com Flaten (2002) em trabalho de revisão, a concentração de alumínio em infusões de chá, com poucas exceções, encontra-se na faixa de 1 – 6 mg L⁻¹. Para infusões de erva-mate destinadas ao preparo do chimarrão, Malavolta e Heinrichs (2001) citados em Da Costa (2008) determinaram concentrações de Al que chegam a 3,75 mg L⁻¹.

Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho são semelhantes aos citados na literatura, com algumas exceções. Acredita-se que a labilidade do alumínio esteja relacionada com o teor de compostos orgânicos presentes na erva-mate, já que compostos orgânicos como fenólicos e flavonoides tem capacidade de complexação e quelação (Flaten, 2002; da Costa *et al.*, 2009; Street *et al.* 2007). Sendo assim, realizou-se um estudo de quantificação de compostos fenólicos e flavonoides, juntamente com a avaliação da atividade antioxidante e ainda uma análise qualitativa dos compostos orgânicos como as melanoidinas, ácidos clorogênicos e aromáticos presentes nas infusões.

5.4. Quantificação de Compostos Fenólicos e Flavonoides

Rossi e Singleton (1965) propuseram o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu para a quantificação dos compostos fenólicos. Nesse método o íon fenolato é oxidado em meio alcalino, enquanto o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico é reduzido para uma solução azul, que absorve a 760 nm. A Figura 31 A representa a curva analítica obtida no espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda 760 nm para a quantificação dos compostos fenólicos que foi construída de acordo com o item 4.8.2. Do mesmo modo, a Figura 31 B representa a curva analítica obtida na quantificação dos flavonoides de acordo com o item 4.8.3.

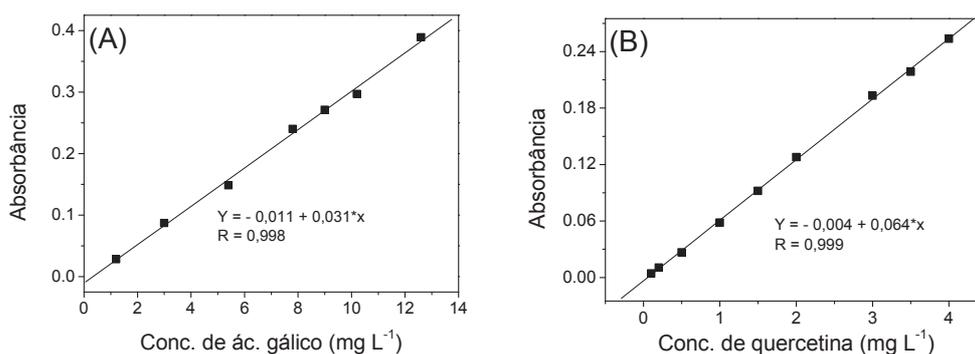


Figura 31. (A) Curva analítica obtida na quantificação dos compostos fenólicos e (B) curva analítica obtida na quantificação de flavonoides. Ambas para amostras de infusão de erva-mate.

As infusões de erva-mate foram analisadas de acordo com os itens 4.8.2. e 4.8.3.

Apartir dos valores de absorvância obtidos para as infusões de erva-mate foram calculadas as concentrações dos compostos fenólicos e flavonoides totais utilizando-se das curvas analíticas. A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos para a quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides para as amostras obtidas nas diferentes etapas do processamento industrial.

Tabela 13. Concentrações obtidas de compostos fenólicos e flavonoides para as amostras de infusão de erva-mate das etapas do processamento industrial.

<i>Amostras*</i>	<i>Compostos Fenólicos</i>		<i>Flavonoides</i>	
	<i>Média (mg g⁻¹)</i>	<i>RSD (%)</i>	<i>Média (mg g⁻¹)</i>	<i>RSD (%)</i>
<i>In natura (PC)</i>	124,46 ± 0,04	0,03	3,600 ± 0,002	0,42
<i>In natura (NC)</i>	102,0 ± 0,7	0,7	1,450 ± 0,004	2,64
Sapeco (PC)	91,9 ± 0,3	0,3	1,48 ± 0,02	1,35
Sapeco (NC)	94,9 ± 4,6	4,8	1,0 ± 0,1	5,3
Cancheada (PC)	195,3 ± 2,9	1,5	4,7 ± 0,1	2,0
Cancheada (NC)	192,8 ± 6,1	3,2	3,2 ± 0,1	1,6

* PC = Primeira coleta, NC = Nova Coleta

A Tabela 13 mostra que as amostras cancheadas foram as que mostraram as maiores concentrações compostos fenólicos chegando a 195,3mg g⁻¹. Fato que pode ser explicado devido sua granulometria que é menor que das demais amostras, podendo obter uma extração mais efetiva (Figura 11). Não observa-se diferenças significativas nas concentrações de compostos fenólicos entre as amostras cancheadas PC e NC. Com relação as amostras *in natura* e sapeco, observa-se que as amostras da etapa do sapeco apresentaram o menor teor de compostos fenólicos de 91,9 e 94,9 mg g⁻¹, para PC e NC, respectivamente. Possivelmente, os compostos fenólicos estão sendo degradados com o aumento da temperatura exigido nessa etapa do processamento. As amostras do sapeco também não mostraram diferenças significativas nas concentrações entre PC e NC.

A Tabela 13 mostra ainda que somente a amostra *in natura* apresentou diferença significativa entre os teores de compostos fenólicos para PC e NC. A ordem de concentração obtida tanto para as amostras PC quanto para as amostras NC foi: sapeco > cancheada > *in natura*. Esse resultado indica que o processo industrial pode estar degradando os compostos fenólicos presentes na erva-mate.

Os teores quantificados de flavonoides nas amostras de infusão de erva-mate também estão apresentados na Tabela 13. Nota-se que as amostras coletas primeiramente são significativamente diferentes das amostras da nova coleta. Esse resultado pode indicar que o solo, região, clima e período no qual as amostras foram coletadas influenciam nos teores desse composto. Novamente a amostra cancheada foi a qual apresentou as maiores concentrações de flavonoides. Na Figura 11 pode-se observar que a granulometria dessa

amostra é mais fina do que das amostras *in natura* e sapeco. Com isso a extração pode ser mais efetiva.

A Figura 32 apresenta um gráfico dos resultados dos teores de compostos fenólicos e flavonoides para as amostras obtidas nas diferentes etapas do processamento industrial de acordo com a Tabela 13.

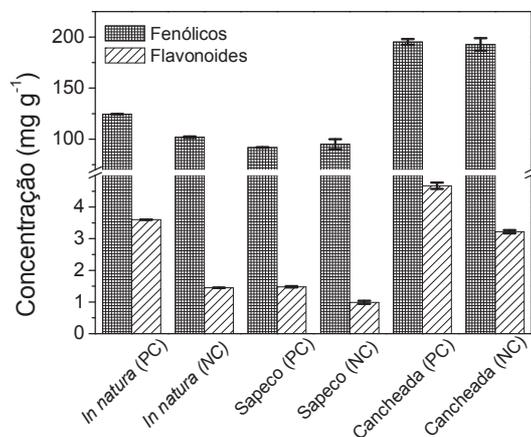


Figura 32. Teor de fenólicos totais e flavonoides quantificados nas infusões de erva-mate obtidas nas diferentes etapas do processamento industrial.

Através da Figura 32, verifica-se que as infusões de erva-mate estudadas são mais ricas em compostos fenólicos totais do que em flavonoides. Esse fato já era esperado, visto que os flavonoides são um grupo pertencente aos compostos fenólicos. As amostras NC apresentaram um menor teor de flavonoides com relação às amostras PC. Isso se deve ao fato de que a produção de flavonoides nas plantas pode ser afetada devido à época de colheita e idade da planta, pois em tecidos mais novos há uma maior concentração de flavonoides e uma maior acumulação dos mesmos em tecidos superficiais, que age no sentido de proteger os tecidos internos da planta da radiação UV-B (Gobbo-Neto & Lopes, 2007).

O mesmo estudo de quantificação de fenólicos totais e flavonoides foi aplicado nas amostras comerciais de erva-mate de chimarrão, tererê e chá-mate. Os resultados obtidos encontram-se dispostos na Tabela 14 e Figura 33.

Tabela 14. Concentrações obtidas de compostos fenólicos e flavonoides para as amostras de infusão de erva-mate comercial.

Amostras*	Compostos Fenólicos		Flavonoides	
	Média (mg g ⁻¹)	RSD (%)	Média (mg g ⁻¹)	RSD (%)
E.M.C. 1	223,4 ± 8,2	3,7	4,4 ± 0,1	2,2
E.M.C. 2	231,1 ± 8,3	3,6	4,1 ± 0,1	2,2
E.M.C. 3	247,6 ± 1,3	0,5	4,6 ± 0,1	3,0
E.M.C. 4	199,9 ± 6,7	3,4	4,0 ± 0,1	1,5
E.M.T. 1	64,1 ± 0,5	0,8	0,96 ± 0,02	1,80
E.M.T. 2	52,8 ± 0,4	0,8	1,2 ± 0,1	4,2
C.M. 1	102,1 ± 1,0	1,0	3,03 ± 0,01	0,19
C.M. 2	149,4 ± 3,9	2,6	4,7 ± 0,1	2,0

* E.M.C. = Erva-Mate destinada ao consumo do chimarrão; E.M.T. = Erva-Mate destinada ao consumo de tererê; C.M. = Chá-Mate

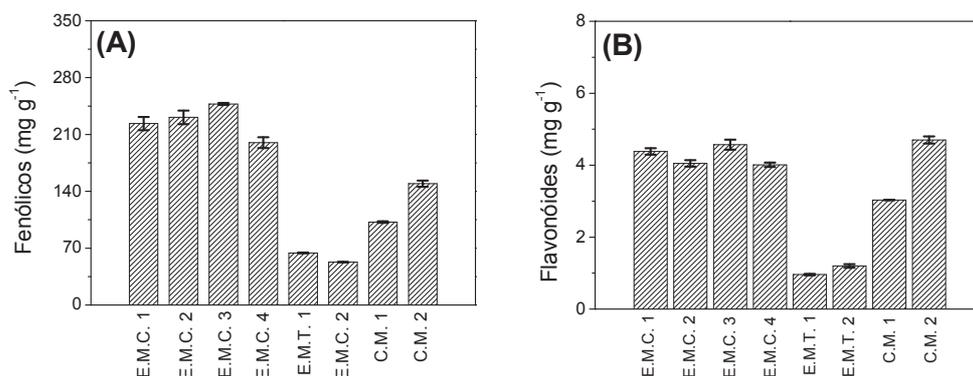


Figura 33. Gráfico representativo da concentração dos compostos fenólicos totais em (A) e flavonoides em (B) nas infusões de erva-mate comerciais. E.M.C. = Erva-Mate destinada ao consumo de chimarrão; E.M.T. = Erva-Mate destinada ao consumo de tererê; C.M. = Chá-Mate.

Através da Figura 33 pode-se observar que em todas as infusões de erva-mate a concentração de compostos fenólicos foi superior que a concentração de flavonoides. Esse fato já era esperado devido os flavonoides pertencerem ao grupo dos compostos fenólicos. Observa-se também que as infusões de erva-mate destinadas ao consumo do chimarrão obtiveram maiores concentrações tanto de fenólicos quanto de flavonoides, com relação a amostra de erva-mate destinadas ao consumo de tererê. A amostra E.M.C. 4 foi a que apresentou o menor teor de fenólicos entre as ervas de chimarrão. A E.M.C.4 é uma erva que passa mais de uma vez por todo o processo industrial, com isso, acredita-se que ocorra degradação dos compostos fenólicos devido ao processo de queima e também devido ao tempo ou idade da erva, que pode acarretar nas perdas de suas características. As duas infusões com erva-mate destinadas ao consumo de tererê foram as que apresentaram um menor teor de fenólicos e flavonoides, pois seu preparo é realizado com água fria (Furgeri *et al.*, 2009). As amostras C.M. 1 e C.M. 2 apresentam diferença em suas concentrações pois a

granulometria das mesmas é diferente, sendo uma considerada grossa e a outra fina, respectivamente (veja Figura 29). As amostras C.M. apresentaram um teor menor de compostos fenólicos em relação às amostras E.M.C., pois estas são amostras torradas no processo industrial, as quais sofrem um processo de queima a mais que a E.M.C., e com isso acredita-se que ocorra degradação dos fenólicos.

da Costa (2008) estudou o teor de polifenóis totais em infusões de erva-mate e chá-mate preparadas a partir de 5,0 g da planta em 150 mL de água fervente durante 10 minutos. As concentrações encontradas para infusões de erva-mate de chimarrão variaram de 42,0 à 46,7 mg g⁻¹ e as infusões de chá-mate variaram de 14,0 à 30,3 mg g⁻¹. As amostras estudadas por da Costa são da região Paranaense. Em outro estudo, as concentrações de compostos fenólicos encontrados em infusões de erva-mate para chimarrão e chá-mate preparadas com água fervente durante 5 minutos, também da região Paranaense, foram de 94,2 e 59,2 mg g⁻¹, respectivamente (Bastos *et al.*, 2006). Valores de concentrações de polifenóis totais variaram de 77,6 a 81,2 mg g⁻¹, e de 103,4 mg g⁻¹, para infusões de chá-mate e de erva-mate de chimarrão, respectivamente, obtidos por Bravo *et al.* (2007). As amostras foram previamente filtradas e preparadas utilizando água em ebulição (150 mL) por 5 min. Em tais trabalhos citados, foi empregado o método de quantificação de Folin-Ciocalteu por espectrofotometria.

Comparando os resultados obtidos neste trabalho com os estudos citados, nota-se uma diferença significativa entre os mesmos. As concentrações de compostos fenólicos obtidas neste estudo são maiores considerando um tempo de extração de 10 minutos. No que diz respeito às infusões de erva-mate de tererê, não se encontram dados na literatura até o momento.

5.5. Avaliação da atividade antioxidante das infusões preparadas com erva-mate

As substâncias antirradicais presentes nas amostras de erva-mate reagem com o radical livre DPPH, convertendo-o no 1,1-difenil-2-picril-hidrazina, através da transferência de um átomo de hidrogênio. Essa reação é monitorada pela mudança de coloração, mudando do violeta para o amarelo (Bondet, Brand-Williams & Berset, 1997). A Figura 34 mostra uma foto referente a essa mudança de cor provocada na reação do radical livre DPPH com as substâncias antirradicais presentes nas infusões de erva-mate.



Figura 34. Foto representativa da mudança de coloração provocada pela reação das substâncias antirradicais presentes nas infusões de erva mate com o radical livre DPPH.

Portanto, quanto maior o índice de substâncias antirradicais presentes nas infusões de erva-mate, maior será sua atividade antioxidante e conseqüentemente a porcentagem de inibição frente ao radical livre DPPH também será elevada.

As análises foram realizadas de acordo com o item 4.8.4. Os resultados obtidos para a avaliação da atividade antioxidante das infusões de erva-mate obtidas nas diferentes etapas do processamento industrial estão dispostos na Tabela 15. Bem como os resultados obtidos para as amostras comerciais de erva-mate estão dispostos na Tabela 16.

Tabela 15. Avaliação da atividade antioxidante das infusões de erva-mate obtidas nas diferentes etapas do processo industrial.

<i>Amostras*</i>	<i>Atividade Antioxidante</i>	
	<i>(%)</i>	<i>RSD (%)</i>
In natura (PC)	37,9 ± 2,3	6,2
In natura (NC)	27,4 ± 1,2	4,5
Sapeco (PC)	55,3 ± 1,9	3,6
Sapeco (NC)	92,5 ± 0,3	0,3
Cancheada (PC)	93,64 ± 0,03	0,03
Cancheada (NC)	93,53 ± 0,03	0,03

* PC = Primeira Coleta; NC = Nova Coleta

Tabela 16. Avaliação da atividade antioxidante das amostras de infusão de erva-mate comerciais.

Amostras	Atividade Antioxidante	
	%	RSD (%)
E.M.C. 1	92,9 ± 0,2	0,2
E.M.C. 2	92,7 ± 0,2	0,2
E.M.C. 3	91,8 ± 0,6	0,6
E.M.C. 4	92,4 ± 0,1	0,1
E.M.T. 1	44,4 ± 2,0	4,5
E.M.T. 2	44,6 ± 1,6	3,6
C.M. 1	81,1 ± 1,2	1,5
C.M. 2	91,4 ± 0,2	0,2

* E.M.C. = Erva-Mate destinada ao consumo de chimarrão; E.M.T. = Erva-Mate destinada ao consumo de tererê; C.M.= Chá-Mate.

Os resultados apresentados nas Tabelas 15 e 16 permitiram a construção de gráficos. A Figura 35 A representa um gráfico da avaliação da atividade antioxidante das infusões de erva-mate obtidas nas diferentes etapas do processo industrial. Bem como a Figura 35 B representa a avaliação da atividade antioxidante das infusões de erva-mate comercial.

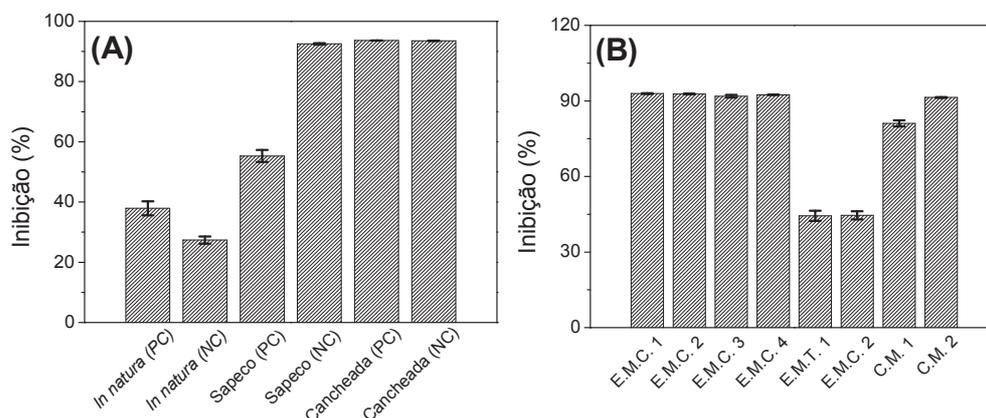


Figura 35. Avaliação da atividade antioxidante das infusões de erva-mate do processamento industrial em (A) e comerciais em (B). PC = primeira coleta; NC = nova coleta. E.M.C. = Erva-Mate destinada ao consumo do Chimarrão; E.M.T. = Erva-Mate destinada ao consumo do Tererê; C.M. = Chá-Mate.

Nota-se na Figura 35 A que a inibição foi elevada e variou de 55 a 94 % para as infusões preparadas com as amostras de erva-mate obtidas em diferentes etapas do processo industrial, excetuando as amostras *in natura*. Além disso, observa-se que as duas primeiras etapas do processo industrial (*in natura* e sapeco) apresentaram baixo potencial antioxidante se comparado com as amostras cancheadas, excetuando a amostra do sapeco (NC) que obteve inibição similar. Vale lembrar, que a granulometria das mesmas é diferente.

Na Figura 35 B observa-se que o potencial antioxidante das amostras comerciais de erva-mate de chimarrão e chá-mate foram similares e bastante elevado, passando de 90% de

inibição. Para as amostras de erva-mate de tererê a inibição com o radical livre DPPH mesmo sendo inferior que das amostras de chá e chimarrão, chegou à 50%, lembrando que sua extração pode ser menos efetiva devido o preparo da infusão ser realizado com água fria. Com isso, pode-se avaliar que todas as amostras de erva-mate destinadas ao consumo através do chimarrão, tererê e chá, possuem alta capacidade antioxidante, agindo possivelmente no combate de radicais livres presentes no organismo humano, promovendo o combate ao câncer, envelhecimento, etc.

A atividade antioxidante pode estar relacionada com o teor de alguns compostos orgânicos como fenólicos, flavonoides e ácidos clorogênicos.

5.6. Avaliação Qualitativa da Presença dos Compostos Orgânicos Melanoidinas, Ácidos Clorogênicos e Aromáticos nas Infusões de Erva-Mate

Os resultados das medidas espectrofotométricas molecular na região visível das infusões de erva-mate obtidas nas diferentes etapas do processo industrial nos comprimentos de onda 280 nm, referente aos compostos aromáticos em geral, 325 nm referente aos ácidos clorogênicos e 480 nm referente às melanoidinas, que se originam pela reação de Maillard, estão dispostos na Tabela 17.

A quantificação das melanoidinas, ácidos clorogênicos e aromáticos não foi realizada nesse trabalho, pois o intuito era apenas conhecer se tais compostos estavam presentes nas infusões de erva-mate. De acordo com os valores de absorbância obtidos nos testes pode-se estimar a presença dos mesmos, em altas ou baixas concentrações.

O teste estatístico de Tukey é utilizado com frequência para a análise das médias dos resultados. Esse mesmo teste foi aplicado para a avaliação dos resultados obtidos.

Tabela 17. Medidas espectrofotométricas para as infusões de erva-mate das diferentes etapas do processo industrial (Média ± desvio padrão, n=3).

Amostras	Absorbância		
	280 nm	325 nm	480 nm
In natura (PC)	0,483 ± 0,001 ^a	0,565 ± 0,001 ^a	0,037 ± 0,001 ^a
In natura (NC)	0,1001 ± 0,0001 ^b	0,1080 ± 0,0004 ^b	0,0216 ± 0,0001 ^b
Sapeco (PC)	0,2962 ± 0,0003 ^c	0,3325 ± 0,0004 ^c	0,0309 ± 0,0002 ^c
Sapeco (NC)	0,4258 ± 0,0004 ^d	0,4849 ± 0,0004 ^d	0,0329 ± 0,0004 ^c
Cancheada (PC)	0,683 ± 0,001 ^e	0,824 ± 0,003 ^e	0,1133 ± 0,0004 ^d
Cancheada (NC)	0,532 ± 0,003 ^f	0,624 ± 0,002 ^f	0,0852 ± 0,0001 ^e

PC = Primeira Coleta; NC = Nova Coleta. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,05).

Nota-se através da Tabela 17 que as absorvâncias determinadas para os compostos aromáticos, ácidos clorogênicos e melanoidinas nas amostras obtidas nas diferentes etapas do processamento industrial se mostraram significativamente diferentes num nível de 95% de confiança. Apenas as amostras do sapeco (PC e NC) apresentaram resultados que não tem diferença significativa para as melanoidinas (480 nm). As duas amostras cancheadas (PC e NC) apresentaram absorvâncias maiores em relação ao restante das amostras do processamento em todos os comprimentos de onda. Isso pode ser explicado devido ao fato da amostra cancheada obter uma extração mais eficiente, pois sua superfície de contato com a solução extratora (água) é maior (veja Figura 11).

Observa-se ainda pela Tabela 17, que as absorvâncias no comprimento de onda 325 nm para todas as amostras são superiores em relação aos comprimentos de onda 280 e 480 nm, ou seja, pode-se considerar que as infusões de erva-mate são ricas em ácidos clorogênicos. Os compostos aromáticos (280 nm) apresentaram absorvância inferior aos ácidos clorogênicos (325 nm) possivelmente devido sua degradação nas etapas de queima da erva-mate durante o processo industrial. Já esperava-se que as melanoidinas (480 nm) apresentassem uma absorvância inferior com relação aos ácidos clorogênicos (325 nm) e aromáticos (280 nm). A formação das melanoidinas é evidenciada através do processo de torrefação da erva-mate pela indústria para a produção do chá-mate. As amostras estudadas obtidas nas diferentes etapas do processo industrial, ainda não passaram por esse processo.

Do mesmo modo, as análises espectrofotométricas foram realizadas para as infusões de erva-mate comerciais de chimarrão, tererê e chá-mate. Os resultados estão dispostos na Tabela 18.

Tabela 18. Medidas espectrofotométricas para as infusões de erva-mate destinadas ao preparo do chimarrão, tererê e chá-mate (Média \pm desvio padrão, n=3).

Amostras *	Absorvância		
	280 nm	325 nm	420 nm
E.M.C. 1	0,637 \pm 0,003 ^a	0,774 \pm 0,003 ^a	0,189 \pm 0,001 ^a
E.M.C. 2	0,587 \pm 0,001 ^b	0,705 \pm 0,002 ^b	0,1875 \pm 0,0002 ^a
E.M.C. 3	0,6089 \pm 0,0002 ^c	0,729 \pm 0,001 ^c	0,2663 \pm 0,0002 ^b
E.M.C. 4	0,617 \pm 0,001 ^c	0,745 \pm 0,002 ^d	0,1580 \pm 0,0004 ^a
E.M.T. 1	0,173 \pm 0,001 ^d	0,2073 \pm 0,0004 ^e	0,0312 \pm 0,0001 ^c
E.M.T. 2	0,176 \pm 0,001 ^d	0,210 \pm 0,001 ^e	0,047 \pm 0,001 ^c
C.M. 1	0,3127 \pm 0,0001 ^e	0,308 \pm 0,001 ^f	0,248 \pm 0,004 ^b
C.M. 2	0,410 \pm 0,001 ^f	0,414 \pm 0,001 ^g	0,4150 \pm 0,0003 ^d

* E.M.C. = Erva-Mate Chimarrão; E.M.T. = Erva-Mate Tererê; C.M. = Chá-Mate. Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (P<0,05).

Através da Tabela 18 nota-se que as leituras realizadas no comprimento de onda 280

nm, não mostraram diferença significativa para as amostras de erva-mate de tererê e as ervas-mate de chimarrão 3 e 4. Vale lembrar, que as diferenças nas absorvâncias nesse comprimento de onda para um mesmo tipo de infusão (erva-mate de chimarrão e chá-mate) podem estar relacionadas com a diferença na composição química de cada erva, levando em consideração a porcentagem de talos presentes, a granulometria (grossa ou fina), etc. As medidas nesse comprimento de onda são uteis para avaliar a quantidade total de compostos aromáticos solúveis presentes nas infusões de erva-mate. Pode-se observar também que as infusões de erva-mate de chimarrão apresentaram maior absorvância em 280 nm em relação ao tererê e chá-mate. Esse resultado indica um maior caráter aromático nas infusões de chimarrão. Provavelmente devido a degradação ou transformação dos compostos aromáticos ocorridas no processo de torrefação, o chá-mate apresenta absorvância inferior. A erva-mate de tererê apresentou absorvância inferior devido sua infusão ser preparada com água fria.

da Costa (2008) observou que a erva-mate de chimarrão apresenta maior absorvância em 280 nm em relação ao chá-mate. De acordo com Bekedam *et al.* (2006) citado em da Costa (2008), compostos polifenólicos e portanto aromáticos são degradados ou transformados quando submetidos ao processo de tostagem. Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho para a análise qualitativa dos compostos aromáticos em erva-mate de chimarrão estão em concordância com a literatura.

As leituras realizadas no comprimento de onda 325 nm, referente aos ácidos clorogênicos, mostraram diferença significativa para todas as amostras de erva-mate estudadas, excetuando as ervas de tererê. Essa mesma erva foi a qual apresentou menor valor de absorvância, devido o preparo da sua infusão ser realizado com água fria. As ervas-mate de chimarrão apesar de se mostrarem significativamente diferentes, obtiveram maiores valores de absorvância em 325 nm se comparado com o chá-mate e tererê. Novamente, esse resultado se explica devido ao processo de torrefação em que o chá-mate é submetido, podendo assim, degradar os ácidos clorogênicos. da Costa (2008) observou que a erva-mate de chimarrão apresenta valores de absorvância superiores em comprimento de onda 325 nm se comparado com o chá-mate. Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho para a análise qualitativa dos ácidos clorogênicos em infusões de erva-mate estão em concordância com a literatura.

Com relação aos resultados obtidos nas análises qualitativas das infusões de erva-mate comercial em 480 nm, nota-se na Tabela 10 que as amostras de erva-mate para chimarrão (E.M.C.) não são significativamente diferentes, excetuando a E.M.C. 3. As ervas-mate de tererê não apresentaram diferença significativa e ainda obtiveram a menor absorvância. Contrariamente aos resultados obtidos nos comprimentos de onda 280 e 325 nm, nos quais o

chá-mate apresenta menor absorvância com relação a erva-mate de chimarrão, em 420 nm o chá-mate apresenta absorvância superior. Isso é explicado pelo fato de que as melanoidinas são formadas pela reação de Maillard no processo de torrefação ao qual o chá-mate é submetido. E ainda, compostos fenólicos e portanto aromáticos juntamente com ácidos clorogênicos tem suas concentrações diminuídas em função do aumento de temperatura ou torra (Santos *et al.*, 2007).

5.7. Relação Entre a Labilidade do Alumínio com Compostos Orgânicos em Infusões de Erva-Mate

Os resultados apresentados até agora, podem explicar a especiação do alumínio em infusões preparadas com erva-mate. Para uma amostra com alta concentração de Al-Lábil, espera-se obter uma menor concentração dos compostos orgânicos, como os fenólicos, por exemplo, devido a uma possível complexação entre os mesmos.

Para avaliar essas relações, entre os teores de Al-Lábil determinados com os compostos orgânicos (fenólicos, flavonóides, ácidos clorogênicos, aromáticos e melanoidinas) ferramentas estatísticas foram empregadas, tal como uma análise de correlação linear. A análise foi aplicada no nível de 95% de confiança, através do software MINITAB 14. Os resultados encontrados encontram-se na Tabela 19.

Esse teste foi aplicado apenas para as amostras comerciais de erva-mate, pois estas são destinadas ao consumo e ainda para as amostras que sofreram o mesmo tipo de extração, portanto as amostras de erva-mate de tererê não foram utilizadas. Lembrando que o interesse é saber se o alumínio está complexado aos compostos orgânicos naturais da erva-mate. Para isso, o teor de Al-Lábil deve ser inversamente proporcional ao teor de orgânicos, ou seja, quanto maior o teor de Al-Lábil dissolvido espera-se um menor teor de compostos orgânicos e vice-versa. Para isso a análise de correlação realizada deve apresentar um R negativo.

Tabela 19. Avaliação da correlação entre o Al-Lábil com os compostos orgânicos.

Correlação	p	R
Al-Lábil <i>versus</i> Fenólicos	0,015	0,563
Al-Lábil <i>versus</i> Flavonoides	0,349	0,235
Al-Lábil <i>versus</i> Aromáticos	0,001	0,696
Al-Lábil <i>versus</i> Ácidos Clorogênicos	0,001	0,700
Al-Lábil <i>versus</i> Melanoidinas	0,030	-0,512

p<0,05 = correlação significativa, R<0 = correlação linear negativa, R>0 = correlação linear positiva.

A análise da Tabela 19 mostra que todas as correlações se mostraram significativas em

um nível de 95% de confiança, excetuando Al-lábil *versus* Flavonoides. Isso pode ser comprovado através do valor de *p* que é maior que 0,05. De acordo com os resultados obtidos no *teste-t*, observa-se uma correlação linear positiva para todas as variáveis. Esse resultado indica que o aumento do teor de Al-Lábil aumenta com o teor de fenólicos, flavonoides, aromáticos ou ácidos clorogênicos. Apenas o Al-Lábil *versus* melanoidinas apresentou correlação linear negativa. Portanto, acredita-se que o alumínio apresenta tendência a se complexar com as melanoidinas. Uma melhor correlação (R) poderia ser observada se a variabilidade entre as amostras também fosse estudada e ainda se um maior número de amostras fosse analisado.

A formação de complexos do alumínio com as melanoidinas pode ser explicada com o auxílio da teoria de ácidos e bases de Pearson, que considera o alumínio um ácido duro com afinidade para formar complexos estáveis com bases duras, as quais devem possuir grupamentos hidroxilas e carboxílicos ionizáveis e não ionizáveis (da Costa, 2008; Flaten, 2002). Segundo Painter (1998) citado em da Costa (2008), íons metálicos trivalentes como o Al^{3+} formam ligações mais fortes com as melanoidinas do que os íons metálicos divalentes ou monovalentes.

Porém esse resultado não indica que o Al não complexe com os outros compostos orgânicos naturais da planta, pois os compostos fenólicos e flavonóides, bem como os ácidos clorogênicos apresentam sítios favoráveis a complexação em sua estrutura (Alberti *et al.*, 2003; da Costa, 2008; da Costa *et al.*, 2009; Street *et al.*, 2007).

A Figura 36 mostra um gráfico referente a uma correlação entre o Al-Lábil e os flavonoides das amostras comerciais de erva-mate de chimarrão. Foram escolhidos os flavonoides para esse estudo devido a evidências citadas na literatura (Alberti *et al.*, 2003; da Costa, 2008; da Costa *et al.*, 2009; Street *et al.*, 2007).

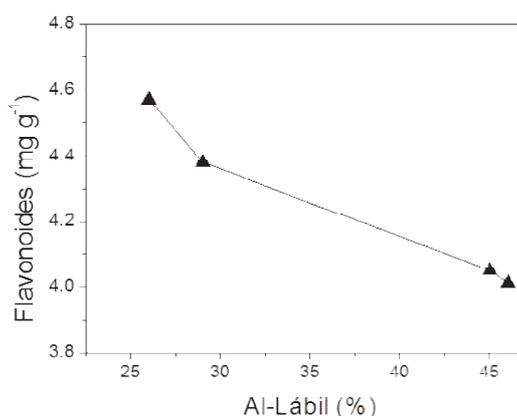


Figura 36. Avaliação entre a porcentagem de alumínio lábil com flavonoides nas infusões de erva-mate de

chimarrão.

Nota-se através da Figura 36, que a labilidade do alumínio é diminuída quando se aumenta a concentração de flavonoides. Bem como quando a porcentagem de alumínio lábil é aumentada, um menor teor de flavonoides é observado. Dessa forma, é possível sugerir que provavelmente o alumínio esteja se complexando a esse composto orgânico.

Considerando que os compostos fenólicos juntamente com os flavonoides possuem sítios de complexação de metais através de suas hidroxilas, pode-se considerar que tal sugestão seja válida (Alberti *et al.*, 2003; da Costa *et al.*, 2009; Street *et al.*, 2007).

Portanto, a ingestão de infusões de erva-mate da região de Guarapuava-PR não apresentam valores de alumínio mais alarmantes devido ao processo de complexação do mesmo com alguns compostos orgânicos naturais da planta.

Neste sentido, acredita-se que a melhor maneira de se consumir a erva-mate é através das infusões frias conhecidas como tererê, pois apresenta baixa biodisponibilidade do alumínio. As infusões de chá-mate podem ser uma alternativa para o consumo de erva-mate através de infusão quente.

6. CONCLUSÕES

O desenvolvimento do protocolo analítico voltado a análise de especiação de alumínio por voltametria adsortiva de redissolução catódica e pulso diferencial empregando vermelho de alizarina S (DASA) como agente complexante, mostrou-se promissor para a análise em concentrações traço de alumínio.

Os parâmetros voltamétricos foram otimizados, o que permitiu a obtenção de elevada sensibilidade do método. A validação do método proposto mostrou que o protocolo analítico pode ser aplicado em amostras de infusão de erva-mate com adequada precisão e exatidão. Além disso, algumas vantagens podem ser relatadas tais como o baixo custo das análises, e rapidez, além da ausência de procedimentos de pré-tratamento da amostra.

As amostras de erva-mate mostraram que a biodisponibilidade do alumínio ultrapassa as recomendações semanais de consumo de acordo com a OMS. Excetuando a erva-mate de tererê.

Pode-se dizer que a erva-mate possui concentrações elevadas de compostos fenólicos e flavonoides. A erva-mate também apresenta potente inibição contra radicais livres através da atividade antioxidante.

Sugere-se que o alumínio presente nas infusões de erva-mate esteja complexado com as melanoidinas, bem como aos compostos fenólicos e flavonoides. Com isso, a toxicidade do mesmo pode ser reduzida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTI, G., *et al.*, Determination of the total concentration and speciation of Al(III) in the tea infusions. *Journal Inorganic Biochemistry*. v.97, p. 79, **2003**.
- ALMEIDA, P, J, F,;Aplicações analíticas da voltametria de adsorção. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Portugal, **2000**.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução – RE nº 899, 29 de maio de **2003**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em dezembro de 2012.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances & Disease Registry. *Aluminium*. p.175. **2012**. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp22-c6.pdf>. Acessado em janeiro de 2013.
- BARTZ, F. R. et al. Análise de metais em amostras comerciais de erva-mate da região sul do Brasil. *Alim. Nutr.*, Araraquara. v. 21, n. 2, p. 259-265, **2010**.
- BASTOS, D. H. M., *et al.*, Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. *Journal of Food Composition and Analysis*.v. 19, p. 539, **2006**.
- BI, S. et al.; Analytical methodologies for aluminium speciation in environmental and biological samples – a review. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, v. 370, p. 984–996, **2001**.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, v. 26,p. 1199-1200.**2002**.
- BRITO, J. J. F. et al.; Fast Determination of Aluminium Reactive to 1,2-Dihydroxyanthraquinone-3-sulfonic Acid in Sea-water. *Analyst*, v. 119, p. 1953, **1994**.
- CAMPOS, M. L. A. M., BENDO. A., VIEL, F. C., Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle da contaminação de metais traço em águas naturais. *QuimicaNova*,v. 25, n. 5, p. 808-813, **2002**.

- CARDOZO JR E. L. *et al.* Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*. v. 20, p. 553–558. **2007**.
- CARVALHO, M. L. de.; et al., Determination of aluminium as contaminant in dialysis concentrates by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*. v.546, p. 79-84, **2005**.
- CHAVES, H. M. et al; Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, **2007**.
- COSTA, A. G. da; Especificação e biodisponibilidade operacional do alumínio em amostras de infusões de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) destinadas ao preparo do chá-mate e do chimarrão. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, **2008**.
- da COSTA, A. M. G.; *et al*; Fractionation of Aluminum in Commercial Green and Roasted Yerba Mate Samples (*Ilex paraguariensis* St.Hil.) and in Their Infusions. *Journal. Agric. Food Chemistry*.,v. 57, p. 196–200, **2009**.
- da SILVA, A. M. M. et al.; Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. *Journal Brazilian Nefrol.*; v. 18, n. 2, p. 180-188, **1996**.
- de la GUARDIA, M. *et al.*; Especificação de arsênio – Revisão. *Química Nova*. v. 23. **2000**.
- DIAS, J. F., et al; The study of the influence of industrial processing on the elemental composition of mate tealeaves (*Ilex paraguariensis*) using the PIXE technique. *Food Science and Technology*. v. 42, p. 74–80, **2009**.
- dos ANJOS, V. E., Especificação de cobre e arsênio no complexo estuarino da baía de Paranaguá. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR. p. 20 – 61, **2006**.
- dos ANJOS, V. E., *et al.*; Comparação da labilidade de metais empregando voltametria, difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) e modelo computacional. *Química Nova*, v. 33, n.6, p. 1307-1312, **2010**.
- dos ANJOS, V. E., Desenvolvimento e avaliação de sensores em difusão em filmes finos por

- gradiente de concentração (DTG) para o estudo de especiação de metais em águas naturais. Tese de Doutorado. Departamento de Química. Universidade Federal do Paraná – UFPR. **2010**.
- DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos. Documento de caráter orientativo. Revisão 04, julho **2011**. P. 7-11.
- DOWNARD, A. J.; *et al.*; A voltammetric study of the aluminium complexes of catechol and 1,2-dihydroxyanthraquinone – 3 sulfonic acid. New Zeland, **1996**.
- DOWNARD, A. J.; *et al.* *Analytical Chim.Acta.* v. 349, p. 111, **1997**.
- DRISCOLL, C. T., *Int. J. Environ. Analytical Chemistry.* v. 16, p. 267, **1984**.
- DUCAT, G. Avaliação da Correlação de Íons Metálicos e Compostos Fenólicos em Plantas Medicinais. Dissertação de mestrado. Departamento de Química – DEQ. Universidade Estadual do Centro Oeste – Unicentro. Guarapuava – PR, **2009**.
- DUCAT, G., QUINÁIA, S. P., Avaliação do teor de minerais da *Ilex paraguariensis* da região Centro-Oeste do Estado do Paraná. *Revista Ciências Exatas e Naturais.* v.6, p. 39, **2004**.
- DUTRA, F. L. G. e RIBANI, R. H.; Determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência isocrática durante estacionamento da erva-mate. *Química Nova.* v. 33, n. 1, 119-123, **2010**.
- ERVA-MATE 81. *Produtos*. Disponível em:
http://www.ervamate81.com.br/modules/catads/adsitem.php?ads_id=16. 06. dez. 2012.
- ESMELINDRO, M. C., *et al.* Caracterização físico-química da erva-mate: influência das etapas do processo industrial. *Ciência Tecnologia Alimentos.* V. 22, n. 2, p. 193-204, **2002**.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em:
ftp://ftp.fao.org/ag/agn/jecfa/JECFA_74_Summary_Report_4July2011.pdf. 12. set. **2012**.
- FERNANDES, S. M., *et al.*, *Revista Brasileira de Agrociência.* v.7, n 3, p.197-199, set-dez, **2001**.
- FILHO, E. e CHIERICI, G. O.; Estudo voltamétrico do complexo de cobre (II) com o ligante vermelho de alizarina S, adsorvido na superfície do eletrodo de grafite pirolítico. *Química*

Nova. v. 22, p. 312, **1999**.

FILIP, M. S. R.; LOTITO, M. S. S. B.; FERRARO, G.; FRAGA, C. G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. *Nutrition Research*, Oxford, v. 20, p. 1437-1446, **2000**.

FINGER, D. Estudo da composição química do extrato oleoso de própolis da região de Prudentópolis. Dissertação de mestrado. Departamento de Química. Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava – PR, **2009**.

FLATEN, T. P. Aluminum in tea – concentrations, speciation and bioavailability. *Coord.Chem. Rev.* v. 228, p. 385, **2002**.

FURGERI, C. *et al.*, Evaluation of phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) processed by gamma radiation. *Radiation Physics and Chemistry*.v. 78, p. 639, **2009**.

GHANATI, F.; MORITA, A.; YOKOTA, H. Growth characteristics of tea plants and tea fields in Japan. *Soil Science and Plant Nutrition*, v. 51, n. 5, p. 625-627, **2005**.

GIULIAN, R.; DOS SANTOS, C. E. I.; SHUBEITA, S. M.; SILVA, L. M.; DIAS, J. F.; Elemental characterization of comercial mate lea teaves (*Ilex Paraguariensis*) before and after hot water infusion using ion bean technique. *Journal Agriculture Food Chemical*.v. 55, p. 741, **2007**.

GNOATTO, S. C. B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 16, p. 723-726, **2005**.

GORBO-NETO, L., LOPES, N.P., Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo demetabólitos secundários. *Química Nova*. v.30,2, p. 374-381, **2007**.

HANASAKI, Y., OGAWA, S., FNKUI, S.; The correlation between active oxygensscavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biol. Med*.v. 16, p. 845-850, **1994**.

HENZE, G. Introduction to polarography and voltammetry. Suiça: Metrohm. **2003**.

HERNADEZ-BRITO J.J., et al. Fast Determination of Aluminium Reactive to 1,2 – Dihidroxyantraquinone – 3 – sulfonic acid in Sea-Water. *Analyst*, v. 119, **1994**.

- IBGE, Produção agrícola municipal: culturas temporárias e permanentes 2010. Instituto brasileiro de geografia e estatística, v. 37. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2010/PAM2010_Publicacao_completa.pdf. 24.jul.2012.
- JACQUES, R. A.; ARRUDA, E. J. ; OLIVEIRA, L. C. S.; OLIVEIRA, A. P.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V.; CARAMÃO, E. B. Influence of agronomic variables on the macronutrient and micronutrient contents and thermal behavior of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p.7510-7516, **2007**.
- Jr CARDOZO, E. L. *et al.*, Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*.v. 20, p. 554, **2007**.
- MAZZAFERA, P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. *Food Chemistry*. v. 60, n. 1, p. 67-71, **1997**.
- MALAVOLTA, E. e HEINRICHS, R. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Ciência Rural*, Santa Maria, v.31, n.5, p.781-785, **2001**.
- MARCHISIO, P. F. *et al.*; On-Line preconcentration/determination of lead in *Ilex paraguariensis* samples (mate tea) using polyurethane foam as filter and USN-ICP-OES. *Journal of Hazardous Materials*. v.124, p. 113-118. **2005**.
- MENDES, R. M. O., *Caracterização e Avaliação da erva-mate (Ilex Paraguariensis St. Hil.), beneficiada no estado de Santa Catarina*. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-**2005**.
- METROHM, VA Application Work AW CH4-0494-12.**2009**.
- PEREIRA, M. S. S., *Especiação e Remoção de Arsênio de Águas Utilizando Voltametria de Redissolução Catódica e Processos Oxidativos Avançados*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas-**2005**.
- POSCHENRIEDER. C., *et al.* A glance into aluminum toxicity and resistance in plants. *Science of the total environment*. 356–368. **2008**.

- REPULA, C. M. M., *Quantificação de contaminantes metálicos em espécies bioindicadoras como ferramenta em estudos de impacto ambiental*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Centro Oeste. Guarapuava – **2009**.
- RODRIGUES, E. R. V., *Efeito antioxidante da erva mate (Ilex Paraguariensis St. Hil.) em volutários sadios*. Dissertação de mestrado. Departamento de ciências da saúde – Universidade São Francisco (USF). Bragança Paulista-**2009**.
- SAHITO, S. R.; *et al*; The contents of fifteen essential, trace and toxic elements in some green tea samples and in their infusions. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, Karachi, v. 27, 1, p. 43-48, **2005**.
- SANCHEZ-MORENO, C., LARRAURI, J.A., SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure theantiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 76, p. 270-276.**1998**.
- SANTOS, M. H.; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. S.; ABREU, C. M. P.; GOUVÊA, M. C. P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividadeantioxidante do café. *Química Nova*, v. 30, p. 604-610, **2007**.
- SEAB – Secretaria de estado de agricultura e do abastecimento, Departamento de economia rural – DERAL, Governo do estado do Paraná. Disponível em: www.agricultura.pr.gov.br dia 01.11.**2012**.
- SILVA, L. O. C., Voltametria adsortiva com redissolução catódica e pulso diferencial em misturas de íons metálicos: uma análise exploratória. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, **2007**.
- SINGLETON, V. L., ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of total phenolics withphosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology andViticulture*, v. 16, p. 144-158.**1965**.
- SHAGHAGHI, M.; MANZOORI, J.L.; JOUYBAN, A., Determination of total phenols in teainfusions, tomato and apple juice by terbium sensitized fluorescence method as naalternativeapproach to the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method. *Food Chemistry*.v.108, p. 695–701,**2008**.
- SIMÕES, C. M. O.;*et al.*, *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5º edição. UFRGS.

2004.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*. Quinta Edição, Editora Bookman, São paulo, **2002**.

SOARES. L. B. S; Avaliação da utilização de diferentes ligantes para a determinação de Alumínio por Voltametria Adsorptiva de Redissolução Catódica em amostras de plantas medicinais. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá - PR, **2008**.

SOUSA C. M. M., *et al.* Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. *Quimica Nova*, v. 30, No. 2, p. 351-355, **2007**.

STREET, R.; *et al.*; Total content and speciation of aluminium in tea leaves and tea infusions. *Food Chemistry*, v. 104, p. 1662–1669, **2007**.

STREIT, N. M. *et al.*; Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (*Ilex paraguariensis*). *Food Chemistry*. v. 102, p. 560 – 564. **2008**.

SUN, T.; TANUMIHARDJO, S. A. An integrated approach to evaluate food antioxidant capacity. *Journal of Food Science*, v. 72, p. 159-165, **2007**.

TEMPLETON, D. M. *et al.*, Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. IUPAC - INTERNATIONAL UNION FOR PURE AND APPLIED CHEMISTRY.; *Pure and Applied Chemistry* v. 72, p. 1453–1470, **2000**.

VAN DEN BERG, *et al.*; The determination of aluminium in seawater and freshwater by cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, v. 188, p. 177 – 185, **1986**.

WANG, X.; *et al.*; Determination of the speciation of aluminum(III) in natural waters by adsorption stripping voltammetry and complexation with AlIII–solochrome violet RS. *Analytica chimica acta*. Department of Chemistry, Nanjing University, China, **2001**.

WANG, HE-YA *et al.*, Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*. v. 128, p. 573–584. **2011**.

WOOD, R. How to validate analytical methods. *Trends Analytical Chemistry*. v. 18, p. 624-

632. **1999.**

WROBEL, K.; WROBEL, K.; URBINA, E. M. C. Determination of total aluminum, chromium, copper, iron, manganese, nickel and their fractions leached to the infusions of black tea, green tea, Hibiscus sabdariffa, and Ilex paraguariensis (mate) by ETA-AAS. *Biological Trace Element Research*, New Jersey, v. 78, n. 1- 3, p. 271-280, **2000.**

YOKEL, R. A.; McNAMARA, P. J. Aluminium toxicokinetics: an updated minireview. *Pharmacology & Toxicology*, v. 88, p. 159-167, **2001.**

YOKEL, R. A.; FLORENCE, R. L. Aluminum bioavailability from the approved foodadditive leavening agent acidic sodium aluminum phosphate, incorporated into abaked good, is lower than from water. *Toxicology*, v. 227, p. 86-93, **2006.**

ZATTA, P.; LUCCHINI, R.; RENSBURG, S. J.; TAYLOR, A. The role of metals in neurodegenerative processes: aluminum, manganese, and zinc. *Brain Research Bulletin*, v. 62, n. 1, p. 15-28, **2003.**