



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



Tese de Doutorado

**DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES METÁLICAS EM MEL DE ABELHAS  
POR ICP OES**

Autora: Teresa Maria Fernandes de Freitas Mendes

Orientadora: Profa. Dra. Solange Cadore

Co-orientador: Prof. Dr. Nivaldo Baccan

Campinas, SP  
Setembro de 2003

UNIDADE ICA  
 Nº CHAMADA 11.1047  
 V EX  
 TOMBO BC/ 57296  
 PROC 16/11/104  
 C D  
 PREÇO 12,00  
 DATA 03/10/04  
 Nº CPD           

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
 UNICAMP

BIB ID 311207

M522d

Mendes, Teresa Maria Fernandes de Freitas.  
 Determinação de espécies metálicas em mel de  
 abelhas por ICP OES/ Teresa Maria Fernandes de  
 Freitas Mendes. -- Campinas, SP: [s.n], 2003.

Orientadora: Solange Cadore  
 Co-orientador: Nivaldo Baccan

Tese (Doutorado) – Universidade  
 Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Mel. 2. Metais. 3. ICP OES. I. Cadore,  
 Solange. II. Baccan, Nivaldo. III. Universidade  
 Estadual de Campinas. IV. Título.

Dedico este trabalho  
à minha mãe, Leodenice (*in memoriam*) e  
ao meu pai José Wilson.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha família, pelo meu trabalho, pelos meus amigos e, sobretudo por  
Sua presença em minha vida;  
À Prof<sup>a</sup>. Solange Cadore, pela orientação, apoio e paciência em todos os momentos  
deste trabalho;  
Ao Prof. Nivaldo Baccan, pela orientação, atenção e valiosas discussões;  
Aos técnicos Paulo e Helena, pelo companheirismo e assistência, sempre com  
otimismo e bom humor;  
Aos colegas de laboratório Anderson, Júlio e Rafael, pela amizade e colaboração  
durante a realização deste trabalho;  
Aos colegas do laboratório Aline, Aloisia, Antenor, Bell, Gisele, Greice, Helena,  
Josiane, Luiz, Martha, Regina, Rita e Vilarinho, que fazem um ambiente de trabalho  
saudável e agradável;  
A todos os funcionários do IQ, em especial ao pessoal da CPG, biblioteca, limpeza,  
vidraria, vigilância e desenho, pela disponibilidade e bom atendimento;  
Aos grandes amigos e colegas, pelo carinho e atenção nos momentos difíceis e  
felizes durante a minha estada em Campinas;  
Ao Instituto de Química da UNICAMP, pelas facilidades concedidas durante a  
realização deste trabalho;  
À Universidade Federal de Roraima, em especial ao Departamento de Química, pelo  
apoio e oportunidade concedidos para o desenvolvimento deste trabalho;  
À CAPES/PICDT, pelo apoio financeiro.

## **SÚMULA CURRICULAR**

### **Formação Acadêmica**

1989 – 1991

Mestrado: Engenharia Mecânica.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil.

Área: Materiais.

Título: Propriedades de Resistência à Tração e ao Impacto de  
Compósitos Poliéster/Sisal – Um Estudo Comparativo.

Bolsista da CAPES.

1988

Especialização: Métodos de Análises Químicas.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil.

Área: Química Analítica.

Título: Separação e Determinações Analíticas Ligadas a Indústria do  
Sal Marinho.

Bolsista da CAPES.

1980 – 1985

Graduação: Engenharia Química.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil.

### **Atividade Profissional**

A partir de 1995

Professora do Ensino Superior.

Universidade Federal de Roraima (D.O.U. Nº 18.06.96), UFRR, Boa  
Vista, Brasil.

## **Comunicação em Congressos**

- 1 - MENDES, T. M. F. F.; BACCAN, N.; CADORE, S. "Quantificação de Constituintes Metálicos em Méis de Abelhas Procedentes de Diferentes Regiões do Brasil por ICP OES". 13º Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. Livro de Resumo, p. 109. Rio de Janeiro, 2003.
- 2 - MENDES, T. M. F. F.; BACCAN, N.; CADORE, S. "Determinação de Macro e Micro-elementos em Amostras Não Mineralizadas de Mel Usando ICP OES". 7º Encontro Nacional Sobre Contaminantes Inorgânicos e 3º Simpósio Sobre Essencialidade de Elementos na Nutrição Humana. Livro de Resumo, p. 69. Rio de Janeiro, 2002.
3. - MENDES, T. M. F. F.; BACCAN, N.; CADORE, S. "Determination of Macro and Micro-elements in Honey by ICP OES". Euroanalysis 12, Book of Abstracts, P1-216. Dortmund, 2002.
- 4 - MENDES, T.M.F.F.; RIBEIRO, A. S.; BACCAN, N.; CADORE, S. "Study of Mineralization of Honey for the Determination of Macro and Micro-elements by ICP OES". Seventh Rio Symposium on Atomic Spectrometry. Book of Abstracts, FR 16. Florianópolis, SC, 2002.
- 5 – SOUSA, R. A.; MENDES, T.M.F.F.; BACCAN, N.; CADORE, S. "Study of Metals Determination in Industrialized Coconut Water Using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES)". Seventh Rio Symposium on Atomic Spectrometry. Book of Abstracts, FR 15. Florianópolis, SC, 2002.
- 6 - MENDES, T.M.F.F.; BORGES, M.R. "Aproveitamento do Rejeito da Estação de Tratamento de Água de Abastecimento Doméstico da Cidade de Boa Vista/RR para a Produção de materiais Cerâmicos" I Congresso Nacional de Meio Ambiente, 13ª Jornada Universitária da UEFS. Livro de Resumo, p. 70. Feira de Santana, BA, 1998.

## **DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES METÁLICAS EM MEL DE ABELHAS POR ICP OES**

*Autora: Teresa M. F. de F. Mendes*

*Orientadora: Prof. Dr. Solange Cadore*

*Co-orientador: Prof. Dr. Nivaldo Baccan*

Foram desenvolvidos dois métodos, mineralização assistida por microondas (MW) e soluções assistidas por ultra-som (US), para a quantificação de metais em mel por Espectrometria de Emissão com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES), considerado-se aspectos como a complexidade da matriz, a otimização instrumental e a essencialidade e/ou toxidez das espécies K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Ni, Pb, Cd. Pelo procedimento US, foram analisadas 69 amostras comerciais brasileiras, de várias regiões do país, e os resultados foram avaliados pelos métodos de análise de agrupamentos hierárquicos e de componentes principais.

Os métodos estabelecidos mostraram-se eficientes, com recuperações na faixa de 90 a 110 %, desvios padrão relativos abaixo de 10% e com características diferenciadas, um em relação ao outro, inerentes aos seus respectivos processos. Os testes estatísticos, F e t, apontam uma concordância entre os dois métodos. O MW mostrou-se mais preciso, porém o US é mais simples, com menos etapas de manipulação e requer menores quantidades de reagentes. Deste modo, a escolha do método dependerá da precisão requerida para a análise.

Os resultados obtidos para as amostras nacionais mostram que os teores de Cd e Pb, considerados potencialmente tóxicos, estão abaixo dos limites de quantificação e que 80 % podem ser consideradas como uma boa ou rica fonte de Mn. As faixas de concentrações de K, Ca, Mg, Mn, Fe e Zn, nas amostras por região geográfica, são amplas e se intercalam. Através do estudo quimiométrico não foi possível estabelecer uma classificação nítida das amostras por região geográfica, com estas variáveis, observando-se apenas uma tendência à sua formação. Esta tendência é fortalecida quando o número de amostras por região é maior e as dimensões regionais são menores.

De um modo geral, os resultados obtidos assinalam novas informações sobre os méis nacionais que, eventualmente, poderão ser úteis para a formação de uma base de dados de composição mineral.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF METALIC SPECIES IN HONEY BEE USING ICP OES

*Author: Teresa M. F de F. Mendes*

*Supervisor: Prof. Dr. Solange Cadore*

*Co-supervisor: Prof. Dr. Nivaldo Baccan*

Two preparative methods for quantification of metals in honey using Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP OES) were developed: microwave assisted digestion (MW) and ultra-sound assisted dissolution (US). Aspects such as matrix complexity, instrumental optimization and the essentiality/toxicity of the species K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Ni, Pb, Cd were considered. Using the US method, 69 samples of Brazilian honey, from different parts of the country, were analysed. The results were treated by the chemometrics methods of hierarchical analysis and principal components.

The proposed methods were shown to be efficient, with recoveries between 90 and 110% and relative standard deviations lower than 10%. They presented differences attributed to the characteristics of the two preparative procedures. Statistical tests, F and t, showed agreement between them. While MW was more precise than US, this second method was simpler, requiring less manipulation and less sample. The choice between them will depend on the precision required by the analysis.

The results obtained indicated that the level of Pb and Cd in Brazilian honeys was below of limit of quantification and also that about 80% of them may be considered as a good source of Mn. The concentrations of K, Ca, Mg, Mn, Fe and Zn varied over a large scale. It was impossible to classify the origin of the honey from different regions of the country by the chemometric evaluation used in this study. However, it was possible to predict a tendency.

The results obtained provide important information about the mineral content of Brazilian honeys.



## ÍNDICE

|                                                                                           |             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>SÍMBOLOS E ABREVIACÕES .....</b>                                                       | <b>xvii</b> |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                                                             | <b>xix</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS .....</b>                                                             | <b>xxi</b>  |
| <b>I. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                | <b>1</b>    |
| <b>II. OBJETIVOS .....</b>                                                                | <b>4</b>    |
| <b>III. JUSTIFICATIVA .....</b>                                                           | <b>4</b>    |
| <b>IV. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>                                                    | <b>5</b>    |
| IV.1 – MEL DE ABELHAS: CLASSIFICAÇÕES E CONTROLE<br>QUÍMICO DE QUALIDADE .....            | 6           |
| IV.2 – DESENVOLVIMENTOS RELACIONADOS AO CONTROLE<br>DE QUALIDADE DE MÉIS DE ABELHAS ..... | 10          |
| IV.2.1 – Processamento e Maturidade .....                                                 | 10          |
| IV.2.2 – Higiene e Resíduos Químicos .....                                                | 11          |
| IV.2.3 – Metais .....                                                                     | 13          |
| IV.2.3.1 – Métodos Analíticos .....                                                       | 14          |
| IV.2.3.2 – Monitoramento Ambiental .....                                                  | 17          |
| IV.2.3.3 – Origem Botânica/Geográfica e Autenticidade .....                               | 20          |
| IV.2.4 – Estudos Desenvolvidos em Méis Brasileiros .....                                  | 22          |
| IV.3 – ESPECTROMETRIA ÓTICA COM PLASMA<br>INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP OES) .....          | 23          |
| IV.4 – PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS .....                                                   | 26          |
| IV.5 – QUIMIOMETRIA .....                                                                 | 30          |
| <b>V. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                                       | <b>33</b>   |
| V.1 – MATERIAIS E EQUIPAMENTOS .....                                                      | 33          |
| V.2 – MÉTODOS .....                                                                       | 34          |
| V.2.1 – Pré-tratamento das Amostras .....                                                 | 34          |
| V.2.1.1 – Mineralização Assistida por Microondas (MW) .....                               | 35          |
| V.2.1.2 – Soluções Assistidas por Ultra-som (US) .....                                    | 35          |
| V.2.1.3 – Decomposição por Fermentação Alcoólica .....                                    | 36          |

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| V.2.2 – Otimização Instrumental .....                                                                                                | 37 |
| V.2.3 – Figuras de Mérito e Validação dos Métodos .....                                                                              | 38 |
| V.2.4 – Comparações entre os Métodos .....                                                                                           | 39 |
| V.2.5 – Análise Quimiométrica .....                                                                                                  | 40 |
| V.2.6 – Tratamento dos Resíduos Gerados .....                                                                                        | 41 |
| <b>VI. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....                                                                                             | 42 |
| VI.1 – MINERALIZAÇÃO ASSISTIDA POR MICROONDAS (MW) .....                                                                             | 42 |
| VI.2 – SOLUÇÕES ASSISTIDAS POR ULTRA-SOM (US) .....                                                                                  | 47 |
| VI.3 – DECOMPOSIÇÃO POR FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA .....                                                                                  | 51 |
| VI.3.1 – Decomposição Utilizando Fermento de Pão Comercial<br>( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) – (DF) .....                       | 51 |
| VI.3.2 – Decomposição Utilizando a Enzima Invertase (DE) .....                                                                       | 52 |
| VI.4 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS:<br>MINERALIZAÇÃO ASSISTIDA POR MICROONDAS (MW)<br>E SOLUÇÕES ASSISTIDAS POR ULTRA-SOM (US) ..... | 54 |
| VI.5 – AVALIAÇÃO DOS CONSTITUINTES MÉTÁLICOS EM<br>AMOSTRAS DE MEL E ABELHAS BRASILEIRAS .....                                       | 57 |
| VI.6 – ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA .....                                                                                                   | 63 |
| VI.6.1 – Região Nordeste .....                                                                                                       | 66 |
| VI.6.2 – Região Sul .....                                                                                                            | 69 |
| VI.6.1 – Região Sudeste .....                                                                                                        | 72 |
| <b>VII. CONCLUSÕES</b> .....                                                                                                         | 78 |
| <b>VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....                                                                                        | 80 |

## SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

**CRM:** Material de Referência Certificado

**BEC:** Concentração Equivalente de Fundo

**DE:** Decomposição Utilizando a Enzima Invertase

**DF:** Decomposição Utilizando Fermento de Pão Comercial (*Saccharomyces cerevisiae*)

**ETAAS:** Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica

**FAAS:** Espectrometria de Absorção Atômica por Chama

**HCA:** Análise de Agrupamentos Hierárquicos

**HMF:** 5-Hidroximetilfurfural

**ICP-MS:** Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado

**ICP OES:** Espectrometria Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado

**LD:** Limite de Detecção

**LQ:** Limite de Quantificação

**MW:** Mineralização Assistida por Microondas

**PC:** Componente Principal

**PCA:** Análise por Componentes Principais

**RSD:** Desvio Padrão Relativo

**RF:** Radiofrequência

**S/F:** Razão sinal/fundo

**S/R:** Razão sinal/ruído

**US:** Soluções Assistidas por Ultra-som

**VRD:** Valores de Referência Diários Recomendados

$\overline{s_b}$  : Estimativa do Desvio Padrão da Intensidade de Emissão do Analito no Branco

$\overline{I_a}$  : Intensidade de Emissão do Analito na Solução da Amostra

$\overline{I_b}$  : Intensidade de Emissão do Analito na Solução do Branco

$\alpha$  : Inclinação da Curva Analítica

$\overline{I_{bsc}}$  : Intensidade de Emissão do Branco do Método sem a Correção de Fundo do Equipamento

$\overline{I_{bc}}$  : Intensidade de Emissão do Branco do Método com a Correção de Fundo do Equipamento

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4.1: Seção transversal de uma tocha e do plasma formado usado em ICP OES, com suas regiões de temperaturas típicas.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                   | <b>24</b> |
| <b>4.2: Mecanismo de observação de tocha de instrumentos equipados com dupla visão, axial e radial.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>25</b> |
| <b>6.1: Razões sinal/fundo obtidas na otimização instrumental para as espécies Ca (317,933 nm, configuração axial), Mg (279,079 nm, configuração radial), Mn (257,610 nm, configuração axial) e Fe (238,204 nm, configuração axial). (a), (c) e (d) vazões de nebulização na potência da RF de 1,3 kW; (b), (d) e (f) potências da RF na vazão de nebulização de 0,6 L min<sup>-1</sup>.....</b> | <b>44</b> |
| <b>6.2: Razões sinal/fundo obtidas na otimização instrumental para as espécies Ca (317,933 nm, configuração axial), Mg (279,079 nm, configuração radial), Mn (257,610 nm, configuração axial) e Zn (213,856 nm, configuração axial). (a), (c) e (d) vazões de nebulização na potência da RF de 1,3 kW; (b), (d) e (f) potências da RF na vazão de nebulização de 0,4 L min<sup>-1</sup>.....</b> | <b>49</b> |
| <b>6.3: Gráfico dos <i>scores</i>: as amostras em vermelho, verde e azul pertencem às regiões Nordeste, Sudeste e Sul, respectivamente.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>64</b> |
| <b>6.4: Gráfico dos <i>loadings</i> para o conjunto de amostras do Nordeste, Sul e Sudeste.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <b>65</b> |
| <b>6.5: Gráfico dos <i>scores</i> para as amostras procedentes da região Nordeste.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | <b>66</b> |
| <b>6.6: Gráfico dos <i>loadings</i> para as amostras procedentes da região Nordeste.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>67</b> |
| <b>6.7: Dendograma para as amostras da região Nordeste.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>68</b> |
| <b>6.8: Gráfico dos <i>scores</i> para as amostras procedentes da região Sul.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>70</b> |
| <b>6.9: Gráfico dos <i>loadings</i> para as amostras procedentes da região Sul.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>71</b> |
| <b>6.10: Dendograma para as amostras da região Sul.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <b>72</b> |

|                                                                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>6.11: Mapa com a classificação por sub-regiões das amostras procedentes da região Sudeste do Brasil.....</b>            | <b>73</b> |
| <b>6.12: Gráfico dos <i>scores</i>, onde as amostras procedentes da região Sudeste estão representadas por pontos.....</b> | <b>75</b> |
| <b>6.13: Gráfico dos <i>scores</i> para as amostras procedentes da região Sudeste.....</b>                                 | <b>75</b> |
| <b>6.14: Gráfico dos <i>loadings</i> para as amostras procedentes da região Sudeste.....</b>                               | <b>76</b> |
| <b>6.15: Dendograma das amostras procedentes da região Sudeste.....</b>                                                    | <b>77</b> |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5.1: Especificações e condições gerais de operação do ICP OES.....</b>                                                                                                                                    | <b>34</b> |
| <b>5.2: Condições de operação para mineralização em forno de<br/>microondas fechado.....</b>                                                                                                                 | <b>35</b> |
| <b>6.1: Tabela 6.1 – Resultados obtidos com o método MW para<br/>quatro amostras (A, B, C, D) de méis comerciais, utilizando<br/>2,0 mg L<sup>-1</sup> de ítrio, como padrão interno (n=3).....</b>          | <b>46</b> |
| <b>6.2: Resultados obtidos com o método US para quatro amostras<br/>(A, B, C, D) de méis comerciais utilizando 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ítrio,<br/>como padrão interno (n=3) .....</b>                       | <b>50</b> |
| <b>6.3: Resultados obtidos pelo teste DE em um mel de abelhas<br/>(amostra B) de procedência comercial (n=3).....</b>                                                                                        | <b>52</b> |
| <b>6.4: Valores de F calculados para as espécies determinadas<br/>nas amostras A, B, C e D, através das métodos<br/>MW e US (graus de liberdade igual a 2, F crítico igual a 19,00).....</b>                 | <b>54</b> |
| <b>6.5: LDs, LQs e BECs obtidos para os métodos MW e US.....</b>                                                                                                                                             | <b>55</b> |
| <b>6.6: Resultados obtidos pelo teste t emparelhado para as<br/>espécies determinadas nas amostras A, B, C e D, através<br/>dos métodos de MW e de US.....</b>                                               | <b>56</b> |
| <b>6.7: Concentrações e o seu somatório, em mg kg<sup>-1</sup>, das espécies<br/>metálicas determinadas nas amostras de mel brasileiras (n=3).....</b>                                                       | <b>58</b> |
| <b>6.8: Valores de referência diários (VRD) e número de amostras (%) que<br/>podem ser classificadas como uma boa ou rica fonte elementar.....</b>                                                           | <b>60</b> |
| <b>6.9: Faixa (mínima e máxima) e a média da concentração e do<br/>somatório, em mg kg<sup>-1</sup>, das espécies metálicas determinadas<br/>nas amostras brasileiras, por região geográfica (n=3) .....</b> | <b>61</b> |
| <b>6.10: Concentrações e o seu somatório, em mg kg<sup>-1</sup>, das espécies<br/>metálicas determinadas em amostras procedentes<br/>de diversos países (n=3).....</b>                                       | <b>62</b> |

|                                                                                                                                                      |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>6.11: Variância (%) e variância acumulada (%) para cada PC, obtidas por PCA das amostras procedentes das regiões Nordeste, Sul e Sudeste.....</b> | <b>64</b> |
| <b>6.12: Similaridades (%) obtidas pelo método HCA para as amostras e grupos formados.....</b>                                                       | <b>68</b> |
| <b>6.13: Variância (%) e variância acumulada (%) para cada PC, obtidas por PCA das amostras procedentes da região Sul.....</b>                       | <b>69</b> |
| <b>6.14: Classes atribuídas às amostras da região Sudeste.....</b>                                                                                   | <b>73</b> |
| <b>6.15: Variância (%) e variância acumulada (%) para cada PC obtidas por PCA das amostras procedentes da região Sudeste.....</b>                    | <b>74</b> |



## I. INTRODUÇÃO

O mel é definido pelas normas de qualidade como um produto alimentício produzido por abelhas melíferas a partir do néctar de flores (floral) ou de secreções procedentes de partes vivas de plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas (melato) que ficam sobre as partes vivas das plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias e deixam maturar nos favos da colméia [1].

A composição química do mel de abelhas é, essencialmente, uma mistura complexa de carboidratos (frutose: 25-45 % m/m, glicose: 25-37 % m/m, maltose: 2-12 % m/m, sacarose: 0,5-3 % m/m), água (15-20 % m/m), minerais (0,04-0,2 % m/m) e muitos outros componentes, presentes em concentrações menores, porém não menos importantes, uma vez que são responsáveis pelas propriedades físicas e organolépticas das suas diferentes classes. As diferenças nas concentrações devem-se à origem do mel, ou seja, variam de acordo com sua origem botânica, região e variações climáticas, processamento e armazenamento [2,3].

O mel de abelhas vem sendo usado pelo homem desde tempos remotos. Os egípcios usavam própolis como bactericida e para embalsamar múmias, enquanto os gregos e romanos seguiam o provérbio: "mel no interior e no exterior" [4]. Atualmente, o mel de abelhas é um alimento muito popular, tanto como suplemento alimentar como coadjuvante terapêutico. Entre suas inúmeras propriedades terapêuticas destacam-se as ações bactericidas, anti-sépticas, vasodilatadoras, diuréticas, digestivas, vermífugas e, recentemente, novas pesquisas têm demonstrado que atua também como antioxidante, pela absorção de radicais livres de oxigênio [4,5]. Estes atributos têm atraído cada vez mais consumidores deste alimento, prevendo-se um aumento significativo de sua comercialização [6].

O potencial de informações analíticas provenientes da determinação de metais em mel de abelhas é grande, uma vez que seus níveis de concentração relacionam-se mais efetivamente com o meio ambiente, e podem estabelecer tanto a origem geográfica como o nível de poluição ambiental (solo, água, plantas e ar), em uma área de aproximadamente 7 km<sup>2</sup> [2,3,7]. Além disso, a determinação de

espécies metálicas é importante não somente para os macro-constituintes como também para os micro-constituintes considerados essenciais para a dieta humana [8].

Os constituintes considerados essenciais à dieta humana podem estar presentes no mel em concentrações tais que podem classificá-lo como uma fonte rica ou boa de determinados minerais [9]. Por outro lado, a quantificação de metais de transição, muitos dos quais indesejáveis em determinadas concentrações, por sua suposta toxicidade, além de estarem relacionados à origem geográfica, podem assinalar possíveis contaminações ou poluição ambiental. Estas informações são úteis, tanto para profissionais da saúde e meio ambiente como para os consumidores em geral.

Assim, no que se refere a teores de metais em méis de abelhas, algumas pesquisas vêm sendo desenvolvidas buscando melhores indicadores para a sua avaliação da qualidade, no sentido de garantir a sua autenticidade e preservar o consumidor de especulações comerciais e, também, de assinalar possíveis contaminações ambientais [2,7,10-15]. A literatura descreve a determinação de metais em méis de abelhas, procedentes de vários países, utilizando técnicas e métodos diversos [16-19].

Quanto ao desenvolvimento de métodos para a quantificação de constituintes metálicos em méis de abelhas, observa-se um grande interesse na determinação de alguns metais de transição, para os quais são aplicadas técnicas diversas [3,20-30].

Entretanto, estudos sistemáticos da composição dos macros e micro-constituintes desta matriz por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) são poucos, apesar desta técnica mostrar-se adequada para a quantificação destas espécies. A técnica de ICP OES proporciona altas temperaturas, o que promove a destruição da matéria orgânica, dissociação de moléculas, atomização e ionização para um grande número de espécies diferentes, em diversos níveis de energia e, ao mesmo tempo, com poucas interferências químicas, o que possibilita a análise multielementar com rapidez, precisão e exatidão [31].

Este estudo apresenta dois métodos, mineralização assistida por microondas (MW) e soluções assistidas por ultra-som (US), para a quantificação simultânea dos macros e micros constituintes Ca, K, Mg, Na, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn, em amostras de mel de abelhas, por ICP OES. A exatidão de cada procedimento analítico foi avaliada através de experimentos de adição e recuperação de analitos em dois níveis de concentrações para quatro amostras brasileiras de diferentes origens comerciais. Foi feito também um estudo preliminar para o pré-tratamento desta matriz, utilizando o princípio da fermentação alcoólica.

Como aplicação, 69 amostras de méis de abelhas comerciais, procedentes das várias regiões do Brasil, foram analisadas através do método US. Através dos métodos quimiométricos, análise por componentes principais (PCA) e análise hierárquica por agrupamentos (HCA), foram feitas análises em amostras procedentes dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e das regiões Nordeste e Sul do país.

## II. OBJETIVOS

Este trabalho teve os seguintes objetivos:

- estabelecer diferentes estratégias para a quantificação simultânea de metais em mel, por ICP OES, considerando: complexidade da matriz; otimização instrumental; essencialidade e/ou toxidez dentro dos limites de tolerância fisiológica, numa concentração que vai além daquela essencial dos macro-elementos K, Ca e Mg e micro-elementos Na, Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Ni, Pb e Cd.
- comparar os métodos propostos pela avaliação de suas respectivas precisões e suas possíveis perdas e/ou interferências para cada espécie estudada;
- avaliar a possibilidade de classificação de méis de algumas regiões do Brasil, através de métodos quimiométricos, de acordo com as concentrações das espécies metálicas estudadas.

## III. JUSTIFICATIVA

A importância deste estudo deve-se não somente ao desenvolvimento de novos métodos analíticos para uma matriz complexa de interesse comercial e ambiental, mas também por assinalar novas informações sobre os méis do país que, em contraste com a sua grande extensão geográfica e diversidade floral, possui poucos registros na literatura mostrando seus dados de composição mineral.

## IV. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nos últimos anos tem sido disseminada a noção de que o consumo de alimentos naturais é excelente para curar e prevenir algumas enfermidades e/ou restabelecer a saúde, porém muitas dessas divulgações não apresentam base científica.

Com relação ao mel de abelhas na saúde humana, o seu mecanismo de efeito tem sido constatado em vários estudos [32]. Estas comprovações de resultados até então empíricos, possivelmente está relacionada ao aumento do consumo deste alimento. Além disso, desde 1935 tem sido comprovado que abelhas, méis e pólen atuam como indicadores ambientais de metais [13]. Assim, o estudo desta matriz apresenta interesse analítico e tem sido estimulado.

A União Européia (EU) adotou uma proposta referente ao mel em que normaliza a sua composição e produção e encoraja o desenvolvimento de métodos analíticos que permitam a verificação e conformidade com as suas especificações de qualidade [2,25]. No Brasil, a portaria 367/97 da Secretaria do Ministério do Estado da Agricultura e do Abastecimento regulamenta a identidade e qualidade do mel, e considera que este não deve exceder os níveis máximos toleráveis de contaminações ou resíduos tóxicos, estando em concordância com a Norma Mundial do Codex para o Mel [1]. Apesar da norma brasileira prever possíveis contaminações, ela não estabelece os níveis máximos toleráveis.

Neste capítulo são apresentados alguns aspectos sobre o mel de abelhas como produto alimentício, os parâmetros estabelecidos pelas normas que regulamentam sua qualidade, suas características e alguns dos desenvolvimentos metodológicos recentes, relacionados à busca de melhores indicadores para a avaliação da sua qualidade, onde são exploradas mais efetivamente as investigações relacionadas a metais. Em seguida, é feita uma abordagem sucinta dos estudos desenvolvidos em méis brasileiros, dos princípios básicos do ICP OES, dos métodos de pré-tratamento de amostras de mel de abelhas e dos métodos quimiométricos utilizados neste estudo.

## **IV.1 - MEL DE ABELHAS: CLASSIFICAÇÕES E CONTROLE QUÍMICO DE QUALIDADE**

Uma das responsabilidades governamentais é assegurar à população o fornecimento de alimentos seguros e saudáveis. Conseqüentemente, um conjunto de normas é definido e análises devem ser realizadas rotineiramente para a verificação do seu cumprimento e para avaliar possíveis adulterações e/ou contaminações do produto.

A classificação do mel é feita de acordo com a sua origem (uniflorais, poliflorais, de melato), com a sua forma de obtenção (escorrido, prensado, centrifugado, filtrado) e com a sua apresentação (líquido, cristalizado, em favos, cremoso, processado). O mel processado sofre aquecimento e filtração para destruir as leveduras e promover a dissolução de cristais de dextrose. A temperatura de aquecimento deve ser entre 32-40 °C, que é a temperatura média da colméia, e não afeta suas propriedades, se o período de aquecimento for curto. Porém, em alguns casos, é feito um aquecimento a temperaturas superiores para liquefação e pasteurização [2,33].

De acordo com as normas estabelecidas, o conjunto de parâmetros que define a qualidade do mel é [1]:

- características sensoriais: cor (uniforme em todo o volume); sabor (característico); aroma (livre de aromas indesejáveis); consistência (fluida, viscosa ou cristalizada).
- características físico-químicas: açúcares redutores (calculados como açúcares invertidos); sacarose aparente; umidade; sólidos insolúveis em água; minerais (cinzas); acidez livre; atividade diastásica; 5-hidroximetilfurfural (HMF); conteúdo de pólen.
- características microbiológicas: coliformes; salmonela; fungos e leveduras.

Através da determinação desses itens é possível estimar a qualidade, origem e adulteração de méis, sabendo que é expressamente proibida a utilização de qualquer tipo de aditivo.

As técnicas comumente empregadas para a sua adulteração são baseadas em dois diferentes princípios: diluição em água e acréscimo de xaropes de açúcares. Os xaropes mais comuns são de açúcares invertidos, de cereal ou a mistura de cereal e frutose. Outras adulterações são devidas à alimentação das abelhas com açúcares, xaropes ou mel artificial em uma miscelânea concernente à origem geográfica ou floral. As propriedades também podem ser afetadas pelo seu processamento, armazenamento e, ainda, por contaminações de resíduos químicos, como produtos usados para controle de doenças das abelhas, agrotóxicos, pesticidas, etc. [2,12,34].

Quando se tem o objetivo de determinar a qualidade sensorial de um alimento, isto é, o resultado das sensações experimentadas pelo homem ao ingeri-lo, deve-se perguntar a ele a resposta. Os provadores são profissionais bem treinados para executar esta avaliação, mas as propriedades que resultam em estímulos sensoriais são difíceis de serem medidas, visto que os mecanismos de integração entre as substâncias que causam este tipo de estímulo e os receptores são extremamente complexos [35].

O sabor e o aroma são muito dependentes de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis presentes na matriz e no espaço em torno desta. A identificação e quantificação destes compostos são dependentes das técnicas de análise utilizadas, sendo de grande importância para a avaliação das mudanças de sabor ligadas ao processamento, armazenamento e origem floral [2,35].

A cor do mel tem sido usada apenas para fixar preços, embora seja um parâmetro útil na caracterização do produto. Alguns méis são coloridos e transparentes, outros são brancos após a cristalização e a maioria dos poliflorais varia do âmbar claro ao escuro. O conteúdo de minerais, carotenos, xantófilos e flavonóis são responsáveis pelas cores. A concentração de aminoácidos é maior em méis escuros que em claros, não sendo encontrados tirosina e triptofano nos méis claros. A cor pode ser alterada com o tempo, uma vez que a cristalização induz a um escurecimento temporário. A avaliação da cor é feita por diferentes procedimentos baseados na comparação visual de padrões [36].

O conteúdo total de minerais indica a pureza do mel e é avaliado pela calcinação (cinzas), aceitando-se o valor máximo de 0,2 % m/m, com uma tolerância de até 1 % m/m para méis poliforais. A variação deste índice deve-se à origem do mel e estende-se em uma ampla faixa, influenciando diretamente a sua cor: de 0,04 % m/m para méis claros até 0,6 % m/m para os escuros. Devido à sua pequena concentração, a ingestão diária de 100 g de mel não contribui, necessariamente, com as necessidades minerais dietéticas. Entretanto, alguns metais podem ser suficientemente tóxicos quando presentes em certas concentrações. Sua quantificação é essencial, não somente quando o seu efeito tóxico é conhecido, mas também para estabelecer seus limites e riscos de ingestão. As concentrações de metais em mel, especialmente elementos traços, são indicadores da origem botânica e geográfica e do nível de poluição ambiental [2,20].

Em relação aos carboidratos, os sacarídeos estão presentes em maiores quantidades no mel. Os principais são os monossacarídeos, glicose e frutose. A razão média da concentração glicose:frutose é de 1,2:1, dependendo da origem botânica. Podem ser determinados por vários métodos, baseados no uso de suas características físicas, químicas ou enzimáticas. A determinação de sacarose é um teste adicional para reconhecimento de adulteração por xaropes, porém, quando sua concentração é inferior a 5 % m/m, somente pode ser detectada por instrumentos com sensibilidade adequada, como por exemplo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); além disso, sua concentração pode diminuir durante o armazenamento, devido à presença da enzima invertase [2].

Normalmente, existe no mel uma quantidade de proteínas menor que 0,5 % m/m, entre as quais incluem-se as enzimas invertase, diástase, glicose-oxidase e catalase. O caráter bacteriostático do mel é atribuído também às atividades enzimáticas, através da produção e acúmulo de peróxido de hidrogênio que atua sobre os microorganismos não osmóticos. A medida da atividade enzimática está relacionada à exposição do mel ao calor e às suas condições de armazenamento, porém varia muito em diferentes amostras, uma vez que cada tipo de néctar requer uma maior ou menor manipulação pelas abelhas na colméia, para obter a consistência ideal. Por outro lado, a atividade diastásica, ou número de diástase



( $\alpha$  - amilase) é determinada pelo índice Goethe. As reações enzimáticas promovem a formação de HMF, cuja concentração indica a presença de adição de açúcar invertido. Porém, este não é um fator determinante, pois a presença de HMF está associada a tratamentos de aquecimento ou armazenamento. Estes dois indicadores juntos são usados para julgar a adulteração, o processamento e a conservação do mel [37].

O teor de água indica o tempo de armazenamento e o grau de maturidade do mel, ou seja, se a sua extração da colméia foi feita precocemente. Os métodos oficiais para determinação de água são realizados por medidas do índice de refração ou determinação da massa perdida, após a secagem ao forno e o seu conteúdo não deve ser superior a 20 % m/m. Valores maiores podem ocasionar fermentação, perda de sabor e baixa qualidade. Uma outra consequência é o aumento da acidez, devido aos processos de fermentação que produzem ácidos orgânicos [6,33].

Tradicionalmente, a determinação da origem floral é feita por identificação e quantificação de grãos de pólen, através de exame microscópico (melissopalínológico). Todavia, existem alguns problemas associados ao método: diferentes espécies de plantas produzem diferentes proporções de pólen que variam de estação para estação; a colheita do pólen pode ser diferente em flores masculinas e femininas; as abelhas podem coletar pólen sem néctar; o pólen pode ser extraído do mel por operação de filtração; o pólen pode ser adicionado ao mel. Deste modo, a avaliação da origem botânica deve levar estas questões em consideração, associando estas informações às outras, obtidas pelos diferentes métodos [2].

A higiene no processamento de alimentos é uma norma imprescindível. Normalmente, são encontrados diversos microorganismos no mel, predominando as leveduras osmofílicas: *Saccharomyces*, *Shizosaccharomyces* e *Torula*, que podem iniciar o processo de deterioração, através da fermentação. Devido às suas propriedades terapêuticas, o mel é comumente usado por ingestão direta ou aplicação local. Deste modo, uma assepsia deficiente pode provocar danos ao produto e à saúde [38].

De um modo geral, é possível associar a concentração de açúcares redutores, a sacarose aparente e a umidade com a maturidade e o processamento do mel. Por

outro lado, a acidez livre, o teor de HMF e o número de diástase relacionam-se com o grau de deterioração, frescor e condições de armazenamento, enquanto que os teores de minerais e sólidos dissolvidos em água indicam o grau de pureza do mel.

## **IV.2 - DESENVOLVIMENTOS RELACIONADOS AO CONTROLE DE QUALIDADE DE MÉIS DE ABELHAS**

O controle de qualidade não é um sistema estático e perfeito, necessitando sempre da revisão de seus parâmetros para melhor entender o comportamento de todas as variáveis, desprezando as desnecessárias e buscando métodos alternativos, no sentido de acompanhar as evoluções, tendências e necessidades.

Assim, considerando o mel de abelhas como uma amostra analítica complexa e heterogênea, na análise de qualquer resultado devem ser consideradas as contribuições provenientes do processamento, equipamentos ou contêineres, clima e fatores sazonais, como precipitação pluviométrica e insuficiência de certos elementos em solos, rochas e água [2,20,25]. Portanto, fatores fitossociológicos, ambientais e de processamento são refletidos na composição das plantas e, conseqüentemente, no mel.

Deste modo, algumas investigações vêm sendo feitas, direcionadas à busca de indicadores e métodos que venham avaliar, o mais fielmente possível, as propriedades do mel de abelhas.

### **IV.2.1 - Processamento e Maturidade**

Os efeitos do processamento e de maturidade têm atraído a atenção de alguns pesquisadores. A partir das diferenças de labilidade das enzimas e da formação de HMF, através da ação combinada do tempo e da temperatura, pode-se estimar a intensidade do tratamento térmico. Deste modo, através da atividade enzimática pode-se avaliar o frescor de méis processados [39].

Bonvehí e colaboradores [37] estudaram o comportamento da atividade de invertase por diferentes processos de aquecimento, em 147 amostras de méis de diferentes procedências botânicas da Espanha e constataram uma variação semelhante da atividade nas diferentes amostras.

Huidobro e colaboradores [40] acompanharam a variação de etanol aparente em 33 amostras de mel comercial da região da Galicia (Espanha) através de medidas do índice de refração a 20 °C, em intervalos de 90 dias, a partir da colheita. Os resultados obtidos mostraram a heterogeneidade do mel pela presença das leveduras esporádicas ou aleatórias. Através de um monitoramento deste tipo é possível estimar um tempo médio de prateleira para o mel.

O teor de água, além de indicar a maturidade, é crítico para prevenir o crescimento de microorganismos e a conseqüente fermentação do mel. Os métodos oficiais de sua avaliação (índice de refração ou secagem ao forno) apresentam significantes variações de resultados para uma mesma amostra, quando feitos por diferentes laboratórios, sob condições físicas e de umidades distintas. Partindo destas premissas, Isengard e colaboradores [33] compararam quatro procedimentos para determinar água em 39 amostras de mel de diferentes origens geográficas e botânicas: índice de refração, secagem ao forno, secagem por infravermelho e titulação Karl Fisher modificado (medidas feitas a 50 °C e secagem por infravermelho). O último procedimento, proposto pelos autores, apresentou maiores concentrações e menores desvios-padrões, sugerindo a ocorrência de menores perdas do conteúdo de água.

#### **IV.2.2 - Higiene e Resíduos Químicos**

Existe uma grande preocupação com o controle higiênico-sanitário direcionado não somente para a presença de microorganismos, mas também para resíduos químicos, como os produtos utilizados nos apiários, resíduos de pesticidas, agrotóxicos, etc.

O grau de contaminação microbiológica e as propriedades organolépticas e físico-químicas foram investigadas por Midgal e colaboradores [38], após tratamento

por irradiação com 10 MeV por um acelerador de elétrons linear de 10 kW em dose de 10 kGy, para diferentes tipos de méis. Após a irradiação, houve um decréscimo de 99 % do total das bactérias presentes e um aumento médio de 1,8 a 2,5, do índice de antibiótico investigado, sem a mudança de cor, sabor, número de diástase, acidez e conteúdo de HMF. Uma vez que as leveduras são responsáveis pela fermentação, este tipo de tratamento aumenta a estabilidade e o período de armazenamento, elevando muito a qualidade do mel pelo seu alto nível de pureza microbiológica. Um produto submetido a este tratamento poderia ser destinado a usos especiais, como para a dieta de pessoas com deficiências imunológicas.

Jiménez e colaboradores [41] determinaram resíduos de 37 tipos de pesticidas em mel, por cromatografia gasosa, após extração em fase sólida. As respostas cromatográficas obtidas por calibração convencional apresentaram recuperações muito acima do esperado, o que foi atribuído ao efeito de matriz, e que pôde ser contornado pelo método de adição de padrões. Em um outro estudo [42], utilizaram polidimetilsiloxano com 10  $\mu\text{m}$  de espessura para a micro-extração de 21 tipos de pesticidas de diferentes famílias químicas, em 6 méis poliflorais de origens diversas. Os autores sugerem este procedimento para análises semiquantitativas.

Outra contribuição de Jiménez e colaboradores [43] refere-se a resíduos e/ou produtos da degradação de clordimeforme, N-(4-cloro-o-tolil)-N, N-dimetilformamida, utilizado no controle de ácaros em apiários. Através das técnicas de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas e cromatografia gasosa com detector de emissão atômica, monitoraram a cinética da reação do clordimeforme, durante 28 semanas, e identificaram a formação de 4-cloro-o-toluidina e N-formil-4-cloro-o-toluidina. Através da linha de emissão do carbono, deduziram o decréscimo do clordimeforme dopado no mel em 7,5 % da sua massa inicial de 2  $\text{mg kg}^{-1}$ .

A determinação de ânions em mel não tem atraído a atenção dos pesquisadores. Entretanto, o ácido oxálico vem sendo usado para o controle de doenças em abelhas. Del Nozal e colaboradores [14] investigaram as concentrações de oxalato, sulfato e nitrato por cromatografia iônica com detecção condutimétrica, após sua separação e extração em fase sólida em uma coluna aniônica e eluição

com uma solução de cromato a  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . Examinaram 99 amostras de mel de abelhas de diferentes origens botânicas, coletadas de uma mesma área, no período de 1996 a 1998. Monitoraram também amostras de mel procedentes de colméias tratadas todos os dias com uma solução de ácido oxálico a 3 % m/v, durante quatro semanas. Foi encontrado sulfato em grande parte das amostras, cujas concentrações (na faixa de 20 a  $206 \mu\text{g g}^{-1}$ ) variam de acordo com as estações do ano; o conteúdo de oxalato nos méis, aparentemente, não é influenciado pelo tratamento das colméias.

#### **IV.2.3 – Metais**

Os metais estão presentes nos méis de abelhas em baixas concentrações, com valor máximo de 0,2 % m/m, porém sua avaliação é de grande importância uma vez que é um alimento consumido como suplemento alimentar e coadjuvante terapêutico em várias enfermidades.

Constituintes considerados essenciais à dieta humana (K, Na, Ca, Mg, P e S) podem estar presentes no mel de abelhas em concentrações tais que podem qualificá-lo como boa fonte nutritiva. Por outro lado, a presença de metais de transição, alguns indesejáveis por sua suposta toxicidade, mesmo em baixos níveis de concentração, pode estar relacionada com a origem geográfica do mel e podem assinalar poluição ambiental [20].

A determinação de metais em alimentos ricos em açúcar tem sido um desafio analítico, devido à interferência da matriz. A diluição da amostra pode minimizar este efeito mas, por outro lado, reduzir as concentrações dos metais abaixo do limite de detecção. Assim, o pré-tratamento é usualmente necessário para destruir a matriz orgânica e/ou extrair os íons metálicos ligados aos complexos orgânicos [20]. Obviamente, a seleção do procedimento deve, sempre, levar em conta as espécies de interesse, a matriz e o tempo necessário para o emprego da técnica considerada observando, também, que tanto o monitoramento ambiental quanto o controle de qualidade requerem um grande número de amostras para análise.

A seguir são apresentados alguns métodos propostos para a determinação de metais em méis de abelhas, algumas aplicações no monitoramento ambiental e determinações da sua origem geográfica e/ou autenticidade.

#### **IV.2.3.1 - Métodos Analíticos**

Os métodos recentemente desenvolvidos para a determinação de metais em mel de abelhas utilizam técnicas de análises que proporcionam determinação simultânea de espécies. Kump e colaboradores [29] compararam o desempenho das técnicas de espectrometria de fluorescência de radioisótopos de raios-X, espectrometria de fluorescência de reflexão total de raios-X e espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado para a detecção de espécies metálicas e não metálicas em mel, pólen e abelhas, após mineralização, constatando que os métodos são compatíveis, desde que as amostras sejam submetidas ao mesmo pré-tratamento.

Lill e colaboradores [30] quantificaram metais em mel, por emissão de raios-X induzidos por partícula, após tratamento de pré-concentração por uma calcinação programada, obtendo ganhos de sensibilidade e limite de detecção, que foram atribuídos à redução da massa na composição das cinzas residuais. A calibração foi feita com cinzas secas de vários materiais biológicos de referência certificados, onde foi observado que os efeitos de matriz são negligenciáveis e que as amostras na forma de cinzas são mais homogêneas e resistentes aos raios catódicos. Os limites de detecção, em geral, foram menores que  $10 \text{ ng g}^{-1}$ , sendo detectada a presença das seguintes espécies em mel: K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Rb, Sr e P.

A determinação da concentração de 24 elementos em amostras de mel de abelhas, produzidos em uma área recuperada de uma mina de urânio no Texas, foi avaliada por Iskander [44], utilizando a técnica de análise de ativação por nêutrons, onde foram detectados Br, Co, Cr, Fe, K, Na, Rb, Sb, SC, Se, Sm, Zn e Zr. Apesar desta técnica apresentar baixos limites de detecção, sua desvantagem está no alto custo para análises de rotina.

Um método para a determinação simultânea de Cu, Pb, Cd e Zn em amostras de mel mineralizadas por microondas, utilizando a voltametria de redissolução anódica por pulso diferencial foi proposta por Sanna e colaboradores [3]. Para evitar a formação de compostos intermetálicos de Cu-Zn, foi adicionada uma solução de Ga (II). Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica mostrando valores estatisticamente compatíveis. Estes pesquisadores investigaram também a possibilidade de especiação em amostras não mineralizadas, mas os resultados não foram satisfatórios devido à capacidade de complexação da matriz e sua alta viscosidade. Assim, foi feita a determinação destes metais em soluções de mel, onde foram encontradas respostas satisfatórias para o Cu. Dois procedimentos para a determinação de Cu livre foram feitos com diferentes diluições, obtendo-se concentrações completamente distintas. Deste modo, os autores enfatizam os cuidados relativos à diluição que, apesar de ser uma operação simples, pode afetar a composição, alterando drasticamente o equilíbrio de complexação da matriz.

Com o objetivo de reduzir as etapas de pré-tratamento e minimizar os interferentes, Buldini e colaboradores [20] compararam os efeitos da digestão assistida por fotólise UV e por microondas em mel de diferentes origens e variadas composições, através de determinações simultâneas de Fe, Cu, Ni, Zn, Pb, Cd, Co, Mn por cromatografia iônica e por voltametria de redissolução catódica de pulso diferencial. Os resultados obtidos, independentes das técnicas utilizadas, mostraram que as espécies determinadas, com exceção do Mn, não foram afetadas pela radiação UV, apresentando uma recuperação entre 97-103 %. Na ausência de material certificado para o mel, as amostras foram analisadas por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica, ETAAS, apresentando uma boa concordância de resultados. Os autores concluíram que ambas as técnicas são convenientes para a determinação de elementos traços em mel, embora necessitem de um tratamento prévio, e a digestão por fotólise UV mostrou-se superior quando comparada à digestão por microondas, tendo em vista que as quantidades de reagentes requeridas são menores.

Um método proposto por Viñas e colaboradores [22] para a determinação de Pb, Cd, Zn e Cu por ETAAS em amostras de mel de abelhas não mineralizadas consiste na diluição da amostra em peróxido de hidrogênio e ácido nítrico e sua introdução no atomizador. Deste modo, a matriz orgânica é destruída durante a etapa de pré-aquecimento, diminuindo o sinal de fundo e a quantidade de resíduos no atomizador, melhorando a precisão da determinação. Os resultados obtidos para o Pb, Zn e Cu apresentaram boa concordância quando comparados com os obtidos para amostras submetidas à calcinação. Entretanto, o conteúdo de Cd determinado pelo método proposto (1,2 a 5,4 ng g<sup>-1</sup>) não pôde ser comparado, uma vez que os resultados obtidos pelo procedimento de calcinação apresentaram valores elevados de desvio padrão relativo (RSD).

Caroli e colaboradores [25] estudaram a concentração de várias espécies metálicas (As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Pt, Sn, V e Zn) em mel de abelhas de duas origens botânicas diferentes, em diferentes estágios de produção (fresco, selado, extraído, maduro). Em função das concentrações de cada espécie, suas determinações foram feitas por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado, espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado a um detetor quadrupolar ou a um espectrômetro de massas de alta resolução. O objetivo deste trabalho não foi somente de quantificar possíveis contaminantes em mel nas suas etapas de produção, mas também de dar início a uma campanha para a produção de um material de referência certificado (CRM). As amostras foram coletadas de duas colméias de uma área considerada despoluída, em Castelmuzio (Itália). As concentrações dos diferentes elementos foram similares nas duas colméias; as poucas exceções notadas foram para as espécies As, Cu, Fe, Ni e Zn que foram atribuídas às diferentes origens botânicas dos méis.

Dando prosseguimento ao projeto de produção de CRM em mel de abelhas, Caroli e colaboradores [26,27] avaliaram a possibilidade de produção de dois materiais de mel de abelhas de diferentes estados físicos. Para a preparação do material, o comportamento mais estável foi obtido pelo encapsulamento de uma solução aquosa de mel purgada com argônio e submetida à radiação  $\gamma$ . A finalidade da radiação é diminuir a atividade microbiológica, que causa floculação e/ou



desnaturação de proteínas e afeta os resultados analíticos, pela variação da composição da matriz através da absorção de íons na solução. O projeto foi considerado um sucesso e os materiais foram submetidos aos critérios de certificação do Instituto de Medidas e Materiais de Referência, Junta do Centro de Pesquisa da Comissão Européia (Institute for Reference Materials and Measurements, Joint Research Centre of the European Commission, EC-JRC-IRMM). Se este trabalho for aprovado, deverá ocorrer um avanço analítico significativo, no que diz respeito à validação de métodos para a determinação de metais em mel de abelhas.

Packer e Giné [28] estudaram a determinação de Ba, Cu, Zn e Pb em amostras de mel de abelhas, sem a etapa de digestão da amostra, usando o método de diluição isotópica e nebulização por injeção direta por ICP-MS. Aproximadamente 0,6 g de mel foi diluído em 15 mL de água desionizada, contendo 4 % v/v de  $\text{HNO}_3$  e 1 % m/v de Triton X-100, agitadas durante 20 s, e injetadas para análise. Os parâmetros envolvidos foram otimizados para a obtenção de sinais transientes estáveis. As razões isotópicas para o Ba, Cu, e Zn foram medidas em uma única injeção, enquanto que a de Pb foi feita separadamente. Os resultados apresentaram uma boa concordância, quando comparados com os obtidos com amostras mineralizadas e calibradas com padrão externo. A análise é caracterizada por uma ótima precisão e redução da etapa de digestão da amostra. Entretanto, uma das desvantagens da técnica consiste na possível penetração de íons ou partículas residuais, provenientes de reações no plasma, as quais podem causar avarias ao quadrupolo.

#### **IV.2.3.2 - Monitoramento Ambiental**

A quantificação de metais em mel de abelhas geralmente é feita para garantir a qualidade e sua autenticidade como alimento saudável para consumo. Neste aspecto, os teores de espécies metálicas presentes atuam como um indicador ambiental, sendo relacionados à situação específica de um dado momento. Assim, investigações relacionadas à qualidade têm, também, dado a sua contribuição para

um aumento do acervo de informações, quando caracteriza méis de diferentes procedências. Entretanto, quanto ao seu uso no monitoramento ambiental, isto é, acompanhando e avaliando os dados em um trabalho progressivo, sistemático e sequencial, são observadas poucas contribuições.

Leita e colaboradores [7] monitoraram as concentrações de Cd, Pb e Zn na superfície de abelhas e o acúmulo destes metais nos seus alimentos, nas abelhas mortas e nos seus méis. Este estudo foi realizado durante 9 semanas, em 10 colméias localizadas a 50 metros de um cruzamento rodoviário. As concentrações das espécies foram determinadas por ICP OES. Foram encontrados Cd e Zn na superfície das abelhas mortas, como consequência de sua exposição ao ambiente. Entretanto, o Pb nas abelhas mortas foi, aparentemente, extraído com água e/ou acumulado no corpo do inseto. A geléia real e os méis apresentaram um alto conteúdo destes metais. Foi encontrada uma relação linear entre as concentrações de Cd nos méis e nas flores. Estes pesquisadores sugerem que os produtos de abelhas melíferas podem ser utilizados como marcadores ambientais e que medidas em abelhas mortas podem ser uma ferramenta útil para avaliar a dinâmica do acúmulo de poluentes.

Um outro trabalho de monitoramento ambiental e avaliação de abelhas melíferas e seus produtos como bioindicadores, foi realizado por Conti e Botré [45]. Foram avaliadas as concentrações de Cd, Cr e Pb por ETAAS em abelhas melíferas, méis, pólen, própolis e cera. As amostras foram coletadas por um período de 3 meses em apiários especialmente construídos para minimizar contaminações por metais e localizados em áreas selecionadas, caracterizadas por impactos ambientais diferentes, da cidade de Roma. Este estudo teve como objetivo específico verificar a possibilidade de detectar variações significativas nas concentrações das espécies estudadas com os diversos tipos de amostras e áreas. Os resultados mostraram que as concentrações dos metais nas áreas consideradas “mais limpas” estavam abaixo do relatado na literatura. Estes pesquisadores consideraram que pólen, própolis, cera e abelhas são mais úteis que somente o mel de abelhas, na avaliação do grau de contaminação, apesar do reduzido tempo de exposição das matrizes e, conseqüente, acúmulo limitado destes metais.

Uren e colaboradores [15] monitoraram as concentrações das espécies metálicas Pb, Cd, Fe, Cu, Zn, Mn, Ca, Mg e K em méis de abelhas produzidos em diferentes regiões da Turquia por espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS), durante o período de 1992 a 1994. Foram coletadas 74 amostras, das quais 33 eram procedentes de uma área localizada entre 15-18 km de uma usina termoeleétrica. Foram observadas consideráveis flutuações nas concentrações das espécies, de acordo com a época de amostragem. As amostras procedentes da vizinhança da usina não apresentaram contaminação pelos metais estudados.

Um exemplo típico do uso do mel de abelhas como indicador ambiental é dado pelo trabalho feito por Borawska e colaboradores [46] que, doze anos após o acidente nuclear de Chernobyl, investigaram os níveis de Cs-147 e K-40 em méis de abelhas procedentes daquela região, por espectrometria de raios gama. Os resultados obtidos foram comparados aos da época do acidente. Os autores supunham que, passado todo esse tempo, a radioatividade presente nas amostras estaria abaixo do limite de detecção instrumental, o que não foi o caso. Porém, os resultados mostraram que os níveis de concentração das espécies estudadas estavam bem abaixo do limite para alimentos, de acordo com a Comissão Internacional de Proteção Radiológica.

Um estudo comparativo de diversos tipos de preparação de amostras em mel de abelhas foi feito por Fodor e Molmar [24], usando ICP OES na determinação de várias espécies metálicas. Estes pesquisadores relataram que as melhores recuperações foram obtidas para as digestões ácidas em bomba de PTFE e forno de microondas e aplicaram estes dois métodos em 7 amostras de mel de abelhas procedentes da Hungria. Os resultados obtidos mostraram que, em geral, as amostras procedentes de áreas industriais apresentaram maiores teores de metais. Apesar deste estudo abordar uma questão importante, relacionada a esta matriz, os autores não apresentaram os resultados relativos às recuperações e não fizeram uma comparação estatística dos resultados obtidos pelos dois métodos.

Miller-Ihli [9] avaliou as concentrações de Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn por AAS e K e Na por espectrometria de emissão atômica em amostras de mel de melado e frutas. A preparação das amostras foi feita por digestão com ácido nítrico e peróxido

de hidrogênio. Os resultados obtidos foram comparados com as definições da Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration's - FDA). Tanto o mel como diversas frutas foram considerados como uma boa fonte de potássio.

Pesquisadores de vários países têm tido a preocupação de fazer levantamentos de perfis físico-químicos e das concentrações de algumas espécies metálicas em diferentes tipos de mel de abelhas de origens botânicas e de regiões distintas, por diferentes métodos e técnicas. Em geral, os resultados são comparados com os de outros países, observando-se que muitas características são intrínsecas da região de origem [16-19].

#### **IV.2.3.3 - Origem Botânica/Geográfica e Autenticidade**

Uma ênfase especial tem sido dada à determinação da origem botânica e geográfica do mel. A análise microscópica é limitada e a determinação de simples parâmetros tais como, HMF, cinzas, atividade enzimática, mono e dissacarídeos e resíduos de tratamentos químicos permitem apenas o indício da origem botânica e/ou geográfica.

Deste modo, a análise de perfis de alguns parâmetros pode ser mais conveniente. Os perfis mais convenientes para a indicação da origem botânica são: oligossacarídeos, ácidos orgânicos, compostos aromáticos, flavonóides, ácidos fenólicos, distribuição de pólen, ésteres, proteínas e razão isotópica estável (D/H). Para a indicação da origem geográfica tem-se: aminoácidos, compostos aromáticos, flavonóides, minerais e elementos traços, oligossacarídeos, proteínas e razão isotópica estável ( $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ ). Todavia, a combinação de métodos é uma aproximação promissora para a comprovação da autenticidade, especialmente quando a avaliação é feita por técnicas estatísticas [2].

Existe uma forte tendência do crescimento comercial de méis. Assim, tanto a caracterização da origem floral, como o estabelecimento dos limites geográficos e de produção, direcionados à proteção de áreas que desenvolvem uma marca com um certo padrão de qualidade, são importantes para fornecer ao consumidor um critério de escolha. Nestas circunstâncias, o estabelecimento de procedimentos para a

determinação da origem e autenticidade é muito importante. Na ausência de um único parâmetro identificador, métodos estatísticos vêm sendo usados [10,11].

A maioria dos estudos feitos através de métodos quimiométricos direcionados ao reconhecimento da origem botânica tem utilizado alguns parâmetros químicos legais de qualidade e, para o reconhecimento geográfico, tem-se usado também a composição mineral.

Paramás e colaboradores [11] fizeram uma análise quimiométrica, utilizando 13 parâmetros físico-químicos e as concentrações de 12 cátions e 4 ânions de méis de abelhas procedentes de seis áreas produtoras das províncias de Salamanca, Zamora e Cáceres (Espanha). O objetivo deste estudo foi o de verificar a possibilidade de diferenciação entre os méis, para estabelecer os limites geográficos de produção de cada área e determinar, se possível, as diferenças entre as áreas geograficamente e botanicamente diferentes dos distintos tipos/qualidades. Assim, 60 amostras de mel fresco foram coletadas das seis áreas, no período de 1992 e 1994. Dados de interesse como localização, data, procedimentos de extração, tratamentos de aquecimento, temperatura, local de armazenamento, dados climatológicos e botânicos foram registrados. Os resultados obtidos na análise de pólen refletiram aproximadamente a proporção de cada tipo de mel produzido em cada área. A aplicação da análise discriminante linear (LDA) permitiu a diferenciação entre os méis e entre as áreas. Foram selecionadas 10 variáveis para as seis áreas, sendo uma combinação de 3 parâmetros físico-químicos e de 9 elementos, apresentando um resultado de 91,38 % de classificação correta. Para três áreas de interesse especial, da região da província de Salamanca, foram selecionadas 6 variáveis, obtendo-se um resultado com 97,07 % de classificação correta.

Outro método semelhante foi desenvolvido por Latorre e colaboradores [10], com o objetivo de confirmar a autenticidade de méis de abelhas produzidos na região da Galícia (Espanha), através de métodos multivariados. Foram feitas determinações de 11 metais em 42 amostras diferentes, divididas em duas categorias: mel galiciano natural e mel não galiciano processado. Foram selecionadas as concentrações de 3 elementos (Li, Mn, Cu) por LDA, as quais foram utilizadas para a diferenciação. Os

resultados obtidos, por diferentes métodos, apresentaram bons níveis de confiança para esta classificação.

Devillers e colaboradores [47] fizeram a análise elementar de 86 amostras de mel de abelhas comercializadas na França por ICP OES. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) para melhor interpretação dos dados analíticos. Foram encontradas relações entre os perfis metálicos e as origens botânicas. Algumas das amostras analisadas, produzidas em áreas próximas às indústrias, apresentaram contaminação por metais.

#### **IV.2.4 – Estudos Desenvolvidos em Méis Brasileiros**

Em contraste com sua grande diversidade floral, poucos registros da composição química de méis brasileiros são descritos na literatura, sendo encontrados alguns estudos acadêmicos, como o trabalho já citado de Packer e Guiné [28], que utiliza o método de diluição isotópica e ICP-MS.

Bastos [35] desenvolveu um método para determinação de compostos voláteis em mel de eucalipto e de laranja pela técnica de isolamento “Headspace” dinâmico e separação por cromatografia gasosa de alta resolução. A identificação de alguns dos compostos foi feita por espectrometria de massas e pelo índice Kovats. A composição de voláteis diferiu de acordo com a origem floral do mel analisado. Foi verificado também que tanto o processamento como as condições de armazenamento afetam a composição dos voláteis nas amostras.

Pamplona [48] estudou diversas amostras de mel de *Apis mellifera* procedentes das regiões Sudeste, Sul e Nordeste, observando a origem floral, algumas propriedades físico-químicas e algumas espécies metálicas determinadas por ICP OES, com o objetivo de estabelecer relações entre estas propriedades. Os resultados indicaram que a composição química do mel varia de acordo com a origem floral, clima e solo; pH, cor, conteúdo de água, sabor e composição metálica são característicos para cada origem floral.

Costa e colaboradores [6] estudaram e compararam características físico-químicas de méis poliflorais e 11 tipos de monoflorais, procedentes de 14 estados brasileiros. Seus resultados apontam algumas características marcantes, as quais podem vir a ser usadas na distinção do mel das diferentes regiões do país. Dos valores obtidos, 82 % estavam em concordância com os regulamentos legais do Brasil e com o Código Europeu. Em um estudo posterior, este mesmo grupo de pesquisadores [49] determinou o teor de 10 oligossacarídeos em 70 amostras das diferentes regiões, utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados comprovaram que alguns destes compostos são úteis na diferenciação das regiões geográficas, e podem também ser usados para testes de autenticidade de méis brasileiros.

Recentemente, Campos e colaboradores [50] compararam a aplicação da equação de Kirkwood e o método de White para a classificação de 25 amostras de méis florais e de melato procedentes de Santa Catarina. O estudo estatístico indicou que os métodos são equivalentes e que ambos podem ser usados. Além desta conclusão, este estudo apresenta parâmetros físico-químicos utilizados na aplicação das equações que contribuem para o acervo de informações dos méis nacionais.

#### **IV.3 - ESPECTROMETRIA ÓTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO**

Na técnica de ICP OES uma amostra é submetida a altas temperaturas e os seus componentes não somente são convertidos a átomos gasosos ou íons elementares, mas também ocorre excitação das espécies a altos estados eletrônicos. A rápida relaxação das espécies excitadas é acompanhada pela produção de linhas espectrais, ultravioleta e visível, que são úteis na análise qualitativa e quantitativa.

As altas temperaturas são promovidas por um plasma de argônio. Por definição, plasma é uma mistura gasosa condutora de eletricidade que contém uma concentração significativa de cátions e elétrons, com uma carga total próxima de zero [51]. O plasma de argônio é formado e mantido por um fluxo de gás argônio em



um campo magnético de alta frequência em uma tocha de quartzo, constituída de três tubos concêntricos.

A formação do plasma dá-se por uma centelha inicial, proveniente da bobina de indução, descarregada no fluxo de gás argônio, tornando-o condutivo, sob um campo magnético. O tubo central conduz a amostra, na forma de aerossol, procedente do nebulizador; no tubo intermediário flui o gás auxiliar para a estabilização do plasma; no tubo externo flui o gás argônio que alimenta o plasma e refrigera a tocha, prevenindo a sua fusão, devido às altas temperaturas atingidas. A Figura 4.1 apresenta a seção transversal da tocha e o plasma formado com suas regiões de temperaturas típicas.

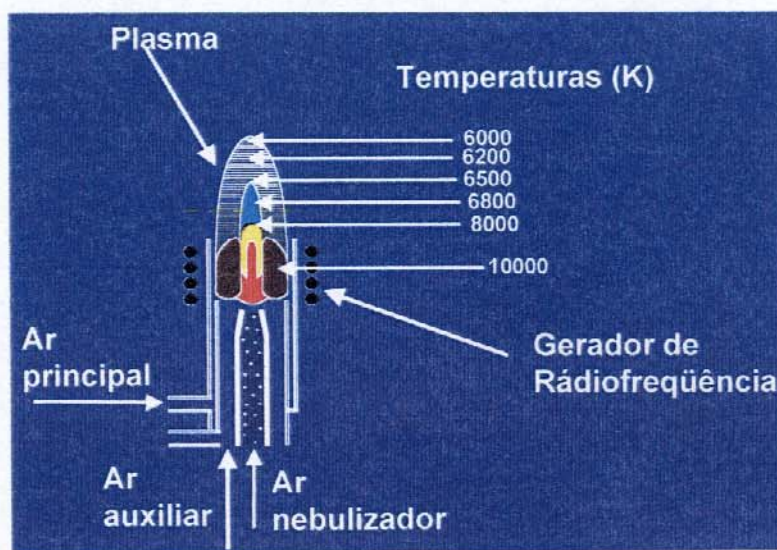


Fig. 4.1 – Seção transversal de uma tocha e do plasma formado usado em ICP OES, com suas regiões de temperaturas típicas [Adaptação da ref. 31].

A região do plasma em que são feitas as medidas da radiação de emissão é conhecida como zona analítica normal (NAZ), as quais podem ser observadas de modo lateral, sob o raio (configuração da tocha radial) ou observada sob o eixo axial (configuração da tocha axial) do plasma [31].

A diferença principal entre os dois modos de configuração da tocha consiste, basicamente, no comprimento da região observada. Em geral, o modo de



observação axial alcança melhores limites de detecção e sensibilidade que o radial, uma vez que a região de observação do sinal analítico é maior. Por outro lado, aumenta o risco de interferências espectrais e diminui a razão sinal/fundo. Em muitos casos, onde a faixa de concentração do analito é elevada ou quando existe o problema de matriz complexa, a escolha do modo de observação radial pode ser a mais conveniente, principalmente para espécies de baixo potencial de ionização [31,52].

Alguns instrumentos combinam os dois modos de observação de tocha (*double vision*) em uma única unidade, onde a radiação é coletada por um foco ótico, tais como lentes convexas ou côncavas, e as escolhas dos modos mais convenientes são feitas e controladas por um computador. A Fig. 4.2 apresenta, esquematicamente, este tipo de mecanismo.

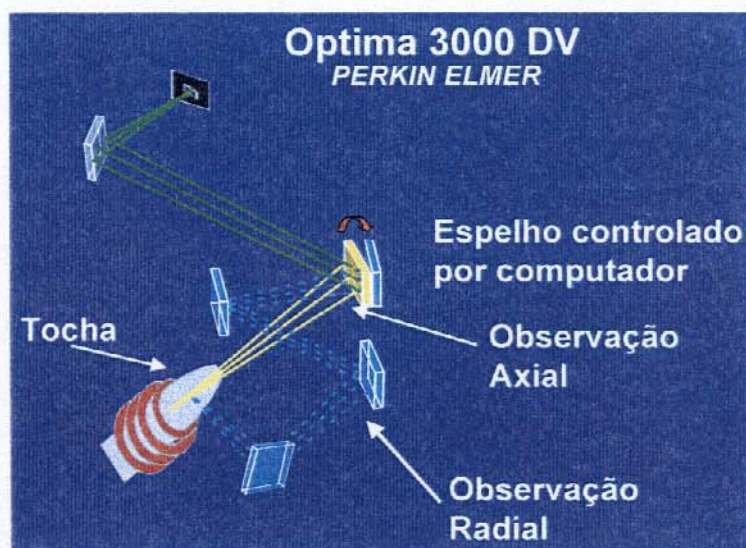


Fig. 4.2 – Mecanismo de observação de tocha de instrumentos equipados com dupla visão, axial e radial [Adaptação da ref. 31].

O processo de nebulização é uma etapa crítica em ICP OES. Para este fim existem vários tipos de nebulizadores no mercado. O sistema ideal de introdução é aquele que transporta toda a amostra para o plasma, de forma que o plasma possa reproduzir a dessolvatação, vaporização, atomização, ionização e excitação. Os

nebulizadores pneumáticos são os mais utilizados, devido à sua simplicidade de construção, boa reprodutibilidade, baixo custo e robustez.

No nebulizador de fluxo cruzado ou de fluxo transversal (*cross-flow*), utilizado neste estudo, o fluxo de argônio é perpendicular ao fluxo da amostra. O contato do fluxo de argônio sobre o fluxo da amostra líquida provoca a sua ruptura em um fino aerossol. Uma vantagem deste tipo de nebulizador sobre os demais é que, além da minimização de problemas com entupimento, eles são mais resistentes à corrosão ou ataques químicos [31].

Atualmente, as fontes de plasma têm se tornado o método mais importante e largamente utilizado na espectrometria de emissão, oferecendo muitas vantagens. Uma dessas vantagens é a determinação multielementar, onde devem ser tomados os devidos cuidados com as interferências espectrais, que é uma consequência direta das altas temperaturas. Bons espectros de emissão são obtidos em um único conjunto de condições de excitação; como resultado, espectros de diversos elementos podem ser registrados simultaneamente. Outra vantagem é que as fontes de plasma são mais energéticas e permitem a determinação em baixas concentrações de elementos que tendem a formar compostos refratários, isto é, compostos como óxidos de boro, fósforo, tungstênio, urânio, zircônio e nióbio que são altamente resistentes à decomposição térmica. Finalmente, os métodos baseados em fontes de plasma oferecem amplas faixas de concentração linear [51].

#### **IV.4 - PRÉ-TRATAMENTO DE AMOSTRAS**

Os métodos de análises espectroscópicas necessitam de uma etapa de pré-tratamento de amostras, por mais simples que seja. Esta etapa é geralmente uma das mais importantes nas análises, por ser responsável por erros na análise. Isto é mais crítico para amostras sólidas ou complexas, uma vez que os métodos utilizados, geralmente, requerem uma solubilização para sua introdução no sistema.

Existem vários métodos de preparação de amostras para análise que são classificados em secagem ou oxidação a seco e digestão úmida. A escolha do

método mais adequado não é uma questão fácil de ser respondida. Cada um apresenta suas vantagens e desvantagens em relação a uma amostra ou a um problema de quantificação em particular.

Os métodos de oxidação a seco são simples e sensíveis. São usadas temperaturas elevadas à pressão atmosférica, geralmente em forno mufla, para assegurar a decomposição e remoção da matéria orgânica. O conteúdo mineral da matriz é transformado em carbonatos ou óxidos, os quais são dissolvidos em um ácido apropriado. A principal desvantagem destes métodos está associada a perdas, devido à volatilização de algumas espécies. Nestes casos, são utilizados reagentes oxidantes para prevenir a volatilização e para auxiliar na velocidade do processo.

A remoção total da matéria orgânica é muitas vezes desejável para a determinação do analito, porém outras vezes isto é desnecessário, podendo-se apenas extrair para a solução as espécies metálicas presentes na amostra. A digestão úmida pode satisfazer estas duas opções. Estes métodos envolvem o uso de alguns ácidos combinados (nítrico, sulfúrico, perclórico, clorídrico, fluorídrico) e peróxido de hidrogênio e podem ser conduzidos em sistemas abertos ou fechados.

Os métodos de digestão ácida em sistemas fechados são geralmente mais eficientes que a oxidação a seco em sistemas fechados, onde o fator limitante das bombas de combustão é a pequena quantidade de amostra permitida a ser tratada [53].

Os procedimentos de digestão úmida em sistemas abertos ou fechados assistidos por microondas parecem ser uma das tendências analíticas, uma vez que o seu aquecimento e sua velocidade de decomposição são mais eficientes que os sistemas convencionais para muitos tipos de amostras consideradas de difícil solubilização. Além disso, tem-se um menor consumo de reagentes e menores riscos de contaminação com maior precisão e repetibilidade.

As microondas são ondas eletromagnéticas que cobrem uma faixa de frequência de 300 a 300.000 MHz do espectro eletromagnético. É uma radiação não ionizante que provoca movimento de moléculas polares e íons em solução, pela migração de íons e/ou rotações de dipolo, ocasionado pelo elevado número de vezes

em que o campo eletromagnético se alterna, proporcionando o aquecimento da amostra em meio ácido [54].

Em um sistema assistido por microondas as radiações são emitidas por um dispositivo eletrônico, denominado magnetron, que converte a energia elétrica de baixa frequência em um campo eletromagnético e situa-se na cavidade de um forno que serve para refletir as ondas. Dois tipos de sistemas são usados: sistema fechado (sob pressão) e focalizado (à pressão atmosférica). No sistema fechado, a pressão é elevada e controlada, onde a energia de microondas é focalizada no frasco que contém a amostra. No sistema de microondas focalizado, a digestão é feita em frascos, na forma de tubos, com capacidade para 50, 100 ou 250 mL à pressão atmosférica [54,55].

Um dos métodos alternativos utilizados no pré-tratamento de amostras consiste no uso da energia de ultra-som (sonicação). A energia de ultra-som tem frequências mais baixas que a faixa audível humana (1 – 16 kHz) e é diferente das ondas eletromagnéticas (ondas de rádio, infravermelho, visível ou ultravioleta, raios-x e raios gama), que podem atravessar o vácuo. A energia de ultra-som passa através da matéria quando o meio contido envolve ciclos de expansão e compressão. Neste caso, se a energia de ultra-som é suficientemente forte, formam-se bolhas ou cavidades, cujo processo é conhecido como cavitação.

Os efeitos químicos da sonicação são atribuídos ao processo de cavitação que gera altas temperaturas (aproximadamente 5000 °C) pela ação mecânica entre as partículas sólidas e fluidas e que podem facilitar processos como dissociação, fusão e lixiviação, sendo um modo efetivo de extração de espécies químicas em diversos tipos de amostras. A eficiência da extração depende das variáveis que influenciam o processo de cavitação (temperatura, viscosidade, presença de partículas sólidas, altura da coluna de água, frequência e posição dos recipientes usados para extração, entre outros). Os mecanismos comumente empregados estão na forma de banho ou sonda. Os banhos de ultra-som são mais populares; entretanto, apresentam as desvantagens de baixa repetibilidade e reprodutibilidade, em relação à sonda de ultra-som que, por apresentar energia focalizada, promove de modo mais eficiente o processo de cavitação. Apesar das limitações, para muitas

situações analíticas a sonicação pode ser uma solução eficiente e de baixo custo [55a].

Matrizes ambientais variam sua composição desde puramente orgânicas a puramente inorgânicas, mas geralmente encontram-se em uma combinação intermediária entre os dois extremos. A sua total solubilização nem sempre é possível em uma única etapa, usando um único reagente. Deste modo, os cuidados devem ser redobrados para que não ocorram contaminações. Isto é particularmente importante na determinação de constituintes em concentrações mais baixas [53].

Além dos cuidados relacionados à qualidade dos resultados analíticos, a questão de segurança deve ser observada, principalmente quanto à utilização de reagentes explosivos. Uma outra questão polêmica, relacionada tanto com a segurança como também com o meio ambiente, envolve os resíduos gerados em laboratórios que decorrem, em grande parte, da etapa de preparação da amostra para análise; para muitos destes, ainda não existe uma aplicação e/ou descarte apropriado.

Em ICP OES, as altas temperaturas favorecem a decomposição das matrizes e diversos tipos de líquidos orgânicos ou suspensões podem ser aspirados diretamente [53]. Em geral, nestes casos, tem-se um menor número de reagentes e etapas de manipulação das amostras. Entretanto, para esta aplicação deve ser observada a possibilidade de efeitos de matriz, devendo-se tomar precauções para que não ocorram entupimentos ou obstrução no sistema de nebulização, como também a formação de compostos de carbono, devido ao alto conteúdo de matéria orgânica, ou altas concentrações de sais em solução que podem diminuir a razão sinal/fundo, afetando drasticamente a sensibilidade instrumental.

Os microrganismos, através de suas atividades enzimáticas, são responsáveis por inúmeros processos na área de alimentos e medicamentos. As enzimas são catalisadores orgânicos, produzidos por células vivas, que governam as reações químicas nos processos vitais. Uma vez elaborada por uma célula, uma enzima poderá atuar independentemente da célula, se condições apropriadas forem mantidas. Uma das propriedades relevantes das enzimas é a sua especificidade sobre o substrato. As enzimas atacam um número muito limitado de compostos e

não têm qualquer efeito sobre outros. Outras propriedades são a atividade em baixa concentração, a rapidez de ação e a não toxicidade [56,57]. Alguns pesquisadores vêm utilizando estes princípios propondo métodos alternativos de decomposição de matrizes orgânicas.

Morris e colaboradores [58] utilizaram o princípio de fermentação alcoólica, para a decomposição de amostras de açúcares procedentes de refinarias, usando fermento de pão comercial (*Saccharomyces cerevisiae*), para a determinação de Pb, Cd e Zn por ETAAS. Estes pesquisadores concluíram que o pré-tratamento utilizado apresenta uma interferência na determinação de Pb, para o qual foram obtidos resultados de 10 a 20 % maiores que o esperado; não foram observadas interferências nas determinações de Cd e Zn. Este comportamento deve-se, possivelmente, à habilidade destes microrganismos absorverem seletivamente algumas espécies metálicas. Bag e colaboradores [59] aproveitaram esta característica para o desenvolvimento de um método de pré-concentração de ferro e níquel utilizando, também, a *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada com sepiolite, um hidrato de magnésio mineral. O método demonstrou ser eficiente, apresentando boas recuperações na determinação destas espécies em ligas metálicas, por FAAS.

Outros métodos vêm sendo propostos utilizando diretamente certos tipos de enzimas para a decomposição de alimentos e quantificação de determinadas espécies metálicas [60,61]. Sabe-se que muitos fatores podem comprometer os resultados, mas apesar do custo elevado associado à aquisição de alguns tipos de enzimas, sua aplicação analítica parece ser alternativa promissora no pré-tratamento de amostras.

## IV.5 - QUIMIOMETRIA

A sofisticação crescente das técnicas instrumentais impulsionadas por ferramentas computacionais no laboratório gera uma grande quantidade de dados analíticos. Entretanto, obter dados não significa possuir informação, mas interpretá-los e colocá-los em um contexto adequado para convertê-los em informação útil é o



grande desafio da quimiometria, que trata de problemas de origem química, utilizando métodos matemáticos e estatísticos ou procedentes da lógica formal para alcançar esta finalidade [62].

Através dos métodos quimiométricos, conhecidos como reconhecimento de padrões, é possível extrair ou interpretar tendências e/ou relações de um conjunto de dados, atendendo a sua natureza multivariada. Dados multivariados correspondem a uma matriz de dados  $m \times n$ , correspondendo a  $m$  linhas (amostras ou objetos) e  $n$  colunas (variáveis ou parâmetros). A questão fundamental reside em transformar a informação multidimensional em bidimensional [62,63].

Os métodos quimiométricos para reconhecimento de padrões são classificados em não supervisionados e supervisionados. Nos métodos não supervisionados o objetivo é identificar classes ou agrupamentos naturais dos dados sem a imposição prévia de relações entre estes, independente do alvo da modelagem. Nos métodos supervisionados, o conhecimento das classes é usado para desenvolver um modelo para classificar futuras amostras [64].

Os dois métodos não supervisionados correspondem à *Análise de Agrupamentos Hierárquicos* (HCA) e à *Análise de Componentes Principais* (PCA). No método HCA, o algoritmo atribui valores de similaridades entre as amostras originais, através de cálculos de distâncias entre as mesmas, no espaço multidimensional, obtendo-se uma matriz de similaridade. Os dados da matriz de similaridade são inspecionados e as amostras com similaridade máxima são selecionadas e somadas, formando um centro de gravidade. Em seguida, um outro par de amostras, de maior similaridade, é selecionado; o processo continua até que todas as amostras sejam contidas em um único agrupamento. O resultado é apresentado na forma de um gráfico bidimensional, chamado de dendograma [64,65].

No método PCA os dados são, também, agrupados de acordo com as similaridades encontradas, porém os dados multidimensionais são projetados em dimensões menores, através de combinações lineares das variáveis originais, formando as componentes principais (PC). Para isto, a matriz de dados originais ( $m \times n$ ) é decomposta em três outras matrizes: a matriz de *scores* de  $m$  linhas de  $d$

colunas (correspondente ao número de PC), a matriz de pesos ou *loadings* com  $d$  linhas e  $n$  colunas e a matriz de resíduos, com  $m$  linhas e  $n$  colunas, correspondente à parte não modelada. Como resultado, da análise por PCA obtém-se gráficos bi ou tridimensionais de *scores* e *loadings*.

O *score* corresponde à coordenada de cada amostra nas PCs; amostras que apresentam valores de *scores* semelhantes são consideradas semelhantes entre si, pois apresentam as mesmas coordenadas no espaço. Os valores dos *loadings* indicam a contribuição da variável na PC e, portanto, quanto maior seu peso maior sua importância para explicar a variabilidade das amostras.

O número de PCs a ser utilizado em um modelo é determinado pela variância máxima explicada por um certo número de PC. Cada PC descreve um máximo de variância que não é modelada pelas outras. Assim, os dados podem ser visualizados em gráficos de *scores* ou *loadings* de uma PC em relação à outra PC [65].

O uso dos dois métodos HCA e PCA é recomendado quando não se conhecem bem os dados, uma vez que suas informações são complementares e proporcionam uma visão geral dos dados, tais como: se o conjunto de dados é homogêneo ou não; se uma amostra particular é discrepante (*outlier*) ou se um conjunto de amostras é diferente das demais; quais parâmetros (variáveis) são essenciais para a correta interpretação dos dados [62,64].



## V. MATERIAIS E MÉTODOS

### V.1 – MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram adquiridas no comércio.

Para o estabelecimento dos métodos foram usadas quatro amostras de mel de abelhas diferentes (A, B, C e D), procedentes dos Estados de São Paulo (SP) e Minas Gerais (MG).

Foram analisadas 81 amostras de mel de abelhas, das quais 69 são nacionais e 12 procedentes de diferentes países.

Nos testes feitos utilizando o princípio de fermentação alcoólica, foi usado fermento de pão instantâneo de marca comercial Fleischmann.

Todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza analítica e a água utilizada foi desionizada com condutividade de 18 MΩ cm, produzida por um sistema Milli-Q (Millipore).

Todos os materiais utilizados (plásticos e vidros) foram previamente deixados em banho de HNO<sub>3</sub> a 10 % (v/v) por 24 h, no mínimo, enxaguados com água desionizada e secos.

Para todas as espécies estudadas, com exceção do K que foi diretamente diluído no padrão multielementar, as soluções estoques foram preparadas nas concentrações de 1000 mg L<sup>-1</sup> a 2 % (v/v) de ácido nítrico. As curvas analíticas foram definidas para quatro pontos a partir da diluição de um padrão multielementar com 1000 mg L<sup>-1</sup> de K, 200 mg L<sup>-1</sup> de Ca, Mg e Na, 20 mg L<sup>-1</sup> de Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn, 10 mg L<sup>-1</sup> de Cd em 2 % (v/v) de ácido nítrico.

Os equipamentos utilizados nos procedimentos de pré-tratamento das amostras foram: forno de microondas fechado (Provecto Analítica – DGT 100); banho de ultra-som (Unique – USC 1400); banho-maria (Fanem - 100).

Para a determinação simultânea das espécies metálicas foi empregada a técnica de espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). As especificações do espectrômetro e as condições gerais de operação utilizadas são apresentadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Especificações e condições gerais de operação do ICP OES.

|                                   |                                   |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Espectrômetro                     | Perkin-Elmer                      |
| Software                          | Modelo: Optima 3000 DV            |
| Detetor Multielementar            | PE Winlab                         |
| Nebulizador                       | SCD                               |
| Gerador de radiofrequência        | Fluxo cruzado                     |
|                                   | Frequência: 40 MHz                |
|                                   | Potência de saída: 1,3 kW         |
| Câmara de nebulização             | Scott                             |
| Diâmetro do tubo injetor da tocha | 2,0 mm                            |
| Vazão de argônio                  | Auxiliar: 0,5 L min <sup>-1</sup> |
|                                   | Principal: 15 L min <sup>-1</sup> |
| Vazão de bombeamento              | 1,0 mL min <sup>-1</sup>          |
| Altura da visão radial            | 15 mm                             |
| Correção de fundo                 | 2 pontos                          |
| Tempo de integração e de leitura  | 1-5 s                             |
|                                   | 30 s                              |
| Número de determinações           | 3                                 |

## V.2 – MÉTODOS

### V.2.1 – Pré-tratamento das Amostras

Foram desenvolvidos dois métodos, classificados e apresentados de acordo com o pré-tratamento dado às amostras: mineralização assistida por microondas (MW) e soluções assistidas por ultra-som (US). São apresentados, também, os

procedimentos feitos utilizando o princípio de fermentação alcoólica para decomposição das amostras.

#### **V.2.1.1- Mineralização Assistida por Microondas - (MW)**

Aproximadamente 1,0 g de mel foi tratado com uma mistura de 2,0 mL de  $\text{HNO}_3$  (65 % m/v), 2,0 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 % v/v) e 0,5 mL de ítrio ( $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), usado como padrão interno. A solução foi submetida ao programa de aquecimento em forno de microondas fechado, cujas condições de operação são apresentadas na Tabela 5.2. A solução resultante foi diluída para 25,0 mL e analisada por ICP OES.

Tabela 5.2 – Condições de operação para mineralização em forno de microondas fechado.

| Etapas       | 1   | 2 | 3   | 4   | 5   |
|--------------|-----|---|-----|-----|-----|
| Tempo (min)  | 1   | 2 | 5   | 5   | 5   |
| Potência (W) | 250 | 3 | 250 | 405 | 575 |

A avaliação dos resultados foi feita através de experimentos de adição e recuperação de analitos, em dois níveis de concentração, para quatro amostras (A, B, C e D) de diferentes origens comerciais, com um número de determinações igual a três.

#### **V.2.1.2 – Soluções Assistidas por Ultra-som - (US)**

As soluções para análise foram preparadas pela adição de 0,5 mL de  $\text{HNO}_3$  (65 % m/v), 0,5 mL de ítrio ( $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), usado como padrão interno, e aproximadamente 1,0 g de uma solução aquosa de mel (50 % m/m) que foi previamente filtrada em papel de filtro quantitativo (Whatman 40) e submetida a um

banho de ultra-som por 20 minutos. A posição dos recipientes com as quatro soluções de mel foram colocadas no centro da cuba do banho de ultra-som, o qual foi preenchido com água, no volume especificado pelo fabricante. A solução final foi diluída em água para 25,0 mL.

A determinação das espécies deve ser feita o mais breve possível, em um intervalo de tempo inferior a quatro horas, para evitar a ocorrência de possível floculação como consequência da desnaturação de proteínas e atividades microbiológicas [26].

A avaliação dos resultados foi feita através de experimentos de adição e recuperação de analitos, em dois níveis de concentração, para quatro amostras (A, B, C e D) de diferentes origens comerciais, com um número de determinações igual a três.

Como aplicação, foram analisadas 81 amostras de mel de abelhas, das quais 69 são nacionais e 12 procedentes de diferentes países.

#### **V.2.1.3 – Decomposição por Fermentação Alcoólica**

##### **i) Decomposição utilizando fermento de pão comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) – (DF)**

Os reagentes foram misturados em balão volumétrico de 25,0 mL na seguinte ordem e quantidades: 0,4 g de fermento, 8,5 g de água desionizada, 8,0 g de uma solução de mel (50 % m/m) e 3,0 g de solução tampão (ácido acético/acetato de sódio) com pH igual a 4,6. A mistura foi colocada em um banho-maria a  $37 \pm 0,5$  °C, por 24 h. O volume da mistura foi diluído para 25,0 mL e transferido para um tubo de centrifugação. Em seguida, uma alíquota de 5,0 mL do líquido sobrenadante foi retirada e diluída para 25,0 mL para posterior análise, por ICP OES.

A avaliação dos resultados foi feita por comparação entre os dados obtidos por este teste e os obtidos pelos métodos MW e US, em uma única amostra para as espécies presentes (K, Ca, Mg e Mn).

## **ii) Decomposição utilizando a enzima invertase (DE)**

A invertase, utilizada neste estudo, foi obtida de acordo com o procedimento adaptado, descrito por de Melo e colaboradores [66], para obtenção de uma solução de invertase parcialmente purificada. Foram triturados cerca de 10 g de fermento de pão em um almofariz, transferindo-se a massa para um erlenmeyer de 125 mL com adição de 100 mL de água. A mistura foi submetida a um banho de ultra-som por 15 minutos, para que o material citoplasmático passasse para a solução, seguida por uma filtração. O resíduo foi descartado, sendo adicionado ao filtrado 100 mL de acetona, a aproximadamente -10 °C. A mistura foi deixada em repouso por 5 minutos e filtrada, descartando-se o filtrado. O resíduo da filtração, constituído por invertase, foi diluído para 25,0 mL.

No tratamento da amostra, os reagentes foram adicionados em um balão volumétrico de 25,0 mL, na seguinte ordem e quantidades: 0,5 mL de solução de invertase, 14,5 mL de água desionizada, 3,0 g de uma solução de mel (50 % m/m) e 2,0 mL de solução tampão (ácido acético/acetato de sódio) com pH igual a 4,6. A mistura foi colocada em um banho-maria a 37 °C, por 24 h. O volume da mistura foi diluído para 25,0 mL, do qual uma alíquota de 5,0 mL foi retirada e diluída para 25,0 mL para análise.

A avaliação dos resultados foi feita por experimentos de adição e recuperação de analitos em dois níveis de concentração, para uma única amostra, que foram, também, comparados com os resultados obtidos pelos métodos MW e US.

## **V.2.2 – Otimização instrumental**

A otimização instrumental para os métodos MW e US foi feita utilizando a amostra A, mediante as razões de sinal/ruído (S/R) e sinal/fundo (S/F) para as espécies presentes (K, Ca, Na, Mg, Mn, Fe e Zn) dos seguintes parâmetros analíticos: vazão de nebulização, potência da radiofrequência (RF), configuração da tocha e comprimentos de onda.

A razões S/R e S/F foram obtidas, através das médias de 10 determinações dos sinais analíticos, de acordo com as expressões dadas a seguir [67,68]:

$$S/R = \frac{\overline{I_a}}{\overline{s_{ib}}}; \quad (5.1)$$

$$S/F = \frac{(\overline{I_a} - \overline{I_b})}{\overline{I_b}}; \quad (5.2)$$

em que  $\overline{s_{ib}}$ ,  $\overline{I_a}$  e  $\overline{I_b}$  correspondem aos valores médios da estimativa do desvio padrão da intensidade de emissão do analito no branco, da intensidade de emissão do analito na solução da amostra e na solução do branco, respectivamente.

Inicialmente fez-se a escolha da melhor vazão de nebulização, através da observação dos sinais analíticos (S/R e S/F) nas vazões de 0,4, 0,6 e 0,8 L min<sup>-1</sup> na potência da radiofrequência de 1,3 kW. Com a vazão de nebulização selecionada, foram avaliadas as melhores respostas analíticas para as potências de 1,1, 1,2 e 1,3 kW. Os sinais analíticos foram avaliados em diversos comprimentos de onda e nos modos de configuração de tocha, radial ou axial. Sob as condições otimizadas, foram determinadas as concentrações das demais espécies nas amostras estudadas.

### V.2.3 –Figuras de Mérito e Validação dos Métodos

Os critérios adotados para a avaliação da eficiência instrumental foram:

- Desvio padrão relativo – RSD (para n=3);
- Limite de detecção – LD;
- Limite de quantificação – LQ;
- Concentração equivalente de fundo – BEC

Os LDs, e os BECs, para as espécies estudadas, foram determinados de acordo com as expressões dadas a seguir [67,68]:

$$LD = \frac{\overline{3s_{ib}}}{\alpha} \quad (5.3)$$

$$BEC = \frac{(\overline{I_{bsc}} - \overline{I_{bc}})}{\alpha} \quad (5.4)$$

em que  $\alpha$  corresponde à inclinação da curva analítica e  $\overline{I_{bsc}}$  e  $\overline{I_{bc}}$ , aos valores médios de 10 determinações da intensidade de emissão do branco do método sem a correção de fundo do equipamento e da intensidade de emissão do branco do método com a correção de fundo do equipamento, respectivamente.

Os LQs, isto é, as menores concentrações nas quais medidas quantitativas podem ser realizadas com segurança, foram estabelecidos para cada método considerando os RSDs, os LDs os BECs e as especificações do fabricante. Nos dois métodos, ao LQ foi atribuído o fator de cem vezes o respectivo valor do LD para todas as espécies, com exceção para o K, Ca e Mg, que é de dez vezes o valor do LD.

Na ausência de material de referência certificado (CRM) para metais em mel, a avaliação da exatidão foi feita através de experimentos de adição e recuperação dos analitos para quatro amostras (A, B, C e D), em dois níveis de concentração, em uma tentativa de simular valores de possíveis concentrações naturais [24,27], seguindo o mesmo procedimento dado às amostras, com um número de determinações igual a três.

#### V.2.4 – Comparações entre os Métodos

Com o objetivo de verificar se existem diferenças significativas entre os resultados obtidos com MW e US para as espécies presentes nas quatro amostras de mel comercial estudadas, utilizadas para a avaliação da exatidão, foi feito o teste F para comparar suas precisões e o teste t emparelhado para comparar os valores

médios das concentrações encontradas, conforme descrito por Baccan e colaboradores [69] e Jeffery e colaboradores [70].

### **V.2.5 – Análise Quimiométrica**

Com o objetivo de melhor interpretar os dados analíticos e/ou avaliar a possibilidade de classificação de amostras de mel de abelhas de algumas regiões do Brasil, foi feito um estudo quimiométrico por análise de componentes principais (PCA) e por análise de agrupamentos hierárquicos (HCA), utilizando o programa computacional Einsight 3.0 [71].

O conjunto total analisado foi de 64 amostras de mel de abelhas nacionais, sendo 16 do Nordeste (NE), 16 do Sul (S) e 32 do Sudeste (SE), cujas concentrações das espécies metálicas foram determinadas através do método US. As espécies utilizadas para este estudo foram K, Ca, Mg, Mn, Zn e Fe. Assim, a matriz de dados originais apresenta a dimensão de 64 x 6.

Para algumas espécies foram consideradas concentrações aproximadas (exatidão  $\pm 90\%$ ), isto é, concentrações um pouco abaixo dos valores de LQ estabelecidos pelo método, porém não menores que cinco vezes o LD, conforme recomendado por Boss e Fredeen [31].

O pré-processamento utilizado foi o auto-escalamento em que os dados são centrados na média e divididos pelo desvio-padrão, de modo que todas as variáveis passam a apresentar a mesma importância, isto é, o mesmo peso [10,72].

Nas análises foram também atribuídas classes às amostras, de acordo com a origem ou proximidade geográfica, para melhor visualizar e/ou interpretar as similaridades e/ou diferenças existentes.



### 5.2.6 – Tratamento dos Resíduos Gerados

O procedimento para o tratamento dos resíduos gerados (soluções metálicas aquosas) nos experimentos executados é o adotado pelo Instituto de Química da UNICAMP, o qual é baseado no princípio de separação por precipitação em pH controlado.

Os resíduos gerados das soluções padrões e das amostras enriquecidas foram estocados em galões de polipropileno para que fossem tratados ao término deste trabalho.

O procedimento consistiu em tratar a solução de resíduos tóxicos, contendo Cd, Co, Cu, Ni, Pb e Zn, com NaOH comercial a  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , a fim de estabelecer o seu pH na faixa de 7 a 8. Em seguida, foi adicionado  $\text{FeCl}_3$  comercial a  $1 \text{ mol L}^{-1}$ , para a co-precipitação das espécies com o  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  (s) formado. Os sais precipitados foram separados da fase aquosa por filtração simples, empregando papel de filtro qualitativo [73]. O filtrado foi descartado em água corrente e o resíduo sólido foi mantido no papel de filtro utilizado, acondicionado em saco plástico, rotulado e enviado para o depósito de resíduos sólidos do Instituto de Química da UNICAMP.

## VI. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### VI.1. MINERALIZAÇÃO ASSISTIDA POR MICROONDAS (MW)

Inicialmente, foi considerada a maior quantidade possível de amostra a ser utilizada para a mineralização, uma vez que isto corresponde a uma das limitações do forno de microondas utilizado neste procedimento. Além disso, a posterior diluição da amostra pode reduzir demasiadamente a concentração de algumas espécies metálicas presentes em níveis abaixo dos limites de detecção instrumental. Nestes testes iniciais, observaram-se também as melhores combinações e proporções dos reagentes, bem como o programa para mineralização.

Uma vez determinadas as melhores condições para a mineralização, foi verificada qual a melhor diluição. Foi observado que embora as soluções diluídas para 10 mL apresentassem maiores intensidades de emissão, sofriam maiores flutuações do sinal analítico, principalmente para os micro-elementos, tendo como consequência um aumento dos valores dos RSDs.

Este comportamento ocorre, possivelmente, pela presença de uma maior concentração de ácido nítrico residual, que neste caso foi de aproximadamente 8% (m/V), que afeta o equilíbrio do plasma, promovendo maiores variações do sinal analítico. Este efeito pode ser confirmado através de um ensaio variando a concentração do  $\text{HNO}_3$  para uma mesma massa de amostra. Deste modo, foi estabelecida a diluição para 25,0 mL, cuja concentração de ácido residual, determinada através do método titulométrico, é de aproximadamente 3 % (m/v) e que mantém os valores dos RSDs em um intervalo aceitável, abaixo de 10 %.

Do mesmo modo, verificou-se que a adição de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ítrio como padrão interno, no comprimento de onda 371,030 nm com emissão iônica, concorre para uma melhora significativa dos resultados, diminuindo os efeitos de interferência de matriz e flutuações do sinal analítico.

Uma das vantagens da técnica de ICP OES é a sua capacidade de excitar e ionizar uma grande quantidade de átomos promovendo altas razões de sinal/fundo e sinal/ruído, para muitas linhas espectrais, ao mesmo tempo. Deste modo, o desafio

consiste em vencer ou minimizar possíveis interferências espectrais, alcançando uma melhor eficiência instrumental [31,67]. Os critérios adotados para este fim levam em consideração um conhecimento prévio das espécies presentes nas amostras.

Na etapa de otimização das condições instrumentais, observou-se que as razões sinal/ruído estão com uma ordem de grandeza de  $10^6$  a  $10^8$ , enquanto que as razões sinal/fundo estão entre  $10^0$  a  $10^3$  e que a melhor condição observada para uma determinada espécie não é, necessariamente, a mesma de outra.

De acordo com Montaser e Golightly [67], a otimização da razão sinal/fundo favorece melhores limites de detecção para as espécies em baixas concentrações. Assim, uma vez que os valores obtidos para a razão sinal/fundo foram inferiores, optou-se pela sua otimização, de tal forma que satisfizesse um maior número de constituintes, os quais foram Ca, Mg, Mn, e Fe. Deste modo, espécies em menores concentrações foram contempladas também por esta seleção.

De um modo geral, os sinais analíticos obtidos, para as diferentes potências da RF, sob uma determinada vazão de nebulização, variaram de forma não acentuada, para a maioria das espécies. Entretanto, sob uma mesma potência da RF, em diferentes vazões de nebulização, as variações foram maiores, principalmente para as espécies em concentrações menores. A Figura 6.1 apresenta as razões sinal/fundo obtidas para a potência da RF de 1,3 kW nas vazões de nebulização de 0,4, 0,6 e 0,8 L min<sup>-1</sup> (Figuras: 6.1a, 6.1c e 6.1e) e para a vazão de nebulização de 0,6 L min<sup>-1</sup> nas potências da RF de 1,1, 1,2 e 1,3 kW (Figuras: 6.1b, 6.1d e 6.1f), para as espécies Ca, Mg, Mn e Fe.

Pode-se observar através da Figura 6.1 que as razões sinal/fundo para o Ca não são afetadas pelas variações da vazão de nebulização e/ou potência da RF; isto se deve, possivelmente, aos seus baixos valores do potencial de ionização e de excitação. Entretanto, para o Mg, Mn e Fe, presentes em menores concentrações, as variações são maiores. Deste modo, o ajuste da vazão de nebulização em uma dada potência representa um ganho significativo do sinal analítico, uma vez que se trata do tempo de permanência das espécies no plasma. As condições instrumentais

estabelecidas neste estudo foram: vazão de nebulização de  $0,6 \text{ L min}^{-1}$  e potência de  $1,3 \text{ kW}$ .

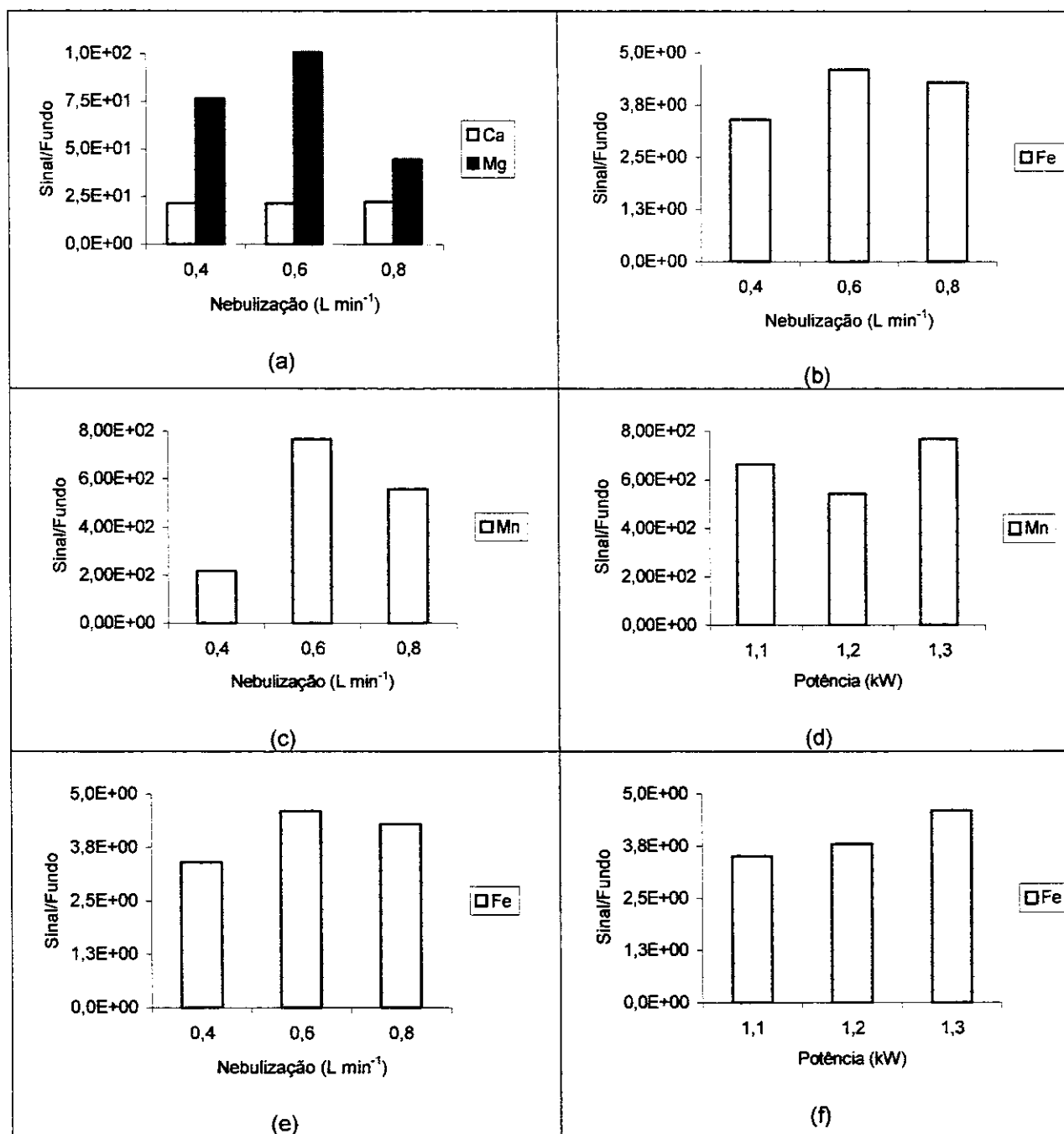


Fig. 6.1 – Razões sinal/fundo obtidas na otimização instrumental para as espécies Ca (317,933 nm, configuração axial), Mg (279,079 nm, configuração radial), Mn (257,610 nm, configuração axial) e Fe (238,204 nm, configuração axial). (a), (c) e (e) vazões de nebulização na potência da RF de  $1,3 \text{ kW}$ ; (b), (d) e (f) potências da RF na vazão de nebulização de  $0,6 \text{ L min}^{-1}$ .

Como a maioria das espécies químicas emite luz, nenhuma linha está completamente livre de outros sinais espectrais, porém algumas são menos afetadas que outras. A seleção do melhor comprimento de onda e do modo de configuração da tocha, axial ou radial, para a determinação de um analito, é essencial para evitar sobreposição de linhas espectrais, principalmente para as espécies presentes em baixas concentrações [31,67].

As concentrações obtidas e as taxas de recuperações encontradas para as espécies estudadas em quatro amostras diferentes de procedência comercial (A, B, C, D), com seus respectivos tipos de linhas de emissão, atômica (I) e iônica (II), comprimentos de onda, configurações de tocha, LQs e BECs, encontram-se resumidos na Tabela 6.1.

O BEC, que é a concentração equivalente de fundo, corresponde à radiação que é produzida quando o analito não está presente e depende da resolução instrumental e das condições de excitação. Na prática, esta radiação é subtraída do total, uma vez que os instrumentos de ICP OES vêm equipados com software que permite fazer correções das radiações de fundo, embora sua eficiência não seja absoluta. Assim, quando o sinal do analito é muito baixo, existe a incerteza do nível do BEC e a concentração do analito não pode ser estabelecida [67,68]. Deste modo, a estimativa do BEC foi mais um parâmetro utilizado na avaliação da eficiência instrumental, principalmente para a determinação das espécies em baixas concentrações.

Foram observadas, também, as recomendações feitas por Boss e Fredeen [31], isto é, para quantificações com aproximadamente 10 % de incerteza, o LQ deve ser de cinco vezes o valor de LD e, para medidas com uma incerteza próxima 2 %, o LQ deve ser de cem vezes o LD. Deste modo, os LQs foram estabelecidos, avaliando-se os RSDs e os BECs obtidos, de forma que não ficassem muito abaixo dos BECs, como foi considerado por Sousa [65].

Tabela 6.1 – Resultados obtidos com o método MW para quatro amostras (A, B, C, D) de méis comerciais, utilizando 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ítrio, como padrão interno\* (n=3).

| Espécies – Conf. da tocha<br>(Linha de emissão) - $\lambda$ (nm)<br>LQ (mg L <sup>-1</sup> )<br>BEC (mg L <sup>-1</sup> ) | Concentração<br>mg kg <sup>-1</sup> (RSD)                        | Recuperação % (RSD)                                                  |                                                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                           |                                                                  | 10,0 mg L <sup>-1</sup>                                              | 40,0 mg L <sup>-1</sup>                                              |
| <b>Nível de concentração adicionada</b>                                                                                   |                                                                  | <b>10,0 mg L<sup>-1</sup></b>                                        | <b>40,0 mg L<sup>-1</sup></b>                                        |
| K - radial<br>(I) - 766,491<br>1,6<br>33,4                                                                                | A: 941,6 (0,5)<br>B: 357,2 (1,7)<br>C: < LQ<br>D: 419,0 (1,0)    | A: 95,2 (2,1)<br>B: 94,2 (3,5)<br>C: 102,3 (2,9)<br>D: 93,4 (1,4)    | A: 100,5 (4,3)<br>B: 95,1 (0,6)<br>C: 96,7 (1,5)<br>D: 95,9 (1,3)    |
| <b>Nível de concentração adicionada</b>                                                                                   |                                                                  | <b>2,0 mg L<sup>-1</sup></b>                                         | <b>8,0 mg L<sup>-1</sup></b>                                         |
| Ca - axial<br>(II) - 317,933<br>0,2<br>0,97                                                                               | A: 82,9 (0,2)<br>B: 41,6 (1,2)<br>C: 40,1 (0,8)<br>D: 26,6 (9,7) | A: 96,1 (5,2)<br>B: 101,9 (2,7)<br>C: 103,3 (7,8)<br>D: 98,0 (2,0)   | A: 98,5 (3,4)<br>B: 98,5 (1,3)<br>C: 98,4 (1,6)<br>D: 99,1 (10,4)    |
| Mg - radial<br>(I) - 279,079<br>1,0<br>6,2                                                                                | A: 60,86 (0,7)<br>B: < LQ<br>C: < LQ<br>D: 44,9 (5,3)            | A: 96,4 (4,5)<br>B: 102,5 (2,0)<br>C: 101,8 (3,7)<br>D: 97,2 (1,0)   | A: 98,3 (4,4)<br>B: 97,5 (0,8)<br>C: 97,2 (1,0)<br>D: 97,8 (1,6)     |
| Na - radial<br>(I) - 589,592<br>2,6<br>8,4                                                                                | A: < LQ<br>B: < LQ<br>C: < LQ<br>D: < LQ                         | A: 99,7 (1,4)<br>B: 103,9 (1,5)<br>C: 108,3 (0,7)<br>D: 105,5 (1,8)  | A: 101,1 (3,0)<br>B: 103,0 (0,1)<br>C: 103,7 (1,7)<br>D: 104,9 (0,6) |
| <b>Nível de concentração adicionada</b>                                                                                   |                                                                  | <b>0,2 mg L<sup>-1</sup></b>                                         | <b>0,8 mg L<sup>-1</sup></b>                                         |
| Mn- axial<br>(I) - 257,610<br>0,009<br>0,02                                                                               | A: 7,8 (0,5)<br>B: 1,9 (1,6)<br>C: < LQ<br>D: 1,3 (5,8)          | A: 100,5 (2,1)<br>B: 106,3 (1,8)<br>C: 110,9 (3,2)<br>D: 108,5 (1,9) | A: 102,9 (3,6)<br>B: 102,5 (0,5)<br>C: 104,9 (0,9)<br>D: 106,1 (1,3) |
| Zn - axial<br>(I) - 213,856<br>0,09<br>0,06                                                                               | A: 3,1 (0,5)<br>B: < LQ<br>C: < LQ<br>D: < LQ                    | A: 99,9 (3,7)<br>B: 96,5 (10,6)<br>C: 107,0 (4,1)<br>D: 95,5 (7,8)   | A: 105,9 (3,2)<br>B: 98,5 (0,5)<br>C: 101,2 (0,5)<br>D: 102,2 (1,8)  |
| Cu - axial<br>(I) - 324,754<br>0,16<br>0,03                                                                               | A: < LQ<br>B: < LQ<br>C: < LQ<br>D: < LQ                         | A: 102,2 (0,7)<br>B: 102,6 (1,8)<br>C: 105,1 (0,1)<br>D: 108,0 (2,1) | A: 106,8 (2,9)<br>B: 104,2 (0,1)<br>C: 104,9 (0,2)<br>D: 107,8 (0,5) |
| Co - axial<br>(II) - 228,616<br>0,13<br>0,13                                                                              | A: < LQ<br>B: < LQ<br>C: < LQ<br>D: < LQ                         | A: 100,2 (4,9)<br>B: 103,8 (1,8)<br>C: 106,8 (0,3)<br>D: 106,3 (1,5) | A: 100,5 (3,5)<br>B: 102,2 (0,5)<br>C: 104,1 (0,2)<br>D: 106,0 (1,1) |
| Ni - axial<br>(I) - 232,003<br>0,59<br>0,73                                                                               | A: < LQ<br>B: < LQ<br>C: < LQ<br>D: < LQ                         | A: 100,7 (0,5)<br>B: 105,7 (1,9)<br>C: 109,7 (3,1)<br>D: 107,1 (5,1) | A: 105,7 (3,1)<br>B: 103,3 (0,2)<br>C: 106,4 (2,4)<br>D: 106,5 (0,1) |
| Pb - axial<br>(II) - 220,353<br>0,97<br>0,97                                                                              | A: < LQ<br>B: < LQ<br>C: < LQ<br>D: < LQ                         | A: 96,2 (1,3)<br>B: 97,2 (3,1)<br>C: 101,5 (4,9)<br>D: 95,7 (1,2)    | A: 98,4 (3,5)<br>B: 97,7 (1,4)<br>C: 99,2 (1,9)<br>D: 99,8 (0,3)     |
| Fe- axial<br>(II) - 238,204<br>0,13<br>0,10                                                                               | A: < LQ<br>B: < LQ<br>C: < LQ<br>D: < LQ                         | A: 95,3 (6,5)<br>B: 99,9 (1,9)<br>C: 100,7 (3,7)<br>D: 102,9 (2,3)   | A: 103,4 (0,1)<br>B: 103,4 (2,3)<br>C: 103,6 (0,9)<br>D: 106,2 (0,4) |
| <b>Nível de concentração adicionada</b>                                                                                   |                                                                  | <b>0,1 mg L<sup>-1</sup></b>                                         | <b>0,4 mg L<sup>-1</sup></b>                                         |
| Cd - axial<br>(II) - 214,438<br>0,07<br>0,04                                                                              | A: < LQ<br>B: < LQ<br>C: < LQ<br>D: < LQ                         | A: 99,0 (1,6)<br>B: 100,7 (1,6)<br>C: 104,3 (4,0)<br>D: 103,3 (1,9)  | A: 100,8 (3,4)<br>B: 99,5 (0,4)<br>C: 101,3 (1,9)<br>D: 101,7 (0,7)  |

\* Y (II), configuração axial, 371,030 nm.

Observa-se que os valores de recuperação para a maioria das espécies estão na faixa de 93 a 107 %. Embora não tenha sido detectada a presença de todas as espécies estudadas nas diversas amostras, em virtude de suas diferentes origens, as taxas de recuperação foram boas para todas as espécies, com RSDs para a maioria das determinações abaixo de 7 %.

Portanto, os dados obtidos mostram que os parâmetros adotados neste estudo resultaram em medidas que contornam satisfatoriamente muitos dos efeitos adversos observados.

## **VI.2 – SOLUÇÕES ASSISTIDAS POR ULTRA-SOM (US)**

A concentração da amostra para este procedimento é limitada pelas condições instrumentais do ICP OES, uma vez que um grande conteúdo de matéria orgânica aumenta demasiadamente a viscosidade da solução, podendo ocasionar obstrução do nebulizador de fluxo cruzado e/ou afetar a sensibilidade instrumental devido à possibilidade de formação de compostos de carbono. Assim, por precaução, utilizou-se uma solução com 2 % m/v de mel de abelhas, preparada a partir de uma solução aquosa de mel mais concentrada (50 % m/m), considerando a natureza heterogênea da amostra e a pequena quantidade de massa utilizada.

A operação de filtração da solução é recomendada, uma vez que se encontram presentes na amostra pequenas partículas ou impurezas, como cera de abelhas, que podem causar, eventualmente, a obstrução do nebulizador. O papel de filtro quantitativo utilizado como meio de filtração pode ser perfeitamente substituído por outro meio que retenha as impurezas maiores sem a ocorrência de eventuais contaminações, como por exemplo, uma tela fina de nylon®.

A passagem da solução pelo banho de ultra-som contribuiu para uma maior homogeneidade da amostra, isto é, observou-se que esta etapa adicional concorre para a obtenção de valores menores de RSDs do que pela diluição direta de 0,5 g da amostra. Apesar da possibilidade de ocorrência de outros fenômenos associados ao uso do banho de ultra-som, nenhuma outra variação foi observada nesta análise.

Do mesmo modo, a adição de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  de ítrio, como padrão interno, concorre para uma melhora significativa dos resultados, diminuindo os efeitos de interferência de matriz e flutuações do sinal analítico.

Na etapa de otimização das condições instrumentais, observou-se que as razões sinal/ruído estão com uma ordem de grandeza na faixa de  $10^0$  a  $10^3$ , enquanto que as razões sinal/fundo estão na faixa de  $10^0$  a  $10^2$ . Do mesmo modo feito para o método MW, optou-se pela melhor condição da razão sinal/fundo que satisfizesse um maior número de constituintes. Neste caso, as espécies mais favorecidas foram Ca, Mg, Mn, e Zn.

O comportamento observado para as espécies metálicas na otimização instrumental utilizando o método US foi, de certo modo, semelhante ao observado no método MW, isto é, as razões sinal/fundo obtidas sob vazões de nebulizações diferentes em uma mesma potência de RF, apresentaram maiores variações que sob uma mesma vazão de nebulização para potências da RF diferentes. As condições instrumentais estabelecidas neste estudo foram: vazão de nebulização de  $0,4 \text{ L min}^{-1}$  e potência de  $1,3 \text{ kW}$ .

A Figura 6.2 apresenta os gráficos das razões sinal/fundo na potência da RF de  $1,3 \text{ kW}$  com as vazões de nebulização de  $0,4$ ,  $0,6$  e  $0,8 \text{ L min}^{-1}$  (Figuras: 6.2a, 6.2c e 6.2e) e da vazão de nebulização de  $0,6 \text{ L min}^{-1}$  nas potências da RF de  $1,1$ ,  $1,2$  e  $1,3 \text{ kW}$  (Figuras: 6.2b, 6.2d e 6.2f) para as espécies Ca, Mg, Mn e Zn.

Observa-se que as razões sinal/fundo para o Ca são mais afetadas pelas variações da vazão de nebulização e potência da RF do que no método MW. Além disso, para as espécies consideradas (Ca, Mg, Mn e Zn), ocorre um aumento apreciável das razões sinal/fundo com a diminuição da vazão de nebulização e na potência da RF de  $1,3 \text{ kW}$ , sugerindo diferenças na composição final das amostras tratadas por ultra-som, comparadas com aquelas em que se utiliza o pré-tratamento por microondas.

A Tabela 6.2 apresenta os resultados obtidos para as espécies estudadas em quatro amostras de diferentes procedências (A, B, C, D), com seus respectivos tipos de linhas de emissão, comprimentos de onda, configurações da tocha, LDs e BECs. Nota-se que, para a maioria das espécies, os valores dos RSDs são inferiores a 10%



e suas recuperações estão na faixa de 92 a 110 %, com exceção do Na (amostras B e C) e Zn (amostra A).

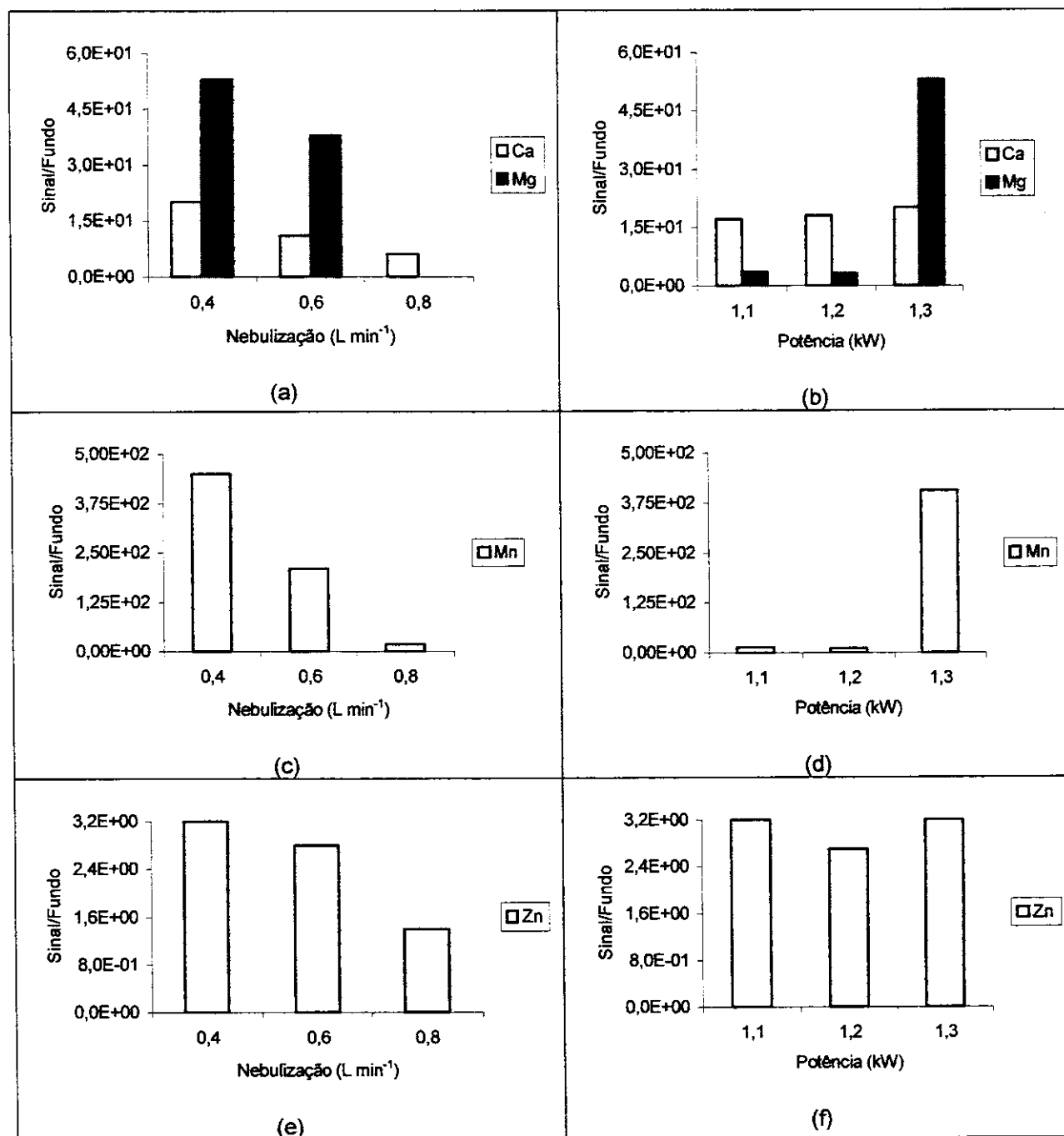


Fig. 6.2 – Razões sinal/fundo obtidas na otimização instrumental para as espécies Ca (317,933 nm, configuração axial), Mg (279,079 nm, configuração radial), Mn (257,610 nm, configuração axial) e Zn (213,856 nm, configuração axial). (a), (c) e (e) vazões de nebulização na potência da RF de 1,3 kW; (b), (d) e (f) potências da RF na vazão de nebulização de 0,4 L min<sup>-1</sup>.

Tabela 6.2 – Resultados obtidos com do método US para quatro amostras (A, B, C, D) de méis comerciais utilizando 2,0 mg L<sup>-1</sup> de ítrio, como padrão interno\* (n=3).

| Espécies-Conf. da tocha<br>(Linha de emissão) -λ(nm)<br>LQ (mg L <sup>-1</sup> )<br>BEC (mg L <sup>-1</sup> ) | Concentração<br>mg kg <sup>-1</sup> (RSD)                        | Recuperação % (RSD)                                                   |                                                                       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| <b>Nível de concentração adicionada</b>                                                                       |                                                                  | <b>10,0 mg L<sup>-1</sup></b>                                         | <b>40,0 mg L<sup>-1</sup></b>                                         |
| K - radial<br>(I) - 766,491<br>2,1<br>45,7                                                                    | A: 1042,3 (1,2)<br>B: 440,4 (6,0)<br>C: <LQ<br>D: 459,3 (3,2)    | A: 98,7 (0,9)<br>B: 92,3 (2,0)<br>C: 101,9 (4,6)<br>D: 92,3 (2,0)     | A: 95,6 (2,6)<br>B: 93,3 (2,9)<br>C: 98,6 (5,8)<br>D: 103,0 (5,5)     |
| <b>Nível de concentração adicionada</b>                                                                       |                                                                  | <b>2,0 mg L<sup>-1</sup></b>                                          | <b>8,0 mg L<sup>-1</sup></b>                                          |
| Ca - axial<br>(II) - 317,933<br>0,04<br>0,031                                                                 | A: 84,8 (0,7)<br>B: 47,5 (3,1)<br>C: 41,7 (3,2)<br>D: 23,6 (3,4) | A: 106,7 (2,7)<br>B: 101,0 (2,0)<br>C: 105,7 (2,7)<br>D: 107,3 (1,5)  | A: 101,2 (3,8)<br>B: 99,7 (2,6)<br>C: 105,7 (6,7)<br>D: 107,9 (6,7)   |
| Mg - radial<br>(I) - 279,079<br>0,95<br>0,081                                                                 | A: 57,7 (2,9)<br>B: <LQ<br>C: <LQ<br>D: 43,3 (10,5)              | A: 106,6 (9,1)<br>B: 99,6 (4,6)<br>C: 99,5 (2,6)<br>D: 98,4 (4,4)     | A: 100,1 (1,5)<br>B: 98,3 (2,2)<br>C: 93,2 (0,9)<br>D: 100,6 (7,0)    |
| Na - radial<br>(I) - 589,592<br>3,95<br>0,049                                                                 | A: <LQ<br>B: <LQ<br>C: <LQ<br>D: <LQ                             | A: 94,0(5,6)<br>B: 82,2 (3,9)<br>C: 81,7 (0,3)<br>D: 88,6 (1,5)       | A: 92,2 (6,8)<br>B: 98,4 (15,7)<br>C: 88,4 (6,7)<br>D: 93,6 (4,7)     |
| <b>Nível de concentração adicionada</b>                                                                       |                                                                  | <b>0,2 mg L<sup>-1</sup></b>                                          | <b>0,8 mg L<sup>-1</sup></b>                                          |
| Mn - axial<br>(II) - 257,610<br>0,009<br>0,68                                                                 | A: 7,8 (2,1)<br>B: 2,0 (6,5)<br>C: <LQ<br>D: 1,1 (3,1)           | A: 109,5 (1,7)<br>B: 101,7 (2,8)<br>C: 107,6 (4,2)<br>D: 106,9 (3,9)  | A: 106,2 (0,7)<br>B: 101,4 (2,3)<br>C: 106,1 (1,8)<br>D: 108,9 (5,6)  |
| Zn - axial<br>(I) - 213,856<br>0,11<br>0,015                                                                  | A: 2,9(7,7)<br>B: <LQ<br>C: <LQ<br>D: <LQ                        | A: 117,7 (3,3)<br>B: 100,4 (2,9)<br>C: 103,6 (6,9)<br>D: 109,9 (10,5) | A: 111,5 (1,2)<br>B: 105,4 (1,8)<br>C: 112,9 (1,7)<br>D: 109,6 (7,2)  |
| Cu - axial<br>(I) - 324,754<br>0,13<br>0,28                                                                   | A: <LQ<br>B: <LQ<br>C: <LQ<br>D: <LQ                             | A: 104,5 (0,1)<br>B: 103,4 (1,0)<br>C: 109,8 (3,9)<br>D: 110,1 (0,9)  | A: 104,3 (0,9)<br>B: 106,9 (3,6)<br>C: 109,9 (2,2)<br>D: 109,1 (6,8)  |
| Co - axial<br>(II) - 228,616<br>0,08<br>0,28                                                                  | A: <LQ<br>B: <LQ<br>C: <LQ<br>D: <LQ                             | A: 106,0 (0,1)<br>B: 103,1 (1,8)<br>C: 106,6 (6,2)<br>D: 105,0 (0,9)  | A: 102,6 (1,8)<br>B: 104,5 (2,0)<br>C: 108,8 (0,8)<br>D: 110,1 (7,2)  |
| Ni - axial<br>(I) - 232,003<br>0,624<br>0,28                                                                  | A: <LQ<br>B: <LQ<br>C: <LQ<br>D: <LQ                             | A: 100,3 (5,2)<br>B: 99,7 (1,2)<br>C: 110,4 (2,4)<br>D: 102,8 (6,1)   | A: 100,8 (0,3)<br>B: 104,9 (1,2)<br>C: 108,4 (1,5)<br>D: 109,7 (4,4)  |
| Pb - axial<br>(II) - 220,353<br>1,1<br>0,54                                                                   | A: <LQ<br>B: <LQ<br>C: <LQ<br>D: <LQ                             | A: 95,4 (3,1)<br>B: 99,5 (4,3)<br>C: 109,1 (1,9)<br>D: 98,6 (2,6)     | A: 100,0 (2,1)<br>B: 103,3 (2,5)<br>C: 105,1 (1,4)<br>D: 109,1 (5,4)  |
| Fe - axial<br>(II) - 238,204<br>0,08<br>0,08                                                                  | A: <LQ<br>B: <LQ<br>C: <LQ<br>D: <LQ                             | A: 102,4 (0,9)<br>B: 107,3 (1,8)<br>C: 110,1 (5,2)<br>D: 110,9 (0,5)  | A: 107,3 (1,7)<br>B: 105,4 (2,0)<br>C: 108,1 (0,9)<br>D: 110,0 (6,8)  |
| <b>Nível de concentração adicionada</b>                                                                       |                                                                  | <b>0,1 mg L<sup>-1</sup></b>                                          | <b>0,4 mg L<sup>-1</sup></b>                                          |
| Cd - axial<br>(II) - 214,438<br>0,04<br>0,24                                                                  | A: <LQ<br>B: <LQ<br>C: <LQ<br>D: <LQ                             | A: 99,9 (0,8)<br>B: 101,7 (2,3)<br>C: 110,1 (4,6)<br>D: 106,6 (1,1)   | A: 100,9 (3,47)<br>B: 105,4 (2,0)<br>C: 110,1 (1,0)<br>D: 103,5 (3,2) |

\* Y (II), configuração axial, 371,030 nm.

Para as amostras B e C, as recuperações do Na no nível de recuperação de  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ , foram inferiores a 90 %. Para esta mesma espécie na amostra B, o valor obtido do RSD, no nível de recuperação de  $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ , foi acima de 10 %. Para o Zn, no nível de concentração  $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ , apenas a amostra A apresentou uma recuperação acima de 110 %.

De um modo geral, os dados obtidos mostram que os parâmetros adotados neste estudo resultaram em medidas que contornam satisfatoriamente os efeitos negativos observados para a maioria das espécies estudadas.

## **VI.3 – DECOMPOSIÇÃO POR FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA**

### **VI.3.1 - Decomposição Utilizando Fermento de Pão Comercial (*Saccharomyces cerevisae*) – (DF)**

Fermento de pão foi usado para decomposição do mel e os resultados obtidos no teste feito para as espécies K, Ca, Mg e Mn, mostraram ser seletivos, isto é, houve o consumo total do K e do Mg e um consumo parcial do Ca e Mn, presentes no branco do método e na amostra. Porém, as concentrações obtidas para o Ca e Mn, quando comparadas com as obtidas pelo método US, estão muito abaixo do esperado, correspondendo a aproximadamente 50 % e 25 %, respectivamente.

Lima e colaboradores [56] apresentaram a composição mineral adequada do mosto, utilizando a *Saccharomyces cerevisae*, para fermentação alcoólica, na qual estão presentes as espécies em questão. Os autores constataram que durante a fermentação ocorre o consumo das espécies estudadas pelas leveduras em crescimento, o que pode explicar os resultados obtidos.

### VI.3.2 - Decomposição Utilizando a Enzima Invertase - (DE)

As condições instrumentais para a determinação das espécies metálicas, nos testes utilizando a invertase parcialmente purificada, para decomposição da amostra, foram as mesmas utilizadas pelo método US. Com exceção do Na, por estar em alta concentração na solução da amostra analisada, todas as espécies foram quantificadas. A Tabela 6.3 apresenta os resultados médios obtidos para uma única amostra (B), com um número de determinações igual a três.

Tabela 6.3 – Resultados obtidos pelo teste DE em um mel de abelhas (amostra B) de procedência comercial (n=3).

| Espécies – Conf. da tocha<br>(Linha de emissão) - $\lambda$ (nm) | Concentração<br>$\text{mg kg}^{-1}$ (RSD) | Recuperação % (RSD)                       |                                           |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| <b>Nível de concentração adicionada</b>                          |                                           | <b>10,0 <math>\text{mg L}^{-1}</math></b> | <b>40,0 <math>\text{mg L}^{-1}</math></b> |
| K - radial<br>(I) - 766,491                                      | 377,7 (0,6)                               | 92,2 (18,2)                               | 108,2 (0,6)                               |
| <b>Nível de concentração adicionada</b>                          |                                           | <b>2,0 <math>\text{mg L}^{-1}</math></b>  | <b>4,0 <math>\text{mg L}^{-1}</math></b>  |
| Ca - axial<br>(II) - 317,933                                     | 10,7 (5,8)                                | 101,2 (21,6)                              | 94,2 (3,4)                                |
| Mg - radial<br>(I) - 279,079                                     | 21,7 (5,5)                                | 105,7 (22,11)                             | 101,2 (3,6)                               |
| <b>Nível de concentração adicionada</b>                          |                                           | <b>0,2 <math>\text{mg L}^{-1}</math></b>  | <b>0,8 <math>\text{mg L}^{-1}</math></b>  |
| Mn- axial<br>(I) - 257,610                                       | 1,7 (4,7)                                 | 101,5 (18,6)                              | 94,7 (2,0)                                |
| Zn - axial<br>(I) - 213,856                                      | < LQ                                      | 103,9 (27,7)                              | 96,7 (2,9)                                |
| Cu - axial<br>(I) - 324,754                                      | < LQ                                      | 90,9 (7,9)                                | 85,2 (3,7)                                |
| Co - axial<br>(II) - 228,616                                     | < LQ                                      | 93,7 (13,4)                               | 89,6 (2,9)                                |
| Ni - axial<br>(I) - 232,003                                      | < LQ                                      | 86,9 (10,2)                               | 88,7 (5,6)                                |
| Pb - axial<br>(II) - 220,353                                     | < LQ                                      | 42,2 (23,7)                               | 68,7 (1,1)                                |
| Fe- axial<br>(II) - 238,204                                      | < LQ                                      | 74,2 (19,2)                               | 76,7 (3,7)                                |
| <b>Nível de concentração adicionada</b>                          |                                           | <b>0,1 <math>\text{mg L}^{-1}</math></b>  | <b>0,4 <math>\text{mg L}^{-1}</math></b>  |
| Cd - axial<br>(II) - 214,438                                     | < LQ                                      | 94,9 (25,9)                               | 87,4 (3,6)                                |

Os resultados apresentados mostram apenas as tendências do procedimento. De um modo geral, as recuperações estão em um nível razoável, apesar dos RSDs obtidos no nível de concentração mais baixa, estarem acima de 10%. Isto demonstra a necessidade de um ajuste nos parâmetros instrumentais.

Os resultados mais críticos foram obtidos para as espécies Ca, Fe e Pb. Para o Fe e o Pb as taxas de recuperações, nos dois níveis de concentração, estão muito baixas, enquanto que para o Ca, o valor da concentração obtida para a amostra foi 77 % menor que a obtida pelo método US, apesar de suas recuperações alcançadas, nos dois níveis de concentração adicionada, estarem em um nível aceitável de 101,2 % e 94,2 %, respectivamente. Isto demonstra que há parâmetros a serem ajustados.

Estes resultados podem estar relacionados à especificidade da invertase nas condições estudadas. Assim, apesar dos resultados não serem conclusivos, os testes apontam possibilidades de um tratamento para amostras ricas em açúcares, com baixo consumo de reagentes e com um baixo grau de toxidez.

#### VI.4 - COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS: MINERALIZAÇÃO ASSISTIDA POR MICROONDAS (MW) E SOLUÇÕES ASSISTIDAS POR ULTRA-SOM (US)

A avaliação da exatidão, dos métodos **MW** e **US**, foi feita através de experimentos de adição e recuperação de analitos em dois níveis de concentração. Ainda assim, não existiu uma concordância plena entre os resultados encontrados.

Deste modo, foram empregados os testes estatísticos **F** e **t** com o objetivo de verificar se existiam diferenças significativas entre os dois conjuntos de resultados, para as espécies determinadas, nas quatro amostras de mel.

As espécies determinadas através dos métodos **MW** e **US** foram K, Ca, Mg, Mn e Zn. Uma vez que o número de determinações foi sempre igual a três, para ambos os métodos, os valores de **F** calculados foram para dois graus de liberdade. Nestas condições, para um nível de confiança de 95 %, o valor de **F** tabelado é de 19,00 [69,70].

Para as espécies K, Ca, Mg e Mn, os valores de **F** calculados encontram-se abaixo do valor crítico de **F** tabelado. Entretanto, para o Zn, presente apenas na amostra A, existe uma diferença expressiva entre estes valores, mostrando que, para esta espécie, as precisões dos dois métodos diferem significativamente. A Tabela 6.4 apresenta os valores de **F** calculados para as espécies determinadas nas amostras estudadas (A, B, C, D).

Tabela 6.4 – Valores de **F** calculados para as espécies determinadas nas amostras A, B, C e D, através dos métodos **MW** e **US** (graus de liberdade igual a 2; **F** crítico igual a 19,00).

| Amostras<br>Espécies | A      | B     | C     | D     |
|----------------------|--------|-------|-------|-------|
| K                    | 7,06   | 17,46 | < LQ  | 12,30 |
| Ca                   | 12,80  | 8,71  | 17,27 | 10,34 |
| Mg                   | 15,42  | < LQ  | < LQ  | 3,65  |
| Mn                   | 17,68  | 18,78 | < LQ  | 4,78  |
| Zn                   | 194,25 | < LQ  | < LQ  | < LQ  |

É interessante observar, também, que para a maioria das determinações o método **MW** apresenta valores das estimativas de desvios-padrão menores, embora os valores dos BECs para a maioria das espécies, com exceção para o K, Mn, Cd, Co e Cu, sejam maiores do que para o método **US**. Ou seja, o método **MW** apresenta concentrações de brancos superiores, com menores flutuações do sinal analítico. Este comportamento deve-se, possivelmente, ao tratamento de mineralização dado às amostras que promove a liberação das espécies metálicas para a solução, diminuindo as interferências. A Tabela 6.5 apresenta, de modo comparativo, os valores obtidos para os LDs, LQs e BECs com os métodos **MW** e **US**.

Tabela 6.5 - LDs, LQs e BECs obtidos para os métodos **MW** e **US**.

| <b>Espécies</b> | <b>LD (mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>LQ(mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>BEC (mg L<sup>-1</sup>)</b> |
|-----------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| K               | MW: 0,16<br>US: 0,21          | MW: 1,6<br>US: 2,1           | MW: 33,4<br>US: 45,7           |
| Ca              | MW: 0,02<br>US: 0,0046        | MW: 0,2<br>US: 0,04          | MW: 0,97<br>US: 0,031          |
| Mg              | MW: 0,1<br>US: 0,095          | MW: 1,0<br>US: 0,95          | MW: 6,2<br>US: 0,081           |
| Na              | MW: 0,026<br>US: 0,0395       | MW: 2,6<br>US: 3,95          | MW: 8,4<br>US: 0,049           |
| Mn              | MW: 0,00009<br>US: 0,00009    | MW: 0,009<br>US: 0,009       | MW: 0,02<br>US: 0,68           |
| Zn              | MW: 0,0009<br>US: 0,0011      | MW: 0,09<br>US: 0,11         | MW: 0,06<br>US: 0,015          |
| Cu              | MW: 0,0016<br>US: 0,0013      | MW: 0,16<br>US: 0,13         | MW: 0,03<br>US: 0,28           |
| Co              | MW: 0,0013<br>US: 0,0008      | MW: 0,13<br>US: 0,08         | MW: 0,13<br>US: 0,28           |
| Ni              | MW: 0,0059<br>US: 0,00624     | MW: 0,59<br>US: 0,62         | MW: 0,73<br>US: 0,28           |
| Pb              | MW: 0,0097<br>US: 0,011       | MW: 0,97<br>US: 1,1          | MW: 0,97<br>US: 0,54           |
| Fe              | MW: 0,013<br>US: 0,0008       | MW: 1,3<br>US: 0,08          | MW: 0,10<br>US: 0,08           |
| Cd              | MW: 0,0007<br>US: 0,0004      | MW: 0,07<br>US: 0,04         | MW: 0,04<br>US: 0,24           |

Os resultados obtidos através do teste  $t$  emparelhado, para os valores das espécies presentes nas amostras estudadas (A, B, C, D), estão abaixo dos respectivos valores de  $t$  tabelados para o nível de confiança de 95 %, mostrando que os valores médios entre as concentrações obtidas não diferem significativamente. A Tabela 6.6 apresenta os valores obtidos no teste  $t$  emparelhado para as espécies determinadas nas amostras estudadas com os métodos **MW** e **US**.

Tabela 6.6 – Resultados obtidos pelo teste  $t$  emparelhado para as espécies determinadas nas amostras A, B, C e D, através dos métodos de **MW** e de **US**.

| <b>Espécies</b> | <b>Graus de Liberdade</b> | <b>t (calculado)</b> | <b>t (tabelado com 95 % de confiança) [70]</b> |
|-----------------|---------------------------|----------------------|------------------------------------------------|
| K               | 2                         | 4,16                 | 4,30                                           |
| Ca              | 3                         | 0,88                 | 3,18                                           |
| Mg              | 1                         | 1,85                 | 12,71                                          |
| Mn              | 2                         | 0,17                 | 4,30                                           |

Assim, pode-se concluir que os métodos não apresentam diferenças expressivas para a maioria dos resultados obtidos, porém, para a determinação de Zn o método **MW** é mais preciso que o método **US**.



## **VI.5 – AVALIAÇÃO DOS CONSTITUINTES METÁLICOS EM AMOSTRAS DE MEL DE ABELHAS BRASILEIRAS**

Atualmente tem sido bastante discutido que uma alimentação com um bom valor nutritivo assegura e/ou promove o restabelecimento da saúde. Do conjunto de nutrientes (orgânicos e inorgânicos) que o organismo necessita, alguns devem ser adicionados à dieta, uma vez que não podem formar-se no organismo, sendo denominados essenciais. Os nutrientes (orgânicos) que podem ser formados no organismo são chamados de não essenciais.

A princípio, todos os minerais são essenciais. Os macro-elementos Ca, P, S, K, Na, Cl e Mg devem estar presentes em maiores quantidades na dieta para cobrir as necessidades corporais, embora muitos outros elementos sejam essenciais, em determinadas concentrações, sendo também responsáveis pela vida, conservação da saúde e reprodução.

Dada a grande variedade e diversidade de um determinado tipo de alimento, é desejável o conhecimento da composição média dos elementos essenciais. Este tipo de informação é útil não somente aos profissionais da saúde, como também aos consumidores em geral, que poderão optar por um certo alimento considerado como uma boa fonte nutritiva de elementos [9,74].

Diante das poucas informações da composição mineral de mel de abelhas, foi feita a análise, através do método US, de 69 amostras comerciais procedentes das várias regiões do Brasil.

A Tabela 6.7 apresenta os resultados das concentrações das espécies determinadas e o seu somatório, em  $\text{mg kg}^{-1}$ . As amostras são denominadas com um prefixo de acordo com a região (Centro-Oeste – co; Norte – n; Nordeste – ne; Sudeste - se e Sul - s), o Estado (Mato Grosso – MT; Amazonas – AM; Alagoas – AL; Bahia – BA; Ceará – CE; Pernambuco – PE; Rio Grande do Norte – RN; Sergipe – SE; Minas Gerais – MG; São Paulo – SP; Paraná – PR; Rio Grande do Sul – RS e Santa Catarina – SC) e Território (Fernando de Noronha – FN) de origem.

Tabela 6.7 – Concentrações e somatório médio, em mg kg<sup>-1</sup>, das espécies metálicas determinadas nas amostras de mel brasileiras (n=3).

| Amostras            | K      | Ca    | Mg    | Mn   | Zn   | Fe   | Σconcentr. |
|---------------------|--------|-------|-------|------|------|------|------------|
| <b>Centro-Oeste</b> |        |       |       |      |      |      |            |
| coMT1               | 3352,9 | 18,8  | 57,2  | 2,2  | <LQ  | 0,7  | 3431,8     |
| coMT2               | 1255,7 | 17,8  | 48,2  | 0,9  | <LQ  | 4,4  | 1327,0     |
| coMT3               | 672,2  | 37,9  | 50,1  | 1,9  | <LQ  | 3,3  | 765,4      |
| <b>Norte</b>        |        |       |       |      |      |      |            |
| nAM1                | 899,7  | 14,6  | 37,8  | 16,9 | <LQ  | <LQ  | 969,0      |
| nAM2                | 1510,1 | 29,8  | 52,9  | 1,1  | 13,6 | 1,9  | 1609,4     |
| <b>Nordeste</b>     |        |       |       |      |      |      |            |
| neAL1               | 372,6  | 7,6   | 23,9  | 0,9  | 9,5  | 0,9  | 415,4      |
| neAL2               | 357,7  | 6,8   | 22,2  | 0,9  | 10,4 | 1,0  | 399,0      |
| neBA1               | 1401,9 | 214,3 | 245,5 | 3,1  | <LQ  | 3,4  | 1868,2     |
| neBA2               | 1328,1 | 210,6 | 248,1 | 3,1  | <LQ  | 3,6  | 1793,5     |
| neCE1               | 464,5  | 10,6  | <LQ   | 1,2  | 9,8  | 1,6  | 487,7      |
| neCE2               | 462,9  | 9,9   | <LQ   | 1,2  | 9,6  | 1,6  | 485,2      |
| neFN1               | 721,7  | 107,5 | 36,8  | <LQ  | <LQ  | 0,5  | 866,5      |
| neFN2               | 590,0  | 102,6 | 25,4  | <LQ  | <LQ  | 0,5  | 718,5      |
| nePE1               | 487,9  | 10,2  | <LQ   | 1,5  | 12,5 | 1,2  | 513,3      |
| neSE2               | 441,7  | 10,5  | 24,7  | 0,5  | 7,5  | 0,5  | 485,4      |
| neRN1               | 1061,3 | 48,4  | <LQ   | 5,2  | <LQ  | 3,1  | 1118,0     |
| neRN2               | 963,4  | 36,8  | <LQ   | 4,8  | <LQ  | 3,7  | 1008,7     |
| neRN3               | 421,1  | 33,5  | <LQ   | 1,1  | <LQ  | 0,9  | 456,6      |
| neRN4               | 1052,9 | 33,3  | 25,5  | 4,5  | <LQ  | 2,6  | 1118,8     |
| nePE2               | 495,2  | 9,7   | <LQ   | 1,5  | 9,7  | 0,9  | 517,0      |
| neSE1               | 446,1  | 9,9   | 24,7  | 0,6  | 8,6  | <LQ  | 489,9      |
| <b>Sudeste</b>      |        |       |       |      |      |      |            |
| seMG1               | 419,1  | 30,1  | <LQ   | 1,4  | <LQ  | 1,6  | 452,2      |
| seMG2               | 442,3  | 30,6  | <LQ   | 1,3  | <LQ  | 1,8  | 476,0      |
| seMG3               | 842,3  | 75,1  | 81,9  | 4,7  | <LQ  | 0,3  | 1004,3     |
| seMG4               | 835,5  | 76,0  | 73,7  | 6,7  | <LQ  | <LQ  | 991,9      |
| seMG5               | 603,2  | 84,9  | 60,3  | 3,9  | 6,1  | <LQ  | 758,4      |
| seMG6               | 603,5  | 94,0  | 63,4  | 4,4  | 6,7  | <LQ  | 772,0      |
| seMG7               | 465,1  | 62,4  | <LQ   | 0,6  | 6,3  | <LQ  | 534,4      |
| seMG8               | 937,5  | 31,0  | 144,4 | 5,2  | <LQ  | 9,7  | 1127,8     |
| seMG9               | 885,5  | 33,8  | 110,2 | 6,6  | <LQ  | 0,8  | 1495,2     |
| seMG10              | 774,5  | 23,2  | 43,5  | 2,3  | <LQ  | 1,6  | 845,1      |
| seMG11              | 336,7  | 5,2   | <LQ   | 1,2  | <LQ  | 1,4  | 344,5      |
| seMG12              | 393,2  | 7,6   | 25,0  | 0,8  | <LQ  | 2,5  | 429,1      |
| seMG13              | 451,9  | 15,3  | 25,4  | 1,8  | <LQ  | 0,7  | 495,1      |
| seMG14              | 1381,5 | 47,1  | 143,2 | 10,4 | <LQ  | 0,7  | 1582,9     |
| seMG15              | 461,2  | 63,5  | <LQ   | 0,6  | 6,5  | <LQ  | 531,8      |
| seSP1               | 1824,4 | 233,7 | 207,7 | 11,7 | <LQ  | <LQ  | 2277,5     |
| seSP2               | 1805,3 | 225,7 | 224,2 | 17,2 | <LQ  | <LQ  | 2272,4     |
| seSP3               | 1904,8 | 187,9 | 188,5 | 10,7 | <LQ  | 14,6 | 2306,5     |
| seSP4               | 166,6  | 70,2  | <LQ   | 1,0  | <LQ  | 0,6  | 238,4      |
| seSP5               | <LQ    | 41,7  | <LQ   | <LQ  | <LQ  | <LQ  | 41,7       |
| seSP6               | 553,9  | 141,3 | 87,9  | 2,4  | 0,0  | 5,5  | 791,0      |
| seSP7               | 2098,6 | 148,4 | 174,3 | 11,3 | 5,6  | 2,4  | 2440,6     |
| seSP8               | 1042,3 | 84,8  | 57,7  | 7,8  | 2,9  | <LQ  | 1195,5     |
| seSP9               | 440,4  | 47,5  | 0,0   | 2,0  | <LQ  | <LQ  | 489,9      |
| seSP10              | 467,5  | 59,5  | 0,0   | 1,1  | <LQ  | 1,1  | 529,2      |
| seSP11              | 977,3  | 150,7 | 81,8  | 5,3  | <LQ  | 4,5  | 1219,6     |
| seSP12              | 364,8  | 11,8  | 23,8  | 4,7  | <LQ  | 0,9  | 406,0      |
| seSP13              | 742,7  | 20,2  | 41,1  | 3,6  | <LQ  | 1,9  | 809,5      |

Continuação da Tabela 6.7.

| Amostras       | K      | Ca    | Mg    | Mn   | Zn   | Fe   | Σconcentr. |
|----------------|--------|-------|-------|------|------|------|------------|
| <b>Sudeste</b> |        |       |       |      |      |      |            |
| seSP14         | 694,7  | 15,4  | 90,8  | 3,2  | <LQ  | 2,9  | 807,0      |
| seSP15         | 1575,7 | 59,7  | 189,4 | 11,8 | <LQ  | 3,4  | 1840,0     |
| seSP16         | 2500,5 | 60,4  | 66,7  | 11,6 | <LQ  | 1,7  | 2640,9     |
| seSP17         | 2240,7 | 71,3  | 373,5 | 24,2 | 6,3  | 2,5  | 2718,5     |
| <b>Sul</b>     |        |       |       |      |      |      |            |
| sPR1           | 2420,8 | 20,3  | 58,5  | 2,5  | <LQ  | 3,7  | 2505,8     |
| sPR2           | 1625,0 | 17,4  | 36,6  | 1,6  | <LQ  | 2,4  | 1683,0     |
| sPR3           | 1597,3 | 35,7  | 41,9  | 0,8  | <LQ  | 14,7 | 1690,4     |
| sPR4           | 2099,9 | 20,0  | 43,0  | 3,4  | <LQ  | 3,3  | 2169,6     |
| sPR5           | 2325,5 | 33,7  | 55,5  | 1,8  | <LQ  | 1,6  | 2418,1     |
| sPR6           | 2950,5 | 43,0  | 70,3  | 2,4  | <LQ  | 2,2  | 3068,4     |
| sPR7           | 1980,8 | 21,5  | 34,5  | 1,7  | <LQ  | 2,2  | 2040,7     |
| sRS1           | 1630,9 | 133,2 | 64,0  | 5,5  | <LQ  | 1,9  | 1835,5     |
| sRS2           | 344,2  | 27,2  | <LQ   | 0,9  | <LQ  | 1,2  | 373,5      |
| sRS3           | 1775,6 | 196,6 | 149,8 | 8,7  | <LQ  | 0,6  | 2131,3     |
| sRS4           | 921,1  | 100,3 | 81,0  | 4,1  | <LQ  | 1,8  | 1108,3     |
| sRS5           | 549,7  | 43,8  | 41,4  | 1,9  | <LQ  | 1,7  | 638,5      |
| sRS6           | 1624,4 | 201,2 | 195,3 | 11,1 | <LQ  | 0,7  | 2032,7     |
| sSC1           | 1346,2 | 34,2  | 63,1  | 2,1  | <LQ  | 3,7  | 1449,3     |
| sSC2           | 1012,5 | 20,5  | 44,2  | 3,3  | <LQ  | 2,8  | 1083,3     |
| sSC3           | 2418,2 | 20,8  | 80,5  | 4,3  | 10,8 | 1,9  | 2536,5     |

RSDs menores que 10 %, para a maioria das determinações

Uma vez que os macros elementos foram determinados nas amostras de mel, o seu somatório representa, de modo aproximado, o conteúdo total dos minerais presentes e indica o grau de pureza do mel. O valor máximo admitido para este parâmetro é de 0,2 % m/m [2,20]. Assim, de acordo com os dados da Tabela 6.7, observa-se que aproximadamente 80 % do total das amostras encontram-se dentro deste limite. Além disso, os teores de Pb e Cd, considerados potencialmente tóxicos, estão abaixo dos LQs para estas espécies.

O órgão responsável pela administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration's – FDA) classifica um alimento como uma boa fonte nutritiva quando contém de 10 a 19 % dos valores de referência diários recomendados (VRD), e como uma fonte rica quando contém mais de 20% dos VRD para um determinado nutriente [75]. Deste modo, fazendo uma comparação entre os resultados obtidos com os VRDs de ingestão dos minerais presentes de acordo com a FDA e com os valores recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) [75,76], aproximadamente 80% dos méis analisados podem ser considerados como uma boa ou rica fonte de Mn. Os demais elementos estão abaixo

de 10 % dos VRDs. A Tabela 6.8 apresenta os VRDs para as espécies determinadas e a classificação das amostras analisadas (%) que podem ser consideradas como uma boa ou rica fonte elementar. Os cálculos foram feitos para a ingestão diária de 170 g de mel de abelhas por dia, conforme Miller-Ihli [9].

Tabela 6.8 – Valores de referência diários (VRD) e número de amostras (%) que podem ser classificadas como uma boa ou rica fonte elementar.

| Elementos | VRD<br>(mg dia <sup>-1</sup> ) | Nº de amostras (%)<br>Classificação |
|-----------|--------------------------------|-------------------------------------|
| K         | 3550 <sup>a</sup>              | 13,0 Boa                            |
| Ca        | 40 <sup>b</sup>                | 2,0 Boa                             |
| Mg        | 400 <sup>a</sup>               | 4,0 Boa                             |
| Mn        | 2 <sup>a</sup>                 | 53,6 Rica<br>24,6 Boa               |
| Fe        | 24 <sup>b</sup>                | 1,5 Boa                             |
| Zn        | 15 <sup>a</sup>                | 13,0 Boa                            |

<sup>(a)</sup>[75]

<sup>(b)</sup>[76]

O conteúdo dos constituintes metálicos determinados nas amostras de mel nacionais está em concordância com as faixas de valores encontrados para méis de outras nacionalidades [10,11,18,19], isto é, as espécies em maiores concentrações são o K, Ca e Mg e, em menores concentrações, o Mn, Zn e Fe.

Entretanto, tentar comparar resultados obtidos por diferentes métodos e técnicas para amostras de mel é uma tarefa complexa, uma vez que são bastante distintos, principalmente quando se leva em consideração o modo de preparação da amostra [24]. Por outro lado, é interessante analisar amostras de mel procedentes de outros países e avaliar a composição mineral em relação àquela dos méis nacionais.

Assim, foram analisadas 12 amostras procedentes de diversos países e seus resultados foram comparados com os valores médios das concentrações obtidas, por região, para os méis de abelhas nacionais. A Tabela 6.9 apresenta as faixas de concentrações mínimas e máximas, além das concentrações médias das espécies metálicas determinadas, por região geográfica, para os méis de abelhas nacionais e

a Tabela 6.10, os resultados obtidos para as amostras internacionais, as quais são denominadas com um prefixo de acordo com o país de origem: Argentina – ARG, Alemanha – ALE, Bélgica – BEL, França – FRA, Itália – ITA.

Tabela 6.9 – Faixa (mínima e máxima) e média da concentração e do somatório, em  $\text{mg kg}^{-1}$ , das espécies metálicas determinadas nas amostras brasileiras, por região geográfica (n=3).

| Região       | Nº de amostras | Faixa de concentração ( $\text{mg kg}^{-1}$ )                                                                                                           | Concentração média ( $\text{mg kg}^{-1}$ )                                                          |
|--------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Centro-Oeste | 3              | K: 672,2 a 3352,9<br>Ca: 17,8 a 37,9<br>Mg: 48,2 a 57,2<br>Mn: 0,9 a 2,2<br>Zn: <IQ<br>Fe: 0,7 a 3,3<br>$\Sigma\text{conc.}$ : 765,4 a 3431,8           | K: 1760,3<br>Ca: 24,8<br>Mg: 51,8<br>Mn: 1,7<br>Zn: <LQ<br>Fe: 2,8<br>$\Sigma\text{conc.}$ : 1841,4 |
| Norte        | 2              | K: 899,7 a 1510,1<br>Ca: 14,6 a 29,8<br>Mg: 37,8 a 52,9<br>Mn: 1,1 a 16,9<br>Zn: <IQ a 13,6<br>Fe: <IQ a 1,9<br>$\Sigma\text{conc.}$ : 969,0 a 1609,4   | K: 1760,3<br>Ca: 22,2<br>Mg: 45,3<br>Mn: 9,0<br>Zn: 6,8<br>Fe: 1,0<br>$\Sigma\text{conc.}$ : 1289,2 |
| Nordeste     | 16             | K: 357,7 a 1401,9<br>Ca: 6,8 a 214,3<br>Mg: <IQ a 245,5<br>Mn: <IQ a 5,2<br>Zn: <IQ a 12,5<br>Fe: <IQ a 3,7<br>$\Sigma\text{conc.}$ : 399,0 a 1868,2    | K: 694,8<br>Ca: 53,9<br>Mg: 42,3<br>Mn: 1,9<br>Zn: 4,9<br>Fe: 1,6<br>$\Sigma\text{conc.}$ : 796,4   |
| Sul          | 16             | K: 344,2 a 2950,5<br>Ca: 17,4 a 201,2<br>Mg: <IQ a 195,3<br>Mn: 0,8 a 11,1<br>Zn: <IQ a 10,8<br>Fe: 0,7 a 14,7<br>$\Sigma\text{conc.}$ : 373,5 a 3068,4 | K: 1663,9<br>Ca: 60,6<br>Mg: 66,2<br>Mn: 3,5<br>Zn: 0,7<br>Fe: 2,9<br>$\Sigma\text{conc.}$ : 1797,8 |
| Sudeste      | 32             | K: 166,6 a 2500,5<br>Ca: 5,2 a 225,7<br>Mg: <IQ a 373,5<br>Mn: <IQ a 24,2<br>Zn: <IQ a 6,7<br>Fe: <IQ a 14,6<br>$\Sigma\text{conc.}$ : 41,7 a 2718,5    | K: 888,8<br>Ca: 71,3<br>Mg: 79,6<br>Mn: 7,0<br>Zn: 2,7<br>Fe: 3,4<br>$\Sigma\text{conc.}$ : 1052,6  |

Tabela 6.10 – Concentrações e o somatório médio, em  $\text{mg kg}^{-1}$ , das espécies metálicas determinadas em amostras de mel procedentes de diversos países ( $n=3$ ).

| Amostras | K     | Ca   | Mg   | Mn  | Zn   | Fe  | Pb  | Cu   | $\Sigma$ concentrações |
|----------|-------|------|------|-----|------|-----|-----|------|------------------------|
| ARG1     | 537,5 | 17,9 | 25,7 | 0,7 | <LQ  | 2,3 | <LQ | <LQ  | 584,1                  |
| ARG2     | 536,7 | 17,8 | 24,2 | 0,7 | <LQ  | 2,3 | <LQ | <LQ  | 581,7                  |
| ALE1     | 740,2 | 24,7 | 33,9 | 1,5 | 10,7 | 4,1 | <LQ | <LQ  | 815,1                  |
| ALE2     | 714,4 | 24,3 | 34,7 | 1,5 | 10,6 | 4,2 | <LQ | <LQ  | 789,7                  |
| ALE3     | 581,7 | 19,3 | 21,9 | 0,8 | 53,3 | 3,6 | 4,6 | 10,3 | 680,6                  |
| BEL1     | 963,7 | 23,8 | 30,5 | 1,1 | 9,7  | 3,7 | <LQ | <LQ  | 1032,5                 |
| BEL2     | 958,9 | 22,1 | 27,8 | 1,1 | 9,5  | 3,5 | <LQ | <LQ  | 1022,9                 |
| FRA1     | 328,5 | 5,7  | <LQ  | 0,1 | 7,8  | <LQ | <LQ | <LQ  | 342,1                  |
| FRA2     | 325,0 | 7,5  | <LQ  | 0,1 | 8,5  | <LQ | <LQ | <LQ  | 341,1                  |
| ITA1     | 423,2 | 23,7 | <LQ  | 0,3 | 0,0  | 1,5 | <LQ | <LQ  | 448,7                  |
| ITA2     | 374,6 | 13,3 | <LQ  | 0,4 | 8,3  | <LQ | <LQ | <LQ  | 396,6                  |
| ITA3     | 391,2 | 13,3 | <LQ  | 0,4 | 19,3 | 1,3 | <LQ | <LQ  | 425,5                  |

RSDs menores que 10 %, para a maioria das determinações

Na Tabela 6.8 observa-se que as faixas de concentração dos constituintes presentes nas amostras brasileiras, considerando-se a região geográfica, são amplas e se intercalam. Por outro lado, comparando os resultados das Tabelas 6.9 e 6.10, apesar do reduzido número de amostras internacionais, estas apresentam o teor de Zn mais elevado e o somatório das concentrações metálicas é mais baixo que a média de concentrações obtidas para as amostras brasileiras. Estas diferenças podem estar relacionadas às diferentes origens.

De um modo geral, os resultados obtidos assinalam novas informações sobre os méis nacionais que, eventualmente, poderão ser úteis para a formação de uma base de dados de sua composição mineral.

## VI.6 – ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA

Os métodos quimiométricos vêm sendo muito utilizados na interpretação de dados obtidos por diferentes técnicas analíticas em alimentos, tanto para o controle de qualidade, como também para obter o máximo de informações provenientes de dados analíticos. Deste modo, foram feitas análises utilizando os métodos PCA e HCA para melhor interpretar os dados analíticos obtidos e avaliar similaridades e/ou diferenças entre um conjunto de amostras de méis de abelhas procedentes de diversas regiões do Brasil.

O método PCA proporciona um estudo multivariado dos dados experimentais, facilitando a visualização e a correlação entre amostras e variáveis e o método HCA possibilita verificar as semelhanças entre as amostras, através do cálculo do grau de similaridade [64].

Os dados utilizados para a análise quimiométrica são aqueles apresentados na Tabela 6.7, onde as amostras brasileiras representam os objetos e as concentrações, em  $\text{mg kg}^{-1}$ , as variáveis. Uma vez que o número de amostras procedentes das regiões Norte e Centro-Oeste são pouco representativos, estas amostras foram retiradas do conjunto de dados para a análise. Deste modo, a matriz de dados iniciais apresenta a dimensão de  $64 \times 7$ .

Assim, foi feita uma análise por PCA em que foram atribuídas classes às amostras das regiões Nordeste, Sudeste e Sul. As amostras foram pré-processadas por auto-escalamento, uma vez que as suas concentrações diferem em ordem de grandeza.

Numa primeira análise, em que foram utilizadas todas as variáveis, não houve uma boa separação entre as classes de amostras, sendo observada, apenas, uma tendência à sua formação. Na visualização dos gráficos de *variável versus variável* verificou-se que o Zn, *versus* todas as outras variáveis, é aquela que melhor concorre para esta tendência de separação de classes. A Tabela 6.11 apresenta a contribuição de informações dadas pelas variâncias para cada PC utilizada.

Tabela 6.11 – Variância (%) e variância acumulada (%) para cada PC, obtidos por PCA das amostras procedentes das regiões Nordeste, Sul e Sudeste.

| PC | Variância (%) | Variância Acumulada (%) |
|----|---------------|-------------------------|
| 1  | 51,79         | 51,79                   |
| 2  | 16,24         | 68,04                   |
| 3  | 13,77         | 81,81                   |
| 4  | 10,07         | 91,88                   |
| 5  | 6,08          | 97,96                   |
| 6  | 2,04          | 100,00                  |

A Figura 6.3 apresenta o gráfico dos *scores* (PC3 versus PC2), onde se pode observar a tendência de formação dos três grupos:

- (1) algumas amostras do Nordeste, em vermelho;
- (2) algumas amostras do Sul, em azul;
- (3) amostras do nordeste, do Sul e do Sudeste.

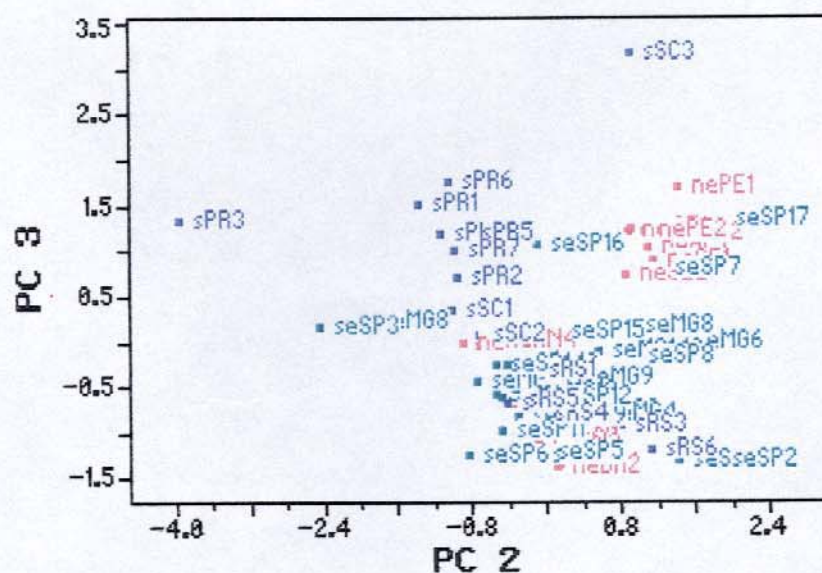


Fig. 6.3 - Gráfico dos *scores*: as amostras em vermelho, verde e azul pertencem às regiões Nordeste, Sudeste e Sul, respectivamente.



O comportamento observado nesta análise deve-se às composições das amostras, sendo explicado através do gráfico dos *loadings*, apresentado na Figura 6.4, onde é possível verificar que a formação dos grupos se relaciona, principalmente, com as variáveis:

- (1) Mg e Mn;
- (2) K e somatório das concentrações, representado por "Soma";
- (3) Mg, Mn e Ca.

O distanciamento das amostras sSC3 e sPR3, deve-se às suas altas concentrações de Zn e Fe, respectivamente.

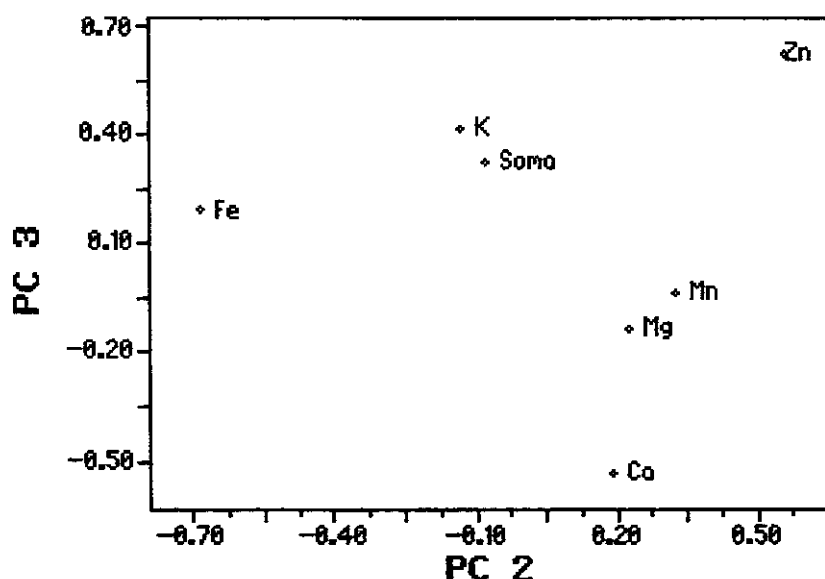


Fig. 6.4 - Gráfico dos *loadings* para o conjunto de amostras do Nordeste, Sul e Sudeste.

A separação das amostras por região não foi nítida devendo-se, provavelmente, à grande extensão do país como um todo. Deste modo, com o objetivo de explorar outras possibilidades de classificação, foram feitas as análises para as amostras por região, separadamente, as quais são apresentadas a seguir.

### VI.6.1 - Região Nordeste

Inicialmente, foi feita uma análise por PCA com o conjunto de resultados obtidos para a região Nordeste utilizando, também, o pré-processamento das amostras por auto-escalamento. Para cada estado e/ou território foram atribuídas classes, correspondendo a um total de 7.

Verificou-se que duas variáveis, concentração de Ca e somatório das concentrações, não contribuem, significativamente, para uma classificação. Portanto, a matriz de dados foi reduzida à dimensão 16 x 5. Nesta análise, a primeira, segunda, terceira e quarta PCs são responsáveis por 69,68 %, 16,98 %, 11,54 % e 1,28 % do total da variância dos dados.

Com as variáveis selecionadas observou-se uma separação de 4 grupos de amostras, apresentados através do gráfico dos *scores* (Figura 6.5, PC3 versus PC1), pertencentes aos seguintes estados e/ou território:

- (1) Alagoas (AL), Ceará (CE), Pernambuco (PE) e Sergipe (SE);
- (2) Fernando de Noronha (FN) e uma amostra do Rio Grande do Norte, neRN3;
- (3) Bahia (BA);
- (4) Rio Grande do Norte (RN).

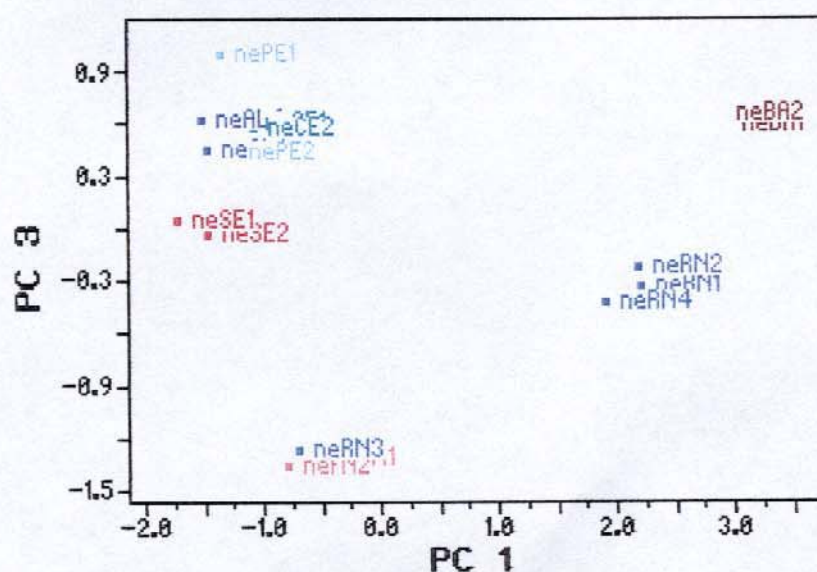


Fig. 6.5 - Gráfico dos *scores* para as amostras procedentes da região Nordeste.

A Figura 6.6 apresenta o gráfico dos *loadings* para esta análise, onde podemos verificar as seguintes relações entre as variáveis e os grupos formados:

- (1) maiores concentrações de Zn e menores concentrações das outras espécies;
- (2) ausência de Zn com menores concentrações de K, Fe e Mn;
- (3) ausência de Zn com maiores concentrações de K e Mg;
- (4) maiores concentrações de Mn, concentrações intermediárias de K, Mg e Fe e ausência de Zn.

A amostra neRN3 apresenta na sua composição teores de Fe, Zn e K semelhantes aos das amostras de Fernando de Noronha, pertencendo ao mesmo grupo.

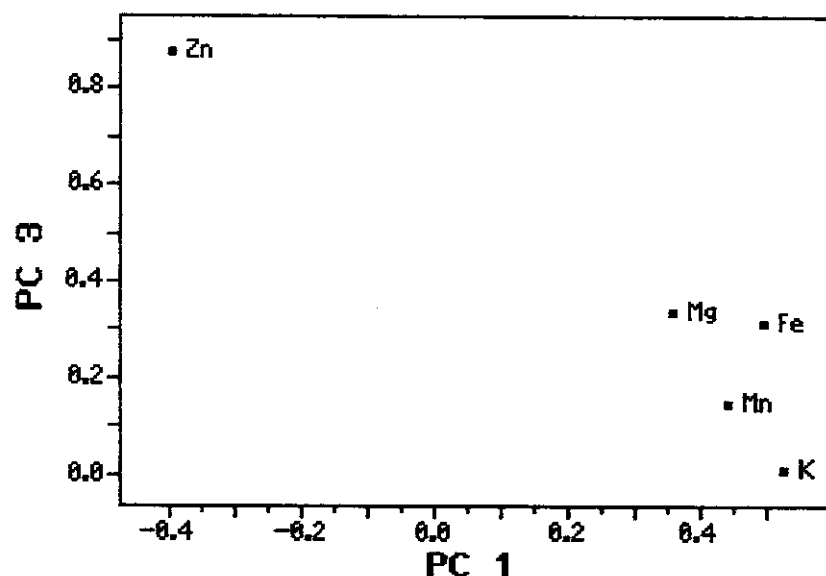


Fig. 6.6 - Gráfico dos *loadings* para as amostras procedentes da região Nordeste.

O método HCA aplicado a estes dados, utilizando a distância Euclidiana para o cálculo de similaridade e o método de agrupamento pelo vizinho mais próximo, *Single Linkage*, confirmou e complementou as informações dadas através do método PCA, apresentando a mesma formação dos grupos. A Figura 6.7 apresenta o dendograma e a Tabela 6.12 apresenta as similaridades obtidas, nesta análise, para amostras pertencentes ao mesmo grupo e entre os grupos distintos.

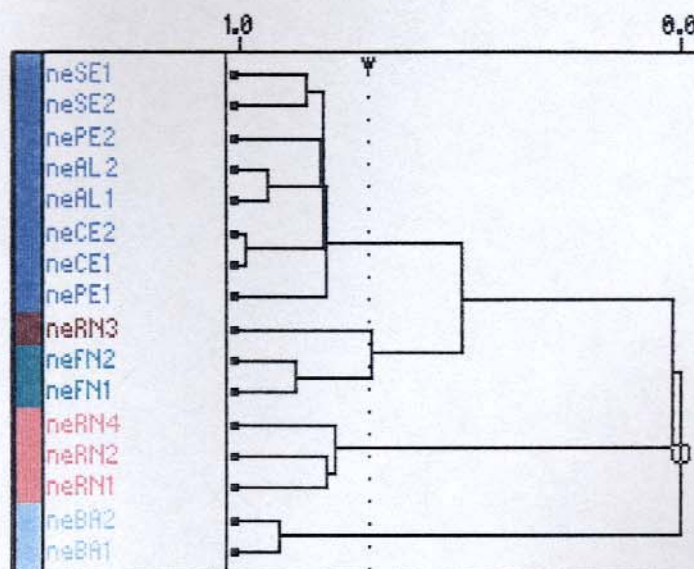


Fig. 6.7 - Dendograma para as amostras da região Nordeste.

Tabela 6.12 – Similaridades (%) obtidas pelo método HCA para as amostras e grupos formados.

| Grupos             | Similaridades (%)       |                     |
|--------------------|-------------------------|---------------------|
|                    | Amostras do mesmo grupo | entre grupos        |
| (1) Al, Ce, Pe, Se | 80                      |                     |
| (2) FN e neRN3     | 70                      | 49 com (1)          |
| (3) RN             | 78                      | 3 com (1), (2)      |
| (4) Ba             | 91                      | 0 com (1), (2), (3) |

Estes resultados devem estar, provavelmente, associados às similaridades características existentes entre os solos, dos quais estas amostras são procedentes [7].



#### IV.6.2 - Região Sul

Neste estudo, foi dado o mesmo tratamento feito para a região Nordeste. Neste caso, verificou-se que o magnésio não contribui significativamente para uma classificação. Deste modo, a matriz de dados ficou reduzida à dimensão 16 x 6. Para cada estado foram atribuídas classes, correspondendo a um total de 3. Nesta análise, foram utilizadas 5 PCs. A Tabela 13 apresenta a contribuição de informações dadas pelas variâncias para cada PC utilizada.

Tabela 6.13 – Variância (%) e variância acumulada (%) para cada PC, obtidos por PCA das amostras procedentes da região Sul.

| PC | Variância (%) | Variância Acumulada (%) |
|----|---------------|-------------------------|
| 1  | 37,40         | 37,40                   |
| 2  | 33,78         | 71,18                   |
| 3  | 16,21         | 87,39                   |
| 4  | 11,66         | 90,05                   |
| 5  | 0,94          | 99,99                   |

Com as variáveis selecionadas, através do gráfico dos *scores* (PC4 versus PC2), apresentado na Figura 6.8, foi possível observar:

- a formação de 2 grupos, nos quais encontram-se reunidas a maiorias das amostras do Paraná e do Rio Grande do Sul, respectivamente;
- duas amostras procedentes de Santa Catarina (sSC1, sSC2), intermediárias entre os dois grupos formados;
- duas amostras procedentes de Santa Catarina e do Paraná (sSC3 e sPR3), afastadas das demais.

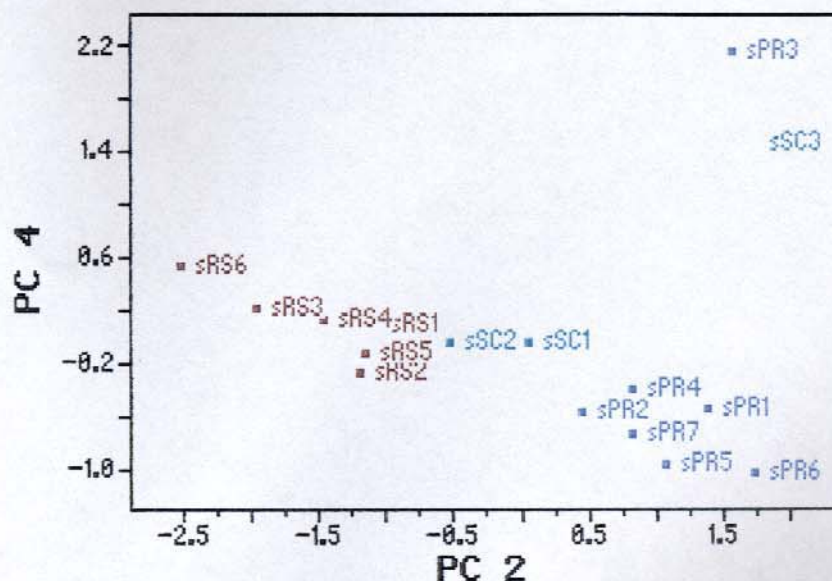


Fig. 6.8 - Gráfico dos *scores* para as amostras procedentes da região Sul.

Através da Figura 6.9, que apresenta o gráfico dos *loadings* para esta análise, podemos verificar:

- (1) o grupo formado por amostras do Paraná apresenta concentrações maiores das variáveis K e somatório das concentrações;
- (2) o grupo formado por amostras do Rio Grande do Sul apresenta maiores concentrações de Ca e Mn;
- (3) as amostras de Santa Catarina, sSC1 e sSC2, apresentam concentrações intermediárias entre os dois grupos formados;
- (4) a amostra do Paraná, sPR3, apresenta concentração de Fe mais elevada que as demais;
- (5) a amostra de Santa Catarina, sSC3, é a única que apresenta Zn.

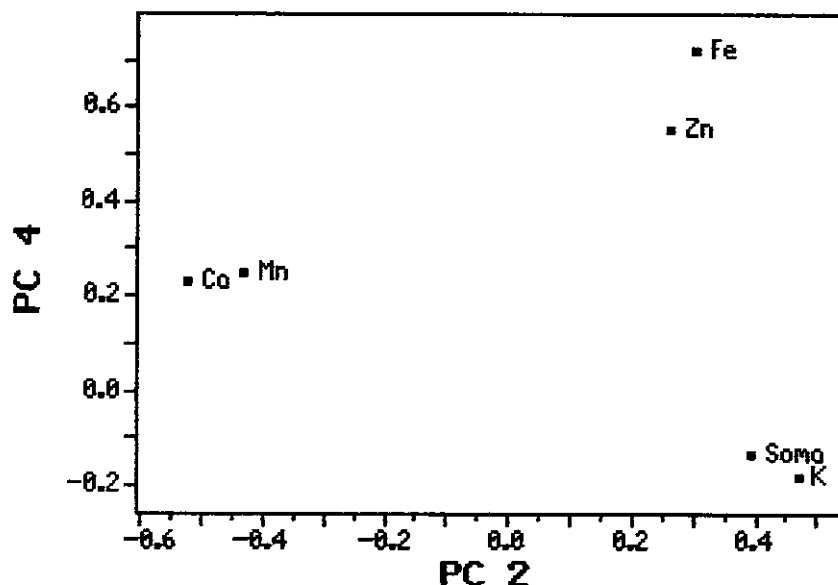


Fig. 6.9 - Gráfico dos *loadings* para as amostras procedentes da região Sul.

O afastamento das duas amostras, sPR3 e sSC3, do restante das amostras do mesmo grupo, pode ter sido ocasionado por contaminações de processamento. De qualquer modo, neste estudo foi possível obter uma separação nítida das amostras procedentes dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul.

A Figura 6.10 apresenta o dendograma obtido através da análise por HCA para as amostras desta região, onde podemos observar que os resultados obtidos por esta análise não confirmaram todas as informações obtidas através da análise por PCA. O grupo formado pelas amostras do Rio Grande do Sul, ficou dividido em dois, com as seguintes amostras: (1) sRS 4, sRS5 e sRS2; (2) sRS1, sRS6, sRS3. Estes subgrupos apresentam uma similaridade de 27 % entre si. A divisão observada entre as amostras do grupo do Rio Grande do Sul deve-se às grandes diferenças de concentrações entre as variáveis do mesmo grupo.

As amostras de Santa Catarina, sSC1 e sSC2, formam um subgrupo que apresenta maior similaridade (65 %) com o subgrupo do Rio Grande do Sul, formado pelas amostras sRS4, sRS5 e sRS2. As amostras sSC3 e sPR3, também se encontram afastadas das demais, apresentando uma similaridade de 9 % entre si.

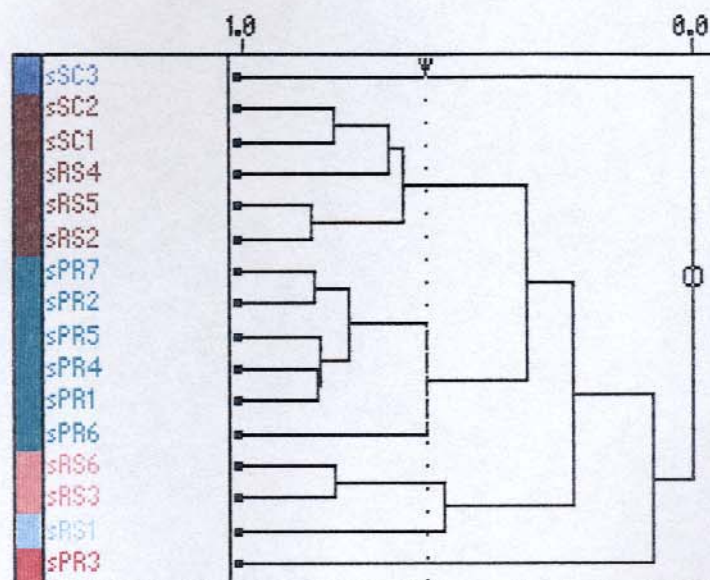


Fig. 6.10 - Dendrograma para as amostras da região Sul.

Os resultados obtidos pelos métodos HCA e PCA diferem, uma vez que na análise por HCA todas as informações estão contidas em uma única representação gráfica, enquanto que na análise por PCA, foram consideradas apenas as informações da melhor representação gráfica obtida, PC4 *versus* PC2. Neste caso, a contribuição das informações dadas pelas variâncias a essas PCs é de 55,4 %.

### VI.6.3 - Região Sudeste

Uma vez que foi observado, nas análises anteriores, separações entre amostras de um mesmo grupo, procedente dos mesmos Estados, o que implica em áreas muito extensas, optou-se em fazer um estudo das amostras procedentes da região Sudeste, classificando-as por sub-regiões. Assim, amostras pertencentes a Estados diferentes, porém de regiões próximas, foram atribuídas à mesma classe, perfazendo um total de 5 classes. A classificação dada às amostras é apresentada



na Tabela 6.14 e a Figura 6.11 apresenta um mapa da região Sudeste do Brasil com as classes das amostras.

Tabela 6.14 – Classes atribuídas às amostras da região Sudeste.

| Classes                               | Amostras                                                                                         |
|---------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (1) Região de fronteira entre MG e SP | seMG1, seMG2, seMG8, seMG9, seMG10,<br>seMG11, seMG12, seMG13, seMG14, seSP13,<br>seSP12, seSP14 |
| (2) Região de Belo Horizonte (MG)     | seMG3, seMG4, seMG5, seMG6, seMG7, seMG15                                                        |
| (3) Região de Angatuba (SP)           | seSP1, seSP2, seSP3                                                                              |
| (4) Região de Campinas (SP)           | seSP4, seSP5, seSP6, seSP7, seSP8, seSP9,<br>seSP10, seSP11                                      |
| (5) Região de Embu-Guaçu e Atibaia    | seSP16, seSP15, seSP17                                                                           |

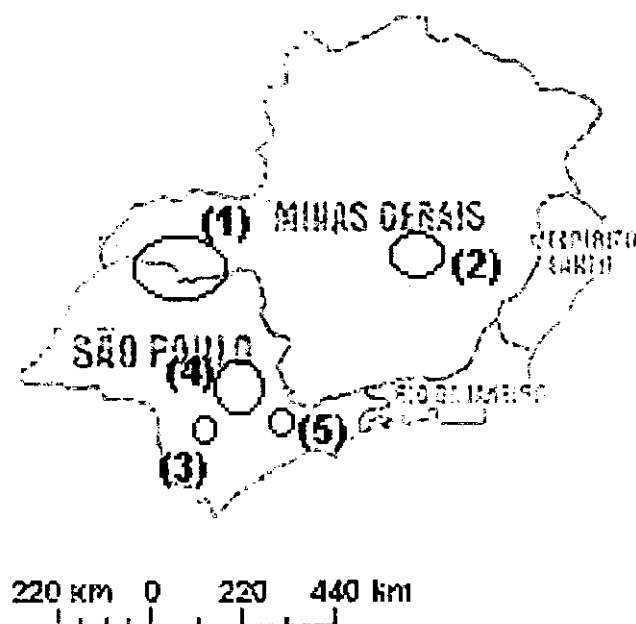


Figura 6.11 - Mapa com a classificação por sub-regiões das amostras procedentes da região Sudeste do Brasil.

Nesta análise, todas as variáveis foram utilizadas, de modo que a matriz de dados apresenta a dimensão 32 x 7. O número de PC utilizadas foi de 5. A Tabela 6.15 apresenta a contribuição de informações dadas pelas variâncias para cada PC utilizada.

Tabela 6.15 – Variância (%) e variância acumulada (%) para cada PC obtidos por PCA das amostras procedentes da região Sudeste.

| PC | Variância (%) | Variância Acumulada (%) |
|----|---------------|-------------------------|
| 1  | 60,31         | 60,31                   |
| 2  | 17,32         | 77,63                   |
| 3  | 9,99          | 87,62                   |
| 4  | 8,59          | 96,21                   |
| 5  | 3,32          | 99,53                   |

A partir dos gráficos dos *scores*, PC4 *versus* PC2 (Figuras 6.12 e 6.13), nos quais as amostras estão representadas na forma de pontos e com suas respectivas denominações, sendo possível verificar:

- a formação de 4 grupos de amostras;
- as amostras seSP3, seSP17 e seMG8 pertencentes às classes (3), (1) e (5), respectivamente, encontram-se afastadas dos demais grupos;
- o grupo I contém as amostras da classe (1) e as amostras seSP15 e seSP16 que pertencem à classe (5);
- o grupo II contém amostras pertencentes à classe (2);
- o grupo III contém amostras pertencentes à classe (3);
- as amostras pertencentes à classe (4) estão divididas em três subgrupos classificados, na Figura 6.11, como IVa, IVb e IVc. O subgrupo IVa contém quatro amostras pertencentes à classe (4) e duas pertencentes à classe (2). O subgrupo IVc encontra-se próximo ao grupo II. O subgrupo IVa está mais próximo do grupo I.

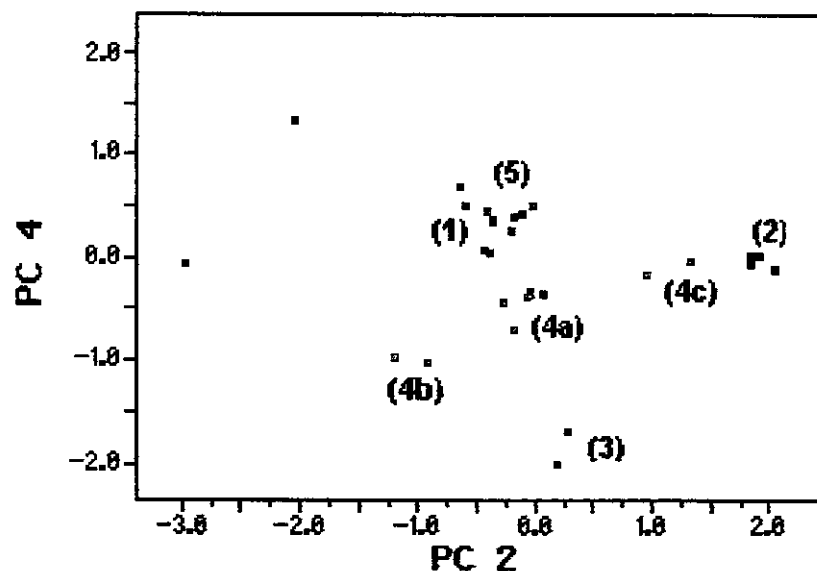


Fig. 6.12 - Gráfico dos *scores*, onde as amostras procedentes da região Sudeste estão representadas por pontos.

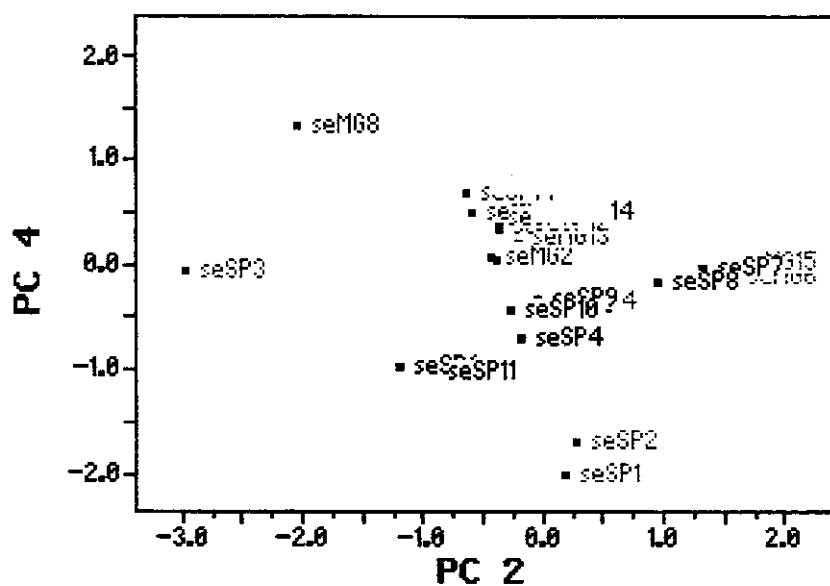


Fig. 6.13 - Gráfico dos *scores* para as amostras procedentes da região Sudeste.

De acordo com o observado, através dos *scores*, com exceção para as amostras da classe (5), os grupos formados estão de acordo com a classificação feita para as amostras.

De acordo com o gráfico dos *loadings* (Figura 6.14), o afastamento das amostras seSP3 e seMG8 devem-se às suas altas concentrações de Fe e para a amostra seSP17, à alta concentração de Zn e Mn. Estas amostras não podem ser consideradas *outliers*, uma vez que podem ter sofrido contaminação por estas espécies.

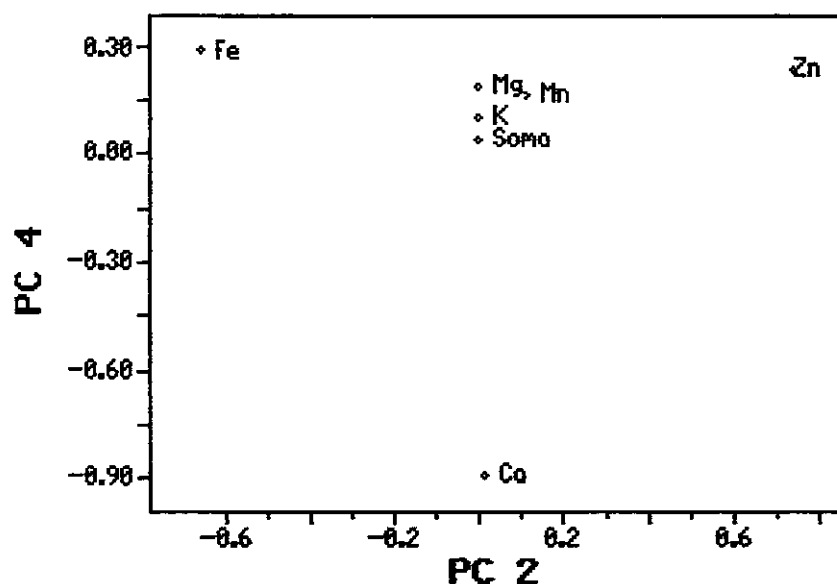


Fig. 6.14 - Gráfico dos *loadings* para as amostras procedentes da região Sudeste.

A Figura 6.15 apresenta o dendograma para as amostras procedentes da região Sudeste, no qual pode-se observar a formação de um grupo de amostras pertencentes à classe (1) apresenta um grau de similaridade com as amostras do grupo IVb de 72 % e a amostra seSP8, pertencente à classe (4) apresenta uma similaridade de 66 % com este grupo. A amostras seSP3 apresenta uma similaridade de 24 % com as amostras pertencentes ao seu grupo (seSP1 e seSP17).

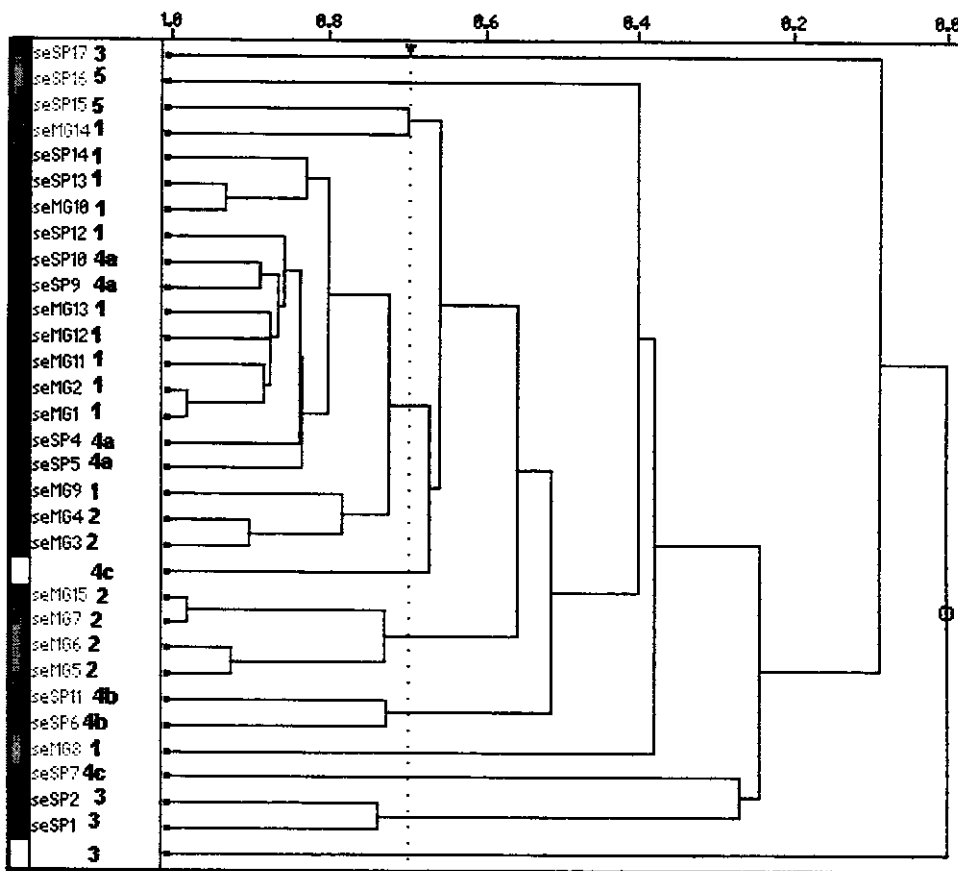


Fig. 6.15 – Dendrograma das amostras procedentes da região Sudeste.

Os resultados obtidos na análise por HCA, do mesmo modo que o observado para as amostras procedentes da região Sul, não confirmaram todas as informações obtidas pela análise por PCA, onde nesta última, a melhor representação gráfica obtida foi para a PC4 *versus* PC2, em que a contribuição das variâncias a essas PCs é de 25,91 %.

De um modo geral, a classificação das amostras por regiões de extensões menores, mostrou ser mais expressiva. Isto sugere que a classificação quimiométrica pode ser otimizada com um maior número de variáveis a serem determinadas.

## VII. CONCLUSÕES

Os métodos estabelecidos neste estudo demonstraram ser eficientes para a quantificação das espécies estudadas em mel, apresentando vantagens e desvantagens, um em relação ao outro, que são características inerentes dos seus respectivos processos. Os testes estatísticos utilizados apontam o método de mineralização assistida por micro-ondas como o mais preciso. Porém, o método de soluções assistidas por ultra-som é mais simples, com menos etapas de manipulação e requer menores quantidades de reagentes.

A escolha do método dependerá, essencialmente, da precisão requerida para a análise, mas deve-se levar em consideração também a etapa de otimização instrumental, considerando as concentrações das espécies presentes nas amostras e o tipo ou modelo do equipamento a ser utilizado.

Apesar dos resultados obtidos nos testes utilizando o princípio de fermentação alcoólica não serem conclusivos, o uso da invertase parcialmente purificada é, aparentemente, o mais promissor, além de utilizar poucos reagentes com baixo grau de toxidez. Isto significa que existe uma possibilidade do uso desta enzima no pré-tratamento de amostras ricas em açúcares, embora algumas variáveis devam ser controladas e alguns obstáculos devam ser contornados.

Através do estudo das 69 amostras comerciais de mel de abelhas nacionais foi possível verificar que as faixas de concentrações dos constituintes presentes (K, Ca, Mg, Mn, Zn e Fe) por região geográfica são amplas e se intercalam. Outra observação importante é que os méis comercializados não apresentaram contaminação de elementos potencialmente tóxicos, considerando os limites de quantificação e que, aproximadamente 80 % das amostras, estão dentro do intervalo estabelecido de pureza para metais. Além disso, aproximadamente 80% das amostras podem ser consideradas como uma boa ou rica fonte de Mn. Estes dados representam novas informações sobre os méis nacionais.

Os testes estatísticos e os métodos quimiométricos utilizados demonstraram ser ferramentas úteis na comparação entre os resultados obtidos e na visualização das similaridades e/ou diferenças entre méis nacionais. Entretanto, com as variáveis

estudadas, no estudo quimiométrico não foi alcançada uma classificação conclusiva das amostras por região geográfica. Foi constatada, apenas, uma tendência à sua formação. Esta tendência é fortalecida quando o número de amostras por região é maior, com dimensões regionais menores. Isto sugere que a classificação quimiométrica pode ser otimizada com um maior número de variáveis a serem determinadas.

## VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. [www.agridat.mg.gov/mercosul/queijos\\_mel/melporcel.html](http://www.agridat.mg.gov/mercosul/queijos_mel/melporcel.html), acessada em 18/03/03.
- [2]. ANKLAN, E. "A Review of the Analytical Methods to Determine the Geographical and Botanical Origin of Honey". *Food Chem.*, **63**, 1998, 549-562.
- [3]. SANNA, G.; PILO, M. I.; PIU, P. C.; TAPPARO, A.; SEEGER, R. "Determination of Heavy Metals in Honey by Anodic Stripping Voltammetry at Microelectrodes". *Anal. Chim. Acta*, **415**, 2000, 165-173.
- [4]. RODRIGUES, C. R. – [www/holos.com.br/artigos/mel.html](http://www/holos.com.br/artigos/mel.html), acessada em 14/11/2002.
- [5]. CUTLER, D.; BARBIER, A.; PESTELL, K. "Radical Honey". *Trends Pharmacol. Sci.*, **22**, 9, 2001, 449.
- [6]. COSTA, L. S. M.; ALBUQUERQUE, M. L. S.; TRUGO, L. C.; QUINTEIRO, L. M. C.; BARTH, O. M.; RIBEIRO, M.; DE MARIA, C. A. B. "Determination of Non-volatile Compounds of Different Botanical Origin Brazilian Honeys". *Food Chem.*, **65**, 1999, 347-352.
- [7]. LEITA, L.; MUHLBACHOVA, G.; CESCO, S.; BARBATINI, R.; MONDINI, C. "Investigation of the Use of Honey Bees and Honey Bee Products to Assess Heavy Metals Contamination". *Environ. Monit. Assess.*, **43**, 1996, 1-9.
- [8]. NEGGERS, Y. H.; LANE, R. H. "Analyzing Food for Nutrition Labeling and Hazardous Contaminants". Chapter 8: "Minerals" Edited by I. J. Jeon and W. G. Ikins. Marcel Dekker, Inc., New York, 1995.
- [9]. MILLER-IHLI, N. J. "Atomic Absorption and Atomic Emission Spectrometry for the Determination of the Trace Element Content of Selected Fruits Consumed in the United States". *J. Food Comp. Anal.*, **9**, 1996, 301-311.
- [10]. LATORRE, M. J.; PEÑA, R.; PITA, C.; BOTANA, A.; GARCÍA, S.; HERRERO, C. "Chemometric Classification of Honeys According to Their Type. II. Metal Content Data". *Food Chem.*, **66**, 1999, 263-268.
- [11]. PARAMÁS, A. M. G.; BÁREZ, J. A. G.; GARCIA-VILLANOVA, R. J.; PALÁ, T. R.; ALBAJAR, R. A.; SÁNCHEZ, J. S. "Geographical Discrimination of Honey by Using Mineral Composition and Common Chemical Quality Parameters". *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 2000, 157-165.



- [12]. MENDES, E.; PROENÇA, E. B.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, M. A. "Quality Evaluation of Portuguese Honey". *Carbohydr. Polym.*, **37**, 1998, 219-223.
- [13]. CRANE, E. "Bees, Honey and Pollen as Indicators of Metals Environment". *Bee World*, **65** (1), 1984, 47-49.
- [14]. DEL NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L.; DIEGO, J. C.; GÓMEZ, L. A.; RUIZ, J. M.; HIGES, M. "Determination of Oxalate, Sulfate and Nitrate in Honey and Honeydew by Ion-chromatography". *J. Chromatogr. A*, **881**, 2000, 629-638.
- [15]. UREN, A.; SERIFOGLU, A.; SARIKAHYA, Y. "Distribution of Elements in Honeys and Effect of a Thermoelectric Power Plant on the Element Contents". *Food Chem.*, **61**, 1998, 185-190.
- [16]. PRZYBYŁOWSKI, P.; WILCZYŃSKA, A. "Honey as an Environmental Marker". *Food Chem.*, **74**, 2001, 289-291.
- [17]. AL-KHALIFA, A. S.; AL-ARIF, I. A. "Physicochemical Characteristics and Pollen Spectrum of Some Saudi Honeys". *Food Chem.*, **67**, 1999, 21-25.
- [18]. YILMAZ, H.; YAVUZ, O. "Content of some Trace Metals in Honey from South-eastern Anatolia". *Food Chem.*, **65**, 1999, 475-476.
- [19]. MERIN, U.; BERNSTEIN, S.; ROSENTHAL, I. "A Parameter for Quality of Honey". *Food Chem.*, **63**, 1998, 241-242.
- [20]. BULDINI, P. L.; CAVALLI, S.; MEVOLI, A.; SHARMA, J. L. "Ion Chromatographic and Voltammetric Determination of Heavy and Transition Metals in Honey". *Food Chem.*, **73**, 2001, 487-495.
- [21]. LI, Y.; WAHDAT, F.; NEEB, R. "Digestion-free Determination of Heavy Metals (Pb, Cd, Cu) in Honey Using Anodic Stripping Differential Pulse Voltammetry and Potentiometric Stripping Analysis". *Fresenius J. Anal. Chem.*, **351**, 1995, 678-682.
- [22]. VIÑAS, P.; LÓPEZ-GARCÍA, I.; LANZÓN, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. "Direct Determination of Lead, Cadmium, Zinc, and Copper in Honey by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Using Hydrogen Peroxide as a Matrix Modifier". *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 3952-3956.
- [23]. LÓPEZ-GARCÍA, I.; VIÑAS, P.; BLANCO, C.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. "Fast Determination of Calcium, Magnesium and Zinc in Honey Using Continuous Flow Flame Atomic Absorption Spectrometry". *Talanta*, **49**, 1999, 597-602.

- [24]. FODOR, P.; MOLMAR, E. "Honey as an Environmental Indicator: Effect of Sample Preparation on Trace Element Determination by ICP-AES". *Mikrochim. Acta*, **112**, 1993, 113-118.
- [25]. CAROLI, S.; FORTE, G.; IAMICELI, A. L.; GALOPPI, B. "Determination of Essential and Potentially Toxic Trace Elements in Honey by Inductively Coupled Plasma-based Techniques". *Talanta*, **50**, 1999, 327-336.
- [26]. CAROLI, S.; FORTE, G.; ALESSANDRELLI, M.; CRESTI, R.; SPAGNOLI, M.; D'ILIO, S.; PAUWELS, J.; KRAMER, G. N. "A Pilot Study for the Production of a Certified Reference Material for Trace Elements in Honey". *Microchem. J.*, **67**, 2000, 227-233.
- [27]. FORTE, G.; D'ILIO, S.; CAROLI, S. "Honey as a Candidate Reference Material for Trace Elements". *J. AOAC Intern.*, **84**, 2001, 1972-1975.
- [28]. PAKER, A. P.; GINÉ, M. F. "Analysis of Undigested Honey Samples by Isotope Dilution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with Direct Injection Nebulization (ID-ICP-MS)". *Spectrochim. Acta Part B*, **56**, 2001, 69-75.
- [29]. KUMP, P.; NECEMER, M.; SNAJDER, J. "Determination of Trace Elements in Bee Honey, Pollen and Tissue by Total Reflection and Radioisotope X-ray Fluorescence Spectrometry". *Spectrochim. Acta Part B*, **51**, 1996, 499-507.
- [30]. LILL, J. O.; HARJU, L.; SAARELA, K. E.; LINDROOS, A.; HESELINS, S. J. "Increased Sensitivity in Thick-target Particle Induced X-ray Emission Analyses Using Dry Ashing for Preconcentration". *Anal. Chim. Acta*, **378**, 1999, 273-278.
- [31]. BOSS, C. B.; FREDEEN, K. J. "Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry". 2<sup>nd</sup> ed. Perkin-Elmer Corp., USA, 1997.
- [32]. SATO, T.; MIYATA, G. "The Nutraceutical Benefit, Part III: Honey". *Nutrition*, **16**, 2000, 468-469.
- [33]. ISENGARD, H. D.; SCHULTHEIB, D.; RADOVIC, B.; ANKLAN, E. "Alternatives to Official Analytical Methods Used for the Water Determination in Honey". *Food Control*, **12**, 2001, 459-466.
- [34]. "Um Padrão Nacional para o Mel". *Pesquisa Fapesp*, novembro, 2000, 58-60.
- [35]. BASTOS, D. H. M. "Compostos Voláteis de Méis de Eucalipto e Laranja". Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 1996.

- [36]. NEGUERELA, A. I.; PEREZ-ARQUILLUE, C. "Color Measurement of Rosemary Honey in the Solid State by Reflectance Spectroscopy with Black Background". *J. AOAC Int.*, **83** (3), 2000, 669-674.
- [37]. BONVEHÍ, J. S.; TORRENTÓ, M. S.; RAICH, J. M. "Invertase Activity in Fresh and Processed Honeys". *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 2000, 507-512.
- [38]. MIDGAL, W.; OWCZARCYK, H. B.; KEDZIA, B.; HOLDERNA-KEDZIA, E.; MADAJCZYK, D. "Microbiological Decontamination of Natural Honey by Irradiation". *Radiat. Phys. Chem.*, **57**, 2000, 285-288.
- [39]. TOSI, E.; ORTEGA, M.; MARTINET, R. "Determinacion Espectrofotometrica de la Actividad de la Glucosa Oxidasa en Miel". *Alimentaria*, **312**, 2000, 97-99.
- [40]. HUIDOBRO, J. F.; REA, M. E.; MATO, I.; MUNIATEGUI, S.; FERNÁNDEZ-MUÑO, M. A.; SANCHO, M. T. "Variation of Apparent Ethanol Content of Unspoiled Northwestern Spanish Honeys During Storage". *Food Chem.*, **73**, 2001, 417-420.
- [41]. JIMÉNEZ, J. J.; BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M. J.; TORIBIO, L.; MARTÍN, M. T. "Gas Chromatography with Electron-capture and Nitrogen-phosphorus Detection in the Analysis of Pesticides in Honey after Elution from a Florisil Column – Influence of the Honey Matrix on the Quantitative Results". *J. Chromatogr. A*, **823**, 1998, 381-387.
- [42]. JIMÉNEZ, J. J.; BERNAL, J. L.; DEL NOZAL, M. J.; MARTÍN, M. T.; MAYORGA, A. L. "Solid-phase Microextraction Applied to the Analysis of Pesticide Residues in Honey Using Gas Chromatography with Electron-capture Detection". *J. Chromatogr. A*, **829**, 1998, 269-277.
- [43]. JIMÉNEZ, J. J.; BERNAL, J. L.; TORIBIO, L.; DEL NOZAL, M. J.; MARTÍN, M. T. "Capillary Gas Chromatography with Mass Spectrometric and Atomic Emission Detection for Characterization and Monitoring Chlordimeform Degradation in Honey". *J. Chromatogr. A*, **946**, 2002, 247-253.
- [44]. IISKANDER, F. I. "Assessment of Trace Elements in Honey Produced on Uranium Mining Reclaimed Land". *Sci. Tot. Environ.*, **192**, 1996, 119-122.
- [45]. CONTI, M. E.; BOTRÈ, F. "Honeybees and Their Products as Potential Bioindicators of Heavy Metals Contamination". *Environ. Monit. Assess.*, **69**, 2001, 267-282.
- [46]. BORAWSKA, M. H.; KAPATA, J.; HUKALOWICZ, K.; MARKIEWICZ, R. "Radioactivity of Honeybee Honey". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **64**, 2000, 617-621.

- [47]. DEVILLERS, J.; DORÉ, J. C.; MARENCO, M.; POIRIER-DUCHÊNE, F.; GALAND, N.; VIEL, C. "Chemometrical Analysis of 18 Metallic and Nonmetallic Elements Found in Honeys Sold in France". *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2002, 5998-6007.
- [48]. PAMPLONA, B. C. "Exame dos Elementos Químicos Inorgânicos Encontrados em Méis Brasileiros de *Apis mellifera* e suas Relações Físico-Biológicas". Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de São Paulo. Instituto de Biociências. São Paulo, 1989.
- [49]. LEITE, J. M. C.; TRUGO, L. C.; COSTA, L. S. M.; QUINTEIRO, L. M. C.; BARTH, O. M.; DUTRA, V. M. L.; DE MARIA, C. A. B. "Determination of Oligosaccharides in Brazilian Honeys of Different Botanical Origin". *Food Chem.*, **70**, 2000, 93-98.
- [50]. CAMPOS, G.; DELLA-MODESTA, R. C.; SILVA, T. J. P.; BAPTISTA, K. E.; GOMIDES, M. F.; GODOY, R. L. "Classificação do Mel em Floral ou Mel de Melato". *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **23**, 2003, 1-5.
- [51]. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T.A. "Princípios de Análise Instrumental". 5ª ed. – Editora Bookman, Porto Alegre, 2002.
- [52]. BRENNER, I. B.; ZANDER, A. T. "Axially and Radially Viewed Inductively Coupled Plasma – A Critical Review". *Spectrochim. Acta Part B*, **55**, 2000, 195 – 1240.
- [53]. HOENIG, M.; KERSABIEC, A. M. "Sample Preparation Steps for Analysis by Atomic Spectroscopy Methods: Present Status". *Spectrochim. Acta Part B*, **51**, 1996, 1297 – 1307.
- [54]. KRUG, F. J. "Métodos de Decomposição de Amostras". 11º Encontro Nacional de Química Analítica. Campinas/SP, 2001".
- [55]. PEDRO, N. A. R. "Determinação de Nutrientes Minerais em Alguns Alimentos por ICP OES". Tese de Doutorado. Universidade estadual de São Paulo. Instituto de Química. São Paulo, 1998.
- [55a]. LUQUE-GARCÍA, J. L.; DE CASTRO, M. D. L. "Ultrasound: a powerful tool for leaching". *Trends and Anal. Chem.*, **22**, (1), 2003, 41-47.
- [56]. LIMA, A. U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. "Biotecnologia – Tecnologia das Fermentações". Vol. 1, 4ª ed. Edgard Blucher, São Paulo, 1975.
- [57]. EVANGELISTA, J. "Tecnologia de Alimentos". 2ª ed. Atheneu Editora, São Paulo, 1994.

- [58]. MORRIS, N. M.; CLARKE, M. A.; TRIPP, V. W.; CARPENTER, F. G. "Determination of Lead, Cadmium, and Zinc in Sugar". *J. Agric. Food Chem.*, **24**, 1976, 45-47.
- [59]. BAG, H.; LALE, M.; TURKER, A. R. "Determination of Iron and Nickel by Flame Atomic Absorption Spectrophotometry After Preconcentration on *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized Sepiolite". *Talanta*, **47**, 1998, 689-696.
- [60]. QUIJANO, M. A.; MORENO, P.; GUTIÉRREZ, A. M.; PÉREZ-CONDE, M. C.; CÁMARA, C. "Selenium Speciation in Animal Tissues After Enzymatic Digestion by High-performance Liquid Chromatography Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry". *J. Mass Spectrom.*, **35**, 2000, 878-884.
- [61]. GONÇALVES, M. J.; MEDEIROS, J. A.; JACOB, S. C. "Determination of Total Aluminum and its Soluble Fraction in a Diet from a Day Nurse in Brasil" Seventh Rio Symposium on Atomic Spectrometry. Book of Abstracts, p.187. Florianópolis, 2002.
- [62]. GRUPO DE QUIMIOMETRIA I QUALIMETRIA DE TARRAGONA, "Quimiometria, Una Disciplina Útil Per a L'anàlisi Química". [www.quimica.urv.es/quimio](http://www.quimica.urv.es/quimio), acessada em 19/ 06/ 2003.
- [63]. AMARAL, P. "Introdução à Quimiometria – um livro de texto eletrônico". [www.dq.fct.unl.pt/qof/chem1.html](http://www.dq.fct.unl.pt/qof/chem1.html), acessada em 19/06/2003.
- [64]. BEEBE, K. R., PELL, R. J., SEASHOLTZ, M. B. "Chemometrics: A Practical Guide". John Wiley & Sons, New York, 1998.
- [65]. SOUSA, R. A. "Uso da Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma de Argônio com Acoplamento Indutivo na Determinação de Nutrientes e Contaminantes Inorgânicos em Água de Coco Natural e Industrializada". Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. Campinas, 2003.
- [66]. DE MELO, W. J.; BERTIPAGLIA, L. M. A.; DE MELO, V. P. "Carboidratos". Material Didático da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da UNESP, Cap. 4, p.184 – 186. Jaboticabal/SP, 2001.
- [67]. MONTASER, A.; GOLIGHTLY, D. M. "Inductively Coupled Plasma in Analytical Atomic Spectrometry". 2<sup>nd</sup> ed., VCH Publishers, New York, 1992.
- [68]. THOMSEN, V.; ROBERTS, G.; BURGESS, K. "The Concept of Background Equivalent Concentration in Spectrochemistry". *Spectrosc.*, **15**, 2000, 33-35.
- [69]. BACCAN, N.; ANDRADE, J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J. S. "Química Analítica Quantitativa Elementar" 3<sup>a</sup> ed., Edgard Blucher, São Paulo, 2001.

- [70]. JEFFERY, G. H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R. C. "Vogel - Análise Química Quantitativa" 5ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1992.
- [71]. EIN SIGHT 3.0, **Infometrix**, Seattle, WA, 1991.
- [72]. MORGANO, M. A.; QUEIROZ, S. C. N.; FERREIRA, M. M. C. "Determinação dos Teores de Minerais em Sucos de Frutas por Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma Indutivamente Acoplado". *Cienc. Tecnol. Aliment.*, **19**, 1999, 344-348.
- [73]. Committee on Hazardous Substances in the Laboratory; Commission on Physical Sciences; Mathematics and Resources e National Research Council Prudent Practices for Disposal of Chemicals from Laboratories, National Academy Press, Washington DC, 1983, 247-249.
- [74]. LÉON, M. C.; BURGOS, A.; VELÁSQUEZ-HERNÁNDEZ, A.; HARDISSON, A. "Alimentación, Nutricion y Salud". *Alimentaria*, **34**, 1996, 29-39.
- [75]. ALTMAN, T. A. "FDA and USDA Nutrition Labeling Guide – Decision Diagrams, Checklist, and Regulations". Chapter 4: "Mandatory Nutrients Declarations", Sections: Dairy Value Reference (DRV); Chapter 5: "Nutrients Content Claims", Section: Reference Daily Intakes (RDI), Claiming "Good Source", "High", "More" or "Lean". Ed. Technomic Publishing CO. Pennsylvania, 1998, pp 4.6, 4.8 and 5.13.
- [76]. "Manual das Necessidades Nutricionais Humanas", Organização de Alimentos e de Agricultura das nações Unidas, FAO – Organização Mundial de Saúde, OMS. Relatório sobre as necessidades mínimas de calorias dos nutrientes e de consumo alimentar. Ed. Atheneu, São Paulo, 2003.