

CURSO DE RESIDÊNCIA MULTIPROFISSIONAL EM SAÚDE NA ÁREA DE
VIGILÂNCIA SANITÁRIA COM ÊNFASE NA QUALIDADE DE PRODUTOS,
AMBIENTES E SERVIÇOS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Priscila Paula Duboc

**DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO, CÁDMIO E CHUMBO NAS FOLHAS E NA
INFUSÃO DE CHÁS DE *Camellia sinensis* COMERCIALIZADOS NO RIO DE
JANEIRO, BRASIL**

Rio de Janeiro

2015

Priscila Paula Duboc

DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO, CÁDMIO E CHUMBO NAS FOLHAS E NA
INFUSÃO DE CHÁS DE *Camellia sinensis* COMERCIALIZADOS NO RIO DE
JANEIRO, BRASIL

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de Especialista.

Preceptor: Dra. Lisia Maria Gobbo dos Santos

Tutor: Dra. Silvana do Couto Jacob

Rio de Janeiro

2015

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Duboc, Priscila Paula

Determinação de arsênio, cádmio e chumbo nas folhas e na infusão de chás de *Camellia sinensis* comercializados no Rio de Janeiro, Brasil . / Priscila Paula Duboc. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

51 f. : il.

Trabalho de conclusão (Residência em Vigilância Sanitária) – Programa de Residência Multiprofissional em Saúde na Área de Vigilância Sanitária com Ênfase na Qualidade de Produtos, Ambientes e Serviços, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2015.

Preceptor: Lisia Maria Gobbo dos Santos. Tutor: Silvana do Couto Jacob

1. Chá. 2. *Camellia sinensis*. 3. Contaminação de Alimentos. 4. Arsênio. 5. Cádmio. 6. Chumbo. 7. Controle de Qualidade. I. Título

Priscila Paula Duboc

DETERMINAÇÃO DE ARSÊNIO, CÁDMIO E CHUMBO NAS FOLHAS E NA
INFUSÃO DE CHÁS DE *Camellia sinensis* COMERCIALIZADOS NO RIO DE
JANEIRO, BRASIL

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em
Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção
do grau de Especialista.

Aprovado em 09 de fevereiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Christina Maria Queiroz de Jesus Moraes
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Bernardete Ferraz Spisso
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Lisia Maria Gobbo dos Santos (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico esse trabalho ao meu marido, Fábio,
que sempre me apoiou nas minhas escolhas e
ao meu filho felino, Jac, pelas distrações.

AGRADECIMENTO

A Deus.

Aos meus colegas de residência.

À minha irmã de consideração e parceira de laboratório: Ana Victoria.

As amigas que fiz durante o curso: Bianca, Shaiene, Julia, Cristiane e Jéssica.

Aos integrantes do setor de contaminantes inorgânicos, em especial a Prof.^a Silvana, minha tutora, e Dr.^a Lisia, minha preceptora, pela paciência e pelos ensinamentos compartilhados.

A minha mãe, pelas análises estatísticas.

Ao INCQS pela oportunidade.

Ao Ministério da Saúde pela bolsa.

Não tenha medo da grandeza,
Alguns nascem grandes,
Alguns alcançam a grandeza
E alguns têm a grandeza imposta a eles.

William Shakespeare

RESUMO

Devido ao seu aroma, sabor e efeitos sobre a saúde o chá de *Camellia sinensis* se tornou a bebida mais consumida depois da água (em torno de 18 a 20 bilhões de xícaras por dia no mundo). As folhas de *C. sinensis* são processadas de diversas formas, produzindo diferentes tipos de chás, os principais são o chá preto, o verde e o branco. Atualmente, o chá é considerado um alimento funcional, conferindo inúmeros benefícios à saúde humana quando consumido diariamente. Em contrapartida, alguns estudos evidenciaram efeitos danosos do chá à saúde, relacionando alguns de seus componentes orgânicos ou metais com neoplasias malignas, problemas renais, entre outros. A qualidade do chá é influenciada pelos componentes orgânicos e inorgânicos das folhas, que funcionam como precursores e são alterados durante a sua transformação (aquecimento e oxidação) em substâncias que determinam o sabor. Pode haver acúmulo de metais prejudiciais à saúde humana, desse modo, o teor de metais tem sido considerado atributo de qualidade, sendo utilizado inclusive para inferir sobre o país de origem do chá. A presença de matéria estranha é outro parâmetro utilizado no controle de qualidade do chá, sendo avaliadas as condições e práticas inadequadas durante as fases de produção, armazenamento e distribuição de alimentos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de contaminantes inorgânicos nas folhas e na infusão e de matérias estranhas em amostras de chás de *C. sinensis*. Para a determinação de metais foram analisadas 16 amostras de chás (6 verdes, 5 brancos e 5 pretos), tanto nas folhas quanto nas infusões. As folhas foram submetidas a uma digestão ácida (HNO_3) em micro-ondas e transferidas para balões volumétricos de 25 mL. As infusões foram realizadas de acordo com as indicações dos fabricantes e adicionadas de HNO_3 a 10 %. A leitura das concentrações foi feita em um ICP-MS. A presença de matéria estranha foi avaliada em 10 amostras, utilizando tamis 20 ABNT para separação das frações e posterior análise em lupa. A concentração de As, Cd e Pb nas folhas de chá foram 0,03 a 2,1 mg kg^{-1} ; 0,01 a 0,09 mg kg^{-1} e 0,02 a 3,6 mg kg^{-1} , e a concentração nas infusões foram <0,005 a 0,007 mg L^{-1} ; <0,005 a 0,0007 mg L^{-1} e <0,005 a 0,015 mg L^{-1} . A transferência de metal das folhas de chá para a infusão não foi significativa. A concentração de Pb nas folhas de chá foram superiores do que os limites determinados pela ANVISA em 9 das 16 amostras analisadas. Não foi possível avaliar a presença de matéria estranha devido a grande pulverização das amostras. Os resultados obtidos sugerem um problema recorrente de contaminação. A pulverização dificulta não só a detecção da matéria estranha, mas também a avaliação de possíveis fraudes. Além disso a popularização e a alta ingestão dos chás de *C. sinensis* indicam que deve-se dar mais atenção aos riscos associados à ingestão reiterada, visto que os metais se acumulam no organismo e podem gerar enfermidades ao longo dos anos.

Palavras-chave: Chá, ICP-MS, *C. sinensis*

ABSTRACT

Camellia sinensis tea became the most consumed beverage after water (around 18-20 billion cups per day in the world), due to its aroma, flavor and health effects. The leaves of *C. sinensis* are processed in different ways, making different types of teas, the main ones are black, green and white teas. Currently, tea is considered a functional food, providing numerous benefits to human health if consumed daily. In contrast, some studies have shown that the tea have harmful effects on health, relating some of his organic compounds or malignancies metals, kidney problems, and others diseases. The quality of the tea is influenced by the organic and inorganic components of the leaves, which act as precursors and are changed during heating and oxidation process for determining the flavor substances. The accumulation of metals can be harmful to human health, thus the metal content has been considered quality attribute, being used to infer about the origin country of tea. The presence of foreign matter is another parameter used for controlling quality of tea, and evaluated the conditions and inadequate practices during the stages of production, storage and distribution. The objective of this study was to evaluate the presence of inorganic contaminants in leaves and infusion and evaluate the presence of foreign matter in samples of *C. sinensis* teas. For the determination of trace metals were analyzed 16 samples of teas (6 green, 5 black and 5 white), in leaves and their infusions. The leaves were subjected to acid digestion (HNO_3) in a microwave and transferred to 25 ml volumetric flasks. Infusions were carried out according to the indications of the manufacturer and added to 10% HNO_3 . The determination of concentrations was made in an ICP-MS. The presence of foreign matter was evaluated in 10 samples using 20 ABNT sieve to separate the fractions and further analysis in magnifying glass. The concentration of As, Cd and Pb in the tea leaves were 0.03 to 2.1 mg kg^{-1} ; 0,01 to 0.099 mg kg^{-1} and 0.02 to 3.6 mg kg^{-1} , and the concentration of the infusions were <.005 to 0.007 mg L^{-1} ; <0.0007 to 0.005 mg L^{-1} and <0.005 to 0.015 mg L^{-1} , there was almost no metal transfer tea leaves for infusion. The concentration of Pb in tea leaves were higher than the limits set by ANVISA in 9 of the 16 samples analyzed. It was not possible to assess the presence of foreign matter due to the dispersed sample. The results suggest a recurring problem of contamination. Spraying hampers not only detection of foreign matter, but also the evaluation of possible fraud. Furthermore, the popularity and high intake of *C. sinensis* teas indicates that the risks associated with repeated intake has to be more attention, since the metals accumulates in the body and can cause illnesses over the years.

Key words: Tea, ICP-MS, *C. sinensis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma do processo de obtenção dos diferentes tipos de chá de <i>Camellia sinensis</i>	14
Figura 2 - Capacidade analítica de alguns métodos e da química clássica.....	22
Figura 3 – Desenho esquemático de um ICP-MS com quadrupolo.....	23
Figura 4 – Superfície abaxial: detalhe da cicatriz deixada por um tricoma (seta vermelha), presença de estômatos anomocíticos inseridos no mesmo nível das células epidérmicas (seta azul).....	33
Figura 5 – Superfície abaxial: presença de tricomas unicelulares longos, fixados à epiderme e circundados por células epidérmicas em roseta (seta vermelha); presença de vários estômatos anomocíticos (seta azul).....	33
Figura 6 – Concentrações de arsênio, cádmio e chumbo presentes nas 16 amostras analisadas.....	38
Figura 7 – Concentrações de arsênio, cádmio e chumbo presentes nas amostras analisadas de (A) chá branco, (B) chá verde e (C) chá preto.....	39
Figura 8 – Concentrações de (A) arsênio, (B) cádmio e (C) chumbo nas 16 amostras analisadas.....	40
Figura 9 – Gráfico de dispersão das concentrações de arsênio, cádmio e chumbo para as 16 amostras analisadas.....	41
Figura 10 – Visualização do chá verde	42
Figura 11 – Matéria estranha encontrada em amostra de chá de <i>C. sinensis</i>	43
Figura 12 – Estômatos amonocíticos observados na amostra Lv.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição (%) do chá verde, chá preto e da infusão de chá preto.....	15
Tabela 2 – Principais grupos de polifenóis, exemplo de substância presente no grupo e alimento fonte dessa substância.	16
Tabela 3 – Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos (arsênio, cádmio e chumbo) em chá, erva mate e outros vegetais para infusão.....	20
Tabela 4 – Programa <i>Leaves and Vegetables</i> do micro-ondas utilizado para a digestão das amostras.....	28
Tabela 5 – Comparativo entre as técnicas de ICP-MS e GFAAS.....	29
Tabela 6 – Condições experimentais usadas no ICP-MS para a determinação de contaminantes inorgânicos em folhas e infusões de chá de <i>C. sinensis</i>	30
Tabela 7 – Massa dos isótopos de As, Cd e Pb, seus limites de detecção e desvio padrão relativo, utilizando Rh como padrão interno.....	31
Tabela 8 – Concentração (mg kg^{-1}) de arsênio nas folhas digeridas de chá de <i>Camelia sinensis</i> ($n = 2$).....	35
Tabela 9 – Concentração (mg kg^{-1}) de cádmio nas folhas digeridas de chá de <i>Camelia sinensis</i> ($n = 2$).....	35
Tabela 10 – Concentração (mg kg^{-1}) de chumbo nas folhas digeridas de chá de <i>Camelia sinensis</i> ($n = 2$).....	36
Tabela 11 – Relação da maior concentração encontrada nas infusões de chás com o teor máximo permitido para padrão de potabilidade da água.....	37
Tabela 12 – Amplitudes amostrais (AA) para as concentrações de arsênio, cádmio e chumbo, incluindo e excluindo os valores aberrantes da amostra Cb.	40
Tabela 13 – Percentual de integridade da amostra.....	42

LISTA DE SIGLAS

a.C.	Antes de Cristo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
EGCG	Galato-epigallocatequina
FAAS	Espectrometria de absorção atômica por chama
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GFAAS	Espectrometria de absorção atômica por forno de grafite
ICP OES	Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado
ICP-MS	Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado
IFIC	<i>International Food Information Council</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
ppb	Parte por bilhão
PPO	Enzima polifenol-oxidase
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 O CHÁ.....	13
1.2 QUALIDADE DE CHÁS.....	17
1.2.1 Matéria estranha.....	18
1.2.2 Contaminantes inorgânicos.....	20
1.2.2.1 <i>Arsênio</i>	20
1.2.2.2 <i>Cádmio</i>	21
1.2.2.3 <i>Chumbo</i>	21
1.2.2.4 <i>Análise de contaminantes inorgânicos em alimentos</i>	22
1.3 JUSTIFICATIVA.....	24
2 OBJETIVOS GERAIS	26
2.1 Objetivos Específicos.....	26
3 MATERIAL E MÉTODO	27
3.1 ANÁLISES QUÍMICAS.....	27
3.1.1 Preparo da planta-digerida.....	27
3.1.2 Preparo do chá-infusão.....	28
3.1.3 Instrumentação.....	28
3.1.4 Análises estatísticas.....	31
3.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA.....	31
3.2.1 Homogeneização.....	31
3.2.2 Pesquisa de matéria estranha.....	32
3.2.3 Identificação microscópica da espécie vegetal <i>C. sinensis</i>	32
3.2.4 Integridade da amostra.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 ANÁLISES QUÍMICAS.....	35
4.1.1 Análises estatísticas.....	38
4.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA.....	41
5 CONCLUSÕES	45
6 REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a palavra “chá” é usada popularmente no Brasil como sinônimo de infusão de frutos, folhas, raízes ou ervas como camomila, hortelã, erva-doce, capim-cidreira, entre outros (LORENZI, MATOS, 2008). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os chás são definidos como “produtos constituídos de partes vegetais, inteiras, fragmentadas ou moídas, obtidas por processos tecnológicos adequados a cada espécie, utilizados exclusivamente na preparação de bebidas alimentícias por infusão ou decocção em água potável, não podendo ter finalidades farmacoterapêuticas” (BRASIL chá), sendo que nem todas as infusões são consideradas chás pela ANVISA.

Devido ao seu aroma, sabor e efeitos sobre a saúde o chá de *Camellia sinensis* se tornou a bebida mais consumida depois da água. Estima-se que são consumidos em torno de 18 a 20 bilhões de xícaras por dia no mundo (HILAL, ENGELHARDT, 2007; KARAK, BHAGAT, 2010).

O chá é proveniente de uma planta perene de três diferentes espécies: *Camellia sinensis*, *Camellia assamica* e *Cambodiensis*, sendo cultivada em mais de 45 países, em áreas tropicais e subtropicais com precipitação adequada, boa drenagem e solos ácidos (KARAK, BHAGAT, 2010). A maioria dos chás comerciais surge a partir da folha seca de *Camellia sinensis*, sendo produzidos diferentes tipos devido às diversas formas de processamento. Os principais tipos consumidos são o chá preto e verde, mas recentemente o chá branco tornou-se mais disponível para os consumidores no Ocidente (HILAL, ENGELHARDT, 2007).

Atualmente, o chá é considerado um alimento funcional, conferindo inúmeros benefícios à saúde humana quando consumido diariamente (KHAN, MUKHTAR, 2007). Em contrapartida, alguns estudos evidenciaram efeitos danosos do chá à saúde, relacionando alguns de seus componentes orgânicos ou metais com neoplasias malignas, problemas renais, Mal de Alzheimer, anemia e fluorose dental (LIMA *et al*, 2009).

1.1 O CHÁ

Historicamente, o cultivo da erva *C. sinensis* iniciou-se no Himalaia, por monges budistas, que utilizavam as folhas para o preparo de uma tradicional bebida. Uma lenda chinesa datada de 2737 a.C. descreve os efeitos terapêuticos do chá verde, sendo o primeiro registro que associa a bebida a efeitos benéficos à saúde (SANTOS, 2012).

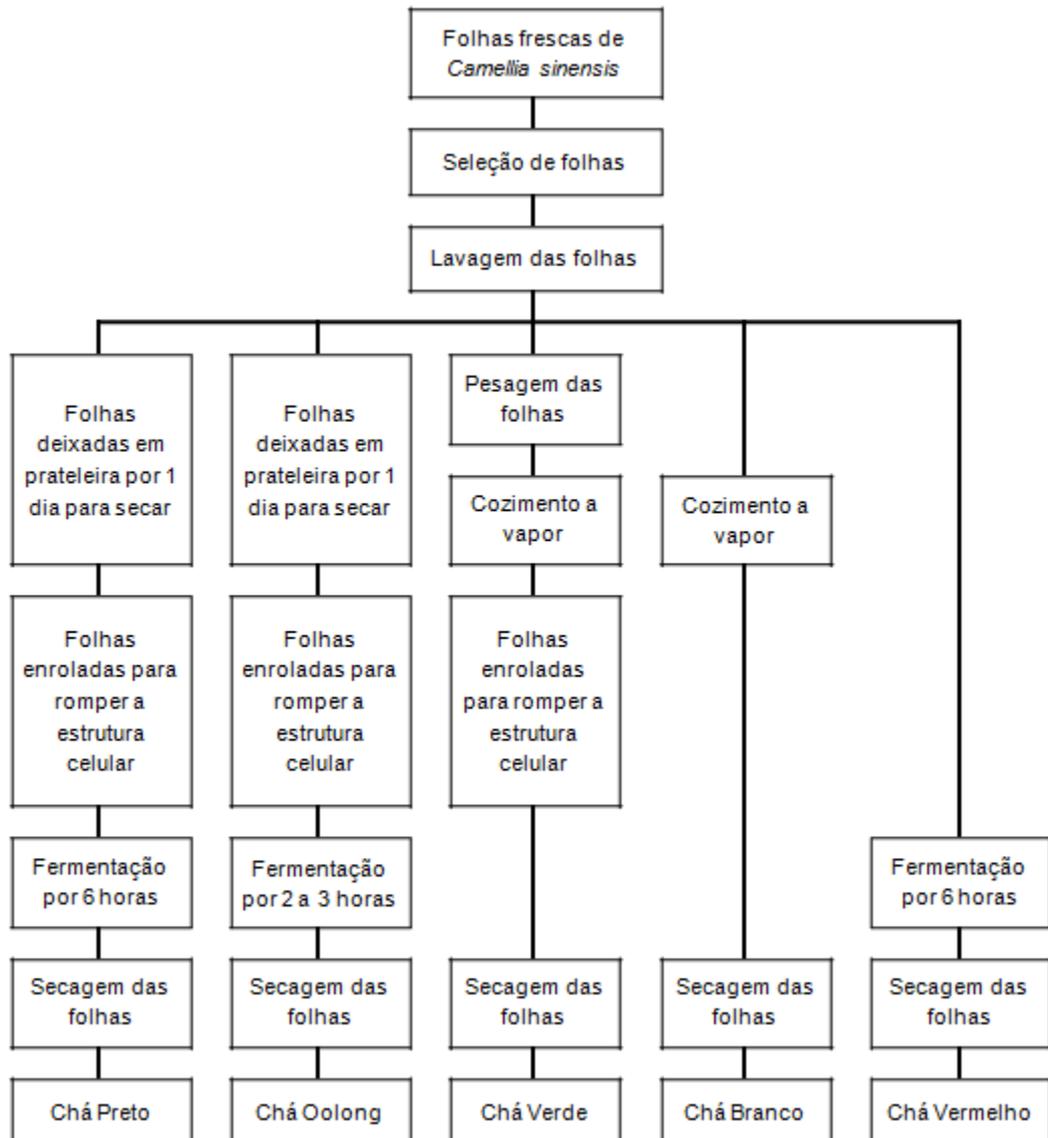
A China atuou ativamente na disseminação da bebida no mundo, já que os produtos orientais exerciam grande fascínio sobre os europeus. Os portugueses e os holandeses foram os primeiros a terem contato com o chá, que era adquirido em Macau, colônia portuguesa na China (PETTIGREW, 1999). O consumo de chá foi introduzido na corte real inglesa por Catarina de Bragança, princesa portuguesa que se casou com o inglês Carlos II em 1660, entretanto o famoso "chá das cinco" se iniciou por volta de 1800 com a duquesa de Bedford (FIRMINO, 2011).

O chá chegou ao Brasil juntamente com a família Real Portuguesa, no início do século XIX, sendo o plantio da *C. sinensis* estimulado por D. João VI para o abastecimento da corte. Entretanto, o plantio foi gradativamente substituído pela cultura do café (FIRMINO, 2011).

A *C. sinensis* é amplamente cultivada no sul da Ásia, incluindo China, Índia, Japão, Tailândia, Sri Lanka e Indonésia (SENGER, SCHWANKE, GOTTLIEB, 2010). Atualmente, a principal região produtora do chá no Brasil é o Vale do Ribeira, em São Paulo (SP), principalmente os municípios de Registro, Pariquera-Açu e Cajati, sendo a colonização japonesa a grande responsável pela expansão dessa cultura na região (LIMA *et al*, 2009).

Existem cinco diferentes tipos de chás provenientes da planta *C. sinensis*: branco, preto, verde, amarelo (oolong) e vermelho (FIRMINO 2011). Um esquema mostrando o processo de obtenção destes chás é apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma do processo de obtenção dos diferentes tipos de chá de *Camellia sinensis*.



FONTE: adaptado de FIRMINO, 2011

O chá branco é o mais sutil de todas as variedades de chá, usando apenas o botão fechado ou as folhas mais novas de cada arbusto, cobertas por pequenos filamentos prateados semelhantes a cabelos, colhidos apenas na primavera. Os brotos são cozidos no vapor e secos logo após a colheita para evitar a oxidação (GONDOIN *et al.*, 2010; HILAL, ENGELHARDT, 2007).

A diferença entre o chá verde e o preto depende de quando as enzimas foliares são inativadas durante o processamento. Na fabricação do chá verde, as enzimas são inativadas imediatamente após a colheita das folhas (TANAKA, KOUNO, 2003), sendo tratadas termicamente (vapor quente ou fritas sem gordura) para a inativação da enzima endógena polifenol-oxidase (PPO), depois é fragmentado e seco. Diferentemente da produção do chá verde, não há a inativação da PPO por calor após a colheita das folhas, ocorrendo uma “fermentação” ou uma fase de oxidação após a fragmentação, conferindo uma coloração escura, que é característica do chá preto. Esse processo oxidativo, catalisado pela PPO, favorece a conversão dos compostos fenólicos simples para formas mais complexas formando uma coloração escura. Como resultado os chás branco, verde e preto diferem em suas características sensoriais e possuem diferentes composições químicas (GONDOIN *et al*, 2010).

Os efeitos benéficos do chá estão relacionados ao teor de polifenóis, que correspondem a cerca de 30% do peso seco das folhas, sendo os flavonóides os mais abundantes, principalmente a galato-3-epigallocatequina (EGCG) (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição (%) do chá verde, chá preto e da infusão de chá preto

Componente	Chá Verde ¹	Chá Preto ¹	Infusão de Chá Preto ²
Proteínas	15	15	traço
Aminoácidos	4	4	3,5
Fibras	26	26	0
Outros carboidratos	7	7	4
Lipídios	7	7	traço
Pigmentos	2	2	traço
Minerais	4	4	4,5
Compostos fenólicos ³	30	5	4,5
Compostos fenólicos oxidados ⁴	0	25	4,5

¹ Dados referentes ao peso seco das folhas

² Tempo de infusão das folhas: 3 minutos

³ Principalmente flavonoides

⁴ Principalmente tearubiginas e teoflavinas

Fonte: CHACO *et al*, 2010

Os polifenóis são os componentes biologicamente ativos, que apresentam propriedades funcionais e que estão relacionados com a qualidade sensorial de alimentos de origem vegetal (coloração, amargor e adstringência). De acordo com o *International Food Information Council* (IFIC) alimentos funcionais são aqueles que provêm benefícios adicionais à saúde aos já atribuídos nutrientes que contêm (LAMARÃO, FIALHO, 2009). A ANVISA alega que propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (BRASIL, 1999).

Os principais grupos de polifenóis estão apresentados na Tabela 2, com um exemplo e seu respectivo alimento de origem.

Tabela 2 – Principais grupos de polifenóis, exemplo de substância presente no grupo e alimento fonte dessa substância.

Grupo de Polifenol	Exemplo	Alimento
ácidos fenólicos	ácido clorogênico	café
Estilbenos	resveratrol	uva
Cumarina	furanocumarinas	alho
Ligninas	lignanas	linhaça
Flavonóides	catequinas	chá

Fonte: FALLER, FIALHO, 2009

O grupo dos flavonóides é o maior e mais estudado grupo, possuindo mais de 5.000 compostos identificados, e tem como principais alimentos-fonte frutas e hortaliças, chás, cacau, soja, dentre outros (FALLER, FIALHO, 2009).

Os polifenóis apresentam ações fisiológicas relacionadas à prevenção de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer, principalmente em função da elevada capacidade antioxidante (FALLER, FIALHO, 2009; HILAL, ENGELHARDT, 2007). O aumento do consumo dos diversos tipos de chás, mas principalmente do chá verde, está relacionado aos efeitos benéficos que a bebida pode trazer para a saúde, sendo associado à redução do colesterol sérico, redução dos riscos de doenças cardiovasculares e câncer, propriedades antialérgicas,

antiesclerótica e antibacteriana, além de possuírem minerais e vitamina K (LIMA *et al*, 2009).

Entretanto, a propriedade que mais favoreceu o aumento do consumo de chá verde é a relação dele com emagrecimento. Diversas dietas para perda de peso a base do chá verde são veiculadas nos meios de comunicação populares, como internet e revistas, indicando até 5 xícaras da bebida por dia. Contudo, a *American Dietetic Association* sugere o consumo de 4 a 6 xícaras de chá verde ao dia, a fim de se obter os efeitos benéficos da bebida à saúde (LAMARÃO, FIALHO, 2009).

Alguns estudos relacionam a indução da perda de peso com o efeito termogênico e com a oxidação lipídica, o que promove o gasto energético, resultante da interação entre as catequinas e a cafeína presentes no chá verde (FREITAS, NAVARRO, 2007), resultando na redução da gordura corporal e nos índices de colesterol séricos.

1.2 QUALIDADE DE CHÁS

Devido ao alto consumo e a associação a efeitos funcionais dos chás de *C. sinensis* é necessário regulamentar as características químicas, físicas e biológicas da bebida a fim de se evitar possíveis riscos à saúde dos consumidores. Um dos principais fatores associados à redução da qualidade do chá, tanto da matéria-prima quanto do produto acabado, é o armazenamento inadequado, que além de gerar perda de princípios ativos do produto, pode favorecer a contaminação por agentes diversos, que por sua vez podem causar danos à saúde do consumidor, além de gerar prejuízos econômicos (FIRMINO, 2011).

A qualidade do chá é influenciada pelos componentes orgânicos e inorgânicos das folhas jovens e dos brotos, que funcionam como precursores e são alterados durante a sua transformação (aquecimento e oxidação) em substâncias que determinam o sabor (LIMA *et al*, 2009).

Apesar de ser de extrema importância a manutenção das características dos chás após a colheita e processamento, outros fatores que afetam as características

da bebida estão relacionados ao local de crescimento da planta, como a altitude, temperatura, umidade e características geoquímicas do solo. Quando cultivados em regiões de altitudes mais altas, temperaturas amenas e baixa umidade, a planta tem crescimento mais lento, com o acúmulo de nutrientes e compostos bioativos, resultando em um chá com qualidade superior das propriedades sensoriais quando comparado com o chá cultivado em regiões de baixa altitude, com temperatura e umidades mais altas (FIRMINO, 2011).

Outros importantes fatores que afetam o crescimento da planta de *C.sinensis* e a qualidade do chá é a composição geoquímica de rochas e solos (LIMA et al., 2009), em parte pelo fato dessa espécie acumular metais essenciais ou tóxicos para maioria das plantas. Como consequência, pode haver acúmulo de metais benéficos ou prejudiciais à saúde humana. Desse modo, o teor de metais tem sido considerado atributo de qualidade, sendo utilizado inclusive para inferir sobre o país de origem do chá (FERNÁNDEZ-CÁCERES et al., 2001).

1.2.1 Matéria estranha

A Resolução RDC nº 14, de 28 de março de 2014 (BRASIL, 2014), estabelece as disposições gerais para avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados, inclusive bebidas e águas envasadas, relacionadas aos riscos à saúde humana. De acordo com a *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2010a), matérias estranhas são quaisquer materiais estranhos no produto associados a condições ou práticas inadequadas na produção, armazenamento ou distribuição; estão incluídos sujidades, material decomposto (tecidos deteriorados devido a causas parasitárias ou não) e diversas substâncias estranhas como areia e solo, vidro, ferrugem, ou outros materiais não pertinentes, excluindo-se as contagens bacterianas. Isto é, entendem-se como sujidades quaisquer matérias indesejáveis oriundas de contaminações provenientes de animais, tais como roedores, insetos, aves ou outro material indesejável devido a condições insalubres.

A presença de matéria estranha é um dos parâmetros utilizados no controle de qualidade do chá, sendo a microscopia a metodologia de análise, pois oferece subsídio para a avaliação de condições e práticas inadequadas durante as fases de produção, armazenamento e distribuição de alimentos (AOAC, 2010a).

Para a RDC nº 14 de 28 de março de 2014 (BRASIL, 2014) matéria estranha é qualquer material não constituinte do produto associado a condições ou práticas inadequadas na produção, manipulação, armazenamento ou distribuição, sendo divididas quanto ao tamanho (macroscópicas e microscópicas), quanto às condições de boas práticas (inevitáveis e indicativas de risco a saúde, indicativas de falhas nas boas práticas de fabricação). Esta legislação estabelece os limites de tolerância de matérias estranhas em alimentos, quanto suas metodologias analíticas. Para matérias estranhas macroscópicas adotam-se as metodologias analíticas estabelecidas no *Macroanalytical Procedures Manual* (FDA) e para as microscópicas adotam-se as metodologias analíticas estabelecidas pela AOAC (BRASIL, 2014).

A contaminação por matéria estranha pode ser avaliada a olho nu na matéria-prima bruta, entretanto, em alimentos triturados ou moídos, a microscopia é essencial, pois é capaz de fornecer informações a respeito das condições higiênicas destes, bem como dos ingredientes constantes da rotulagem, informando se a amostra é pura ou contém alguma mistura estranha, e ainda se esta mistura é uma impureza acidental (sujidade), ou adição intencional (fraude), visando um fim econômico (BARBIERI, 2001). De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA) (USA, 2010) são incluídas como matérias indesejáveis: .

A qualidade de matérias-primas de origem vegetal depende de vários fatores como cultivo, coleta, armazenamento e processamento. Falhas em qualquer etapa do processo produtivo podem acarretar danos à saúde do usuário. Por esse motivo faz-se necessária a avaliação da qualidade dos chás a fim de detectar possíveis contaminantes, adulterações, falsificações presença de micro-organismos (GIL, 2007).

1.2.2 Contaminantes inorgânicos

Os metais pesados constituem a maior fonte poluidora inorgânica de solos e águas, sendo introduzidos no ambiente por meio de fertilizantes, pesticidas, combustão de carvão e óleo, emissões veiculares, mineração, fundição, refinamento e incineração de resíduos urbanos e industriais (FRANCO *et al*, 2011; SINGH *et al*, 2011). A contaminação dos diversos chás de ervas ocorre, geralmente, em consequência da contaminação do solo ou durante a etapa de processamento dos chás, quando as espécies vegetais ficam em contato com os utensílios industriais (HAN *et al.*, 2005; VULCANO, SILVEIRA, ALVAREZ-LEITE, 2008).

A Resolução RDC 42, de 29 de agosto de 2013, que dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos, estabelece os parâmetros de qualidade para os chás quanto às concentrações de arsênio (As), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) (BRASIL, 2013). Os valores de referência podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 – Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos (arsênio, cádmio e chumbo) em chá, erva mate e outros vegetais para infusão

Contaminante Inorgânico	Concentração
Arsênio	0,6 mg kg ⁻¹
Cádmio	0,4 mg kg ⁻¹
Chumbo	0,6 mg kg ⁻¹

Fonte: BRASIL 2013

1.2.2.1 Arsênio

Trata-se de um metalóide cristalino que pode ocorrer em três formas alotrópicas de cores amarela, cinzenta e negra, sendo o vigésimo elemento mais abundante na crosta terrestre. Alguns autores consideram este elemento como metal pesado devido a sua toxicidade sobre o ambiente e os seres vivos (ESTEVEES,

2009). Quando absorvido, o arsênio é armazenado no fígado, rins, coração e pulmões. Uma pequena parte é mantida nos músculos e nos tecidos nervosos e seu acúmulo está associado a doenças como câncer, diabetes, hepatotoxicidade, neurotoxicidade e disfunção cardíaca (SINGH *et al*, 2011). Outros sintomas são dor abdominal, vômito, diarreia, sangue na urina, convulsões, coma e morte, que podem ser confundidas com sintomas de doenças como cólera e pneumonia (HUGHES, 2011; TELLES-PLAZA *et al*, 2012).

1.2.2.2 Cádmio

O cádmio é um poluente ambiental que está presente em alguns alimentos, na fumaça de cigarro e no ar. É absorvido pelo corpo através da alimentação ou respiração. O cádmio é amplamente absorvido e é distribuído igualmente por toda a planta, estando presente nas folhas, frutas e sementes (MORAES, COSTA, PEREIRA, 2012). A intoxicação por cádmio está associada a prevalência de doenças hepáticas, cardiovasculares e do sistema nervoso central, deficiência renal, câncer de mama, efeitos hematológicos e imunológicos, deficiência reprodutiva e de desenvolvimento embrionário (MORAES, COSTA, PEREIRA, 2012; TELLEZ-PLAZA *et al*, 2012; ABERNETHY *et al*, 2010).

1.2.2.3 Chumbo

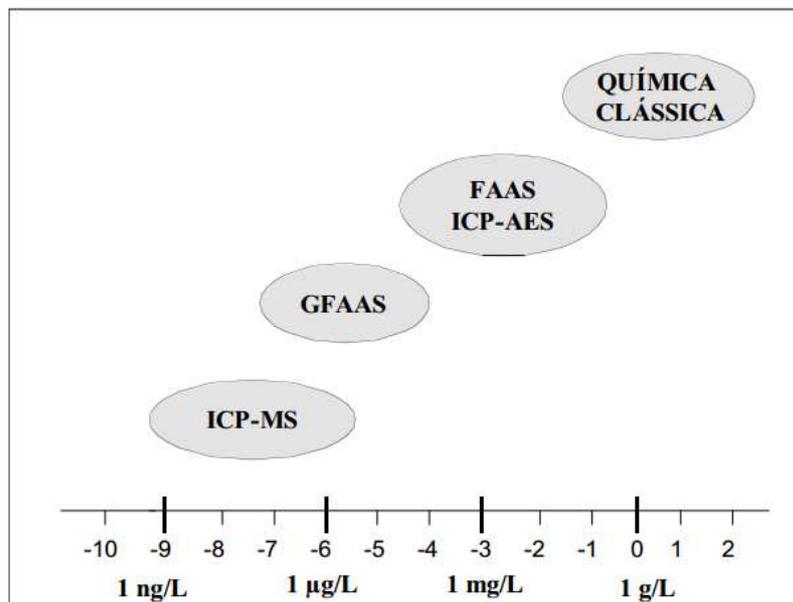
O chumbo é o contaminante ambiental mais comum, estando distribuído por todo o planeta, na forma de sais, ligas metálicas e íons inorgânicos. A alimentação é a principal fonte de exposição ao chumbo, sendo seguida pela respiração e pela ingestão de água (MORAES, COSTA, PEREIRA, 2012). Não apresenta nenhuma função biológica e está associado à anemia crônica, devido à inibição da enzima que catalisa uma etapa essencial na produção de hemoglobina (FRANCO, 2011). A intoxicação por chumbo também está associada a nefrotoxicidade e neurotoxicidade,

resultando na redução do desenvolvimento do sistema nervoso central, principalmente em crianças (MORAES, COSTA, PEREIRA, 2012, SARFO *et al*, 2012).

1.2.2.4 Análise de contaminantes inorgânicos em alimentos

A presença de contaminantes inorgânicos em alimentos pode ser avaliada através das técnicas espectrométricas, que envolvem a espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS), espectrometria de absorção atômica por forno de grafite (GFAAS), espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). A Figura 2 mostra a capacidade analítica dos métodos de detecção de contaminantes inorgânicos.

Figura 2 - Capacidade analítica de alguns métodos e da química clássica.



FAAS - espectrometria de absorção atômica ; GFAAS - espectrometria de absorção atômica com forno de grafite; ICP AES - espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado; ICP-MS - espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado.

Fonte: BABOUR, 2011.

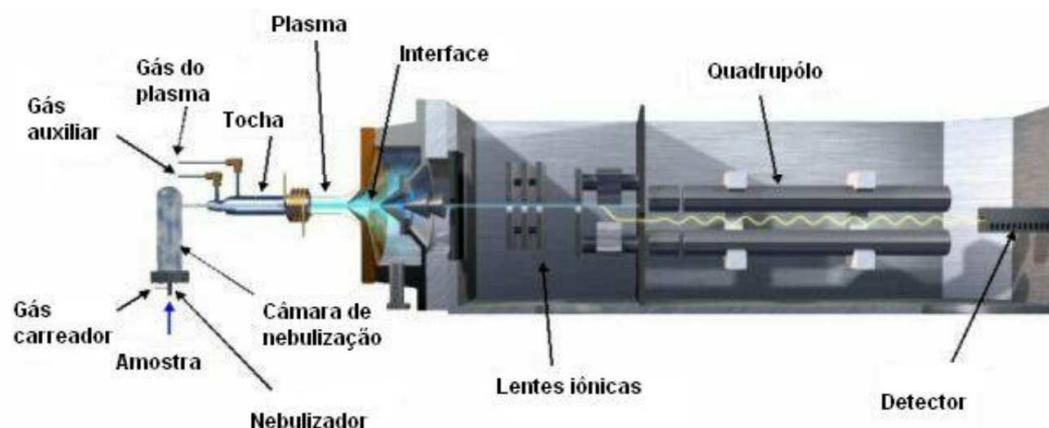
Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado

A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) tem como principal vantagem a análise multielementar simultânea rápida, aliada à alta sensibilidade. É uma técnica analítica instrumental que permite separar espécies iônicas com base em suas relação massa-carga (m/z), sendo possível utilizá-la tanto em análises qualitativas quanto quantitativas, por gerar sinais analíticos proporcionais às concentrações das espécies presentes nas amostras (BABOUR, 2011).

A técnica baseia-se numa fonte de energia capaz de gerar íons, que são carregados para o espectrômetro, onde são separados e enviados ao detector. A separação ocorre através de técnicas eletro-magnéticas, sendo o plasma formado por acoplamento indutivo, uma das fontes de ionização mais utilizadas em espectrômetros de massas (ALMEIDA, 2008).

Os componentes do espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado são os seguintes: sistema de introdução de amostras, tocha fonte de íons, interface (sistema para extração e focalização dos íons, composto de cone de amostragem, cone de separação ou *skimmer* e lentes iônicas), analisador de massas (quadrupolo) e sistema de detecção de íons (Figura 3) (BABOUR, 2011).

Figura 3 - Desenho esquemático de um ICP-MS com quadrupolo.



Fonte: ALMEIDA, 2008

A forma mais utilizada é a introdução de amostras líquidas porque apresenta vantagens de homogeneidade, facilidade de manipulação e disponibilidade de soluções padrão de cada elemento para calibração (BABOUR, 2011). A câmara de nebulização ciclônica proporciona a formação de aerossol com gotas menores, que favorecem a estabilidade do plasma e reduzem o limite de detecção do método, permitindo a detecção de quantidades muito pequenas dos elementos analisados (PETRY, 2005).

A ionização do plasma é uma fonte de energia suficiente para dessolvatar e ionizar a maioria dos elementos em solução. A interface tem como função separar os íons positivos dos elétrons e das espécies moleculares por um potencial negativo, onde os íons positivos são acelerados e focalizados por uma lente magnética de íons para um orifício de entrada de um analisador de massa quadripolar (SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2009). Os íons de interesse são conduzidos de uma extremidade a outra do quadrupolo, por uma diferença de potencial, e atingem o detector, onde ocorre a conversão dos pulsos elétricos em correntes e a amplificação do sinal, que é então processado por um computador (BABOUR, 2011, SKOOG, HOLLER, NIEMAN, 2009).

A ICP-MS é uma ferramenta versátil e largamente usada na identificação dos elementos presentes em diversas amostras. Suas principais aplicações estão na geoquímica, áreas ambientais, biológicas e de alimentos e isso se deve aos baixos limites de detecção, ao seu alto grau de seletividade, à sua razoável precisão e exatidão, à rápida detecção das razões isotópicas, ao pequeno volume de amostras, além, é claro, à capacidade multielementar. Cerca de 90% dos elementos podem ser determinados com limites de detecção na faixa de 0,1 a 0,001 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ppb) em soluções aquosas (NASCIMENTO, 2008).

1.3 JUSTIFICATIVA

Devido aos riscos toxicológicos associados à presença de metais nos alimentos, neste projeto levanta-se a hipótese de que as folhas de chá contêm quantidades de As, Cd e Pb superiores às permitidas, e questiona-se se esses

elementos são lixiviados das folhas de chá para infusão (veja Tabela 1, página 16). Além disso, é importante avaliar a presença de matéria estranha nos chás, visto que esta contribui negativamente para a qualidade dos mesmos.

2 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho é avaliar a concentração de As, Cd e Pb em diferentes marcas e tipos de chás de *Camellia sinensis*, correlacionando as concentrações dos metais nas folhas e na infusão e pesquisar a presença de matéria estranha nas amostras.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectar a presença de As, Cd e Pb nas folhas e nas infusões de chás preto, branco e verde.

Quantificar os metais analisados nas folhas e nas infusões de cada amostra.

Comparar os resultados obtidos para as folhas com os obtidos para as infusões.

Avaliar a presença de matéria estranha nas amostras de chás.

Avaliar a integridade das amostras de chá.

3 MATERIAL E MÉTODO

Para as análises químicas foram adquiridas 16 amostras em mercados na cidade do Rio de Janeiro-RJ e Niterói, de acordo com a disponibilidade, sendo divididas em 6 amostras de chá verde, 5 de chá branco e 5 de chá preto de diferentes marcas (*C. sinensis*), não havendo mais de uma amostra para cada tipo e marca. As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Contaminantes Inorgânicos do Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Foram avaliadas 10 amostras de chá de *C. sinensis* quanto a parâmetros microscópicos, identificação e detecção de matérias estranhas no laboratório de Microscopia de Alimentos do Departamento de Química, do INCQS da FIOCRUZ.

3.1 ANÁLISES QUÍMICAS

Todas as soluções foram preparadas usando água ultrapura, deionizada em sistema de purificação Milli-Q (Millipore). Os reagentes foram adquiridos da empresa Merck e utilizados dentro dos respectivos prazos de validade.

Os padrões analíticos contendo $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$, $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, $1 \mu\text{g L}^{-1}$, $5 \mu\text{g L}^{-1}$, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de arsênio, cádmio, chumbo e 1 % v/v de HNO_3 , usado como conservante foram preparados a partir da diluição de soluções estoque de 1000 mg L^{-1} (PerkinElmer, Estados Unidos da América). Uma solução com 1% v/v, na ausência destes elementos, foi preparada e utilizada como branco. Nos padrões, na solução branco e nas amostras foi adicionado $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Rh, usado como padrão interno.

3.1.1 Preparo da planta-digerida

Para determinação dos contaminantes As, Cd e Pb na planta, os sachês de cada amostra foram abertos e homogeneizados em um recipiente. Foi pesado

aproximadamente 0,6 g de cada amostra em duplicata. As amostras foram transferidas para tubos de teflon e adicionadas de 2 mL de água deionizada (Millipore, Brasil), 2 mL de ácido nítrico Suprapur (Merck, Alemanha) e 1 mL de peróxido de hidrogênio (Merck, Alemanha). O branco de digestão foi a mistura de água, ácido e peróxido de hidrogênio no tubo de teflon. Em seguida as amostras foram digeridas utilizando o micro-ondas modelo SpeedWave (Berghof, Alemanha) e o programa escolhido foi *Leaves and Vegetables* pré-programado pelo equipamento (Tabela 4). Após o resfriamento as amostras foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, d, adicionado padrão interno ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Rh) e completado o volume com água deionizada.

Tabela 4 – Programa *Leaves and Vegetables* do micro-ondas utilizado para a digestão das amostras.

Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Ramp	Tempo (min)	Potência (W)
170	50	5	10	90
200	50	1	15	90
50	0	1	10	0
50	0	1	10	0
50	0	1	1	0

Fonte: micro-ondas modelo SpeedWave - Berghof

3.1.2 Preparo do chá-infusão

Um sachê pesando aproximadamente 1 g de planta seca foi adicionada à 200 mL de água Milli-Q® fervente e deixada por 3 minutos. Após este tempo, o sachê foi retirado, e adicionado de volume suficiente de ácido nítrico Merck® Suprapur para se obter um chá com 1 % de ácido e padrão interno ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Rh). Quando necessário a amostra foi filtrada em peneira de polietileno.

3.1.3 Instrumentação

Embora o laboratório possua outro equipamento capaz de quantificar os contaminantes inorgânicos, a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) foi escolhida por apresentar melhor sensibilidade e praticidade, visto que é uma técnica multi-elementar, quando comparado à técnica de absorção atômica por forno de grafite (GFAAS). A Tabela 5 apresenta as vantagens e desvantagens das duas técnicas de análise.

Tabela 5 – Comparativo entre as técnicas de ICP-MS e GFAAS.

Parâmetro	GFAAS	ICP-MS
Limite de detecção (μL^{-1})	As – 2,0 Cd – 0,3 Pb – 1,58	As – 0,0055 Cd – 0,0050 Pb – 0,0429
Tempo de análise	3 a 4 min por elemento	Todos os elementos em até 1 min por amostra
Precisão	As – 4,5 % Cd – 2,4% Pb – 1,5 %	As – 1,8 % Cd – 2,0 % Pb – 1,6 %
Interferências de matriz	alta	baixa
Linearidade (curva) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	As – 2,0 a 20 Cd - 0,5 a 5,0 Pb – 5,0 a 40,0	0,1 a 10
Número de elementos analisados	Mono-elementar	Multi-elementar
Volume de amostra	Pequeno (1 mL)	Médio (5 mL)
Despesas de funcionamento	Médio	Alto
Custo por elemento analisado:		
Muitas amostras – poucos elementos	Alto	Médio
Muitas amostras – muitos elementos	Alto (5X maior)	Baixo a médio

FONTE: ThermoElemental, 2001

Além das vantagens e desvantagens apresentadas na tabela acima, o efeito de matriz não foi observado na espectrometria de massas, diferentemente do que ocorreu nas análises utilizando a GFAAS, feitas anteriormente pelo laboratório.

Todos os experimentos foram realizados num espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (NexION 300D, PerkinElmer, EUA). O equipamento é equipado com um nebulizador concêntrico (Meinhard), câmara de nebulização ciclônica de vidro, cone, skimmer e hiper-skimmer de níquel. O equipamento foi operado no modo padrão, tempo de permanência de 15 ms, 50 varreduras por leitura, uma leitura por réplica, três repetições. Gás argônio com pureza mínima de 99,996% foi obtido a partir White Martins (São Paulo, Brasil). A avaliação diária de desempenho do instrumento foi feita utilizando uma solução padrão contendo $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Be, Ce, Fe, Na, Li, Mg, Pb, e em meio HNO_3 1 % e os resultados foram comparados com os parâmetros fornecidos pelo fabricante.

Tabela 6 – Condições experimentais usadas no ICP-MS para a determinação de contaminantes inorgânicos em folhas e infusões de chá de *C. sinensis*.

ICP-MS	Condições Experimentais
RF potência	1400 W
Fluxo no nebulizador	$1,0 \text{ L min}^{-1}$
Fluxo do gás auxiliar	1.1 L min^{-1}
Fluxo de argônio (plasma)	17.0 L min^{-1}
Tempo de permanência	15 ms
Modo de operação do detector	Dual
Sweeps	50
Signal measurement	Peak Hopping
Leituras por replicata	1
Auto lens mode	On

A performance analítica do método foi avaliada a cada batelada de análise, através do estudo de recuperação, onde foi adicionado uma quantidade conhecida dos elementos de interesse numa amostra controle. O método mostrou-se bastante exato com uma concordância de 104 % para As, 109 % para Cd e 114 % para Pb

dos valores esperados e precisão superior a 85% conforme recomendação do INMETRO. Os limites de detecção do método podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7 – Massa dos isótopos de As, Cd e Pb, seus limites de detecção e desvio padrão relativo, utilizando Rh como padrão interno.

Elemento	Massa do isótopo (u.m.a.)	Limite de detecção (ng L ⁻¹)	RSD (n=5)	Recuperação
As	75	5.5	1,8%	104 %
Cd	111	4.9	2,0%	109 %
Pb	208	43	1,6%	114 %

3.1.4 Análises estatísticas

Foi utilizada apenas estatística descritiva através da construção de gráficos de coluna. Devido ao número reduzido de amostras analisadas (alto custo das análises e disponibilidade de amostras) e à natureza dos dados, nenhuma inferência era passível de ser feita sobre qualquer população de chás. As análises ficam reduzidas às amostras utilizadas e seus resultados são apenas indicativos.

Foram feitos oito gráficos considerando sempre as concentrações de arsênio, cádmio e chumbo nas amostras: um gráfico de colunas com as três concentrações em todas as amostras, apresentando um panorama geral dos resultados; um gráfico de dispersão com as concentrações dos metais por amostra, com o objetivo de apresentar uma melhor visualização dos metais mais significativos; uma sequência com três gráficos de coluna, cada um deles com as concentrações dos três metais em um único tipo de chá, com a finalidade de verificar uma possível relação entre essas variáveis; e uma sequência de três gráficos de coluna com as concentrações de um único metal em cada uma das amostras, com o objetivo de verificar o comportamento das concentrações de cada um dos metais nas amostras. Para complementar esta última análise, foi feita uma tabela com as amplitudes amostrais considerando as concentrações de um único metal nas amostras.

3.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA E MACROSCÓPICA

3.2.1 Homogeneização

Devido à quantidade limitada do produto, foi feita a homogeneização de 100% do produto contido em cada embalagem, sendo cada sachê aberto de forma a evitar contaminação externa e avaliado o peso final da amostra.

3.2.2 Pesquisa de matéria estranha

As amostras foram passadas em tamis de 20 ABNT (aberturas de 0,84 mm), reservando em separado a parte da amostra retida no tamis e a parte não retida. A parte não retida no tamis foi pesada, obtendo assim a quantidade de pó.

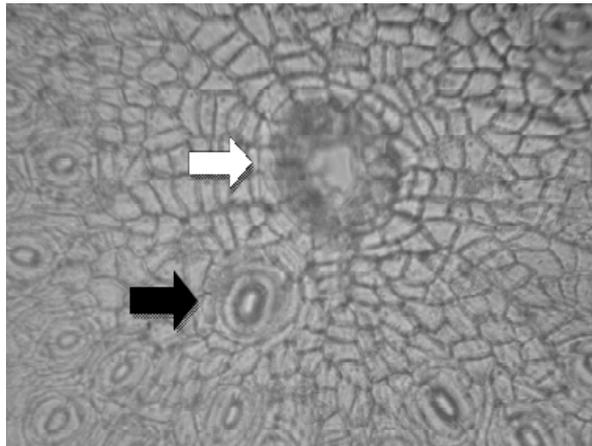
Procedeu-se à observação direta na parte da amostra retida no tamis, onde foi verificada a presença de matérias estranhas macroscópicas. Usou-se o microscópio estereoscópio, nos aumentos 25X e 32X, para avaliar o aspecto morfológico dos frutos e compará-los com padrões e bibliografias de referência com posterior identificação.

3.2.3 Identificação microscópica da espécie vegetal *C. sinensis*.

Para análise dos caracteres microscópicos, as folhas de cada amostra foram hidratadas e em seguida selecionadas. Os fragmentos das folhas dos sachês foram clarificados com hipoclorito de sódio (2,5%) até ficarem transparentes, como descrito em Rodrigues, Atui e Correia (1999). Após a clarificação, o material foliar foi lavado em recipiente com água destilada, sendo posteriormente colocado sobre uma lâmina e coberto por uma lamínula. As lâminas foram visualizadas, fotografadas no microscópio e comparadas buscando identificar os principais marcadores para a morfodiagnose foliar dessa espécie.

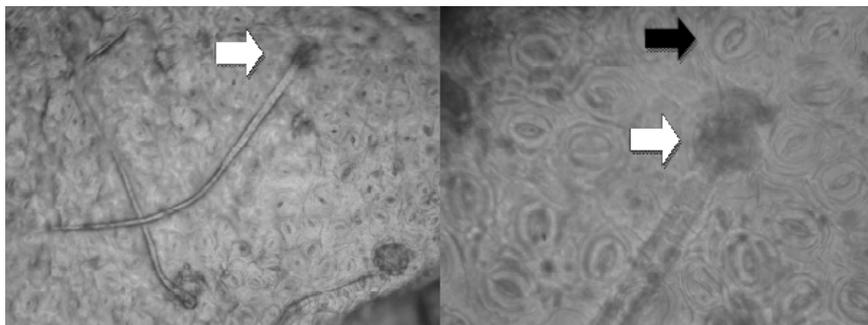
A *Camellia sinensis* é identificada pela presença de estômatos anomocíticos inseridos no mesmo nível das células circunvizinhas na face abaxial (Figura 4) e muitos pelos tectores simples (unicelulares) e longos, de paredes espessadas, com ápice agudo e circundados na base por células epidérmicas em roseta (Figura 5).

Figura 4 – Superfície abaxial: detalhe da cicatriz deixada por um tricoma (seta branca), presença de estômatos anomocíticos inseridos no mesmo nível das células epidérmicas (seta preta).



Fonte: FIRMINO, 2011

Figura 5 – Superfície abaxial: presença de tricomas unicelulares longos, fixados à epiderme e circundados por células epidérmicas em roseta (seta branca); presença de vários estômatos anomocíticos (seta preta).



Fonte: FIRMINO, 2011

3.2.4 Integridade da amostra

A avaliação da integridade média percentual da amostra foi realizada com base no peso obtido em 100% da amostra subtraído do percentual pulverizado que não foi retido pelo tamis de 20 ABNT (Equação 1) (SANTOS, 2012).

Equação 1.

$$IM (\%) = \frac{PA - PP}{100}$$

Onde:

IM - integridade média dos frutos

PA - peso absoluto

PP - peso peneirado

Onde se considerou:

- a) Integridade Alta - presença predominante de folhas íntegras (% Integridade \geq 70%);
- b) Integridade Média - presença significativa de folhas fragmentados e pulverizados (% Integridade entre 40 e 69 %);
- c) Integridade Baixa - presença predominante de frutos fragmentados e pulverizados (% Integridade \leq 39 %).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES QUÍMICAS

Os teores de arsênio nas folhas de *C. sinensis* digeridas podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8 – Concentração (mg kg^{-1}) de arsênio nas folhas digeridas de chá de *Camelia sinensis*. (n = 2)

Marca	Branco	Verde	Preto
C	0,36±0,01	<i>sem amostra</i>	0,04±0,002
D	0,11±0,001	0,154±0,007	0,04±0,001
L	0,110±0,002	0,0300±0,005	0,04±0,01
R	0,21±0,05	0,117±0,003	0,027±0,002
S	0,07±0,01	0,11±0,01	<i>sem amostra</i>
T	0,14±0,01	0,060±0,002	0,12±0,003
Valor de referencia*	0,6 mg kg^{-1}		

* BRASIL, 2013

A Tabela 9 apresenta as concentrações de cádmio nas folhas de chá branco, verde e preto das diferentes marcas.

Tabela 9 – Concentração (mg kg^{-1}) de cádmio nas folhas digeridas de chá de *Camelia sinensis*. (n = 2)

Marca	Branco	Verde	Preto
C	0,09±0,001	<i>sem amostra</i>	0,01±0,001
D	0,03±0,003	0,0547±0,003	0,02±0,001
L	0,04±0,007	0,01±0,005	0,02±0,01
R	0,04±0,003	0,02±0,001	0,013±0,002
S	0,03±0,001	0,04±0,001	<i>sem amostra</i>
T	0,05±0,001	0,02±0,001	0,02±0,001
Valor de referencia*	0,4 mg kg^{-1}		

* BRASIL, 2013

Podemos observar que todas as amostras de chá verde, branco e preto possuem concentrações de As e Cd inferiores ao máximo determinado pela resolução RDC número 42, de 29 de agosto de 2013, que Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos (BRASIL, 2013). Os valores obtidos variaram de 0,03 mg kg⁻¹ a 0,36 mg kg⁻¹ para o arsênio e 0,01 mg kg⁻¹ a 0,09 mg kg⁻¹ para o cádmio nas folhas digeridas, enquanto para as infusões dos chás foram encontradas concentrações até 0,007 mg L⁻¹ para As e até 0,0007 mg L⁻¹, mostrando que uma parcela muito pequena dos metais presentes nas folhas são lixiviados para as infusões.

A Tabela 10 apresenta as concentrações de chumbo nas folhas de chá branco, verde e preto das diferentes marcas.

Tabela 10 – Concentração (mg kg⁻¹) de chumbo nas folhas digeridas de chá de *Camelia sinensis*. (n=2)

Marca	Branco	Verde	Preto
C	3,61±0,06	<i>sem amostra</i>	0,18±0,006
D	0,94±0,11	0,258±0,001	0,15±0,05
L	1,03±0,18	0,11±0,04	0,17±0,004
R	2,12±0,03	1,11±0,03	0,021±0,011
S	0,81±0,27	1,06±0,02	<i>sem amostra</i>
T	1,58±0,04	0,21±0,032	0,78±0,10
Valor de referencia*	0,6 mg kg ⁻¹		

* BRASIL, 2013

Diferentemente do que ocorreu com as análises de As e Cd, das 16 amostras analisadas 9 apresentaram concentrações de chumbo superiores às determinadas pela legislação (0,06 mg kg⁻¹), sendo que dessas 6 amostras eram de chá branco, 2 de verde e 1 de preto. E ainda, as amostras de chá branco apresentaram concentrações de Pb superiores às encontradas nos chás verde e preto. As infusões dos 3 tipos de chá apresentaram concentrações de chumbo variando até 0,015 mg L⁻¹, concentrações abaixo da máxima determinada pela legislação.

Esses resultados são condizentes com os encontrados por Salahinejad e Aflaki (2009) que encontraram nas folhas concentrações de As e Cd abaixo do limite de detecção do método utilizado no estudo (As - 0,05 mg kg⁻¹ ; Cd - 0,003 mg kg⁻¹) e concentração de Pb variando de 0,91 à 2,92 mg kg⁻¹. Os valores encontrados por esse mesmo grupo para as infusões de chá preto também foram abaixo do limite de detecção do método para os três elementos (As - 0,05 mg kg⁻¹; Cd - 0,003 mg kg⁻¹ ; Pb - 0,04 mg kg⁻¹). A metodologia de análise foi a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) que possui limites de detecção superiores a ICP-MS.

Entretanto, as características de potabilidade da água descritas na Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, que classifica como água potável a água para consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça riscos à saúde. A água potável deve estar em conformidade com o padrão de substâncias químicas que representam risco para a saúde expresso na Tabela 11, onde os valores máximo permitidos pela portaria para o As, Cd e Pb podem ser comparados com os maiores valores de concentração obtidos para esses metais nas infusões .

Tabela 11 – Relação da maior concentração (mg L⁻¹) encontrada nas infusões de chás com o teor máximo permitido para padrão de potabilidade da água

Elemento	Maior Concentração (mg L ⁻¹)	VMP ¹ (MS ²) (mg L ⁻¹)
As	0,007	0,01
Cd	0,0007	0,005
Pb	0,015	0,01

¹ Valor máximo permitido em mg L⁻¹ (BRASIL, 2011)

² MS - Ministério da Saúde

Pode ser observado que as concentrações encontradas nas infusões de chá de *C. sinensis* são inferiores ao valor máximo permitido (VMP) para a água ser

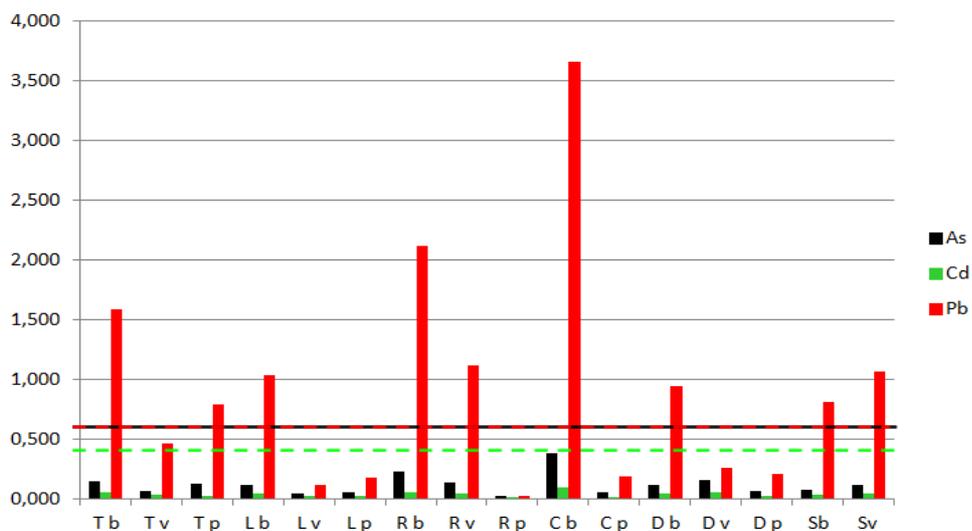
considerada potável para o As e Cd, e que para Pb as amostras apresentam concentrações próximas do VMP.

É importante ressaltar que existem outras fontes de contaminação por metais pesados, como alimentação e respiração cutânea, sendo assim, o consumo excessivo de chás de *C. sinensis* pode contribuir para doenças associadas ao acúmulo de metais pesados no organismo. Essas doenças ocorrem com a ingestão a longo prazo e normalmente não se liga a causa à consequência, visto que os sintomas aparecem tardiamente e algumas dessas doenças podem estar associadas a outros fatores, como genética e idade.

4.1.1 Análises estatísticas

A Figura 6 apresenta um gráfico de barras com as concentrações de As, Cd e Pb das amostras analisadas relacionadas com as concentrações máximas permitidas para cada metal analisado. O gráfico mostra claramente que o elemento químico que se apresenta em concentrações além do permitido em situação preocupante é o chumbo: em 9 das 16 amostras.

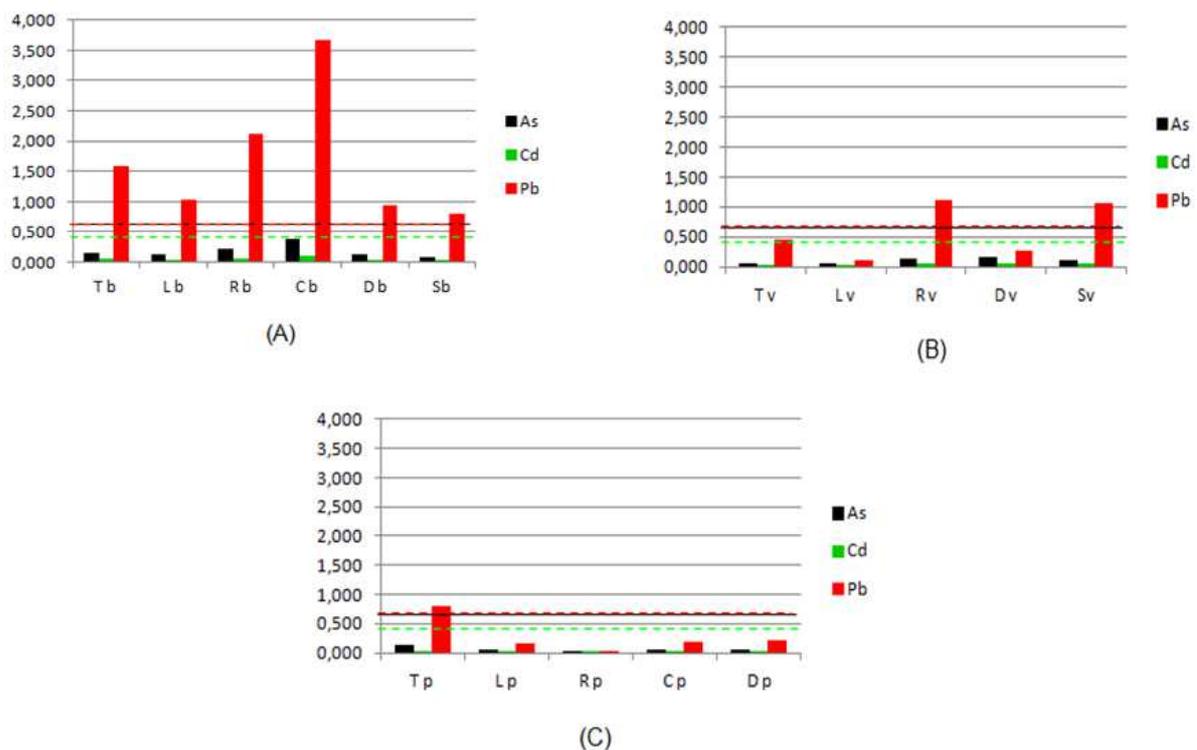
Figura 6 – Concentrações de arsênio, cádmio e chumbo presentes nas 16 amostras analisadas.



Linhas tracejadas: concentrações máximas permitidas pela legislação (As e Pb – 0,6 mg k⁻¹; Cd – 0,4 mg k⁻¹).

A Figura 7 apresenta o gráfico de barras das concentrações de As, Cd e Pb das amostras analisadas separados por tipo de chá. Nestes gráficos podemos observar que o chá branco possui concentrações de chumbo acima do previsto em todas as amostras, sendo a menor quantidade apresentada em torno de 1,35 vezes a quantidade máxima permitida. O chá verde apresenta concentrações baixas em 2 amostras (Lv e Dv), tendendo ao limite em 1 (Tv) e altas em 2 amostras (Rv e Sv). Apenas 1 amostra de chá preto apresenta concentrações de Pb acima do permitido pela legislação (Tp).

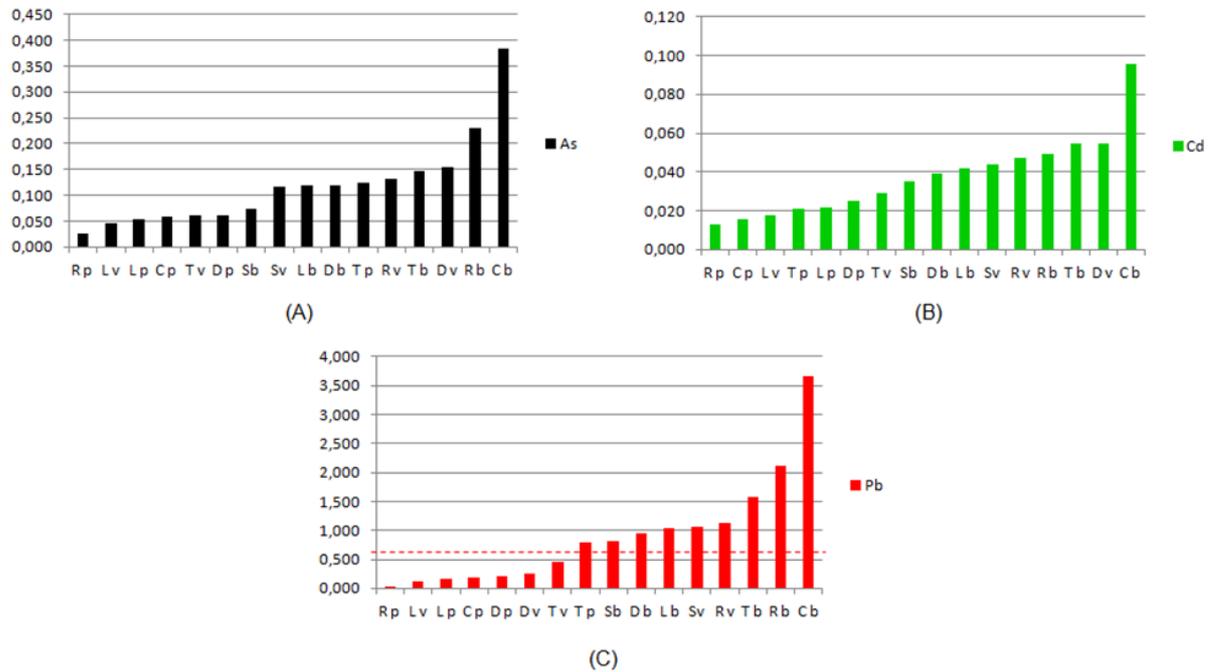
Figura 7 – Concentrações de arsênio, cádmio e chumbo presentes nas amostras analisadas de (A) chá branco, (B) chá verde e (C) chá preto.



Linhas tracejadas: concentrações máximas permitidas pela legislação (As e Pb – 0,6 mg k⁻¹; Cd – 0,4 mg k⁻¹).

Pela Figura 8 verifica-se que a amostra de chá branco da marca C (Cb) apresenta concentrações de arsênio, cádmio e chumbo bem diferenciadas em relação às outras amostras, chegando a ser no mínimo 65% maior que a maior das concentrações de chumbo entre as outras amostras.

Figura 8 – Concentrações de (A) arsênio, (B) cádmio e (C) chumbo nas 16 amostras analisadas.



Linhas tracejadas: concentrações máximas permitidas pela legislação (Pb – 0,6 mg k⁻¹).

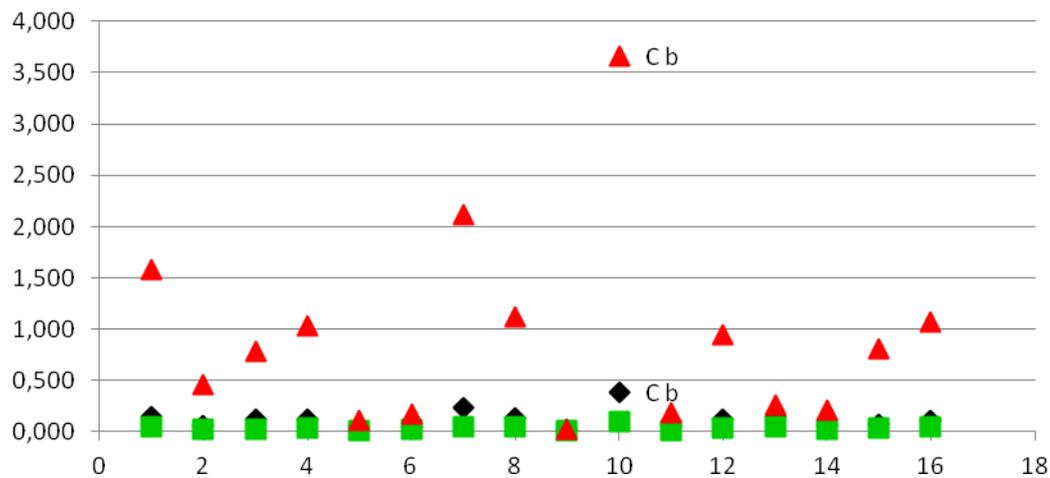
A amostra Cb apresenta valores aberrantes típicos para as concentrações estudadas, com grande influência na amplitude amostral. A Tabela 12 nos mostra que a amplitude intervalar amostral pode ser reduzida em 22%, 49% e 42% em relação às concentrações de arsênio, cádmio e chumbo se os valores aberrantes forem desconsiderados, diminuindo bastante a dispersão dos dados.

Tabela 12 – Amplitudes amostrais (AA) para as concentrações de arsênio, cádmio e chumbo, incluindo e excluindo os valores aberrantes da amostra Cb

Metal	AA incluindo Cb (I)	AA excluindo Cb (II)	Relação II/I
As	0,261	0,204	0,78
Cd	0,083	0,042	0,51
Pb	3,643	2,099	0,58

O gráfico da Figura 9 apresenta a dispersão das amostras, mostrando que as concentrações obtidas para a amostra Cb são as que apresentam maior distanciamento das concentrações obtidas para as outras amostras.

Figura 9. Gráfico de dispersão das concentrações de arsênio, cádmio e chumbo para as 16 amostras analisadas.



As análises estatísticas corroboram com as avaliações e observações feitas sobre as amostras analisadas. A presença de Pb em concentrações superiores às determinadas pela legislação mostram que este é um problema recorrente.

4.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E MICROSCÓPICA

A metodologia descrita pela AOAC (2010b), que é realizada pela tamisação e posterior análise do material retido no tamis, permite a avaliação da integridade das amostras de chá, detecção da presença de matérias estranhas, possui baixo custo e não utiliza reagentes tóxicos em grande quantidade (SANTOS, 2012). A avaliação da integridade pode ser verificada na Tabela 13, onde se constata que todas as amostras apresentam de média a baixa integridade das folhas.

Tabela 13 – Percentual de integridade da amostra.

Marca	Retido* (g)	Não Retido (g)	Soma (g)	Integridade (%)	Classificação ¹
Lv	1,19	15,76	16,95	7,02	Baixa
Lb	10,79	14,14	24,93	43,28	Média
Lp	3,06	13,89	16,95	18,05	Baixa
Db	8,34	7,99	16,33	51,07	Média
Dp	1,60	27,00	28,6	5,59	Baixa
Rv	1,37	13,08	14,45	9,48	Baixa
Rb	5,25	7,03	12,28	42,75	Média
Tv	4,15	15,74	19,89	20,86	Baixa
Tb	4,57	10,45	15,02	30,43	Baixa
Cp	0,00	20,56	20,56	0,00	Baixa

* Retido no tamis de 20 ABNT (abertura de 0,84 mm)

§ Integridade Alta - %Integridade \geq 70%;

Integridade Média - %Integridade entre 40 e 69%;

Integridade Baixa - %Integridade \leq 39%.

A Figura 10 apresenta a visualização do chá verde na lupa.

Figura 10. Visualização do chá verde



Amostra Lv - aumento de 8x.

De acordo com a AOAC (2010b), somente o conteúdo retido no tamis de 20 (0,84 mm) é avaliado quanto à presença de matéria estranha, porém, devido ao alto

grau de pulverização das amostras, buscou-se a presença de matéria estranha na parte não retida pelo tamis. Entretanto, como as amostras se apresentavam muito fragmentadas, houve a dificuldade de identificação e separação da matéria estranha, visto que esta também se encontrava pulverizada.

As imagens da Figura 11 mostram alguns exemplos de matérias estranhas encontradas nas amostras de chá de *C. Sinensis* retidas no tamis.

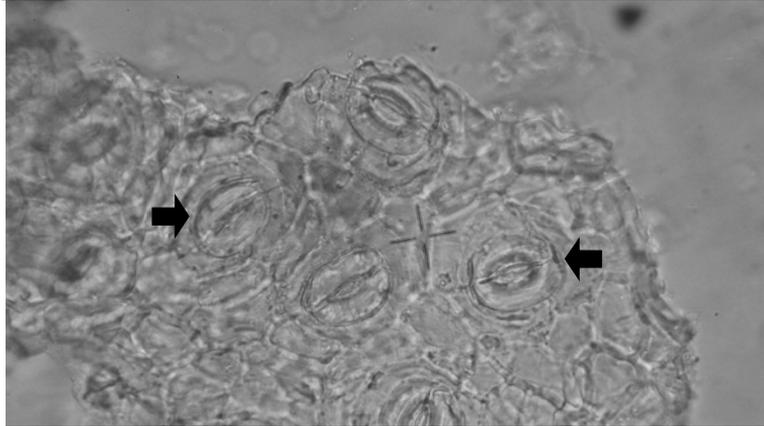
Figura 11 – Matéria estranha encontrada em amostra de chá de *C. sinensis*.



(A) Amostra Rb - sementes, (B) Amostra Lv - ovo de inseto, (C) Amostra Rb - pedra e (D) Amostra Tb - não identificado. Todas as imagens em aumento de 20 x.

Devido ao pequeno tamanho dos fragmentos das amostras em sachês, foi difícil fazer a morfodiagnose das amostras. A Figura 12 apresenta as estômatos amonocíticos, característicos da folhas de *C. sinensis* encontrados na amostra Lv.

Figura 12. Estômatos amonocíticos (seta) observados na amostra Lv.



Aumento de 200 x

Embora não tenha sido possível quantificar a presença de matérias estranhas, vale ressaltar que a presença delas é indicativa de más condições sanitárias durante a produção, transporte ou armazenamento e o não cumprimento das Boas Práticas de Fabricação exigidas pela Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997, que dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. (BRASIL, 1997) e que garantem a inocuidade do alimento.

5 CONCLUSÕES

Grande parte das amostras está imprópria para o consumo, de acordo com a legislação vigente, quanto ao teor de chumbo encontrado nas folhas, embora as concentrações de arsênio e cádmio estejam dentro dos padrões exigidos.

Apesar das infusões de *Camellia sinensis* não apresentarem concentrações de As, Cd e Pb superiores às determinadas para a água potável, o consumo reiterado contribui para o aumento da ingestão diária desses contaminantes, o que a longo prazo pode induzir as enfermidades associadas a cada um, visto que esses metais se acumulam no organismo e o chá não é a única fonte de ingestão desses contaminantes.

A dificuldade de detecção de matérias estranhas está relacionada à baixa integridade das amostras que encontravam-se, em grande parte, pulverizadas, não permitindo a visualização de insetos, pedras, entre outros. A pulverização também dificulta a identificação de elementos histológicos, que favorecem a caracterização e confirmação da espécie de vegetal, dificultando a identificação de possíveis fraudes.

Este trabalho contribui para a fiscalização e monitoramento das amostras de chá quanto à presença de contaminações, atendendo a missão do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, que é contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à vigilância sanitária, buscando coordenar, avaliar e ampliar projetos de desenvolvimento tecnológico.

A continuidade deste estudo é importante pois o número de amostras analisados é sugestivo de um problema recorrente que pode ser observado em outros trabalhos publicados em todo o mundo, entretanto não é representativo quando relacionado à quantidade de chás produzidos pelo país. Além disso, a popularização e a alta de ingestão dos chás de *Camellia sinensis* indicam que deve-se dar mais atenção aos riscos associados a ingestão reiterada, avaliando-se se os valores determinados pela legislação são condizentes com os riscos associados aos contaminantes presentes.

6 REFERÊNCIAS

ABERNETHY, D.R. et al. Metal Impurities in Food and Drugs. **Pharmaceutical Research**, vol. 27, n. 5, p. 750 – 755, maio, 2010

ALMEIDA, C.M.S.; **Estudos sobre a origem e transformação do selênio e de suas espécies químicas ao longo do refino do petróleo**. 2008, 155 f., Dissertação (Mestrado em Química) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC) Foreign Matter in Spices and Condiments Sieving Method: Official method 960.51. **Official methods of analysis of AOAC**. Gaithersburg, MD, 2010b.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official method 972.40A. **Official methods of analysis of AOAC**, Gaithersburg, MD, 2010a.

BABOUR, R.. **Determinação de impurezas em cobre eletrolítico por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências: Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011

BARBIERI, M. K. et al. **Microscopia em alimentos**: Identificação histológica e material estranho. Campinas: CIAL – ITAL, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União. Brasília, DF, dez. 2011.

Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC n º 42, de 29 de agosto de 2013**. Regulamento técnico Mercosul sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, ago. 2013

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997**, Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtor/industrializadores de alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, ago.1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999**, Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, mai. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 14, de 28 de março de 2014**. Dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Republicada no Diário Oficial da União, Brasília, DF. mar. 2014.

CHACO S.M. et al. Beneficial effects of green tea: A literature review. **Chinese Medicine**, vol. 5, nº 13, p. 1-9, 2010.

ESTEVEZ, C.S.H. **Influência de aditivos em solos contaminados com arsênio na produção de hortícolas**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente – Tecnologias Ambientais) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2009.

FALLER, A.L.K.; FIALHO, E.. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Rev Saúde Pública**, vol. 43, nº 2, p. 211-218, out, 2009.

FERNÁNDEZ-CÁCERES, P.L. et al. Differentiation of tea (*Camellia sinensis*) varieties and their geographical origin according to their metal content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 49, nº. 10, p. 4775-4779, 2001. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0106143>.

FIRMINO, L.A.. **Avaliação da qualidade de diferentes marcas de chá verde (*Camellia sinensis*) comercializadas em salvador-bahia**. 2011. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade, Federal da Bahia, Salvador, 2011.

FRANCO, M. J; et al. Determinação de metais em plantas medicinais comercializadas na região de Umuarama-PR. **Arq. Ciênc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 121-127, maio./ago. 2011.

FREITAS, H. C.P.; NAVARRO, F.. O chá verde induz o emagrecimento e auxilia no tratamento da obesidade e suas comorbidades. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, vol. 1, nº. 2, p. 16-23, mar-abr, 2007.

GIL, E.S. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. 2.ed. São Paulo: Pharmabooks, 2007.

GONDOIN, Anais et al. White and green tea polyphenols inhibit pancreatic lipase in vitro. **Food Research International**, vol. 43, n. 5, p.1537-1544, jun. 2010.

HAN W.Y.; SHI YZ, M.A.L.F.; RUAN, J.Y. Arsenic, cadmium, chromium, cobalt, and copper in different types of Chinese tea. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 75, nº. 2, p. 272-277, 2005.

HILAL, Y.; ENGELHARDT, U.. Characterisation of white tea – Comparison to green and black tea. **J. Verbr. Lebensm**, vol. 2, nº. 43, p. 414-421, ago. 2007.

HUGHES, M. F.; et al. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective. **Toxicological Sciences**, vol. 123, nº. 2, p. 305–332, jul. 2011.

KARAK, T.; BHAGAT, R.M.. Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review. **Food Research International**, vol. 43, nº. 9, p. 2234-2252, ago. 2010.

KHAN, N.; MUKHTAR, H.. Tea polyphenols for health promotion. **Life Sciences**, vol. 81, nº. 7, p. 519-533, jul, 2007.

LAMARÃO, R.C.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Rev. Nutr.** [online], vol. 22, nº. 2, p. 257-269. ISSN 1415-5273. 2009

LIMA, J.D. et al. Chá: aspectos relacionados à qualidade e perspectivas. **Ciência Rural**, Santa Maria, Rs, vol. 39, nº. 4, p. 1270-1278, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil – Nativas e Exóticas**, 2ªed. Nova Odessa, São Paulo; Institto Plantarum, 2008.

MANFREDINI, V. et al. Chá verde: benefícios para a saúde humana. **Infarma**, Brasília, v.16, n.9-10, p.68-70, 2004

MARBANIANG, D.G. et al. Study of trace metal (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn and Cd) composition in tea available at Shillong, Meghalaya, India. **International Journal of Environmental Protection**, vol.1 nº.1, p. 13-21, 2011

MORAES, S.; COSTA, F.G.; PEREIRA, M.L.I.. Heavy metals and human health, **Environmental Health - Emerging Issues and Practice**. ISBN: 978-953-307-854-0, InTech, 2012. Disponível: <http://www.intechopen.com/books/environmental-health-emerging-issuesand-practice/heavy-metals-and-human-health>. Acesso em 15/01/2015.

NASCIMENTO, R.S.. **Aplicação de métodos quimiométricos para a determinação de constituintes inorgânicos em leite materno por ICP-MS e ICP OES**. 2008, 140 f. Dissertação (Mestrado em Química – Química Analítica) Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2008.

PETRY, C. F.. **Determinação de elementos traço em amostras ambientais por ICP OES**. 2005, 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

PETTIGREW, J. **Chá- VIP**, Ed. Nobel, S. Paulo, 1999, 96 p.

RODRIGUES, R. M. M. S.; ATUI, M. B.; CORREIA, M. (Coord.). Métodos de análise microscópica de alimentos. São Paulo: Letras & Letras, 1999.

SALAHINEJAD, M.; AFLAKI, F. Toxic and essential mineral elements content of black tea leaves and their tea infusions consumed in Iran. **Biol Trace Elem Res**, nº 134, p. 109-117, 2010.

SANTOS, J. M.. **Pesquisa de matérias estranhas em espécie vegetal, *Pimpinella anisum* L., para o preparo de “chá”**. Trabalho de Conclusão de Curso

(Especialização em Vigilância Sanitária) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2012.

SARFO, D.K. et al. Levels of metals in commercially available tea from some selected markets in Ghana. **Elixir Food Science**, vol. 53, p. 12165-12168, dez. 2012

SENGER, A.E, V.; SCHWANKE, C.H.A.; GOTTLIEB, M.G.V. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Scientia Medica**, vol. 20, nº 4, p. 292-300, 2010.

SINGH, R.; et al. Heavy metals and living systems: An overview, **Indian J Pharmacol**, vol. 43, nº. 3, p. 246–253, mai.– jun., 2011.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A., Princípios de Análise Instrumental, 6ª ed., Bookman: São Paulo, 2009

TANAKA, T.; KOUNO, I.. Oxidation of Tea Catechins: Chemical Structures and Reaction Mechanism. **Food Sci. Technol. Res.** v. 9, n. 2, p.128-133, mar. 2003.

TELLES-PLAZA, M. et al. Cadmium exposure and all-cause and cardiovascular mortality in the U.S. general population. **Environmental Health Perspectives**, vol. 120, nº 7, p. 1017- 1022, jul.2012

THERMO ELEMENTAL. **AAS, GFAAS, ICP or ICP-MS? Which technique should I use? An elementary overview of elemental analysis.** USA, 2001. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/152042812/AAS-GFAAS-ICP-ICP-MS-Which-Technique-Should-i-Use#scribd>. Acesso em: 16/01/2015

USA, US Department of Health and Human Services/Public Health Service Food and Drug Administration Bureau of Foods, FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Defect Levels Handbook.** The Food Defect Action Levels.Levels of natural or unavoidable defects in foodsthat present no health hazards for humans.2010. Disponível em: <http://www.fda.gov/food/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidancedocuments/sanitation/ucm056174.htm>. Acesso em 20/11/2012.

VULCANO, I.R.C.; SILVEIRA, J.N.; ALVAREZ-LEITE, E.M.. Teores de chumbo e cádmio em chás comercializados na região metropolitana de Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 44, nº. 3, jul.-set., 2008