



Instituto Superior de  
**Engenharia** do Porto

Teor mineral e capacidade antioxidante  
em chás e infusões

**2013**

---

**Andreia Marlene Castro Rocha**

**Orientação:  
Doutora Maria  
Teresa Pereira  
de Oliva Teles  
Moreira**



## Agradecimentos

Ao ISEP pela aprendizagem e oportunidades de crescimento.

Ao GRAQ (Grupo de Reação e Análises Químicas) pela cedência de condições para projetar este trabalho, assim como, a todos os que fazem parte da equipa.

À Doutora Teresa Oliva Teles e à Doutora Fátima Barroso pelo tempo despendido na orientação da minha tese.

Aos meus amigos do ISEP, sempre a par de todas as dificuldades pois também passavam pelo mesmo, aos meus amigos da minha cidade minhota que permanecem na minha vida há largos e bons anos, aos meus amigos de trabalho da Colquímica que tiveram sempre uma palavra de ânimo mesmo quando achava que já não era possível.

À minha quase-irmã e amiga de todas as horas, Andreia Rodrigues, quem me conhece melhor que ninguém.

E porque os últimos são sempre os primeiros, à minha família mas, primordialmente, aos que são o meu-mais-que-tudo, os meus pais e o meu irmão. Quanto a vocês, fico sem palavras, é graças a vocês que sou quem sou.

O meu muito obrigado.

‘Para ser grande, sê inteiro: nada

Teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Pões quanto és

No mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda

Brilha, porque alta vive’



## Sumário

O chá é uma das bebidas mais populares do mundo por causa do seu aroma atrativo e sabor, sendo preparado a partir das folhas de um arbusto da espécie *Camellia sinensis*. A composição do chá varia com a época do ano, a idade da folha, o clima e práticas de horticultura. No entanto, as indústrias de bebidas lançam, com bastante regularidade, no mercado vários tipos de bebidas à base de infusões de variadas ervas, plantas e essências de frutas, com efeitos benéficos a nível de saúde e estética.

Considerando que o nível de consumo destas bebidas cresceu e que estão sempre a surgir novas bebidas no mercado, a preocupação com a segurança alimentar destes produtos aumentou. Contudo, Portugal, e muitos outros Países, ainda não têm legislação específica (associada à segurança alimentar) para este tipo de produto. A real importância e perigos de certos metais pesados presentes nestas bebidas ainda não foram ainda estudados e avaliados. Este trabalho visa essencialmente avaliar os teores minerais e antioxidantes obtidos para as diferentes amostras, e correlacionar os teores obtidos com os ingredientes existente nas respetivas amostras, como por exemplo, a presença de chá, de sene, ou algas. Pretende-se também esclarecer a população, para além da qualidade e características nutricionais destas bebidas, os eventuais níveis de contaminação ambiental destes produtos naturais.

Neste projeto efetuou-se a análise de macro e microminerais e a avaliação da capacidade antioxidante numa grande variedade de infusões, obtidas a partir de chás, ervas aromáticas ou misturas destas, comercializadas em Portugal em saquetas de doses individuais. Foram quantificados o Na, K, Ca, Mg, Cu e o Cd por espectrometria de absorção atómica de com fonte contínua; e o teor de fenóis totais, de flavonoides totais, atividade anti-radicalar, pelo método do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•) e o método do poder de redução férrica (FRAP).

Por fim, conseguiu-se observar a influência de componentes como ervas, extratos de frutos ou tipos de chá quer na concentração de minerais, quer na capacidade antioxidante, na infusão final.

No caso do cádmio, elemento que é avaliado como elemento tóxico, apresentou níveis elevados primordialmente em amostras contendo algas.

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

Capacidade antioxidante total superiores foram obtidas principalmente em chás verdes, enquanto que as capacidade antioxidantes totais inferiores obtiveram-se essencialmente em infusões de cavalinha.

De uma forma bastante simplória, infusões de chá verde e sene são equilibradas em termos de capacidade antioxidante e teor mineral.

No entanto, todo este trabalho necessita de um estudo estatístico mais aprofundado para se poder obter conclusões mais rigorosas. Dever-se-á, também, obter valores de ferro e zinco para as amostras, análises que não foram totalmente concluídas por dificuldades analíticas no equipamento.

## Abstract

Tea is one of the most popular beverages in the world due to its attractive scent and flavor and it is prepared by a tree of species *Camellia sinensis*' leaves. Tea composition varies according to the season, leave's age, climatic conditions and horticulture practices. However, beverage industries shed quite regularly, in market, several drink infusions of various herbs, plants and fruit essences, with beneficial effects on health and esthetics.

With this industrialization process, concern about the safety of these products increase. However, there is still no legislation in Portugal, as in many other countries for this type of product. The real importance and dangers of certain heavy metals have not been studied. This study aims to assess the levels of minerals and antioxidants obtained for the different samples and correlating the values obtained by the ingredients existing in the respective samples, for example, the presence of tea, sene, or seaweeds. It's also intended to inform the population, in addition to the quality and nutritional characteristics of these drinks, any environmental contamination levels of these natural products.

In this project there were analyzed macro and micro minerals and evaluated the antioxidant capacity in a variety of infusions obtained from teas, herbs or mixtures of these, marketed in Portugal in sachets of individual doses. It was quantified the Na, K, Ca, Mg, Cu and Cd by atomic absorption spectrometry with continuum source, and the phenolic content, total flavonoid and antiradical activity, by the method of radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH •) method and ferric reducing power (FRAP).

Finally, there were obtained important conclusions concerning the influence of certain components as herbs, fruits extracts or different types of tea either in the concentration of minerals, either in the antioxidant capacity in the final infusion.

In the case of cadmium, element that is related considered a toxic element, presented higher levels in samples containing essentially seaweeds.

Higher total antioxidant capacity was obtained primarily in green teas, while the less total antioxidant capacity was obtained in essentially horsetail infusions.

In a very simplistic way, green tea and sene infusions are equilibrated in terms of antioxidant capacity and mineral content.

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

However, all this work requires a more in-depth statistical study to be able to reach the more stringent.

## Índice

1	Introdução.....	1
1.1	Minerais.....	2
1.2	Antioxidantes.....	3
1.3	Legislação.....	2
1.4	Análise de minerais.....	2
1.5	Análise da capacidade antioxidante.....	8
2	Parte experimental.....	13
2.1	Material e equipamento.....	13
2.2	Reagentes.....	14
2.3	Preparação de soluções padrão para a análise de minerais.....	14
2.4	Preparação de soluções padrão para análise de antioxidantes.....	15
2.5	Amostras.....	16
2.6	Preparação de soluções de amostra.....	17
2.7	Análise por espectrometria de absorção atômica.....	20
2.8	Análise da capacidade antioxidante total.....	21
2.9	Tratamento de dados.....	22
2.9.1	Caraterização da curva de calibração.....	22
2.9.2	Regressão Linear.....	22
2.9.3	Regressão Quadrática.....	23
2.9.4	Ensaio de recuperação.....	24
3	Resultados e discussão.....	25
3.1	Caraterização dos métodos de análise.....	25
3.1.1	Minerais.....	25
3.1.2	Capacidade antioxidante.....	27

# Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

3.2	Análise das amostras (infusões) .....	28
3.2.1	Sódio .....	28
3.2.2	Potássio.....	29
3.2.3	Cálcio .....	30
3.2.4	Magnésio.....	31
3.2.5	Cobre .....	32
3.2.6	Cádmio.....	33
3.2.7	Teor fenólico.....	34
3.2.8	Teor de flavonoides total .....	35
3.2.9	Atividade anti-radicalar .....	36
3.2.10	Poder de redução férrica - FRAP.....	37
3.3	Discussão de resultados.....	38
4	Conclusões .....	43
	Bibliografia.....	45

## Índice de Figuras

Figura 1.1 - Estrutura genérica de um flavonoide[40].	5
Figura 1.2 - Estrutura genérica de uma catequina.[11].	5
Figura 1.3 - Estrutura genérica de uma epicatequina [11].	5
Figura 1.4 - Lâmpada de arco de Xénon, utilizada em HR-CS AAS [57].	6
Figura 1.5 - Representação esquemática de uma Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua (HR-CS AAS) [65].	7
Figura 1.6 - Visualização de dados em HR-CS AAS [62].	8
Figura 1.7 - Estrutura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH·).	10
Figura 1.8 - Leitor de placas microplacas Synergy HT (BioTek®).	11
Figura 3.3 - Concentração de Na nas amostras analisadas por FL-CS-AAS.	29
Figura 3.4 - Concentração de K nas amostras analisadas por FL-CS-AAS.	30
Figura 3.5 - Concentração de Ca nas amostras analisados por F-CS-AAS.	31
Figura 3.6 - Concentração de Mg nas amostras analisados por F-CS-AAS.	32
Figura 3.7 - Concentração de Cu nas amostras analisados por ET-CS-AAS.	33
Figura 3.8 - Concentração de Cd nas amostras analisados por ET-CS-AAS.	34
Figura 3.9 - Teor fenólico total das amostras analisadas pelo de Folin-Ciocalteu.	35
Figura 3.10 - Teor de flavonoides total das amostras analisadas pelo método do cloreto de alumínio.	36
Figura 3.11 - Atividade anti-radicalar das amostras analisadas pelo método do DPPH. ..	36
Figura 3.12 - Poder de redução férrica das amostras analisadas pelo método de FRAP.	37
Figura A.1 – Curvas de calibração dos elementos analisados por FL-AAS.	54
Figura A.2 – Curvas de calibração dos elementos analisados por GF-AAS.	54



## Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Resultados da revisão bibliográfica sobre análise de minerais em infusões de chás e ervas aromáticas. ....	3
Tabela 2.1 - Condições das soluções para FL-CS-AAS. ....	15
Tabela 2.2 - Descrição da preparação dos padrões utilizados na construção da curva de calibração dos diferentes métodos. ....	16
Tabela 2.3 - A composição das amostras. ....	18
Tabela 2.4 - Programa no micro-ondas para a digestão de dez vasos com amostra acidificada. ....	20
Tabela 2.5 - Otimização de parâmetros da atomização por chama. ....	20
Tabela 2.6 - Programa de temperatura otimizado para as etapas de pirólise e atomização na análise por ET-CS-AAS. ....	21
Tabela 2.7 - Fortificações com padrão nos elementos analisados por AAS. ....	24
Tabela 3.1 - Parâmetros experimentais dos métodos utilizados em F-CS-AAS. ....	26
Tabela 3.2 - Parâmetros experimentais dos métodos utilizados em ET-CS-AAS. ....	27
Tabela 3.3 - Parâmetros experimentais das curvas de calibração ( $Y=ax+b$ ) para a determinação da capacidade antioxidante. ....	28
Tabela 3.4 - Amostras com concentrações acima do P75 e abaixo do P25 em minerais (ordenadas por nº de amostra). ....	38
Tabela 3.5 - Amostras com capacidades antioxidantes acima do P75 e abaixo do P25 (ordenadas por nº de amostra). ....	40



## Lista de Abreviaturas

- a, b, c : Parâmetros de regressão linear ou quadrática
- AAS: Espectrofotometria de absorção atômica (*Atomic absorption spectrophotometry*)
- AES: Espectrometria de emissão atômica (*Auger electron spectroscopy*)
- CS-AAS: Espectrofotometria de absorção atômica de fonte contínua (*Continuous source – atomic absorption spectrophotometry*)
- DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- DS<sup>2</sup>: Diferença de variâncias
- EDPXRF: Espectrofotometria de fluorescência por polarização de raio X (*Energy-Dispersive-X-Ray-Fluorescence analysis*)
- EGCG: (-)-Epigallocatequina-3-galato
- ET-CS-AAS: Espectrofotometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica com fonte contínua (*Electrothermal - continuous source –atomic absorption spectrophotometry*)
- F: Teste de F-Fisher
- F-CS-AAS: Espectrofotometria de absorção atômica com atomização por chama com fonte contínua (*Flame - continuous source - atomic absorption spectrophotometry*)
- FRAP: Poder antioxidante de redução férrica (Ferric reducing antioxidant power)
- HR-CS-AAS: (*High Resolution – continuous source –atomic absorption spectrophotometry*)
- ICP: Plasma indutivamente acoplado (Inductively coupled plasma)
- LD: Limite de detecção
- LQ: Limite de quantificação
- LS-AAS: Espectrofotometria de absorção atômica com fonte de linha (Linear source - Atomic Absorption Spectrophotometry)
- MS: Espectrometria de massa (*Mass spectrophotometry*)
- n: número de níveis de concentração
- P25: Percentil 25
- P75: Percentil 75
- REC: Recuperação
- RSD: Desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)
- S<sub>a</sub>: Desvio padrão da intercepção com a origem da regressão linear

# Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

$S_b$ : Desvio padrão do declive

$SS_{res}$ : Somatório dos quadrados dos resíduos (*sum of squares of the residuals*)

$S_{x0}$ : Desvio padrão do método

$S_y$ : Desvio padrão da regressão

TFT: Teor de fenóis totais

TPTZ: 2,4,6-tripiridil-s-triazina

$V_{x0}$ : Coeficiente de variação do método

x: variável independente da curva de calibração

y: variável dependente da curva de calibração (Absorvância)

$\hat{y}_i$ : Valor padrão de y calculado pela função de calibração

## 1 Introdução

Desde os tempos primórdios, que o consumo de infusões quentes preparadas a partir de plantas colhidas ou, mais tarde, cultivadas foi gradualmente substituindo o consumo de água [1]. Em resposta às necessidades atuais do consumidor e conhecedores das suas preferências, os industriais da alimentação e bebidas desenvolvem com frequência novos produtos, com base nas infusões, com fins nutricionais, medicinais, sensoriais e dietéticos. Nesta gama de produtos lançados no mercado, pode-se referir as infusões como o chá, essências de frutas (tais como ananás e maçã), de folhas, flores e raízes de certas plantas, como o funcho, o dente de leão, e o sabugueiro, e misturas de componentes, nos quais se incluem as algas. O chá e as infusões têm valor medicinal reconhecido para prevenção e tratamento de vários problemas de saúde. Alguns estudos mostraram que o chá pode diminuir o risco de doenças cardíacas, derrame e alguns tipos de cancro como o de pâncreas, oral e de próstata [2-7].

As folhas de um arbusto da espécie *Camellia sinensis* originaram uma das bebidas mais populares do mundo, o chá, por causa do seu aroma e sabor atrativos. A composição do chá varia com a época do ano, a idade da folha, o clima e práticas de horticultura. [8, 9] A planta do chá é cultivada em mais de 45 países, incluindo Portugal (Açores), distribuídos por todos os continentes, exceto na América do Norte, dentro da faixa latitudinal de 45 °N até 34 °S. É uma planta que cresce melhor em áreas tropicais e subtropicais com chuvas adequadas, em solos de boa drenagem e ácidos [10]. O chá é um dos produtos mais importantes no comércio internacional, sendo a Índia um dos principais países envolvidos na produção e exportação de diferentes variedades de chá [9]. São comercializados três tipos de chás: os não fermentados (chá verde e chá branco), os parcialmente fermentados (chá vermelho e chá oolong) e completamente fermentado (chá preto) [11]. Os chás verde e preto são os dois tipos mais populares. O chá preto é a bebida mais comercializada no Ocidente [2, 11]. O consumo diário de chá é considerado seguro, não sendo conhecidos efeitos adversos na saúde humana. A maioria dos efeitos benéficos do chá verde são atribuídos às suas características antioxidantes por serem ricas em flavonoides, vitaminas (C, E), carotenoides e minerais. Estes compostos são essenciais para a saúde humana, cuja deficiência pode causar doenças e ser prejudicial para a saúde.

# Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

Infusões de misturas contendo algas marinhas (entre 0,2% a 25%) são atualmente comercializadas. Dos dois tipos principais de algas, as microalgas (por exemplo, as verdes azuladas) e as macroalgas (incluiu algas verdes, algas castanhas e algas vermelhas), são as algas castanhas as mais utilizadas a nível alimentar [12-14], com fins essencialmente estéticos, medicinais e/ou nutricionais. São reconhecidos os seus efeitos drenante, adelgaçante e eliminador de celulite. De um ponto de vista nutricional, as algas são caracterizadas por possuírem concentrações elevadas de fibras (33-50%), de minerais (8-40%), por terem um conteúdo de gordura baixo, e elevados níveis de proteínas e hidratos de carbono [14-16]. Além disso, as algas marinhas têm vindo a ser reconhecidas pelo seu elevado conteúdo em vitaminas (A, B1, B2 e C) e compostos antioxidantes [8]. Considerando estes fatores nutricionais citados, as algas podem efetivamente contribuir para uma dieta completa tornando-se benéficas para a saúde humana [17]. Contudo, a intensificação das atividades industriais (com início na revolução industrial), a extensa extração de minérios e o aumento exponencial da população mundial, gerou elevados níveis de contaminação pela introdução de elevadas quantidade de contaminantes, tais como, compostos orgânicos e metais no meio ambiente (terrestre, aéreo e aquático) [18]. A reconhecida bioacumulação de metais por organismos marinhos, como é o caso das algas, tem sido objeto de grande interesse e preocupação nos últimos anos. Os frequentes níveis elevados de metais nos meios aquáticos, são insuficientemente controlados e podem ter efeitos prejudiciais sobre os organismos marinhos e, indiretamente, sobre o ser humano, quando estes organismos contaminados.

## 1.1 Minerais

Os minerais encontram-se na natureza e alguns são componentes essenciais dos ecossistemas globais. Estão presentes no meio ambiente nos vários estados de oxidação e número de coordenação, sendo essas formas relacionadas com a sua toxicidade [1]. Por conseguinte, os minerais estão presentes nos alimentos, uns em níveis vestigiais (microminerais, tais como o Cu, Fe e Zn) e outros, os macrominerais (tais como, Na, K, Ca, Mg) que existem naturalmente em concentrações mais elevadas, que não são necessariamente consequência da contaminação antropogénica [19].

# Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

Os seres humanos necessitam de mais de 22 minerais sendo alguns deles necessários em grandes quantidades e outros em quantidades residuais. [20] De acordo com o conhecimento atual, o grupo de elementos essenciais, em que 73 têm como fonte os alimentos, incluem: cálcio (Ca), cobre (Cu), magnésio (Mg), potássio (K) e o sódio (Na).[21]-Existem certos elementos, como por exemplo o cádmio, que é encontrado em várias matrizes ambientais, como resultado de emissões e que não desempenham uma função biológica no nosso organismo [22].

A ingestão de minerais em quantidades excessivas, de macrominerais ou microminerais, pode ter efeitos prejudiciais sobre a saúde, apesar de serem necessários para diversas funções corporais (essenciais) [23, 24].

A contaminação ambiental (ar, água e solos) reconhecida e frequente em muitos meios agrícolas e marinhos justifica a importância do controlo destes produtos alimentares comercializados, para uma melhor segurança e prevenção alimentar. A população em geral está exposta a metais pesados, principalmente, através da ingestão de alimentos e água contaminados [25]. A segurança dos alimentos é uma preocupação importante na nossa sociedade, quer por parte dos consumidores quer por parte de profissionais de saúde e autoridades da segurança alimentar.

Há uma grande variedade de infusões disponíveis no mercado contendo ingredientes de naturais e que não estão a ser controlados. Para controlo nutricional é fundamental conhecer o teor mineral de todos os alimentos e das bebidas ingeridas. Têm sido reportados estudos de avaliação de minerais em folhas de chá [5, 26-28] e em soluções (infusões) [29-34]. A maioria dos trabalhos analisa as infusões de chá (preto, verde, vermelho), camomila e menta e avaliam os teores em Na, K, Ca, Mg, Fe, Zn e Cu [45, 48, 50, 53, 61]. Neste projeto, pretendeu-se contemplar a segurança alimentar e a nutrição, pelo que foram analisadas infusões e os resultados obtidos foram correlacionados com os seus componentes.

## 1.2 Antioxidantes

Define-se como antioxidante, qualquer composto que, quando presente em baixas concentrações, comparativamente ao substrato oxidável, é capaz de impedir ou retardar danos provocados pela oxidação. Uma outra propriedade importante destes compostos

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

prende-se com o facto de, após a inibição do radical livre, originarem um novo radical que não é tóxico para o organismo humano [35].

Os radicais livres são espécies produzidas durante a respiração aeróbia, como consequência da redução incompleta da molécula de oxigénio, e estão diretamente relacionadas com diversas doenças, tais como a esclerose, cancro, e mesmo o envelhecimento. O organismo humano tem a capacidade de inibir a ação de radicais livres por meio de enzimas reguladoras. No entanto, como este sistema de regulação não é completamente eficaz, os organismos vivos utilizam os compostos antioxidantes existentes na dieta alimentar para tornar o sistema de defesa mais eficaz [36].

Variados fatores podem afetar os valores estimados de capacidade antioxidante e é difícil de avaliar cada componente antioxidante separadamente e / ou as interações entre os diferentes componentes antioxidantes nas amostras. A avaliação da capacidade antioxidante pode ser classificada em dois grupos: ensaios baseados na inibição da oxidação da lipoproteína humana de baixa densidade ou aqueles baseados na capacidade de eliminação de radicais livres de oxigénio.

Atualmente, os métodos *in vitro* para a avaliação da capacidade antioxidante tem como base o princípio da inibição da oxidação de um substrato adequado. Após a oxidação do substrato, em condições normais, a extensão da reação é determinada num tempo fixo ou numa gama que é característica de o radical livre gerado. Para esta determinação podem utilizar-se métodos cromatográficos, espectrofotometria UV-vis ou quimiluminescência, por exemplo [37].

O interesse em compostos fenólicos aumentou notavelmente na última década, por causa da sua elevada capacidade de eliminação de radicais livres associada com várias doenças [38]. Os flavonoides são uma sub-classe dos compostos fenólicos. São caracterizados por ter uma estrutura (Figura 1.1) baseada no esqueleto de carbono do difenilpropano (C6-C3-C6) com vários grupos hidroxilo, cujo número influencia diretamente o teor da capacidade antioxidante. Compostos como a catequina (Figura 1.2) e a epicatequina (Figura 1.3) pertencem a esta família de flavonoides [39].

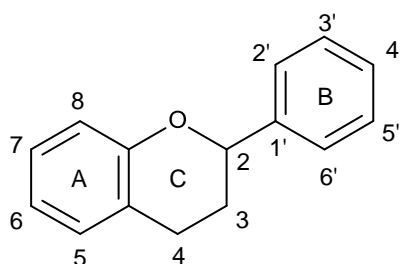


Figura 1.1 - Estrutura genérica de um flavonoide[40].

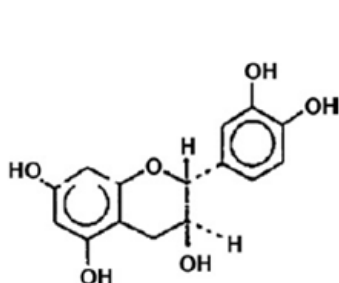


Figura 1.2 - Estrutura genérica de uma catequina.[11].

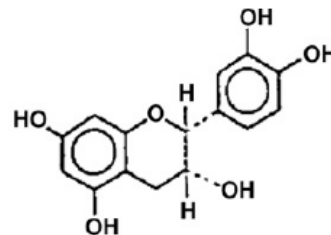


Figura 1.3 - Estrutura genérica de uma epicatequina [11].

Vários estudos publicados descrevem a determinação e a avaliação do perfil antioxidante para infusões de chás e outros ingredientes [11, 41-43]. O conhecimento da capacidade antioxidante destas bebidas e, em particular a identificação dos ingredientes responsáveis pela valorização nutricional do produto alimentar, auxilia os industriais na preparação e comercialização de novas bebidas e fornece informação nutricional aos consumidores (a partir dos rótulos). Para além disso, apoia os agentes de saúde e de nutrição na elaboração de dietas alimentares.

Os chás e as infusões são reconhecidos como uma boa fonte de antioxidantes, principalmente em catequinas (constituem mais de 30% dos sólidos em peso do chá) e os seus derivados. As catequinas do chá verde têm sido relatadas como possuidoras de várias propriedades fisiológicas e farmacológicas [44, 45]. A (-)-Epigalocatequina-3-galato (EGCG) foi identificada como sendo a catequina mais abundante no chá verde [38].

Os estudos têm incidido na bebida, de modo a avaliar o nível nutricional [11, 36, 39, 42, 46-49]. A capacidade antioxidante tem abordado maioritariamente os valores medidos de teor de fenóis totais (método colorimétrico de Folin-Ciocalteu) [11, 39, 46-48], da atividade anti-radicalar (método DPPH) [11, 39, 46-49] e poder de redução férrica (método de FRAP) [36, 42].

## 1.3 Legislação

A contaminação por metais é um aspeto que pode condicionar a segurança dos alimentos e em particular alimentos ou bebidas contendo algas, mas há poucos estudos sobre contaminantes inorgânicos em preparações comercialmente disponíveis de algas [16]. A legislação da Comunidade Europeia (CE) só regula os teores de chumbo (Pb), cádmio (Cd) e mercúrio (Hg) nos géneros alimentícios, no que respeita a limites de minerais [50]. As algas, sendo organismos com elevada capacidade de bioacumulação de espécies metálicas, são géneros não contemplados, embora haja indicadores que a Comissão de Peritos da Comissão Europeia esteja a criar uma regulamentação especial [51]. Os Estados Unidos de América, a Austrália e a Nova Zelândia estabeleceram regras específicas para elementos tóxicos em algas comestíveis [16]. A França foi o primeiro país europeu a estabelecer regulamentos sobre o uso de algas para consumo humano como alimentos não tradicionais. Nesta legislação, 24 algas são permitidas, entre algas castanhas, vermelhas, verdes e três microalgas, desde que não ultrapassem os valores limites de certos minerais, como o arsénio, o cádmio e o mercúrio [51, 52].

Em Portugal, não existe legislação específica para chás e infusões de ervas aromáticas e outros constituintes. No entanto, existe legislação para as águas destinadas a consumo humano onde se pode reter valores de minerais como o sódio, o cobre e o cádmio de 200 ppm, 1 ppm e 0,003 ppm, respetivamente [53, 54].

## 1.4 Análise de minerais

Para a análise de metais em chás e infusões foram citadas técnicas como plasma indutivamente acoplado (ICP) [30], ou acoplado a espectrometria de emissão atómica (ICP-AES) [5, 32-34, 55, 56], ou a espectrometria de massa (ICP-MS) [28]. A fotometria por chama foi utilizada para a análise de potássio e sódio em infusões de chá verde, por exemplo [29]. Existem, ainda, ensaios com utilização da espectrofotometria de absorção atómica (AAS) com atomização eletrotérmica (ET-AAS) [26, 29] ou por chama F-AAS [30,

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

57-59], espectrometria de fluorescência por polarização de raios X (EDPXRF) [60, 61] e eletroforese capilar [31].

Os trabalhos que apresentam avaliação das infusões descrevem análise direta da infusão (sem qualquer tratamento) [30, 32-34, 57], ou com tratamento prévio de (i) digestão seca (a 480°C) [62], (ii) digestão ácida (com ácido nítrico e ação de calor, à temperatura de ebulição)[5, 28, 29], digestão ácida assistida por micro-ondas [61] ou (iii) por de digestão Kjeldahl com ação dos ácidos nítrico e perclórico [59].

Na Tabela 1.1 indicam-se trabalhos em que foram realizadas análises de infusões de chá verde, chá verde descafeinado, chá preto, chá branco, chá Rooibos, chá de camomila e chá de menta, tendo como objetivo a avaliação nutricional. Os elementos analisados foram o Ca, K, Na, F, Al, Mn, Fe, Cr, Se, B, Cu, Ni, P, Zn, Mg, Pb e Co. Na Tabela 1.1 estão também descritos os métodos analíticos utilizados em cada metal.

*Tabela 1.1 - Resultados da revisão bibliográfica sobre análise de minerais em infusões de chás e ervas aromáticas.*

Elemento	Gama de Concentração (mg/L)	Tipo de infusão	Análise	Referência
Na	0 - 69	Chá verde	Fotometria por chama, AES, ICP-AES	[29, 33, 34, 62]
	7,37	Chá verde descafeinado		
	0,4 - 46,96	Chá preto		
	2503, 86	Chá camomila		
	7,97	Chá menta		
K	66,23 - 28890,9	Chá verde	Fotometria por chama, FAAS, AES, ICP-AES, AES	[29, 30, 32-34, 62]
	82	Chá verde descafeinado		
	94 - 25520,5	Chá preto		
	196 - 358	Chá branco		
	38,5 - 58,2	Chá rooibos		
	386 - 27497,8	Chá camomila		
Ca	0 - 18	Chá verde	FAAS, titulação com EDTA, AAS, ICP-OES, EDPXRF, ICP-AES, AAS, EDPXRF, ICP-MS, AAFES	[29, 30, 32-34, 62]
	3,26	Chá verde descafeinado		
	0 - 9,88	Chá preto		
	1,72 - 4,73	Chá branco		
	18,8 - 6,63	Chá rooibos		
	28,8 - 8186,5	Chá camomila		

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

Elemento	Gama de Concentração (mg/L)	Tipo de infusão	Análise	Referência
	19,07	Chá menta		
Mg	3,86 - 58,4	Chá verde	FAAS, ICP-AES,AAS	[30, 32-34, 62]
	2,25	Chá verde descafeinado		
	5 - 156,3	Chá preto		
	10,5 - 18,5	Chá branco		
	10,3 - 19,8	Chá rooibos		
	16,8 - 2164,9	Chá camomila		
B	0,165 - 0,512	Chá verde	ICP	[30]
	0,134 - 0,403	Chá preto		
	0,134 - 0,412	Chá branco		
	0,428 - 0,408	Chá rooibos		
	0,898	Chá camomila		
Fe	0,005 - 2,94	Chá verde	EAAS, ICP, ICP-AES,AAS	[29, 30, 33, 34, 62]
	0,19	Chá verde descafeinado		
	0,026 - 8,92	Chá preto		
	0,01 - 0,037	Chá branco		
	0,042 - 0,165	Chá rooibos		
	0,122 - 244,5	Chá camomila		
	0,21	Chá menta		
Zn	0,091 - 17,55	Chá verde	ICP, ICP-AES,AAS	[30, 32-34, 62]
	0,1	Chá verde descafeinado		
	0,08 - 8,71	Chá preto		
	0,163 - 0,441	Chá branco		
	0,064 - 0,087	Chá rooibos		
	0,235 - 26,0	Chá camomila		
Mn	0,52 - 20,25	Chá verde	EAAS, ICP, ICP-AES,AAS	[29, 30, 33, 34, 62]
	2,48	Chá verde descafeinado		
	1,3 - 90,82	Chá preto		
	1,5 - 3,38	Chá branco		
	0,2 - 0,634	Chá rooibos		
	0,203 - 24,3	Chá camomila		
	0,13	Chá menta		

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

Elemento	Gama de Concentração (mg/L)	Tipo de infusão	Análise	Referência
P	6,10 - 28,5	Chá verde	ICP, colorimetria	[30, 62]
	8	Chá verde descafeinado		
	28,6 - 33,7	Chá preto		
	22,3 - 38,0	Chá branco		
	2,13 - 7,78	Chá rooibos		
	61,7	Chá camomila		
F	0,44 - 1,79	Chá verde	Potenciometria, FISE	[29, 57]
Cu	0,03 - 0,201	Chá verde	ICP, ICP-AES, AAS	[30, 32-34, 62]
	0,07	Chá verde descafeinado		
	0,01 - 0,59	Chá preto		
	0,048 - 0,182	Chá branco		
	0,145 - 0,226	Chá rooibos		
	0,348 - 7,40	Chá camomila		
Al	0,434 - 266,8	Chá verde	EAAS, ICP, ICP-AES	[29, 30, 33, 34]
	0,4055 - 0,207	Chá branco		
	0,167 - 0,237	Chá rooibos		
	0,292 - 266,8	Chá camomila		
Se	(nd)	Chá verde	EAAS	[29]
Co	0,0057	Chá preto	ICP-MS	[32]
Cr	(nd) - 0,448	Chá verde	EAAS, ICP-AES	[29, 33]
	0,4	Chá preto		
	11,19	Chá camomila		
Pb	<0,00038	Chá preto	ICP-MS	[32]
Ni	0,059 - 0,269	Chá verde	ICP	[30]
	0,076 - 0,152	Chá preto		
	0,05 - 0,135	Chá branco		
	0,008 - 0,031	Chá rooibos		
	0,04	Chá camomila		

A espectrofotometria de absorção atômica é a técnica de referência e a mais usada na determinação de metais nas mais diversas amostras, devido à sua elevada seletividade e sensibilidade. Esta técnica é baseada no princípio de que os átomos livres gasosos, gerados num atomizador, são capazes de absorver radiação eletromagnética de frequência específica do analito, sendo a intensidade de radiação absorvida diretamente

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

relacionada com a quantidade do elemento em estudo, através da lei de Bouger-Lambert-Beer. A lei de Bouger-Lambert-Beer pode ser descrita como  $A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \varepsilon \times b \times c$ , em que A é a absorvância,  $P_0$  é a potência da radiação incidente, P é a potência da radiação transmitida,  $\varepsilon$  é a absorvidade molar, b é o percurso ótico de passagem pela amostra e c é a concentração molar do absorvedor.

Os equipamentos de AAS são constituídos pelos seguintes módulos básicos: uma fonte de luz discreta que emite uma radiação com os comprimentos de onda do metal em estudo (lâmpada de cátodo oco revestida pelo metal), um atomizador (chama ou câmara de grafite com aquecimento eletrotérmico), um monocromador (rede *echellete* como elemento de dispersão da radiação eletromagnética), um detetor (fotomultiplicador) e um sistema de aquisição e de processamento de dados [63, 64].

Recentemente, foi desenvolvido e comercializado um equipamento de alta resolução que utiliza uma fonte contínua, HR-CS AAS (do inglês "*High-Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometer*") com ligeiras diferenças relativamente aos equipamentos de AAS de fonte descontínua (LS-AAS, do inglês *Linear Source Atomic Absorption Spectrometer*), embora sejam usados alguns componentes semelhantes. O equipamento apresenta uma lâmpada de arco curto de xénon a alta pressão (15 bar, quando fria), Figura 1.4, cuja emissão compreende a faixa contínua entre 190 e 850 nm. A lâmpada é operada a uma potência de 300 W, e é constituída por dois eletrodos de tungsténio com uma distância de 1mm entre eles.

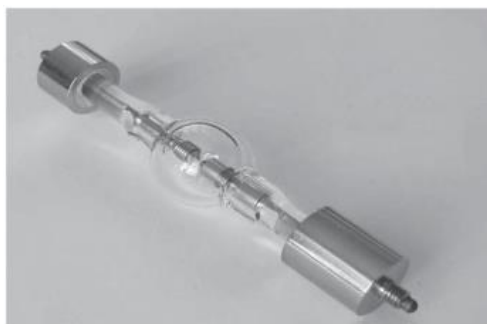


Figura 1.4 - Lâmpada de arco de Xénon, utilizada em HR-CS AAS [57].

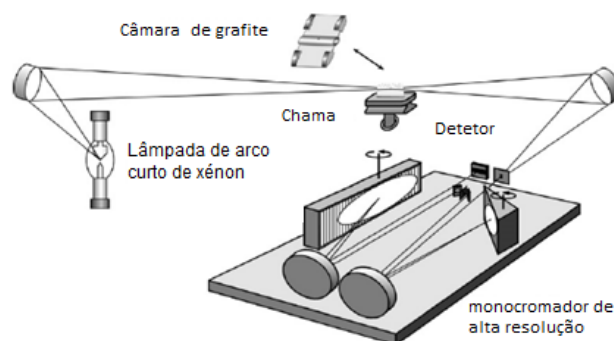
Embora os arcos sejam instáveis, o seu posicionamento é ativamente corrigido por um sistema controlado por computador que move continuamente um espelho garantindo que

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

o feixe de radiação esteja a ser constantemente corrigido e alinhado, de modo a estar no mesmo ponto do atomizador e, portanto, na fenda de entrada do monocromador [64].

Na Figura 1.5 apresenta-se um esquema desses equipamentos.



*Figura 1.5 - Representação esquemática de uma Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Contínua (HR-CS AAS) [65].*

Nestes equipamentos, a radiação transmitida pela amostra é dirigida para um monocromador duplo, responsável pela alta resolução, denominado DEMON (*Double-Echelle Monochromator*), onde incidirá num prisma e numa rede de difração *echelle*, em arranjo *Littrow*. O prisma desempenha o papel de pré-dispersor selecionando a parte do espectro de interesse, e a rede de difração possibilita a alta resolução dos comprimentos de onda e um intervalo espectral de ordem dos 2 pm.

O comprimento de onda de interesse é, desta forma, selecionado pela rotação do prisma e da rede de difração para posições pré-ajustadas, através de motores de passos sobre os quais estes componentes estão fixados. Todos os elementos do monocromador estão combinados num módulo estável e compacto.

Por fim, a radiação emitida e transmitida, após o processo de dispersão, atinge o detetor que recebe dois tipos de sinal, um alternante e um contínuo. Estes sinais são convertidos para os tipos correspondentes de resposta elétrica [64, 66]. O detetor é do tipo CCD de alta eficiência. Com a HR-CS AAS, é possível avaliar uma terceira dimensão do fenómeno da absorção que ocorre no atomizador, como se pode ver na Figura 5. Consequentemente, este é o único equipamento que permite visualizar de três formas a absorção de radiação eletromagnética: (i) a imagem tridimensional (3D), que mostra a absorvância como função do tempo e do comprimento de onda, Figura 1.6a, modo visualmente mais perceptível do potencial do HR-CS AAS no que diz respeito à visualização do ambiente espectral, (ii) o

# Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

sinal de absorvância integrada versus comprimento de onda, que permite visualizar qualquer absorção de radiação que tenha ocorrido no intervalo espectral em análise, Figura 1.6b, e (iii) o tradicional sinal transiente (absorvância versus tempo para um dado comprimento de onda, Figura 1.6c.

A resposta 3D de um equipamento HR-CS AAS é a grande vantagem relativamente aos convencionais, pois permite visualizar um ambiente espectral do pico central de absorção e, desse modo, identificar eventuais interferências espectrais. [64]

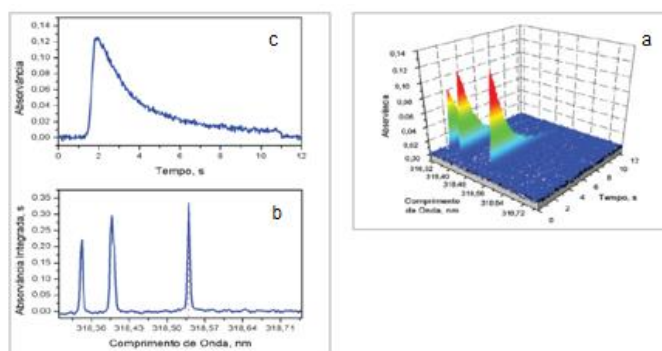


Figura 1.6 - Visualização de dados em HR-CS AAS [62].

Este novo equipamento tem diversas vantagens, sendo de referir o uso de uma única fonte de radiação para todos os elementos; a minimização de ruído, uma vez que a emissão é contínua e a intensidade é aproximadamente uniforme nas diversas regiões do espectro UV-Vis, embora seja mais fraca nos limites da zona do UV; a correção simultânea do fundo nas proximidades da linha analítica; a correção automática para todos os eventos contínuos, como absorção molecular e outros fenómenos em banda larga como emissão do atomizador; melhor desempenho analítico na determinação de elementos vestigiais em amostras complexas.

## 1.5 Análise da capacidade antioxidante

Vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos com a finalidade de determinar a capacidade antioxidante em alimentos, bebidas e amostras biológicas. De uma forma geral são métodos óticos que avaliam a capacidade que um determinado composto tem

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

em inibir/neutralizar a formação de radicais. Dentro destes métodos foi avaliado (i) o teor fenólico total pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, (ii) o teor de flavonoides total pelo método do cloreto de alumínio, (iii) a atividade anti-radicalar usando o método do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e (iv) o poder de redução férrica pelo método de FRAP.

O método de Folin-Ciocalteu consiste na reação de oxidação-redução entre o reagente de Folin (constituído por um complexo de molibdénio e tungsténio, de cor verde azulada) e os compostos fenólicos existentes na amostra. O método original foi desenvolvido em 1927, para a análise de tirosina, sendo posteriormente adaptado para a determinação de compostos fenólicos totais. O método original do TFT é um método simples, sensível e preciso, contudo a reação é lenta a pH ácido e o método é pouco específico [67]. A quantificação é efetuada por espectrofotometria de absorção molecular a 765nm. Para a construção da curva de calibração usam-se soluções padrão de antioxidante de ácido gálico.

O método descrito para a determinação do teor de flavonoides total ou método do cloreto de alumínio, consiste na capacidade que o cloreto de alumínio tem em formar complexos estáveis com os grupos carbonilo e hidroxilo dos flavonoides. Inicialmente, o extrato é oxidado com nitrito de sódio, seguido de uma reação de nitrosilação e da formação do complexo com o ião alumínio. Posteriormente, é adicionado hidróxido de sódio e o complexo vai produzir uma cor em tons rosa, confirmando, assim a presença de flavonoides. Uma das principais desvantagens associadas a este método é o facto de que não se adequa a todos as classes de flavonoides. [68-70] A quantificação é realizada por espectrofotometria de absorção molecular a 510 nm. O padrão antioxidante utilizado na construção da curva de calibração é a epicatequina.

O DPPH' ( ) , 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo é um dos poucos radicais livres de azoto que apresenta uma forte coloração púrpura. Este radical está disponível comercialmente e é amplamente utilizado para a avaliação do perfil antioxidante. A técnica para a avaliação da atividade anti-radicalar utilizando o radical DPPH' foi desenvolvida originalmente pela equipa de Brand-Williams e mais tarde modificada, sendo ainda hoje um dos métodos mais utilizados para a avaliação da atividade anti-radicalar na análise do perfil antioxidante. [71]. O método DPPH é baseado na captura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH') (Figura 1.7) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 517 nm. À medida que o radical vai sendo eliminado (através da

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

neutralização eletrônica do radical), ocorre a mudança de cor na presença de moléculas antioxidantes. A curva de calibração é obtida com padrões de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), um análogo da vitamina E.

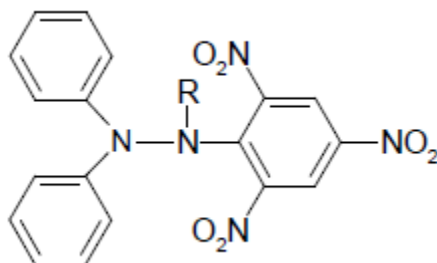


Figura 1.7 - Estrutura do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH·).

No método do poder de redução férrica (FRAP) avalia-se a transformação de Fe(III) em Fe(II) por antioxidantes existentes na amostra. Foi inicialmente desenvolvido para análise do poder de redução em plasma, sendo posteriormente adaptado para a análise do perfil antioxidante de diferentes matrizes, como é o caso de plantas. Este método consiste na redução, a pH ácido, do complexo ferro (III) - 2,4,6-tripiridil-s-triazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) à forma de  $\text{Fe}^{2+}$  (que apresenta uma coloração azul), por compostos redutores nos extratos em análise. [72] A quantificação é efetuada por espectrofotometria de absorção molecular a 700 nm, usando-se como antioxidante padrão o ácido gálico para obtenção da curva de calibração.

A capacidade antioxidante total é avaliada por espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta-visível, sendo utilizado atualmente para o efeito um leitor de microplacas (Figura 1.8). Este equipamento utiliza uma lâmpada de xénon como fonte de luz, o selecionador do comprimento de onda é um monocromador que proporciona uma seleção entre 200 e 999 nm. O leitor de placas possui como detetor tubos fotomultiplicadores.

Relativamente às análises realizadas em espectrofotómetros UV-Visível estes equipamentos são uma melhor alternativa pela sua rapidez (96 poços em frações de segundos) e precisão (3 réplicas por cada poço).



*Figura 1.8 - Leitor de placas microplacas Synergy HT (BioTek®).*



## 2 Parte experimental

### 2.1 Material e equipamento

Todo o material utilizado nos ensaios foi devidamente lavado e colocado num banho ácido (5% de ácido nítrico em água desionizada) com uma permanência de, pelo menos, 12h, sendo, posteriormente, enxaguado com água desionizada e seco numa estufa a 50°C. Este procedimento era para evitar, as contaminações suscetíveis de interferir nos ensaios. Todas as soluções envolvidas nas análises por atomização eletrotérmica foram preparadas com água ultrapura, proveniente de um sistema Simplicity 185 da marca Millipore cuja resistividade era de 18,2 MΩ.cm. As restantes soluções foram preparadas com água desionizada, com resistividade superior a 5 MΩ.cm, obtida por um sistema de purificação Millipore Elix 3 Advantage.

A digestão das infusões foi efetuada num micro-ondas MarsX 1500W da CEM Corporation com recurso a vasos de teflon XP 500 Plus™ de 100 mL. O equipamento utilizado na análise de minerais foi o espectrofotómetro de absorção atómica ContrAA 700, da Analytik Jena, equipado com dois amostradores automáticos, ambos da Analytik Jena, o AS 52S e o MPE para as análises por atomização na chama (F-CS-AAS) e atomização eletrotérmica (ET-CS-AAS), respetivamente. As análises por ET-CS-AAS foram realizadas em tubos de grafite pirolíticos com plataforma (Ic Pin) da Analytik Jena. Os gases de combustão utilizados na F-CS AAS foram o ar e o acetileno e na ET-CS AAS utilizou-se o árgon, como gás de purga. Os gases utilizados foram comercializados pela empresa Linde Sogás.

A capacidade antioxidante total das infusões foi analisada por espectrofotometria de absorção no visível, recorrendo-se a um leitor de microplacas Synergy HT da BioTek®, com agitação controlada e usando placas de 96 poços.

## 2.2 Reagentes

Na realização do trabalho experimental, foram utilizados reagentes da qualidade *pro-analysis*, exceto o ácido nítrico que era *Suprapure* (65%) e fornecido pela Merck.

Foram usadas soluções padrão de 1000 ppm dos elementos metálicos: os do Ca, Mn, Mg e Cd eram da Panrec-AA e os de Na e de K eram da Alfa Aeser-AA. Nas análises com atomização por chama utilizaram-se, como ionizadores de chama, o CsCl e o  $\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  comercializados pela Riedel-de Haën e Panreac, respetivamente. Os modificadores de matriz utilizados nas análises por ET-CS-AAS foram o  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  e o  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  da Merck.

Nas determinações da capacidade antioxidante utilizou-se o ácido gálico, o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico 6 (Trolox), o reagente de Folin-Ciocalteu (2 N), o carbonato de sódio, o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), o 2,4,6-tripiridil-s-triazina TPTZ e o cloreto de ferro (III) hexahidratado, que foram adquiridos à Sigma-Aldrich; o ácido ascórbico L(+), o cloreto de alumínio hexahidratado, o hidróxido de sódio (98,0 %), o etanol absoluto e o acetato de sódio trihidratado que foram adquiridos à Merck; o ácido clorídrico (37%) era da marca ACS Basic e o ácido acético glacial da Carlo Erber Reagents.

## 2.3 Preparação de soluções padrão para a análise de minerais

Todas as soluções padrão foram acidificadas com  $\text{HNO}_3$  a 0,5%.

Na determinação por F-CS-AAS dos metais em estudo (Ca, Na, Mg e K) prepararam-se soluções padrão (ver Tabela 2.2) diretamente a partir dos padrões de 1000 ppm ou a partir de um padrão de concentração intermédia. O ionizador de chama, o CsCl ou no caso das análises para o Ca, o  $\text{La}(\text{NO}_3)_2$  foi adicionado às soluções de acordo com a especificação indicada no manual do equipamento para o analito.

Nas análises por ET-CS-AAS (Cu e Cd), preparava-se uma solução padrão de concentração intermediária (1 ppm), devidamente acidificada, a partir da qual se obtinha a solução padrão de concentração mais elevada da curva de calibração do elemento em estudo (Cu ou Cd); o amostrador automático era programado para preparar as restantes soluções padrão com o respetivo modificador (5 $\mu\text{L}$ ) na ponta do pipetador, a um volume

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

constante de 20 µL, e usando como solução de diluição o HNO<sub>3</sub> 0,5% (o branco). O pipetador media primeiro o modificador de matriz, depois o solvente e por fim o padrão e para de seguida injetar no tubo de grafite. O intervalo de concentrações, as percentagens (v/v) de HNO<sub>3</sub> e de modificador utilizados para cada elemento estudado por F-CS-AAS e por ET-CS-AAS apresentam-se na Tabela 2.1.

*Tabela 2.1 - Condições das soluções para FL-CS-AAS.*

Elemento	Concentração (número de padrões)	HNO <sub>3</sub> (%; v/v)	Modificador de matriz (%; v/v)			
			CsCl	La(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Na	0 - 1,4 ppm (9)	0,5	0,1	-		
K	0 - 1 ppm (10)	0,5	0,1	-		
Ca	0,4 - 10 ppm (8)	0,5	-	0,5		
Mg	0 - 0,6 ppm (8)	0,5	0,1	-		
Cu	0 - 12,0 ppb (7)	0,5			0,1	
Cd	0 - 2,0 ppb (10)	0,5				1

### 2.4 Preparação de soluções padrão para análise de antioxidantes

As soluções padrão mãe e as de trabalho (traçado das curvas de calibração) para as análises da capacidade antioxidante foram preparadas diariamente, aquando da realização dos respetivos ensaios, dia em que se preparavam, também, as infusões, sendo mantidas em frascos de vidro escuro de forma a evitar a interação com a luz. A Tabela 2.2 apresenta as especificações relativas à preparação das soluções padrão, (i) em balões volumétricos de 10 mL para o teor de flavonoides totais e de DPPH e (ii) em balões de 25 mL para o teor de fenóis totais e FRAP. Todos os padrões foram diluídos com água desionizada.

# Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

Tabela 2.2 - Descrição da preparação dos padrões utilizados na construção da curva de calibração dos diferentes métodos.

	Método			
	TFT	Teor de Flavonoides Totais	DPPH	FRAP
<b>Solução padrão mãe</b>	Ácido gálico 200 µg/mL	Epicatequina 300 µg/mL	Trolox 500 µmol/mL	Ácido ascórbico 100 µg/mL
<b>Solvente</b>	Água desionizada	Água desionizada	Etanol	Água desionizada
<b>Número de padrões</b>	6	6	6	6
<b>Volume preparado</b>	25 mL	10 mL	10 mL	25 mL
<b>Intervalo de concentrações das soluções padrão</b>	10 – 200 µg/mL	15 -300 µg/mL	20 – 200 µmol/mL	10 – 200 µg/mL

## 2.5 Amostras

As amostras analisadas e respetivos componentes estão apresentadas na Tabela 4; foram chás, ervas aromáticas, plantas ou misturas adquiridas em superfícies comerciais do Norte de Portugal. De entre muitos tipos de produtos comercializados, escolheram-se amostras que possuíssem componentes comuns de modo a serem correlacionados com os resultados obtidos. A composição das amostras selecionadas (Tabela 2.3) abrangeu diversas misturas de plantas, ervas, algas e chás, com diferentes percentagens, como se verifica, por exemplo, nas amostras 4 e 5 e nas amostras 8 e 10 mas também foram adquiridas infusões de componentes isolados, quando possível, como as amostras 2 e 17, por exemplo.

### 2.6 Preparação de soluções de amostra

As amostras foram analisadas sob a forma da infusão habitualmente ingerida pelos consumidores, pelo que o procedimento selecionado foi baseado nas instruções indicadas nos rótulos das embalagens. Consistiu em mergulhar durante 5,0 minutos as saquetas em 200 mL de água aquecida à ebulição. Enquanto a infusão arrefecia até atingir a temperatura ambiente, a saqueta ficava a gotejar para o interior do gobelé e posteriormente era transferida para um balão volumétrico de 200 mL e aferia-se com água desionizada. Por cada amostra foi preparada uma só infusão.

A capacidade antioxidante foi analisada de imediato, com a infusão recém-preparada ou diluída, para evitar a decomposição dos compostos antioxidantes. A restante solução amostra era guardada a baixas temperaturas (-20 °C), no dia seguinte, em frascos de 50 mL até a digestão ácida para a análise de minerais.

Para a análise mineral foram usados 10,00 mL de infusão que foram digeridas com 6,00 mL de ácido nítrico *Suprapure* no micro-ondas com ambiente controlado (pressão e temperatura). Na Tabela 2.4, pode ver-se o programa de pressão e temperaturas utilizado. Após arrefecimento dos vasos, as soluções eram transferidas para balões volumétricos de 50 mL e aferia-se o volume com água ultrapura. Todas as amostras digeridas eram retiradas do congelador no dia da análise e deixadas a descongelar à temperatura ambiente.

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

Tabela 2.3 - A composição das amostras.

COMPONENTES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
alcachofra																							20%	25%					
alecrim						x																							
algas			0,20%	10%	x			10%	10%	15%	x	10%	15%	x	x	x										x	100%	20%	
amieiro				10%	X			4%			X			X												x			
anis estrelado										10%																			
barbas de milho													15%																
bardana												20%																	
bétula											x																		20%
camomila	100%																												
cavalinha				15%	x							15%		X	X	x						30%	100%		30%		x		
centelha asiática																													25%
chá de java,								23%																					
chá preto		100%																				100%							
chá preto descafeinado							100%																						
chá verde			3%					70%							x		100%	100%								100%			
chicória (fibra)			X	15%	x																								
dente de leão						10%						15%											60%						15%
dextrose			X																										
erva príncipe					x			20%																					10%
frutos (aroma)			x																										

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

Continuação da Tabela 2.3.

COMPONENTES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
funcho								5%				20%	30%			x					20%								100%
gilbarbeira																												10%	
ginseng												5%																	
hortelã pimenta																					25%								
laranjeira										25%			30%																
lúcia lima					x					15%																			
maçã (fibra)						x																							
malvas			x																										
manjericão				10%																									
menta						x																	20%						
oliveira						8%																							
pés de cereja												15%																	
pilriteiro																								20%					
rainha dos prados						12%																							
sabugueiro				10%	x																						x		
sene				30%	x			58%		35%	x		10%	x	x	x					100%	25%					x		
urtiga branca																											x		
urtiga verde																								25%					

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

*Tabela 2.4 - Programa no micro-ondas para a digestão de dez vasos com amostra acidificada.*

	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Potência Máxima (W)
Estágio 1	0 - 5	35 – 50	720
	5 - 12	50	
Estágio 2	12 - 22	50 – 90	840
	22 - 32	90	
Estágio 3	32 - 42	90 – 150	960
	42 - 57	150	

### 2.7 Análise por espectrometria de absorção atômica

Em todas as análises por AAS fez-se a otimização dos parâmetros instrumentais do elemento em estudo, seguidamente quantificavam-se as soluções padrão para o traçado da curva de calibração e procedia-se à análise das soluções amostra.

Nas análises por F-CS-AAS otimizou-se a proporção de gases (acetileno-ar) e a altura de queimador. Os valores usados estão apresentados na Tabela 2.5.

*Tabela 2.5 - Otimização de parâmetros da atomização por chama.*

Elemento	Linha espectral (nm)	Caudal C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> /Ar (L/h)	Altura do Queimador (mm)
Na	588,9993	45	5
K	766,4908	40	4
Ca	422,6728	50	4
Mg	285,2125	50	6

Nas determinações por ET-CS-AAS dos dois elementos (Cu e Cd) utilizou-se o programa de secagem das soluções pré-estabelecido pelo fabricante do equipamento e que envolve 3 etapas com temperaturas de 80, 90 e 110 °C e uma duração total de 40 segundos. As etapas de pirólise e de atomização foram otimizadas estando descrito os valores selecionados na Tabela 2.6.

# Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

Tabela 2.6 - Programa de temperatura otimizado para as etapas de pirólise e atomização na análise por ET-CS-AAS.

Elemento	Linha Espetral (nm)	Pirólise			Atomização		
		T (°C)	V (°C/s)	t (s)	T (°C)	V (°C/s)	t (s)
Cu	324,7540	1000	300	10	2100	1500	4
Cd	228,8018	550	300	10	1200	1400	3

## 2.8 Análise da capacidade antioxidante total

Para a quantificação da capacidade antioxidante utilizaram-se microplacas de poços para a preparação e a reação das soluções padrão e amostra, para os quatro métodos estudados; análise do teor fenólico total (método de Folin-Ciocalteu), de flavonoides totais, da atividade anti-radicalar (DPPH) e do poder de redução férrica (FRAP). Os padrões e as 25 amostras analisadas foram quantificados em triplicado.

Para a determinação do teor fenólico total (TFT), pelo método de Folin-Ciocalteu, adicionou-se a cada poço da placa, 25 µL de amostra ou solução padrão (ácido gálico) ou água desionizada (ensaios em branco), 75 µL de água desionizada e 25 µL do reagente de Folin-Ciocalteu recém-diluído com água desionizada numa proporção de 1:1. Após 6 minutos de reação, adicionou-se 100 µL de solução aquosa de carbonato de sódio (75 g/L) e ficou a reagir durante 90 minutos no escuro. De seguida, as soluções presentes na placa foram analisadas no leitor de placas, ao fim de 1 min de agitação a 765 nm.

Na quantificação dos flavonoides totais, adicionou-se a cada poço 100 µL de água desionizada, 10 µL de uma solução de nitrito de sódio (50 g/L), previamente preparada, e 25 µL de solução padrão (solução de epicatequina) ou amostra ou água desionizada (ensaios em branco). Após 5 minutos, adicionou-se 15 µL de solução de cloreto de alumínio (100 g/L) e ao fim de 1 minuto de reação adicionou-se 50 µL de solução aquosa de hidróxido de sódio (1 M). Por fim, a placa foi introduzida no leitor de placas, onde se procedeu a uma agitação suave num período de 10 minutos e a absorvância foi medida a 510 nm.

A preparação dos ensaios para avaliar a atividade anti-radicalar (DPPH) iniciava-se com a adição aos poços de 25 µL de padrão (trolox) ou amostra e 200 µL de uma solução alcoólica de DPPH (0,1 mmol/L) preparada diariamente; na preparação dos brancos

# Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

utilizava-se etanol perfazendo um total de 225  $\mu\text{L}$ . As soluções eram deixadas a repousar 30 minutos num local isento de luz, e medindo-se, seguidamente, as absorvâncias a 517 nm.

No método de avaliação do poder de redução férrica (FRAP) colocaram-se 20  $\mu\text{L}$  de solução amostra ou padrão na microplaca e, de seguida, adicionavam-se 180  $\mu\text{L}$  de reagente de FRAP. O reagente de FRAP é composto por solução tampão de acetato (pH=5,6), solução aquosa de cloreto de ferro (III) e solução de aquosa TPTZ, numa proporção 10:1:1. Na preparação do branco utiliza-se 20  $\mu\text{L}$  de água e 180  $\mu\text{L}$  de reagente de FRAP. Posteriormente, media-se a absorvância a 593 nm, após uma agitação suave de 10 minutos.

## 2.9 Tratamento de dados

### 2.9.1 Caraterização da curva de calibração

Todas as quantificações foram realizadas pelo método direto (curva de calibração), aplicando o método dos mínimos quadrados para determinação da regressão linear (análises de K, Cu e de antioxidantes) ou da regressão quadrática ( $y=ax^2 + bx + c$ ) na análise dos restantes minerais. A seleção da curva de calibração (linear ou quadrática) para os métodos de AAS foi baseada na avaliação dos resultados obtidos no teste da linearidade com um grau de significância de 95%, nos coeficientes de correlação (R), nos resíduos ( $SS_{\text{res}}$ ), no desvio padrão da regressão ( $S_y$ ), na ordenada na origem ( $Y_0$ ) e nos limites de deteção e de quantificação. [73-75][67-69]

### 2.9.2 Regressão Linear

Em cada curva de calibração linear foram determinados os parâmetros da equação da reta,  $y=ax+b$  bem como o coeficiente de determinação ( $r^2$ ), as incertezas da regressão pelo cálculo dos desvios padrão da regressão ( $S_y$ ) e os limites de deteção (LOD) (Equação 2.1) e de quantificação (LOQ) (Equação 2.2) [73, 74].:

$$LOD = 3 \times S_{x0} \quad 2.1$$

$$LOQ = 10 \times S_{x0} \quad 2.2$$

O teste de linearidade aplicado baseia-se na diferença de variâncias ( $DS^2$ ) (Equação 2.3) entre a regressão linear ( $S_{y1}$ ) e a regressão quadrática ( $S_{y2}$ ) e pelo cálculo do valor teste PG (Equação 2.4). A linearidade é atribuída após a comparação do valor PG com o valor teórico de um teste de F-Fischer, e permite avaliar se a diferença de variâncias resultante é estatisticamente significativa ou não. Se o valor de PG for inferior ao valor de teste-F, o ajuste mais adequado é o linear, caso contrário, é estatisticamente aconselhado um ajuste não linear. [73]:

$$DS^2 = (N - 2)S_{y1}^2 - (N - 3)S_{y2}^2 \quad 2.3$$

$$PG = \frac{DS^2}{S_{y2}^2} \quad 2.4$$

### 2.9.3 Regressão Quadrática

O ajuste quadrático ( $y=ax^2 + bx + c$ ) dos pontos experimentais obtidos para o traçado da curva de calibração foi utilizado na análise dos elementos Na, Ca, Mg e Cd por AAS. Nesta análise os valores das incertezas  $S_y$ ,  $S_{x0}$  e  $V_{x0}$  e os limites LOD e LOQ foram calculados através das expressões 2.5, 2.6, 2.7, 2.8 e 2.9, respetivamente.

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum(y - \hat{y})^2}{N-3}} \quad 2.5$$

$$S_{x0} = \frac{S_y}{E} \quad 2.6$$

$$V_{x0} = \frac{S_{x0}}{\bar{x}} \times 100 \quad 2.7$$

$$LOD = \frac{3 \times S_y}{b + 2 \times c \times \bar{x}} \quad 2.8$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_y}{b + 2 \times c \times \bar{x}}$$

2.9

## 2.9.4 Ensaios de recuperação

Nas análises dos minerais por CS-AAS fizeram-se os estudos de recuperação em 5 amostras aleatoriamente escolhidas. Nestes ensaios a solução amostra era fortificada com uma quantidade conhecida de padrão do elemento a analisar Tabela 2.7 e o resultado obtido era comparado com o da análise da solução amostra e o valor da concentração do padrão adicionado. O valor da recuperação foi calculado através da Equação 2.10.

Tabela 2.7 - Fortificações com padrão nos elementos analisados por AAS.

Elemento	Concentração adicionada
Na	0,35 ppm
K	0,25 ppm
Ca	1 ppm
Mg	0,1 ppm
Cu	5 ppb
Cd	5 ppb

$$REC (\%) = \frac{Conc_{Amostra+FORT} - Conc_{Amostra}}{Conc_{FORT}} \times 100$$

2.10

## 3 Resultados e discussão

### 3.1 Caracterização dos métodos de análise

#### 3.1.1 Minerais

Os elementos sódio (Na), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram determinados por F-CS-AAS usando método de calibração direto, após a otimização prévia de parâmetros instrumentais (caudal de gases de combustão e altura do queimador), para ir de encontro a uma melhor sensibilidade do equipamento partindo como estimativa inicial dos valores fornecidos pelo distribuidor do equipamento. Os parâmetros de caracterização dos métodos utilizados nas análises em F-CS-AAS estão descritos na Tabela 3.1 e onde se pode verificar que os coeficientes de variação destes métodos foram inferiores a 5%.

Após a análise dos resultados obtidos nas duas regressões optou-se por uma regressão quadrática para o sódio, por apresentar menor valor residual ( $S_y$  de 0,0091 para a regressão linear e de 0,0036 para a regressão quadrática), melhor coeficiente de determinação (0,993 para a regressão linear e 0,997 para a regressão quadrática) e melhor ordenada na origem (0,025 para a regressão linear e -0,0014 para a regressão quadrática).

No potássio, os coeficientes de determinação foram idênticos para as duas regressões (0,996 para a regressão linear e 0,996 para a regressão quadrática) e o teste de linearidade apontou para um comportamento linear, com uma ordenada na origem inferior a  $S_y$ .

Nas análises do cálcio verificou-se que o coeficiente de determinação era superior na regressão quadrática mas o  $S_y$  foi menor neste método. O teste de linearidade veio ainda corroborar a não linearidade dos dados experimentais e, por isso, utilizou-se a regressão quadrática.

Por último, para o magnésio, o coeficiente de determinação da regressão quadrática foi francamente melhor (0,998 para a regressão quadrática e 0,995 para a regressão linear) e melhor ordenada na origem (0,80 para a regressão linear e 0,0056 para a regressão

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

quadrática). Recorrendo ao teste de linearidade, foi possível concluir que o ajuste quadrático era o que melhor traduzia os resultados experimentais do magnésio.

Os valores limites de quantificação obtidos foram de 0,10 ppm para o potássio, de 0,24 ppm para o Na, de 0,74 ppm para o Ca e de 0,065 ppm para o magnésio.

Os valores de recuperação foram bastante satisfatórios para todos estes elementos, A menor recuperação (84%) foi obtida para o K numa das amostras estudadas e a maior recuperação (126%) foi obtida para uma das amostras do magnésio.

*Tabela 3.1 - Parâmetros experimentais dos métodos utilizados em F-CS-AAS.*

	K	Na	Ca	Mg
	Linear ( $A=aX+b$ )	Quadrática ( $A=aX^2+bX+C$ )		
a	1,51	1,01	5,57	1,06
b	0,0055	-1,4E-01	-1,3E-03	-4,5E-01
c	-	-0,0014	-0,0004	0,0056
R <sup>2</sup>	0,9996	0,997	0,9996	0,998
S <sub>y</sub>	0,015	0,024	0,0039	0,0069
S <sub>x0</sub> (ppm)	1,0E-02	2,9E-02	8,6E-02	7,7E-03
V <sub>x0</sub> (%)	3,2	4,7	2,2	4,0
DS <sup>2</sup>	-5,3E-03	5,6E-03	8,2E-04	1,5E-03
PG	-5,19	9,38	53,2	30,9
F	12,2	13,7	16,3	16,3
LOD (ppm)	0,030	0,072	0,22	0,019
LOQ (ppm)	0,10	0,24	0,74	0,065
REC (%)	84 - 109	95 - 119	87 - 92	107 - 126

Os elementos cobre (Cu) e cádmio (Cd) foram determinados por ET-CS-AAS após otimização das temperaturas de pirólise e de atomização para obter um maior sinal. Os parâmetros de caracterização dos métodos utilizados nas análises de Cu e Cd estão descritos na Tabela 3.2.

# Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

Tabela 3.2 - Parâmetros experimentais dos métodos utilizados em ET-CS-AAS.

	Cu	Cd
	Linear ( $A=aX+b$ )	Quadrática ( $A=aX^2+bX+C$ )
a	2,20E-02	-1,32E-02
b	0,0190	1,33E-01
c	-	0,0014
R <sup>2</sup>	0,998	0,999
S <sub>y</sub>	7,0E-03	2,2E-03
S <sub>x0</sub>	3,1E-01	1,7E-02
V <sub>x0</sub> (%)	5,0	1,6
DS <sup>2</sup>	-2,2E-04	2,8E-04
PG	-1,21	59,3
F	98,5	11,3
LOD (ppb)	0,93	0,048
LOQ (ppb)	3,1	0,16
REC (%)	69 - 132	61 - 103

A regressão linear para o cobre era notória visualmente e foi confirmado pelo teste de linearidade. Por sua vez, a curva que melhor traduziu a resposta analítica para o cádmio foi a regressão quadrática, apresentando um melhor coeficiente de determinação (0,994 para a regressão linear e 0,999 para a regressão quadrática) e desvios mais baixos.

O método para o cobre originou um LOQ de 3,1 ppb e para o cádmio o valor de 0,16 ppb. As recuperações obtidas nas cinco amostras apresentaram valores muito dispersos. Estes resultados não eram previsíveis para o cobre, de acordo com estudos anteriormente realizados neste equipamento para este metal e estas amostras [76] o que seria de repetir estes estudos e alarga-lo a outras amostras, para se poder obter melhores conclusões quanto a possíveis efeitos de matriz.

### 3.1.2 Capacidade antioxidante

Os métodos colorimétricos convencionais utilizados foram o método de Folin-Ciocalteu (para a determinação do teor de fenóis totais, TFT), o método do cloreto de alumínio (para a determinação do teor de flavonoides totais), o método do DPPH e FRAP para a determinação da atividade anti-radicalar. Os métodos estavam já implementados pelo

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

grupo de investigação pelo que foram não realizados testes de linearidade nem ensaios de recuperação. A resposta linear já estava reconhecida, e as curvas de calibração eram traçadas diariamente. Os parâmetros de calibração obtidos nos quatro métodos estão apresentados na Tabela 3.3.

*Tabela 3.3 - Parâmetros experimentais das curvas de calibração ( $Y=ax+b$ ) para a determinação da capacidade antioxidante.*

	Método			
	TFT	Teor de flavonoides totais	DPPH	FRAP
a	2,20E-02	9,48E-03	6,84E-01	-3,03E-02
b	0,0067	0,0017	-0,0016	0,0082
R <sup>2</sup>	0,9990	0,996	0,9995	0,998
S <sub>y</sub>	0,017	0,015	0,0083	0,015
S <sub>x0</sub>	2,6 µg ácido gálico/L	8,5 mg epicatequina/L	-5,2 µg trolox/L	1,9 µg/mL ácido ascórbico
V <sub>x0</sub> (%)	2,9	6,7	2,5	4,3
LOD	7,8 µg ácido gálico/L	26 mg epicatequina/L	16 µg trolox/L	5,6 µg/mL ácido ascórbico
LOQ	26 µg ácido gálico/L	85 mg epicatequina/L	52 µg trolox/L	19 µg/mL ácido ascórbico

### 3.2 Análise das amostras (infusões)

#### 3.2.1 Sódio

Na Figura 3.1 estão representadas as concentrações de sódio das amostras analisadas sendo que variaram entre 0,84 e 77,5 ppm. A amostra com maior concentração de sódio foi a amostra 23 que tinha na sua composição cerca de 60% em dente de leão. A mediana das concentrações foi cerca de 11 ppm. O percentil 75 foi cerca de 22 ppm enquanto que o percentil 25 foi cerca de 4,2 ppm.

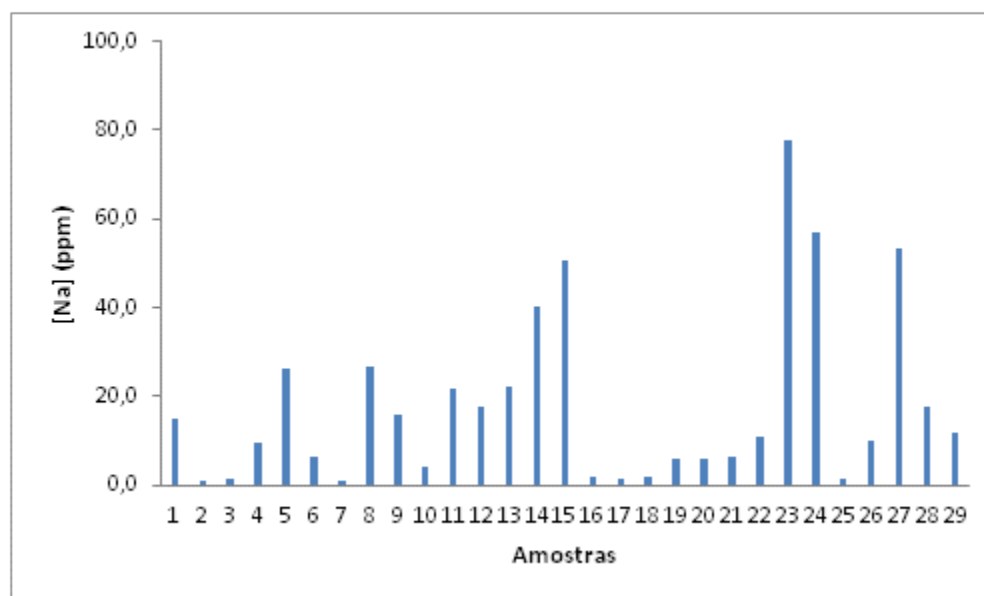


Figura 3.1 - Concentração de Na nas amostras analisadas por FL-CS-AAS.

### 3.2.2 Potássio

Na Figura 3.2 estão representadas as diferentes concentrações de potássio encontradas nas infusões analisadas. Os valores de potássio variaram entre 2,5 e 26 ppm, sendo a amostra 10, a menos rica neste mineral e as amostras 5, 22 e 23 as mais ricas em potássio. Este elevado teor nas amostras 5 e 22 poderá estar relacionado com a presença de cavalinha, uma vez que a amostra 22 era uma infusão de 100% cavalinha. O teor de potássio na maioria das infusões analisadas não apresentaram grandes diferenças, os valores de percentil 25 e 75 foram de 6,7 e 11 ppm, sendo a mediana de 8,0 ppm.

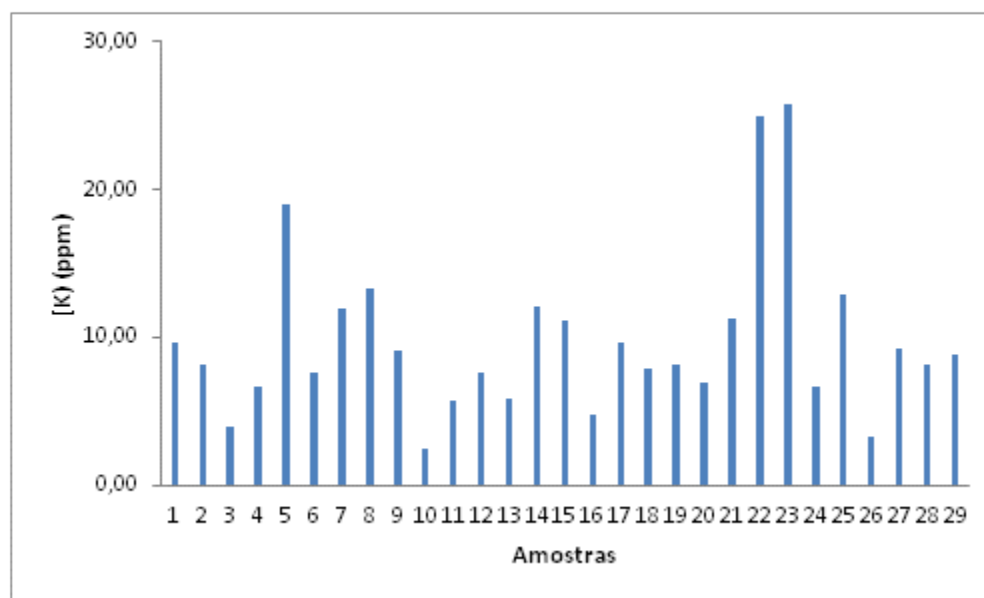


Figura 3.2 - Concentração de K nas amostras analisadas por FL-CS-AAS.

### 3.2.3 Cálcio

Na Figura 3.3 estão representadas as concentrações de cálcio encontradas pelas diferentes amostras. A gama de concentrações de cálcio nas amostras variou entre 1,3 e 85 ppm, sendo a amostra 18 a amostra mais pobre em cálcio; e a amostra com teor mais elevado a infusão 22, sendo seguida pela amostra 20, com 58 ppm, e pela amostra 5, com 42 ppm. A amostra 22 era uma infusão de cavalinha (100%), enquanto que a amostra 20 era uma infusão 100% sene, o que nos leva a crer que estes dois componentes estarão intimamente ligados com a concentração de cálcio, até porque a terceira amostra mais concentrada em cálcio (amostra 5) era uma mistura que continha estes dois componentes.

A mediana das concentrações foi cerca de 16 ppm. O percentil 75 é 27 ppm enquanto que o percentil 25 foi cerca de 4,0 ppm.

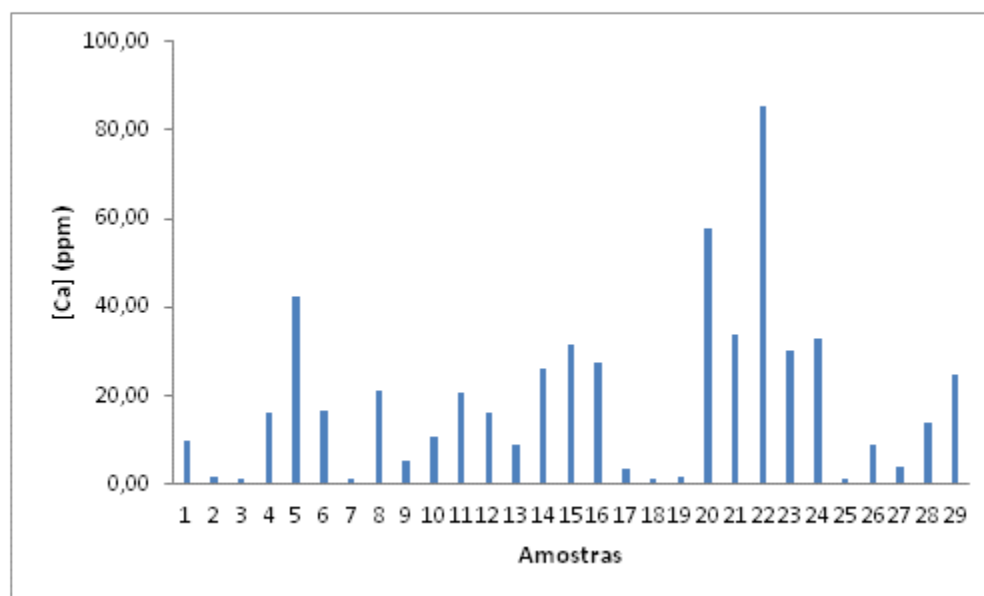


Figura 3.3 - Concentração de Ca nas amostras analisados por F-CS-AAS.

### 3.2.4 Magnésio

Na Figura 3.4 estão representadas as concentrações de magnésio nas diferentes infusões.

Pode observar-se que a gama de concentrações de magnésio variou entre 2,3 e 50 ppm. A mediana das concentrações foi cerca de 12 ppm e os percentis 75 e 25 foram de 23 ppm e 7,5 ppm, respetivamente. A amostra 22 foi a amostra com maior teor de magnésio sendo esta amostra uma infusão de cavalinha 100%.

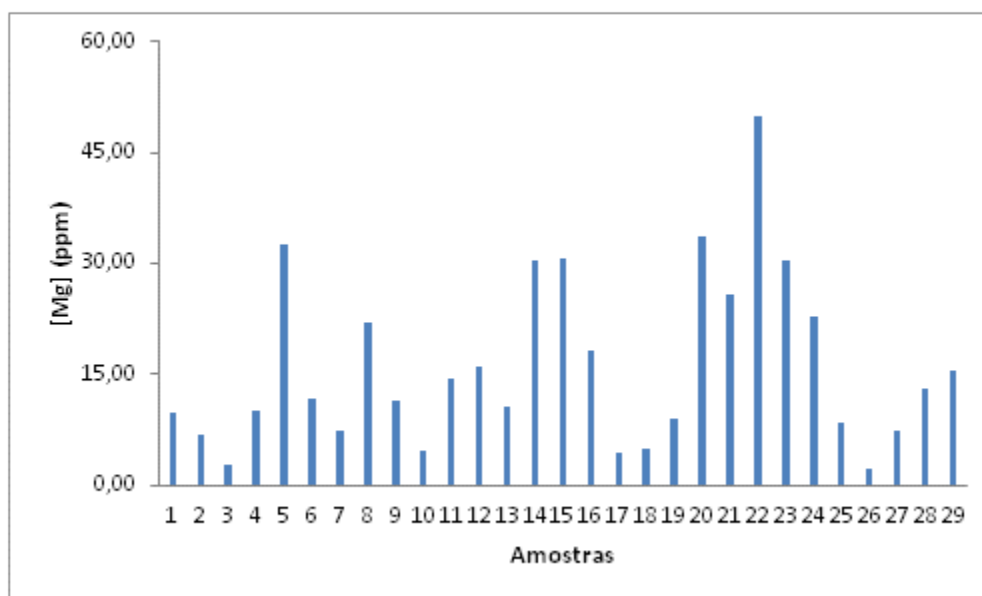


Figura 3.4 - Concentração de Mg nas amostras analisados por F-CS-AAS.

### 3.2.5 Cobre

Na Figura 3.5 estão representadas as concentrações de cobre das diferentes infusões analisadas. As concentrações de cobre nas amostras variaram entre 11 e 121 ppb. As amostras com teor mais elevado foi a amostra 17, sendo esta uma infusão 100% chá verde. A mediana das concentrações foi de 43 ppb. O percentil 75 foi 56 ppb enquanto que o percentil 25 foi cerca de 32 ppb.

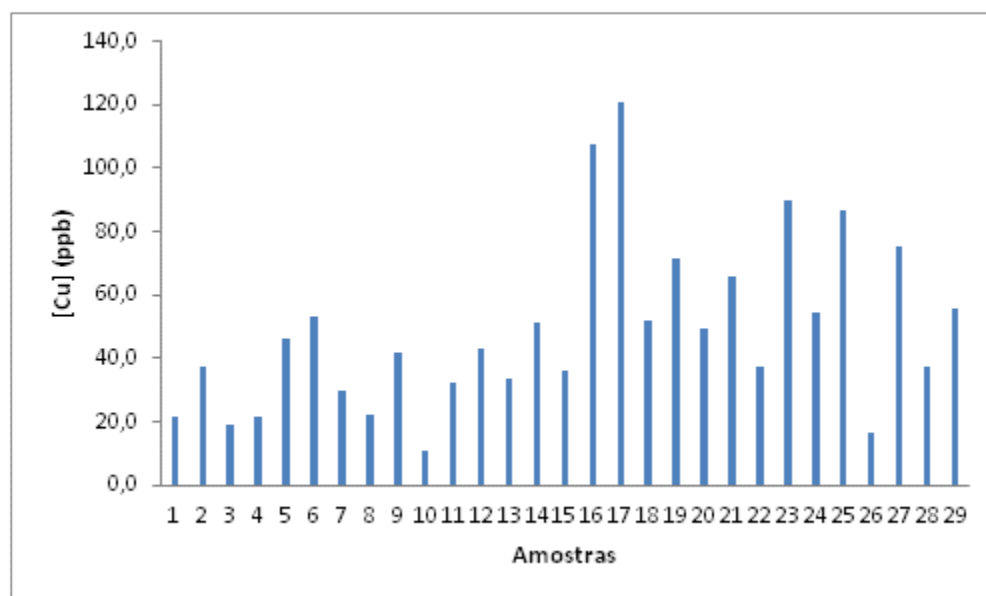


Figura 3.5 - Concentração de Cu nas amostras analisados por ET-CS-AAS.

### 3.2.6 Cádmio

Na Figura 3.6 estão representadas as concentrações de cádmio das diferentes infusões analisadas. Em geral, pode dizer-se que as quantidades de cádmio nas amostras foram vestigiais. A mediana nas amostras foi de 1,0 ppb. O percentil 75 é 1,1 ppb enquanto que o percentil 25 foi 0 ppb. As amostras 3, 5, 6, 7, 8, 10, 13, 16, 18, 24, 26 e 29 apresentaram valores inferiores ao limite de quantificação. A amostra com um teor superior em cádmio foi a amostra 2 que era uma infusão 100% chá preto, seguida da amostra 28 (mistura de componentes: algas, bétula, centelha asiática, dente de leão, erva príncipe e gilbarbeira) e 20 (infusão sene 100%).

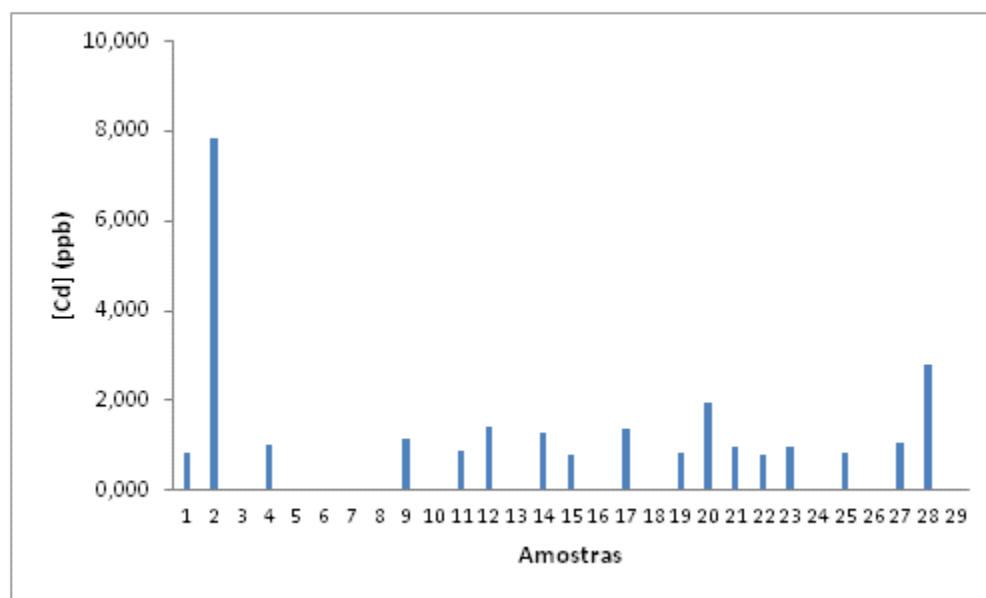


Figura 3.6 - Concentração de Cd nas amostras analisados por ET-CS-AAS.

### 3.2.7 Teor fenólico

Na Figura 3.7 estão representados os teores de fenóis totais das amostras analisadas pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. Os teores de fenóis encontrados variaram entre 38 e 706  $\mu\text{g}$  ácido gálico/L, sendo as amostras com maior teor as infusões 19, 11 e 17, por esta ordem. A amostra 19 era uma infusão 100% de chá preto a amostra 17 era uma infusão 100% de chá verde e a amostra 11 era uma mistura de algas e outras ervas. A amostra 25 apresentou o quinto maior teor fenólico entre as infusões analisadas, sendo, também de chá verde 100%. A mediana do teor de fenóis nas amostras foi de 162  $\mu\text{g}$  ácido gálico/L e os percentis 75 e 25 foram de 231  $\mu\text{g}$  e 106  $\mu\text{g}$  ácido gálico/L, respetivamente.

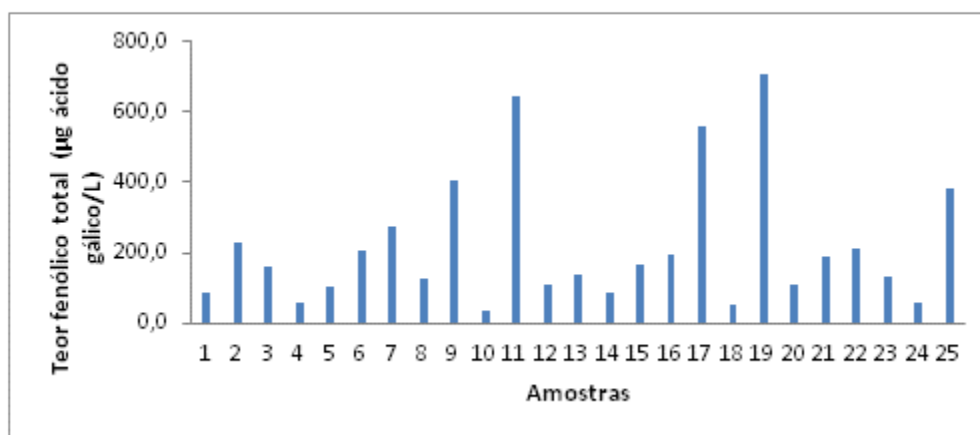


Figura 3.7 - Teor fenólico total das amostras analisadas pelo de Folin-Ciocalteu.

### 3.2.8 Teor de flavonoides total

Na Figura 3.8 estão representados os teores de flavonoides das amostras analisadas pelo método do cloreto de alumínio. Como se pode observar na figura, foram encontrados valores desde 6,33 a 255 mg epicatequina/L. A mediana, o percentil 75 e o percentil 25 foram de 114, 164 e 65 mg epicatequina/L, respetivamente.

De forma semelhante ao que aconteceu com o teor fenólico, também o teor de flavonoides teve o valor mais baixo para a amostra 10 e o valor mais elevado para a amostra 19. A amostra 16 apresentou o segundo maior teor de flavonoides entre as amostras, sendo esta uma infusão com várias ervas incluindo a cavalinha, erva que pareceu ter interação neste teor pois a amostra seguinte em teor de flavonoides foi a amostra 22, que se tratava de uma infusão 100% cavalinha.

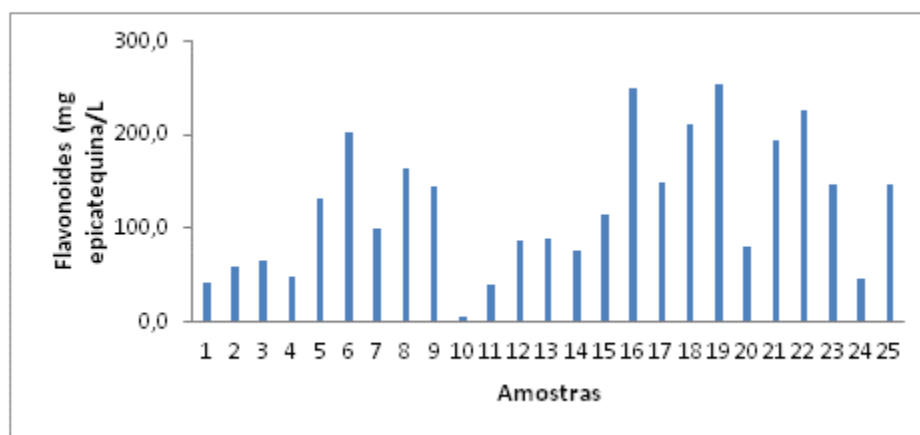


Figura 3.8 - Teor de flavonoides total das amostras analisadas pelo método do cloreto de alumínio.

### 3.2.9 Atividade anti-radicalar

Na Figura 3.9 estão representadas as atividades anti-radicalares das diferentes amostras obtidas pelo método do DPPH. Como se pode observar a gama variou entre os 110 a 2641  $\mu\text{g}$  trolox/L. Novamente, a amostra com menor capacidade antioxidante foi a amostra 10. Por outro lado, os valores mais elevados foram obtidos para as amostras 25, 9 e 3 sendo infusões com diferentes percentagens de chá verde: 100% chá verde, 70% de chá verde e 3% de chá verde, respetivamente.

O valor da mediana dos resultados foi de 386  $\mu\text{g}$  trolox/L, com percentis 75 e 25 de 397 e 284  $\mu\text{g}$  trolox/L, respetivamente.

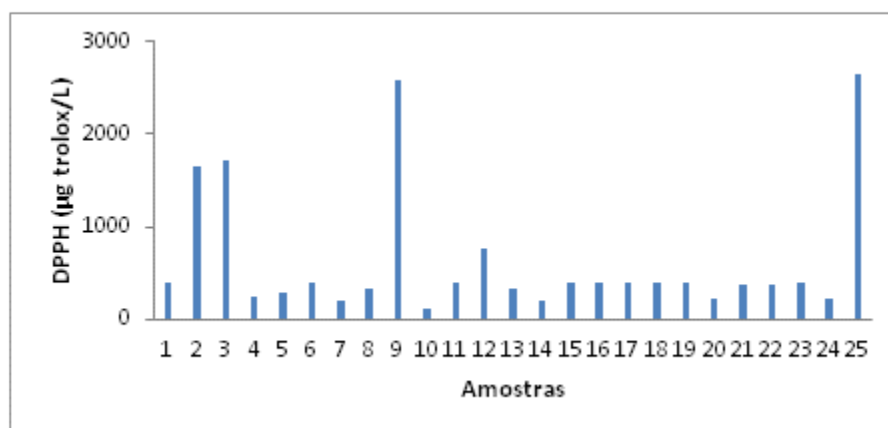


Figura 3.9 - Atividade anti-radicalar das amostras analisadas pelo método do DPPH.

### 3.2.10 Poder de redução férrica - FRAP

Na Figura 3.10 estão representados os resultados obtidos na análise do poder de redução férrica (método de FRAP) para todas as amostras. O valor da mediana foi de 88  $\mu\text{g/mL}$  em ácido ascórbico e os percentis 75 e 25 foram de 319 e de 94  $\mu\text{g/mL}$  ácido ascórbico, respetivamente. Como se pode ver na Figura 3.10, o valor mais baixo encontrado também foi na amostra 10 e os valores mais elevados nas amostras 17 e 18, infusões de chá verde 100%. Seguidamente, encontra-se a amostra 9 com uma percentagem de chá verde de 70%.

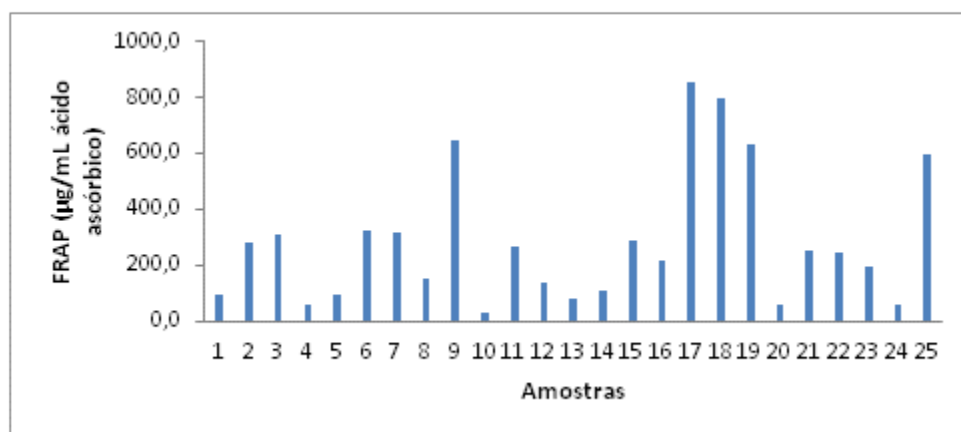


Figura 3.10 - Poder de redução férrica das amostras analisadas pelo método de FRAP.

## 3.3 Discussão de resultados

Na Tabela 3.4 estão identificadas as amostras cujos teores em minerais se evidenciaram das restantes amostras, por excesso (acima do valor encontrado para o percentil 75) ou por defeito (abaixo do percentil 25). As células coloridas representam as amostras cujos teores se evidenciaram pelos valores mais elevados e mais baixos.

*Tabela 3.4 - Amostras com concentrações acima do P75 e abaixo do P25 em minerais (ordenadas por nº de amostra).*

	Na	K	Ca	Mg	Cu	Cd
Amostras com quantidades superiores às do Percentil 75	5	5	5	5	16	2
	8	7	15	14	17	9
	13	8	16	15	19	12
	14	14	20	20	21	14
	15	21	21	21	23	17
	23	22	22	22	25	20
	24	23	23	23	27	27
	27	25	24	24	29	28
Amostras com quantidades inferiores às do Percentil 25	2	3	2	2	1	3
	3	4	3	3	3	5
	7	10	7	7	4	6
	10	11	17	10	7	7
	16	13	18	17	8	8
	17	16	19	18	10	10
	18	24	25	26	11	13
	25	26	27	27	26	16
						18
						24
					26	
					29	

Como se pode observar na tabela anterior, foram encontradas amostras que se destacaram por possuírem maiores ou menores concentrações em minerais do que na maior parte das outras amostras.

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

As amostras 14 e 22 evidenciaram-se em três metais. A amostra 14 era rica em Na, K e Mg enquanto que a amostra 22 era rica em K, Ca e Mg. A amostra 14 é uma amostra com vários componentes (algas, amieiro, cavalinha e sene) e a amostra 22 é uma infusão de cavalinha (100%).

As amostras 5 e 21 apresentaram valores superiores aos do P75 em quatro minerais (K, Ca, Mg) e Na para amostra 5 ou Cu na amostra 21. As duas amostras eram misturas de componentes: a amostra 5 continha algas, amieiro, cavalinha, erva príncipe, lúcia lima, sabugueiro e sene, e a amostra 21 continha cavalinha, funcho, hortelã pimenta e sene.

A amostra 23 foi a que se destacou de todas das restantes por ser rica nos cinco minerais, Na, K, Ca, Mg e Cu. Esta amostra 23 era uma infusão de contendo alcachofra, dente de leão e menta.

Quanto ao cádmio, tratando-se um elemento tóxico cuja presença está frequentemente associada à contaminação ambiental, não era de esperar que as amostras apresentassem valores elevados neste metal. As amostras com teor mais elevado em cádmio foi a amostra 2 que era uma infusão 100% chá preto, seguida da amostra 28 que era uma mistura de componentes (algas, bétula, centelha asiática, dente de leão, erva príncipe e gilbarbeira) e a amostra 20 que era 100% sene. Das oito amostras com valores acima do P75, cinco (9, 12, 14, 27 e 28) são misturas que tinham em comum algas, que é um componente que pode estar sujeito a poluição aquática do local onde são cultivadas ou colhidas.

Amostras com valores destes minerais abaixo do P25, são de referir a amostra 18 (no Na, Ca, Mg e Cd) e a amostra 26 no K, Mg, Cu e Cd. A amostra 18 é um chá verde enquanto que a amostra 26 é uma infusão de diferentes componentes (algas, amieiro, cavalinha, sabugueiro, sene e urtiga branca).

As amostras 7 e 10 apresentaram concentrações abaixo do P25 para o Na, Mg, Cu, Cd e Ca para a amostra 7 ou K para a amostra 10. A amostra 7 é um chá verde descafeinado ao passo que a amostra 10 é uma infusão de algas, anis estrelado, laranjeira, lúcia lima e sene. A amostra 3 aparece em todos os elementos. A amostra 3 é composta por algas (apenas 0,2%), chá verde, chicória, dextrose, frutos e malvas.

Estabelecendo uma comparação com a tabela de resultados da revisão bibliográfica sobre análise de minerais em infusões de chás e ervas aromáticas (Tabela 1.1), pode denotar-se que o mínimo de concentração em sódio foi o mesmo quer neste estudo, quer

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

na revisão bibliográfica (0 ppm). No entanto, o valor máximo encontrado na bibliografia foi de 2504 ppm, muito além do valor máximo das amostras estudadas, 170 ppm.

No caso do potássio, o mínimo de concentração encontrado na bibliografia foi de 82 ppm, ao passo que, neste estudo, foi menor, 3 ppm. Em visão contrária, o máximo de concentração de potássio em amostras de infusões analisadas na bibliografia foi 28891 ppm enquanto que neste projeto foi 47 ppm.

O cálcio, elemento também analisado neste projeto, apresentou-se como quantidade mínima 1 ppm e como concentração máxima 85 ppm. Por sua vez, na literatura, o valor mínimo encontrado para o cálcio foi 0 ppm e o valor máximo 19 ppm.

Os valores de concentração de cobre nas infusões relatados na bibliografia variaram entre 0,01 e 7,40 ppm. Neste trabalho, os valores de concentrações variaram ente 11 ppm e 120 ppm.

Na Tabela 3.5 estão identificadas as amostras cujas capacidades antioxidantes se evidenciaram das restantes amostras, por excesso (acima do valor encontrado para o percentil 75) ou por defeito (abaixo do percentil 25). As células coloridas representam as amostras cujos teores se evidenciaram pelos valores mais elevados e mais baixos.

*Tabela 3.5 - Amostras com capacidades antioxidantes acima do P75 e abaixo do P25 (ordenadas por nº de amostra).*

	TFT	Flavonoides	DPPH	FRAP
Amostras com quantidades superiores às do Percentil 75	2	6	2	6
	7	8	3	7
	9	16	9	9
	11	18	12	17
	17	19	15	18
	19	21	18	19
	25	22	25	25
Amostras com quantidades inferiores às do Percentil 25	1	1	4	1
	4	2	5	4
	5	3	7	5
	10	4	10	10
	14	10	14	13
	18	11	20	20
	24	24	24	24

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

Como se pode observar pela tabela, as amostras que mais frequentemente apareceram com capacidade antioxidante superior às do P75 foram as amostras 18, 19 e 25. Além dos teores elevados em flavonoides e atividade anti-radicalar, a 18 evidenciou-se pelos valores elevados de DPPH, as amostras 19 e 25 pelos teores de fenóis totais. As amostras 18 e 25 são chás verdes enquanto que a amostra 19 é um chá preto.

Pelo lado oposto, as amostras 4, 10 e 24 evidenciaram-se das restantes amostras por aparecerem na lista de infusões com teores abaixo do P25 para os 4 métodos estudados para avaliação da capacidade antioxidante.

As amostras 1 e 5 apresentaram valores inferiores aos do P25 em três diferentes métodos. A amostra 1 apresentou-se abaixo do P25 no TFT, teor de flavonoides e método de FRAP.

Por último, a amostra 5 destacou-se nos métodos TFT, DPPH e método de FRAP.

A amostra 1 era uma infusão de camomila (100%), mas as amostra 4, 5, 10 e 24 eram misturas de vários componentes. A amostra 10 era uma infusão de algas, anis estrelado, laranjeira, lúcia lima e sene. Enquanto que a amostra 24 era uma infusão que continha outros componentes (alcachofra, cavalinha, pilriteiro e urtiga verde). Por outro lado, as amostras 4 e 5 eram infusões em comum continham algas, amieiro, cavalinha, sabugueiro e sene, embora a amostra 4 quatro ainda tivesse chicória e manjerição, ao passo que a amostra 5 tinha erva príncipe e lúcia lima.

No entanto, todo este trabalho necessita de um auxílio estatístico mais aprofundado para se poder obter conclusões mais rigorosas, elaborar réplicas dos ensaios para obter reprodutibilidade e aumentar a pesquisa a outros metais, como elementos tóxicos.

A análise estatística será utilizada para relacionar os resultados obtidos (metais e antioxidantes) com os componentes das infusões de modo a relacionar a presença de certos ingredientes nos vários tipos de infusões estudadas com o teor mineral e a capacidade antioxidante total.

Os resultados obtidos neste trabalho serão submetidos a análise multivariada de dados com especial ênfase nas técnicas de reconhecimento de formas supervisionadas e não supervisionadas. De um modo geral, a análise multivariada refere-se a todos os métodos estatísticos que simultaneamente analisam múltiplas medidas sobre cada indivíduo ou objeto de investigação. De alguma forma, qualquer análise de mais de duas variáveis pode ser considerada análise multivariada [77].



### 4 Conclusões

Neste projeto foi feita a análise de macro e microminerais e a avaliação da capacidade antioxidante numa grande variedade de infusões, obtidas a partir de chás, ervas aromáticas ou misturas destas, comercializadas em Portugal em saquetas de doses individuais. A análise de minerais foi realizada num espectrofotómetro de absorção atómica com fonte contínua e a avaliação da capacidade antioxidantes foi avaliada num leitor de microplacas. Os minerais analisados foram o Na, K, Ca, Mg, Cu e Cd. Os métodos utilizados para avaliar a capacidade antioxidantes das amostras foram: o teor de fenóis, o teor de flavonoides totais, o DPPH e o método de FRAP.

Atendendo aos cálculos de percentis, obtiveram-se conclusões importantes quanto à influência de determinado chá ou até mesmo erva, quer na concentração de minerais, quer na capacidade antioxidante, na infusão final.

Níveis superiores ao percentil 75 para o Na, K, Ca, Mg e Cu foram apresentados, de um modo geral, por amostras de algas, amieiro, cavalinha e sene. No caso do cádmio, elemento que é avaliado, do ponto de vista nutricional, de forma diferente por ser considerado um elemento tóxico, apresentou-se superior ao percentil 75 primordialmente em amostras contendo algas na sua composição.

As capacidade antioxidantes foram superiores ao percentil 75 principalmente em chás verdes, enquanto que as capacidade antioxidantes foram inferiores ao percentil 25 essencialmente em infusões de cavalinha.

No entanto, todo este trabalho necessita de um auxílio estatístico mais aprofundado para se poder obter conclusões mais rigorosas, elaborar réplicas dos ensaios para obter reprodutibilidade a aumentar a pesquisa a outros metais, como elementos tóxicos.

A análise estatística será utilizada para relacionar os resultados obtidos (metais e antioxidantes) com os componentes das infusões de modo a relacionar a presença de certos ingredientes nos vários tipos de infusões estudadas com o teor mineral e a capacidade antioxidante total.



## Bibliografia

1. Malik, J., et al., *Aluminium and other elements in selected herbal tea plant species and their infusions*. Food Chemistry, 2013.
2. Korkmaz Görür, F., et al., *Radionuclides and heavy metals concentrations in Turkish market tea*. Food Control, 2011. 22(12): p. 2065-2070.
3. Li, X., et al., *Determination for major chemical contaminants in tea (Camellia sinensis) matrices: A review*. Food Research International, 2012.
4. Piljac-Zegarac, J., et al., *Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions*. Food Chemistry, 2010. 121(3): p. 820-825.
5. Salahinejad, M. and F. Aflaki, *Toxic and Essential Mineral Elements Content of Black Tea Leaves and Their Tea Infusions Consumed in Iran*. Biological Trace Element Research, 2010. 134(1): p. 109-117.
6. Anderson, R.A. and M.M. Polansky, *Tea enhances insulin activity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. 50(24): p. 7182-7186.
7. Mahani, M.K. and M.G. Maragheh, *Simultaneous Determination of Sodium, Potassium, Manganese and Bromine in Tea by Standard Addition Neutron Activation Analysis*. Food Analytical Methods, 2011. 4(1): p. 73-76.
8. Nagai, T. and T. Yukimoto, *Preparation and functional properties of beverages made from sea algae*. Food Chemistry, 2003. 81(3): p. 327-332.
9. Lagad, R.A., et al., *Instrumental neutron activation analysis for multi-elemental determination in Indian tea samples*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 2011. 288(2): p. 613-620.
10. Karak, T. and R.M. Bhagat, *Trace elements in tea leaves, made tea and tea infusion: A review*. Food Research International, 2010. 43(9): p. 2234-2252.
11. Almajano, M.P., et al., *Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions*. Food Chemistry, 2008. 108(1): p. 55-63.
12. Pangestuti, R. and S.-K. Kim, *Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae*. Journal of Functional Foods, 2011. 3(4): p. 255-266.
13. El Gamal, A.A., *Biological importance of marine algae*. Saudi Pharmaceutical Journal, 2010. 18(1): p. 1-25.

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

14. Ruperez, P., *Mineral content of edible marine seaweeds*. Food Chemistry, 2002. 79(1): p. 23-26.
15. Rodenas de la Rocha, S., et al., *Trace elements determination in edible seaweeds by an optimized and validated ICP-MS method*. Journal of Food Composition and Analysis, 2009. 22(4): p. 330-336.
16. Almela, C., et al., *Total arsenic, inorganic arsenic, lead and cadmium contents in edible seaweed sold in Spain*. Food and Chemical Toxicology, 2006. 44(11): p. 1901-1908.
17. Dawczynski, C., et al., *Nutritional and toxicological importance of macro, trace, and ultra-trace elements in algae food products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007. 55(25): p. 10470-10475.
18. Torres, M.A., et al., *Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008. 71(1): p. 1-15.
19. Francesconi, K.A., *Toxic metal species and food regulations making a healthy choice*. Analyst, 2007. 132(1): p. 17-20.
20. Martinez-Ballesta, M.C., et al., *Minerals in plant food: effect of agricultural practices and role in human health. A review*. Agronomy for Sustainable Development, 2010. 30(2): p. 295-309.
21. Fraga, C.G., *Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health*. Molecular Aspects of Medicine, 2005. 26(4-5): p. 235-244.
22. Falandysz, J. and J. Borovicka, *Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013. 97(2): p. 477-501.
23. Lee, H.S., et al., *Dietary exposure of the Korean population to arsenic, cadmium, lead and mercury*. Journal of Food Composition and Analysis, 2006. 19: p. S31-S37.
24. Al-Othman, Z.A., et al., *Evaluation of Trace Metals in Tea Samples from Jeddah and Jazan, Saudi Arabia by Atomic Absorption Spectrometry*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2012. 89(6): p. 1216-1219.
25. Iavicoli I., Fontana L., and Bergamaschi. A., *The Effects of Metals as Endocrine Disruptors*. Journal of Toxicology and Environmental Health, 2009.
26. Mandiwana, K.L., N. Panichev, and S. Panicheva, *Determination of chromium(VI) in black, green and herbal teas*. Food Chemistry, 2011. 129(4): p. 1839-1843.

27. Mokgalaka, N.S., R.I. McCrindle, and B.M. Botha, *Multielement analysis of tea leaves by inductively coupled plasma optical emission spectrometry using slurry nebulisation*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004. 19(10): p. 1375-1378.
28. Kara, D., *Evaluation of trace metal concentrations in some herbs and herbal teas by principal component analysis*. *Food Chemistry*, 2009. 114(1): p. 347-354.
29. Reto, M., et al., *Chemical composition of green tea (Camellia sinensis) infusions commercialized in Portugal*. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2007. 62(4): p. 139-144.
30. Malik, J., et al., *Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions*. *Food Chemistry*, 2008. 111(2): p. 520-525.
31. Feng, H.T., T.L. Wang, and S.F.Y. Li, *Sensitive determination of trace-metal elements in tea with capillary electrophoresis by using chelating agent 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR)*. *Food Chemistry*, 2003. 81(4): p. 607-611.
32. Matsuura, H., et al., *Multielement determination and speciation of major-to-trace elements in black tea leaves by ICP-AES and ICP-MS with the aid of size exclusion chromatography*. *Analytical Sciences*, 2001. 17(3): p. 391-398.
33. Ozcan, M.M., et al., *Mineral content of some herbs and herbal teas by infusion and decoction*. *Food Chemistry*, 2008. 106(3): p. 1120-1127.
34. Fernandez, P.L., et al., *Multi-element analysis of tea beverages by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*. *Food Chemistry*, 2002. 76(4): p. 483-489.
35. Carochi, M. and I.C.F.R. Ferreira, *A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives*. *Food and Chemical Toxicology*, 2013. 51(0): p. 15-25.
36. Martins, A.C., et al., *The antioxidant activity of teas measured by the FRAP method adapted to the FIA system: optimising the conditions using the response surface methodology*. *Food Chemistry*, 2013. 138(1): p. 574-80.
37. Barroso, M.F., C. Delerue-Matos, and M.B.P.P. Oliveira, *Evaluation of the total antioxidant capacity of flavored water and electrochemical purine damage by sulfate radicals using a purine-based sensor*. *Electrochimica Acta*, 2011. 56(24): p. 8954-8961.

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

38. Barreira, J.C.M., et al., *Antioxidant Potential of Chestnut (Castanea sativa L.) and Almond (Prunus dulcis L.) By-products*. Food Science and Technology International, 2010. 16(3): p. 209-216.
39. Oh, J., et al., *Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas*. Food Control, 2013. 31(2): p. 403-409.
40. Balasundram, N., K. Sundram, and S. Samman, *Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses*. Food Chemistry, 2006. 99(1): p. 191-203.
41. du Toit, R., Y. Volsteedt, and Z. Apostolides, *Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents*. Toxicology, 2001. 166(1-2): p. 63-69.
42. Benzie, I.F.F. and Y.T. Szeto, *Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. 47(2): p. 633-636.
43. Polovka, M., V. Brezová, and A. Staško, *Antioxidant properties of tea investigated by EPR spectroscopy*. Biophysical Chemistry, 2003. 106(1): p. 39-56.
44. Tsai, C.-F., et al., *The in vivo antioxidant and antifibrotic properties of green tea (Camellia sinensis, Theaceae)*. Food Chemistry, 2013. 136(3-4): p. 1337-1344.
45. Kilmartin, P.A. and C.F. Hsu, *Characterisation of polyphenols in green, oolong, and black teas, and in coffee, using cyclic voltammetry*. Food Chemistry, 2003. 82(4): p. 501-512.
46. Chan, E.W.C., et al., *Antioxidant properties of tropical and temperate herbal teas*. Journal of Food Composition and Analysis, 2010. 23(2): p. 185-189.
47. Atoui, A.K., et al., *Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile*. Food Chemistry, 2005. 89(1): p. 27-36.
48. Socha, R., et al., *Determination of free radicals and flavan-3-ols content in fermented and unfermented teas and properties of their infusions*. European Food Research and Technology, 2013. 237(2): p. 167-177.
49. Zhang, Y.T., et al., *Evaluation of antioxidant activity of ten compounds in different tea samples by means of an on-line HPLC-DPPH assay*. Food Research International, 2013. 53(2): p. 847-856.
50. *Regulamento (CE) n.o 1881/2006*, 2006, União Europeia.

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

51. Besada, V., et al., *Heavy metals in edible seaweeds commercialised for human consumption*. Journal of Marine Systems, 2009. 75(1-2): p. 305-313.
52. *Réglementation algues alimentaires Synthèse CEVA au 18/09/2012*, 2012, França.
53. *Decreto-Lei n.º 306/2007*, 2007, Portugal.
54. *Decreto Lei Nº 72 - 2004*, Portugal.
55. Lambie, K. and S.J. Hill, *Determination of trace-metals in tea using both microwave digestion at atmospheric-pressure and inductively-coupled plasma-atomic emission-spectrometry*. Analyst, 1995. 120(2): p. 413-417.
56. Ashraf, W. and A.A. Mian, *Levels of selected heavy metals in black tea varieties consumed in Saudi Arabia*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2008. 81(1): p. 101-104.
57. Koblar, A., G. Tavcar, and M. Ponikvar-Svet, *Fluoride in teas of different types and forms and the exposure of humans to fluoride with tea and diet*. Food Chemistry, 2012. 130(2): p. 286-290.
58. dos Santos Magalhaes, I.R., et al., *Determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in the Leaves and Tea of Arrabidaea chica (Humb. & Bompl.) Verl.* Biological Trace Element Research, 2009. 132(1-3): p. 239-246.
59. Yemane, M., B.S. Chandravanshi, and T. Wondimu, *Levels of essential and non-essential metals in leaves of the tea plant (Camellia sinensis L.) and soil of Wushwush farms, Ethiopia*. Food Chemistry, 2008. 107(3): p. 1236-1243.
60. Desideri, D., et al., *Polarized X ray fluorescence spectrometer (EDPXRf) for the determination of essential and non essential elements in tea*. Microchemical Journal, 2011. 98(2): p. 186-189.
61. Lozak, A., et al., *Determination of selected trace elements in herbs and their infusions*. Science of the Total Environment, 2002. 289(1-3): p. 33-40.
62. Gallaher, R.N., et al., *Mineral analysis of ten types of commercially available tea*. Journal of Food Composition and Analysis, 2006. 19: p. S53-S57.
63. AG, Analytic Jena., *contraAA 700 High Resolution Continuum Source Atomic Absorption Spectrometer*, 2008, Analytik Jena AG: Jena. p. 29.
64. D., B., et al., *Fundamentos da espectrometria da absorção atômica de alta resolução com fonte contínua*. Revista Analytica, 2005: p. 58-66.

## Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

---

65. Welz, B., et al., *High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry — An analytical and diagnostic tool for trace analysis*. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2007. 62(9): p. 873-883.
66. Skoog D., Holler F., and Crouch S., *Principles of Instrumental Analysis* 2007, Belmont, Canada: David Harris.
67. Prior, R.L., X.L. Wu, and K. Schaich, *Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. 53(10): p. 4290-4302.
68. Singab, A.N., et al., *Phenolic Constituents of Eucalyptus camaldulensis Dehnh, with Potential Antioxidant and Cytotoxic Activities*. Records of Natural Products, 2011. 5(4): p. 271-280.
69. Herald, T.J., P. Gadgil, and A. Tilley, *High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012. 92(11): p. 2326-2331.
70. Dewanto, V., et al., *Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002. 50(10): p. 3010-3014.
71. Brand-Williams W., Cuvelier ME, and Berset C. B. C., *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT - Food Science and Technology 1995. 28(25).
72. Benzie, I.F.F. and J.J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay*. Analytical Biochemistry, 1996. 239(1): p. 70-76.
73. *ISO 8466-1:1990(E) Water Quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics-Part 1: Statistical evaluations of the linear calibration*.
74. *ISO 8466-2:2001 Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics Part 2: Calibration Strategy for non-linear second-order calibration functions*.
75. Miller, J.N.M.J.C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 5<sup>th</sup> ed 2005: Ellis Horwood.
76. Pinto J., *Análise de metais em infusões de chás e ervas aromáticas por espectrofotometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua*. , 2010.

77. Hair J., et al., *Análise Multivariada de Dados*, L. House, Editor 1998.



# Anexos

# Teor mineral e capacidade antioxidante em chás e infusões

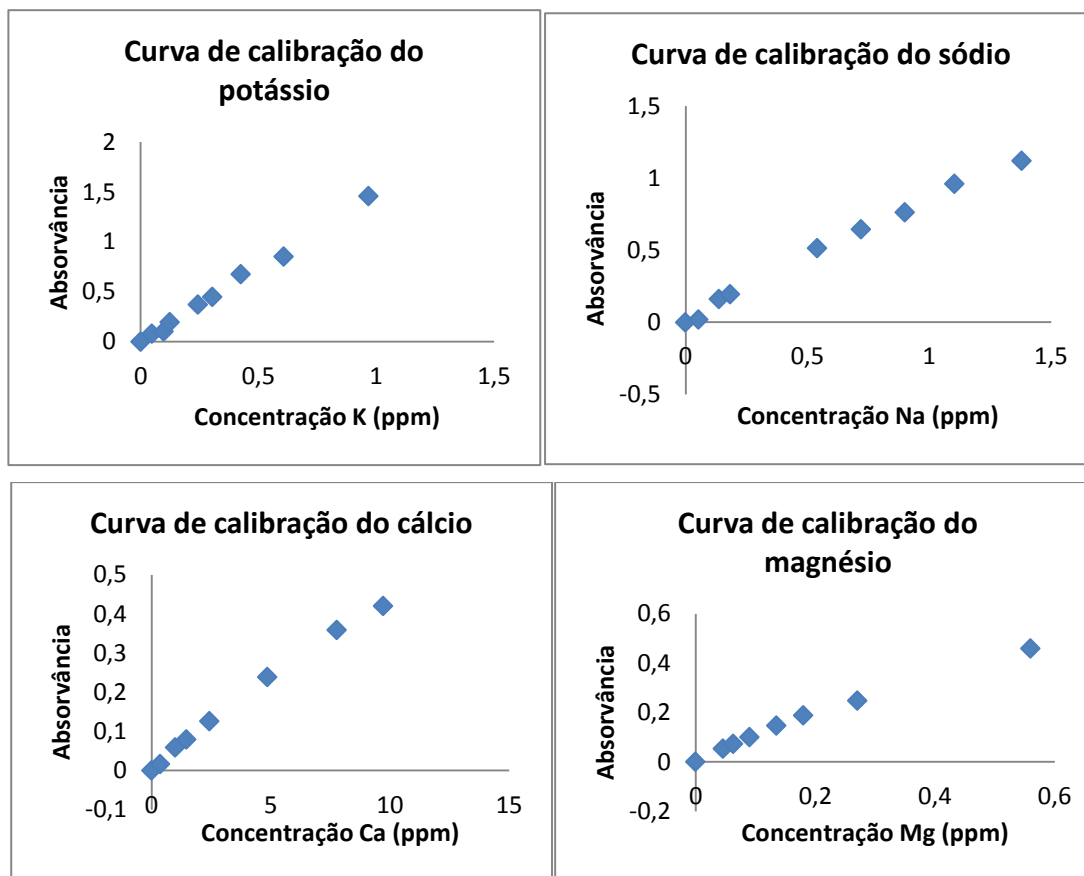


Figura A.1 – Curvas de calibração dos elementos analisados por FL-AAS.

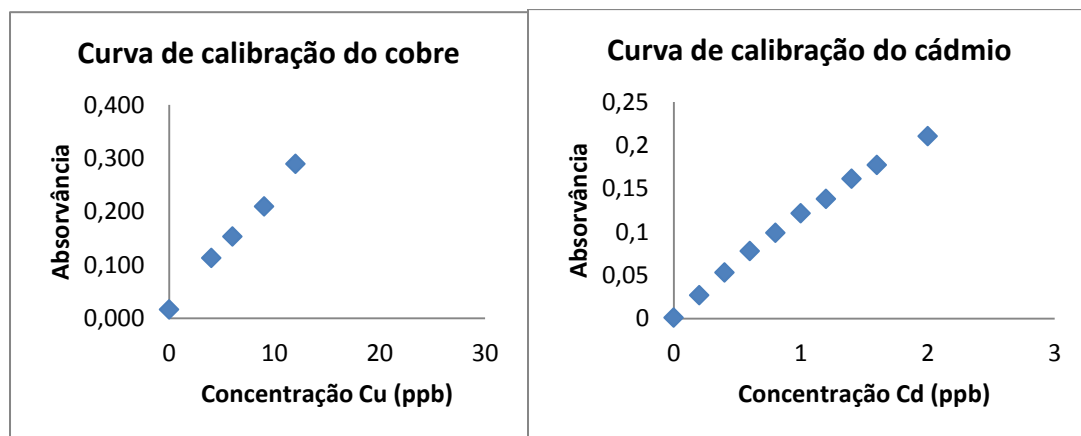


Figura A.2 – Curvas de calibração dos elementos analisados por GF-AAS.