

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Instituto de Química Departamento de Química Analítica

"AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE DECOMPOSIÇÃO ENZIMÁTICA E FOTÓLISE OXIDATIVA NO PREPARO DE MEL PARA ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA EM PLASMA DE ARGÔNIO COM ACOPLAMENTO INDUTIVO"

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thiago Marcelo Ribeiro Gianeti

Orientadora: Profa. Dra. Solange Cadore

Campinas, São Paulo Dezembro de 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

 Gianeti, Thiago Marcelo Ribeiro. Avaliação de técnicas de decomposição enzimática e fotólise oxidativa no preparo de mel para análise por espectrometria de emissão óptica em plasma de argônio com acoplamento indutivo / Thiago Marcelo Ribeiro Gianeti. -- Campinas, SP: [s.n], 2009.
 Orientadora: Solange Cadore.
 Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.
 Mel. 2. Fotólise oxidativa. 3. Constituintes inorgânicos. 4. ICP OES. I. Cadore, Solange.

II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química, III. Título.

Título em inglês: Evaluation of techniques of enzymatic decomposition and oxidative photolysus in honey sample preparation for the analysis by inductively coupled plasma optical emission spectrometry

Palavras-chaves em inglês: Honey, Oxidative photolysis, Inorganic constituents, ICP OES

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Solange Cadore (orientadora), Nivaldo Baccan (IQ-UNICAMP), Julio Cesar Jose da Silva (DQ-UFJF)

Data de defesa: 11/12/2009

Dedico

A meu filho Gustavo.

A minha esposa e companheira, Tatiana

Aos meus pais, Diógenes, Maria das Graças e irmãos Rodrigo e Eric.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Solange Cadore pela oportunidade de realização deste projeto, pelo incentivo, orientação e apoio em todos os momentos;

Ao prof. Carlos Roque por ter me aberto as portas no Instituto de Química e por acreditar em minha formação, independentemente das adversidades;

Em especial ao Prof. Nivaldo Baccan, pela importante contribuição ao trabalho e pelas prazerosas conversas sobre Química Analítica;

Aos demais docentes do Instituto de Química pela contribuição em minha formação;

À técnica Helena, pela ajuda não somente nas análises, mas também na compreensão sobre questões humanas e amizade;

Ao Paulo, técnico do laboratório, pelo esforço, dedicação e sábias sugestões;

À Greice, pelo apoio em novas idéias, pela contribuição nas otimizações e planejamentos experimentais do trabalho, além da amizade e companheirismo;

Ao Rafael que me incentivou desde o início a incorporar o GEATOM, pelas entusiasmadas discussões sobre ICP OES, pela importante contribuição ao trabalho, pela amizade;

À Taise pela ajuda e importante contribuição ao trabalho. Sua vontade de aprender foi um grande incentivo para as finalizações dos experimentos;

Aos demais colegas do laboratório: Lorena, Mariana, Mario, Mirian, Rita, Érika, Sabrina e Heitor por proporcionarem um agradável ambiente de trabalho;

Ao pessoal da Central Analítica, especialmente à Daniela e Érica, pelo apoio e dedicação, aos professores da comissão gestora Lauro Kubota e Paulo Imamura, aos colegas Fábio, Gislene, Enrico, Newton, Fabiano, Seu João, Jurandir, Sabrina e Cíntia;

Aos funcionários e grandes amigos que fiz no Instituto de Química, Pimpim, Ricardo, Fontana, Cláudio, Mário, André, Bel, Tião, pessoal da CPG, pessoal da faxina, informática, oficinas, biblioteca, xerox, etc;

Aos amigos de República, especialmente o Leonardo, Rômulo, Rodrigo (boi) e Renato;

v

Ao Instituto de Química da Unicamp, pelas facilidades, e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

Albert Einstein

SÚMULA CURRICULAR

Thiago Marcelo Ribeiro Gianeti

Formação:

2002 - Bacharelado em Química pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo – FFCLRP USP Ribeirão Preto

2002 - Licenciatura em Química pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo – FFCLRP USP Ribeirão Preto

Atividades Profissionais:

2009 – Especialista de Vendas – PerkinElmer do Brasil LTDA.

2006-2009 – Especialista de Vendas de Instrumentos Analíticos Varian Indústria e Comércio LTDA.

2004-2005 – Químico. Fundação de Desenvolvimento da UNICAMP - convênio Central Analítica do Instituto de Química da UNICAMP.

2003-2004 – Vendedor técnico. Micronal Ind. e Com. LTDA. Vendas de equipamentos e materiais de consumo em contas públicas da região de Campinas e Piracicaba.

Atividades Acadêmicas:

2001 – Monitoria Acadêmica da disciplina Análise Química Quantitativa do curso de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto.

2002 – Programa de reciclagem dos professores do ensino médio das escolas da rede pública de Ribeirão Preto através do depto. de Educação e depto. de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da USP de Ribeirão Preto

1999 a 2002 – Iniciação Científica no Laboratório de Síntese de Compostos Organocalcogêneos

2003 – Professor eventual no ensino médio para escolas da rede pública de Campinas.

Trabalhos em congressos:

DABDOUB, M. J., GIANETI, T. R. "Zincatos Vinílicos de Baixa Ordem. Geração e uso de Novos Reagentes Vinílicos de Zinco Através de Reações de Transmetalação" In: 90 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (SIICUSP), 2001, São Paulo. CD ROM do 9° Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo (SIICUSP). São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001. – PRÊMIO MENÇÃO HONROSA.

HURTADO, G. R., BARONI, A. C. M., LENARDÃO, E. J., GIANETI, T. R., GUERRERO JR, P. G., Dabdoub, M. J. "Síntese de (Z)-tiobutenoínos através da Reação de Hidrossulfurilação de 1,3-butadiínos simétricos e não simétricos", In: IX Encontro Regional de Química-SBQ, Londrina. Livro de Resumos. Londrina, Sociedade Brasileira de Química. Regionais PR, SC e RS, 2001. p. QO061

HURTADO, G. R., BARONI, A. C. M., LENARDÃO, E. J., GIANETI, T. R., DABDOUB, M. J. "Síntese de (Z)-1-Fenilseleno-1,4-diorganoil-1-buten-3-inos. Hidroselenação de 1,4-Diorganoil-1,3-butadiínos Simétricos e não Simétricos" In: IX Encontro Regional de Química - SBQ, 2001, Londrina.

DABDOUB, M. J., DABDOUB, V. B., MARINO, J. P., CATANI, V., GIANETI, T. R. "Novas Fórmulas de Vinilzincatos de Lítio. Zincatos Vinílicos de Baixa ordem pela Transmetalação Direta Telúrio/Zinco no Butilteluroeteno". In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002, Poços de Caldas

DABDOUB, M. J., MARINO, J. P., GIANETI, T. R. "Zincatos Vinílicos de Baixa Ordem. Geração e uso de Reagentes Vinílicos de Zinco através de Reações de Transmetalação" In: 54^ª Reunião Anual da SBPC (Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência), 7-12/07/2002 Goiânia.

CADORE, S.; GIANETI, T. M. R.; MACAROVSCHA, G. T., "Construção e emprego de um reator fotodigestor Lab Made para determinação de espécies metálicas em amostras de mel de abelhas por ICP OES". In: 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia. Livro de Resumos da 30^a RASBQ, 2007. p. 43-43.

MACAROVSCHA, G. T., FRANCO, C. M., GIANETI, T. M. R., SOUSA, R. A., CADORE, S., "Otimização dos fatores experimentais de um reator de fotólise oxidativa para determinação de espécies metálicas em amostras de mel de abelhas por ICP OES". In: 30^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia. Livro de Resumos da 30^a RASBQ, 2007. p. 138-138

GIANETI, T. M. R., MACAROVSCHA, G. T., CASTRO, T. S., CADORE, S., "Fotólise Oxidativa versus Digestão Ácida no preparo de amostras mel de abelhas: Figuras de Mérito dos diferentes métodos." In: XI ENCI – Encontro Nacional Sobre Contaminantes Inorgânicos, 22-24/10/2008 Campinas.

Publicações:

DABDOUB, M.J., BARONI, A.C.M., LENARDAO, E.J., GIANETI, T.R., HURTADO, G.R., "Synthesis of (Z)-1-phenylseleno-1,4-diorganyl-1-buten-3-ynes: hydroselenation of symmetrical and unsymmetrical 1,4-diorganyl-1,3-butadiynes". *Tetrahedron* 57: (20) 4271-4276, 2001

DABDOUB, M. J., DABDOUB, V. B., GIANETI, T. R., AGUIAR, F. B., MARINO, J. P., "Desenvolvimento de novas fórmulas de vinilzincatos de lítio. Zincatos vinílicos de baixa e alta ordem pela transmetalação direta telúrio/zinco no butilteluroeteno". Revista de Iniciação Científica. São Carlos, SP: v.4, 87-92, 2002

RESUMO

"AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE DECOMPOSIÇÃO ENZIMÁTICA E FOTÓLISE OXIDATIVA NO PREPARO DE MEL PARA ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA EM PLASMA DE ARGÔNIO COM ACOPLAMENTO INDUTIVO"

Autor: Thiago Marcelo Ribeiro Gianeti Orientador: Profa. Dra. Solange Cadore

A determinação de elementos metálicos em alimentos ricos em açúcar é um desafio analítico devido a interferência da matriz. Diluições das amostras podem minimizar este efeito, por outro lado, podem reduzir as concentrações dos elementos metálicos abaixo do limite de detecção. Assim, o pré-tratamento é usualmente necessário para destruir ou transformar a matriz orgânica e extrair os íons metálicos ligados aos complexos orgânicos buscando, ainda, minimizar os resíduos gerados nas etapas de preparação e análise química.

Este trabalho descreve diferentes tratamentos de amostras de mel, como a digestão ácida, fotólise oxidativa e digestão enzimática, alternativas "limpas" no preparo de amostras para a determinação de Mn, Cd, Pb, Zn, Ba, Cu, Co, Fe, Al, Cr, Ni e As por ICP OES Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma de Argônio com Acoplamento Indutivo. Os resultados obtidos com os diferentes tratamentos foram avaliados levando em consideração o tempo, facilidade de operação e desempenho dos parâmetros analíticos. O método de fotólise oxidativa mostrou-se viável para a análise deste tipo de amostra uma vez que os resultados analíticos mostraram exatidão e precisão adequadas, além de não gerar resíduos químicos no final do tratamento. O fator custo também foi favorável a este tratamento, e o equipamento pode ser construído no laboratório.

ABSTRACT

"EVALUATION OF TECHNIQUES OF ENZYMATIC DECOMPOSITION AND OXIDATIVE PHOTOLYSIS IN HONEY SAMPLE PREPARATION FOR THE ANALYSIS BY INDUCTIVELY COUPLED PLASMA OPTICAL EMISSION SPECTROMETRY"

Author: Thiago Marcelo Ribeiro Gianeti Supervisor: Prof. Dr. Solange Cadore

The determination of metals in foods with high sugar has been an analytical challenge, due to interference of the matrix. Dilutions of the samples can minimize this effect, but may also reduce the concentrations of metals below the limit of detection. Thus pre-treatment is usually necessary to destroy or convert the organic matrix and extract the metal ions bounded to organic complexes. It is also desirable to use a procedure that minimize residuals in order to not affect the environment.

This work deals with the investigation of different kind of treatment for honey, like the acid digestion, the oxidative photolysis and enzymatic digestion. The last two procedures act as an alternative "clean" in sample preparation of honey for the determination of Mn, Cd, Pb, Zn, Ba, Cu, Co, Fe, Al, Cr, Ni and As by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. The results obtained with the different sample treatment were evaluated considering time, easy of operation and performance of analytical parameters. The oxidative photolysis showed to be adequate for this complex sample with good results related to accuracy and precision besides not to generates chemical residuals. This procedure is also not expensive and the reactor used may be manufactured at the laboratory.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	XV
LISTA DE TABELAS	XVI
LISTA DE FIGURAS	XVIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVIÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1. A espectrometria de emissão óptica em plasma com acoplamento	
indutivo	6
2.2. O mel e sua origem	11
2.3. Características de elementos que podem ser encontrados em méis	14
2.4. Conceitos de Fotoquímica	16
2.4.1. Definição e campos de estudo	16
2.4.2 Alguns aspectos teóricos e práticos sobre processos fotoquímicos	17
3. OBJETIVO	20
4. PARTE EXPERIMENTAL	21
4.1 Materiais e Métodos	21
4.2 Decomposição Enzimática utilizando a enzima Invertase	22
4.3 Mineralização com Ácido Sulfúrico	23
4.4 Fotólise Oxidativa	24
4.5 Determinação do Conteúdo de Carbono	26
4.6 Irradiação das amostras	27
4.7 Figuras de Mérito	28
4.8 Aplicação analítica	29
4.9 Tratamento dos resíduos gerados	

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO
5.1 Decomposição enzimática
5.1.1 Limites de detecção e quantificação e resultados para o método da digestão
enzimática32
5.2 Decomposição com ácido sulfúrico e HNO ₃ 36
5.2.1 Limites de detecção, quantificação e resultados para o método de
decomposição ácida37
5.3 Fotólise Oxidativa40
5.3.1 Construção e uso do Fotoreator40
5.3.2 Planejamento estatístico 2 ⁵⁻¹ 42
5.3.3 Determinação do Conteúdo de Carbono48
5.3.4 Irradiação das amostras52
5.3.5 Resultados da Fotólise54
5.3.6 Limites de detecção, quantificação e resultados para o método de fotólise
oxidativa55
5.4 Aplicação analítica59
5.4.1 Análise de méis de diferentes regiões59
6. CONCLUSÕES
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LISTA DE ABREVIATURAS

TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimentos;

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

ICP OES – do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* (Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma com Acoplamento Indutivo);

FAAS – do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry* (Espectrometria de Absorção Atômica em Chama);

ETAAS – do inglês *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry* (Espectrometria de Absorção Atômica por atomização Eletrotérmica);

ICP-MS – do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (Espectrometria de Massas com fonte de Plasma com Acoplamento Indutivo);

LC-HGAAS – do inglês *Liquid Chromatography Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry* (Cromatografia Líquida Absorção Atômica por Geração de Hidretos);

UV – Ultravioleta (radiação);

RF – Radiofreqüência

USDA - do inglês *United States Agriculture Departament* (Departamento da Agricultura dos Estados Unidos);

VD – Valor Diário

ATP – do inglês Adenosine-Triphosphate Trifosfato de Adenosina;

RNA – do inglês Ribonucleic acid (Ácido Ribonucleico);

SCD - do inglês *Segmented Array Charge Coupled Device* (Dispositivo de Arranjo Segmentado de Carga Acoplada);

IB-USP – Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo;

IC - do inglês Inorganic Carbon (Carbono Inorgânico);

TC - do inglês Total Carbon (Carbono Total);

LOD – Limite de Detecção;

LOQ – Limite de Quantificação;

RSD – do inglês Relative Standard Deviation (Desvio Padrão Relativo);

BEC - do inglês *Background Equivalent Concentration* (Concentração Equivalente de Fundo);

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições experimentais utilizadas no ICP OES21
Tabela 2 - Limites de detecção e limites de quantificação para o método da
digestão enzimática32
Tabela 3 - Resultados obtidos para a análise de mel usando o método de
decomposição enzimática33
Tabela 4 – Resultados obtidos com o método de decomposição enzimática com a
utilização de Y ⁺ padrão interno34
Tabela 5 - Limites de detecção e limites de quantificação para o método da
decomposição ácida37
Tabela 6: Resultados obtidos com o método da mineralização ácida.
Experimentos de adição e recuperação em dois níveis, sem padrão
interno
Tabela 7 – Resultados obtidos com o método de mineralização ácida.
Experimentos de adição e recuperação em dois níveis, utilizando Y ⁺ como padrão
interno
Tabela 8 - Valores das variáveis para os níveis menos (-) e mais (+) dos cinco
fatores principais43
Tabela9–ResultadosdarecuperaçãoparaBárioeArsênio
(porcentagem)45
Tabela 10 - Resultados da fotólise oxidativa para a potência de 125W e
exposição variando de 0 a 150 minutos51
Tabela 11 - Resultados da fotólise oxidativa para a potência de 400W e
exposição variando de 0 a 40 minutos51
Tabela 12 - Limites de detecção e limites de quantificação para o método da
fotólise oxidativa
Tabela 13 – Resultados obtidos com o método da fotólise oxidativa. Experimentos

Tabela 14 – Resultados obtidos com o método da fotólise oxidativa. Experimentos de adição e recuperação em dois níveis utilizando Y⁺ como padrão interno.......57 **Tabela 15** – Concentrações (μg g⁻¹) e RSD´s de alguns méis investigados........58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de um instrumento de ICP OES7
Figura 2: Nebulizador tipo Cross-Flow
Figura 3: Tocha de quartzo e o gradiente de temperatura do plasma9
Figura 4: Visualização da tocha em instrumentos equipados com dupla visão,
axial e radial10
Figura 5: Representação esquemática da construção do reator24
Figura 6: Suporte construído para acomodar frascos de quartzo contendo as
amostras de mel (60 % m/v)26
Figura 7: Esquema de montagem do espectrofluorímetro utilizado27
Figura 8: Amostras em processo de digestão ácida
Figura 9: Sequência de montagem do fotoreator41
Figura 10: Gráfico normal para os efeitos do planejamento fatorial do elemento
Bário46
Figura 11: Gráfico normal para os efeitos do planejamento fatorial do elemento Arsênio46
Figura 12: Aspecto das soluções após períodos contínuos de exposição a radiação UV
Figura 13: Porcentagem de redução do carbono orgânico total utilizando
lâmpada de 125 W e exposição variando de 0 a 150 minutos50
Figura 14: Porcentagem de redução do carbono orgânico total utilizando lâmpada
de 400 W e exposição variando de 0 a 40 minutos50
Figura 15: Espectro de Emissão da Lâmpada de 125 W53

Figura 16: Espectro de Emissão da Lâmpada de 400 W	53
Figura 17: Investigação do espectro de emissão do Selênio e das amostras	
que sofreram fotólise	.58

1. INTRODUÇÃO

Nutrição é o conjunto dos processos biológicos através dos quais os seres vivos utilizam, transformam e incorporam em seus organismos substâncias procedentes do meio em que vivem, garantindo a sua subsistência¹.

Os processos nutritivos possibilitam obter: (i) energia, para satisfazer o metabolismo basal e repor energia gasta devido às atividades, e (ii) materiais necessários para a formação e renovação das estruturas orgânicas e regulagem dos processos metabólicos¹.

O funcionamento dos organismos vivos depende dos nutrientes que chegam às suas células. Existem cinco tipos de nutrientes: carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas e minerais. Os carboidratos, lipídeos e proteínas são denominados macronutrientes, enquanto as vitaminas e os minerais são denominados micronutrientes¹.

Depois do carbono, oxigênio e nitrogênio, as espécies químicas que devem estar presentes em maior quantidade na alimentação humana são: Ca, P, S, K, Na, CI e Mg. Estes elementos são denominados **macroelementos**, devido às quantidades relativamente altas dos mesmos, que são necessárias para cobrir as necessidades corporais, e por serem encontrados em concentrações altas nos alimentos^{1,2}.

Existem também os **micronutrientes minerais**, que são: Fe, Zn, Cu, Mn, I, Se, Mo, Co, Cr, Si, Ni, V, Li, Sn, As e F. Estes elementos são componentes minerais minoritários dos alimentos e da água potável, e devem ser considerados sob dois aspectos: (i) essencialidade, onde são necessários para a realização do metabolismo humano e formação das partes constituintes do corpo; e (ii) toxidez, quando alteram o metabolismo, provocando disfunções orgânicas^{1,2}.

Alguns elementos, mesmo em pequenas quantidades são tóxicos e não devem ser ingeridos, como no caso do Chumbo. Entretanto, aqueles considerados essenciais (Fe, Zn, Cu, Mn, I, Se, Mo, Co e Cr) também prejudicam a saúde e podem causar até mesmo a morte, quando ingeridos em altas concentrações^{2,3}. Portanto, na maioria dos casos, a diferença entre toxidade e essencialidade é uma questão de concentração.

Em outras palavras, o caráter tóxico ou essencial de cada micronutriente pode ser definido por um intervalo de concentração. Os elementos que apresentam um intervalo entre essencialidade e toxidez mais estreito são normalmente considerados sob o aspecto tóxico e aqueles que apresentam um intervalo mais extenso são considerados sob o aspecto essencial ².

Investigando o histórico da indústria alimentícia, de uma década atrás, observa-se que não existiam muitas informações no Brasil sobre a composição dos alimentos. As tabelas de composição de alimentos utilizadas eram geralmente desatualizadas, pouco confiáveis (em função da metodologia utilizada), incluíam produtos pouco ou não mais consumidos e muitas vezes, só consideravam a composição dos alimentos no estado cru, sem levar em conta possíveis modificações durante o seu preparo³. Hoje, existem mais dados disponíveis para os alimentos brasileiros. Considerando os macro e micronutrientes inorgânicos ainda há muito para ser feito, mas alguns dados já estão disponibilizados, após o extenso trabalho realizado pelo Grupo TACO (tabela brasileira de composição de alimentos), coordenado por docentes da Unicamp⁴.

Entre os produtos naturais pode-se destacar o mel, que é um alimento saboroso e de alto valor energético, utilizado como adoçante e que é conhecido por suas propriedades terapêuticas⁵. O mel é também usado externamente devido às suas propriedades antimicrobianas e antissépticas, ajudando a cicatrizar e a prevenir infecções em feridas ou queimaduras superficiais, além de ser largamente empregado na área cosmética (cremes, máscaras de limpeza facial, tônicos, etc.) devido às suas qualidades adstringentes e suavizantes^{6,7}.

2

No Brasil, era comum o fornecimento direto de mel por pequenos produtores artesanais. Nos últimos anos, porém, verifica-se um aumento na industrialização deste produto e, neste caso, pode ocorrer alterações no seu valor nutricional devido a fontes de perda e/ou contaminação inerentes ao processo⁸, além da contaminação ambiental⁹⁻¹¹.

Tendo em vista esses aspectos, estudos relacionados ao monitoramento de espécies presentes em mel são importantes para investigar sua composição química e nutricional. Diversos trabalhos foram publicados, mas a maioria aborda os macronutrientes. Além disso, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)¹² exige das indústrias apenas a indicação dos teores de Ca, Fe e Na, nos rótulos dos alimentos. Por outro lado, estudos sobre as espécies inorgânicas, incluindo micronutrientes minerais, também devem ser considerados, pois estas espécies possuem um valor tóxico ou essencial, dependendo da concentração em que se encontram no mel².

A determinação de elementos minerais no mel utilizando técnicas de análise multielementares, como a espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado (ICP OES), viabiliza procedimentos rápidos e simples para monitorar macroelementos e micronutrientes minerais neste produto, podendo ser empregados em estudos sobre a sua composição química. A técnica de ICP OES pode ser usada também para um controle de qualidade mais minucioso, visando obedecer a normas e exigências necessárias para exportação.

Do ponto de vista da química analítica, o mel é uma mistura de carboidratos bastante complexa. A determinação de componentes inorgânicos em produtos alimentícios ricos em açucares é um desafio analítico devido à interferência da matriz, o qual pode ser contornado através de diluições sucessivas. Neste caso, entretanto, a diluição pode reduzir a concentração dos elementos de interesse abaixo dos limites de detecção, inviabilizando a determinação.

Pré-tratamentos de amostras são requeridos para a destruição da matéria orgânica e/ou para extrair os íons metálicos ligados a complexos orgânicos.

3

Obviamente, a seleção do procedimento adotado deve levar em consideração os analitos de interesse e a técnica instrumental que será utilizada. Muitas técnicas de pré-tratamento são propostas para a determinação de impurezas metálicas em mel, açúcares e alimentos em geral, sendo que na maioria dos casos é necessária a mineralização da matriz^{11,13}.

As técnicas instrumentais mais utilizadas para a determinação de elementos metálicos em amostras de mel são a Espectrometria de Absorção Atômica com chama (FAAS)^{9,10,14,15}, Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica (ETAAS)¹⁴⁻¹⁶ e a Espectrometria de Emissão Óptica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES)^{14,17-19}, mas outras técnicas, como Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)^{20,} Fluorescência de Raios-X com Reflexão Total²¹, Voltametria^{22,23} e Cromatografia de Íons²³ também são utilizadas. Todas requerem o tratamento da amostra, que envolve etapas de diluição ácida, extração ou decomposição por via úmida, necessária para evitar problemas relacionados a altas concentrações de matéria orgânica no atomizador/tocha.

A literatura descreve muitas pesquisas dedicadas a elaborar formas alternativas de pré-tratamento de matrizes complexas. Viñas *et al.* utilizaram um procedimento de digestão enzimática para promover a análise de especiação de arsênio em produtos alimentícios usando a técnica de geração de hidretos após a separação das espécies de As por cromatografia líquida (LC-HGAAS)²⁴.

loannidou e colaboradores publicaram um método para a análise de traços de elementos metálicos de caráter tóxico em méis e acúcares por ICP OES apenas diluindo as amostras, porém foi relatada recuperação insuficiente para Pb e Zn²⁵.

Mendes e colaboradores estudaram diversas formas de pré-tratamento de mel, de diferentes regiões do Brasil para análise por ICP OES, concluindo que o uso de um banho de ultrassom, permite a determinação de diversos elementos com boa precisão e exatidão^{19, 26}.

Buldini *et al.* aplicaram a fotólise utilizando radiação ultravioleta (UV) em amostras de mel para posterior análise por voltametria, cromatografia de íons e ETAAS. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos com mineralização assistida por microondas, verificando que a fotólise oxidativa por UV mostrou-se superior à mineralização por microondas, pois exige menor quantidade de reagentes²³.

Neste trabalho, estudou-se o tratamento da amostra para a determinação de Mn, Se, Zn, Cu, Co, Fe, Al, Mo, Mg e Ca em amostras de mel, por serem possíveis constituintes da matriz, além de avaliar eventuais contaminações das amostras por elementos potencialmente tóxicos como Cd e Pb, Cr, Ni, As e Ba. A presença de Na e K também foi avaliada nas amostras, porém, com menor ênfase, pois a presença destes macroelementos na matriz já é bastante explorada na literatura ^{6, 7, 27,28}.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A espectrometria de emissão óptica em plasma indutivamente acoplado

Um dos grandes avanços na Química Analítica foi o desenvolvimento da técnica de Espectrometria de Emissão Óptica utilizando plasma como fonte de excitação. O plasma é um gás parcialmente ionizado a altas temperaturas, variando em um gradiente de ~ 10.000 a 6.000 K com números aproximadamente iguais de elétrons e cátions, tornando-o eletricamente neutro. Contudo, o plasma apresenta a capacidade de conduzir corrente elétrica e de interagir com campos magnéticos²⁹⁻³¹.

A técnica de ICP OES baseia-se nas observações de emissões radiativas dos elementos constituintes da amostra, em um plasma, geralmente de argônio. No plasma obtêm-se átomos e íons livres que podem ser detectados e determinados quantitativamente em função das intensidades de emissão em comprimentos de onda específicos. A vantagem do uso de um plasma como fonte de excitação, quando comparado com uma chama, é a obtenção de temperaturas mais altas e ambientes quimicamente menos reativos²⁹⁻³¹.

Um espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado constitui-se, basicamente, de um gerador de rádio freqüência, um sistema para introdução da amostra, uma tocha, um sistema de gás argônio, um sistema óptico para a detecção do sinal analítico e um sistema computacional para controle do equipamento²⁹⁻³¹ (Figura 1).

O gerador de rádio-freqüência (RF) é um dispositivo elétrico empregado como fonte de potência que tem a função de manter o plasma²⁹. O sistema de nebulização é composto, em geral, por um nebulizador e uma câmara de nebulização. O nebulizador produz um aerossol da amostra, que é conduzido ao plasma pela câmara, a qual favorece a introdução apenas das gotas de menor tamanho³¹.



Figura 1: Esquema de um instrumento de ICP OES³¹.

Existem dois tipos de nebulizadores usualmente empregados nos equipamentos de ICP OES: os pneumáticos e os ultra-sônicos, sendo os primeiros os mais comuns. Dentre a variedade de nebulizadores pneumáticos os concêntricos são mais eficientes e, por isso, os mais populares. Entretanto, são suscetíveis de entupimento. Ao contrário, os nebulizadores *cross-flow* e *cone spray* são menos suscetíveis, uma vez que apresentam um diâmetro maior do capilar de amostra³¹.

No nebulizador *cross-flow* o fluxo do gás nebulizador (Ar) é perpendicular ao fluxo da amostra e no *cone spray* a amostra flui sobre um orifício por onde passa o gás nebulizador, sendo mais adequado para amostras viscosas e com elevadas concentrações de sais e/ou soluções com partículas em suspensão.

Neste trabalho, empregou-se apenas o nebulizador de fluxo cruzado (cross-flow) (Figura 2).



Figura 2: Nebulizador tipo Cross-Flow³¹.

A tocha é um dispositivo de quartzo onde o plasma é formado. É constituída por três tubos concêntricos por onde passam os fluxos do argônio principal, auxiliar e nebulizador. O fluxo do argônio principal é responsável pela manutenção do plasma e proteção das paredes da tocha contra a fusão; o fluxo nebulizador introduz a amostra no plasma e o fluxo auxiliar tem a função de direcionar o aerossol da amostra para dentro do plasma²⁹. A Figura 3 mostra uma tocha, com o plasma formado em sua extremidade, e o gradiente de temperatura do mesmo.



Figura 3: Tocha de quartzo e o gradiente de temperatura do plasma³¹.

Entre as partes constituintes do espectrômetro, a mais complexa é o sistema óptico. Existem dois tipos de sistemas: um para medidas seqüenciais do sinal e outro para medidas simultâneas, e a observação do sinal pode ser realizada de duas formas: na configuração radial ou axial da tocha²⁹⁻³¹.

Na configuração radial são captadas as emissões que ocorrem no raio da tocha, em uma dada altura de observação, enquanto as emissões que ocorrem no eixo da tocha são captadas na configuração axial, como ilustrado na Figura 4.

Os instrumentos que fazem a leitura do sinal apenas em uma das configurações operam de maneira seqüencial ou simultânea, enquanto os instrumentos de dupla visão operam de maneira seqüencial, em relação ao modo de observação do sinal, e simultânea na realização da leitura²⁹⁻³¹.



Figura 4: Visualização da tocha em instrumentos equipados com dupla visão, axial e radial e representação esquemática do espectrômetro Echelle³¹.

Como na configuração axial toda a região ao longo do eixo do plasma é observada, obtém-se, em geral, maiores sensibilidades e melhores limites de detecção (LOD) em relação à configuração radial²⁹⁻³¹. Entretanto, o uso da configuração axial é mais suscetível a interferências, devidas, em especial, aos processos de auto-absorção e recombinação que ocorrem na extremidade do plasma³².

Nos instrumentos comercialmente disponíveis existem diferentes recursos para eliminar a região mais fria do plasma como o uso de uma interface gasosa, de N₂ ou Ar, posicionada a 90º em relação à tocha, chamado de "shear gas" ou gás de corte. Porém, as interferências são apenas minimizadas e não eliminadas³³.

Logo, o desempenho analítico das configurações radial e axial pode variar com o tipo de amostra e com os elementos a serem determinados, sendo desejável avaliar experimentalmente a configuração mais adequada, de acordo com os objetivos da análise^{34,35}.

Atualmente, existem aplicações para a técnica de ICP OES em praticamente todas as áreas de análise química (amostras geológicas, agronômicas, biológicas, águas, cosméticos, polímeros, aço, entre outros). Seu sucesso maior deve-se à capacidade multielementar, rapidez analítica e simplicidade de operação, razões pelas quais muitos laboratórios de análise estão equipados com um instrumento de emissão óptica ³³.

Outras características da técnica são: excelente fonte de emissão, relativamente livre de interferências químicas, devido à alta temperatura alcançada; curvas analíticas lineares com até seis ordens de grandeza; limites de detecção geralmente baixos, na faixa de µg'L⁻¹; satisfatórias precisão (desvios relativos na faixa de 1 %) e exatidão^{29,33}.

2.2. O mel e sua origem

O mel é um produto natural produzido por abelhas a partir do néctar das flores, secreções de plantas e excreções de insetos parasitas que se alimentam de seiva. Estes líquidos açucarados são procurados e colhidos pelas abelhas e armazenados em colméias onde passam por processos enzimáticos até a maturação³⁶.

Basicamente, o mel é uma solução saturada de uma mistura de açúcares em água. Entretanto, variáveis como as floradas de origem e as espécies de abelhas, juntamente com outros componentes conferem a este produto um elevado grau de complexidade^{7,19}.

Dentre os principais componentes do mel, podemos destacar os monossacarídeos frutose e glicose, que somados compõem 80% da quantidade total de açúcares presentes. Já os dissacarídeos, como sacarose e maltose, somados podem chegar a até 10% da composição total de açúcares; em menores quantidades já foi constatada a presença de açúcares incomuns como isomaltose, nigerose, leucarose e turanose ⁵⁻⁷.

Durante o processo de produção, ocorre a adição, pelas abelhas, de enzimas ao néctar, causando mudanças químicas que aumentam a quantidade de açúcar, o que não seria possível sem essa ação enzimática. A enzima invertase adicionada pelas abelhas transforma 3/4 da sacarose inicial do néctar coletado nos açúcares invertidos glicose e frutose, ao mesmo tempo em que açúcares superiores são sintetizados, não estando presentes no material vegetal original. Sua ação é contínua até que o "amadurecimento" total do mel ocorra⁷.

Dessa forma, pode-se definir o amadurecimento do mel como a inversão da sacarose do néctar pela enzima invertase e sua simultânea mudança de concentração. A enzima invertase irá permanecer no mel conservando sua atividade por algum tempo, a menos que seja inativada pelo aquecimento. Mesmo assim, o conteúdo da sacarose do mel nunca chega a zero. Essa inversão de sacarose em glicose e frutose produz uma solução mais concentrada de açúcares, aumentando a resistência desse material à deterioração por fermentação, promovendo, assim, o armazenamento de um alimento altamente energético em um espaço mínimo⁷.

Diversas outras enzimas, como diastase, catalase, alfa-glicosidase, peroxidase, lipase, amilase, fosfatase ácida e inulase, já foram detectadas no mel por diferentes autores³⁷⁻³⁹.

A diastase quebra o amido, sendo sua função na fisiologia da abelha ainda não claramente compreendida, podendo estar envolvida com a digestão do pólen. Como a diastase apresenta alto grau de instabilidade frente à temperaturas elevadas, sua presença ou ausência se faz importante na tentativa de detectar possíveis aquecimentos do mel vendido comercialmente, apesar de que também em temperatura ambiente ela pode vir a deteriorar-se quando o armazenamento for prolongado³⁹.

A catalase e a fosfatase são enzimas que facilitam a associação açúcarálcool, sendo um dos fatores que auxiliam na desintoxicação alcoólica pelo mel⁴⁰. Entretanto, a catalase presente no mel se origina do pólen da flor e sua quantidade depende da fonte floral e da quantidade de pólen coletado pelas abelhas⁴¹.

A glicose-oxidase, que em soluções diluídas é mais ativa, reage com a glicose formando ácido glucônico (principal composto ácido do mel) e peróxido de hidrogênio, esse último capaz de proteger o mel contra a decomposição bacteriana até que seu conteúdo de açúcares esteja alto o suficiente para fazê-lo²⁷.

Segundo White *et al.*⁴², a principal substância antibacteriana do mel é o peróxido de hidrogênio, cuja quantidade é dependente tanto dos níveis de glicoseoxidase, quanto de catalase, uma vez que a catalase destrói o peróxido de hidrogênio.

Uma das propriedades relevantes das enzimas é a sua especificidade sobre o substrato, uma vez que atacam um número limitado de compostos e não têm qualquer efeito sobre outros. Também são importantes a atividade, mesmo em baixas concentrações, a rapidez de ação e a não toxicidade²³.

O conteúdo mineral do mel é de aproximadamente 0,17 %, mas pode variar bastante conforme a sua origem. Desde 1984, quando Crane²⁷ publicou os primeiros resultados a respeito do conteúdo mineral de elementos metálicos de méis coletados em colméias próximas ou distantes de rodovias, este alimento é considerado também como um indicador de poluição ambiental.

Um exemplo considerável foi um estudo conduzido na Suécia após o acidente de Chernobyl, para monitorar os níveis de Césio radioativo em um grupo de alimentos, inclusive o mel. As abelhas, em sua busca por alimento, podem carregar junto com o néctar qualquer contaminante que esteja depositado sobre as flores ⁴³.

Caroli e colaboradores estudaram o conteúdo mineral de uma série de amostras de mel por ICP OES e ICP-MS, diretamente após a coleta e também após o processamento e envase. Os autores observaram que pode ocorrer a contaminação de diversos elementos-traços de diferentes formas, nem sempre fáceis de identificar, com destaque para as concentrações de Cr, Pb e Sn que em amostras de mel processadas apresentam valores maiores do que nas amostras recém coletadas ^{44,45}.

Além disso, a determinação de íons metálicos de caráter tóxico e de micronutrientes é muito importante para o controle de qualidade dos alimentos de uma forma geral.

2.3. Características de elementos que podem ser encontrados em mel

A seguir, são apresentadas algumas características e propriedades de elementos que podem ser encontrados em mel. Quando disponíveis, são reportados valores diários de ingestão recomendados.

OBS: A ANVISA refere-se aos valores diários recomendados para ingestão de nutrientes utilizando como fonte de referência os valores estabelecidos pela USDA ("United States Department of Agriculture")¹².

- Alumínio: É pouco absorvido pelo organismo, sendo eliminado pelas fezes. É um elemento presente em alimentos por ser abundante na litosfera⁸.

 - Cálcio: É necessário para o crescimento e desenvolvimento normal do esqueleto e dentes. Está envolvido em vários processos metabólicos como a coagulação sangüínea e a contração muscular. A ingestão elevada de Ca pode levar à calcificação excessiva dos ossos e de tecidos moles como os rins³. O valor diário (VD) de ingestão recomendado para Ca é de 1000 mg⁴⁵.

- **Cobre:** Participa da síntese da hemoglobina na oxidação do ferro, no plasma sanguíneo, através da ferroxidase. Está presente nas enzimas responsáveis pela síntese de elastina e colágeno e na enzima citocromo oxidase, que catalisa a redução do oxigênio molecular para água, na célula. Intoxicação por este elemento é caracterizada pelo seu acúmulo no fígado, causando náuseas e vômitos⁴⁷. O VD recomendado para ingestão de Cu é de 2 mg⁴⁶.

 Ferro: Atua principalmente sobre a hemoglobina, prevenindo a anemia, e sobre as enzimas citocromo oxidases, envolvidas na produção oxidativa de energia (ATP). É metabolizado na presença de cobre⁴⁷ e o VD é de 18 mg⁴⁶.

Magnésio: Participa de vários processos bioquímicos e fisiológicos, como o metabolismo da glicose, a síntese de proteínas, a atividade e a transmissão neuromuscular³. O VD de Mg recomendado para ingestão é de 400 mg⁴⁶.

- **Manganês:** Atua como cofator de várias enzimas, como a carboxilase. É necessário para a síntese de mucopolissacarídeos, relacionados com a síntese de polissacarídeos e glicoproteínas. A deficiência de manganês inibe a síntese do colesterol e pode causar infertilidade. Além disso, tanto o excesso quanto a carência de Mn podem afetar o cérebro⁴⁷. O VD para ingestão é de 2 mg de Mn⁴⁶.

Potássio: É o principal cátion do líquido intracelular. Regula a pressão osmótica
 e a transmissão de impulsos nervosos³. O VD é de 3500 mg⁴⁶.

Selênio: Interage com metais pesados, como cádmio e mercúrio, reduzindo o efeito toxicológico dos mesmos³. O VD para ingestão é de 70 μg⁴⁶.

- Sódio: Está presente em todos os líquidos corporais e tecidos e é o componente principal do líquido extracelular. Mantém a pressão osmótica dos líquidos corporais, preserva a irritabilidade dos músculos e a permeabilidade das células³.
 O VD recomendado para a ingestão é de 2400 mg de Na⁴⁶.

 Zinco: É um dos constituintes da anidrase carbônica, da fosfatase alcalina e de uma série de desidrogenases e peptidases. É necessário para a síntese de RNA e de outras proteínas. É essencial para o crescimento e desenvolvimento normal do esqueleto³. O VD para ingestão é de 15 mg⁴⁶.

2.4. Conceitos de Fotoquímica

2.4.1. Definição e campos de estudo

Fotoquímica é a ciência que estuda todos os fenômenos químicos e físicos que ocorrem após a excitação eletrônica da matéria provocada pela radiação eletromagnética⁴⁹. Assim, a fotoquímica engloba estudos⁴⁸:

 de processos de criação do estado excitado, como a excitação por luz ou outra radiação eletromagnética ou ionizante apropriada e a quimiexcitação ou criação de estados excitados por intermédio de reações químicas altamente exotérmicas;

- da dinâmica de relaxação e da redistribuição da energia de excitação entre estados excitados da molécula imediatamente após a excitação;

 - dos diversos processos de luminescência através dos quais os estados excitados decaem ao estado fundamental com a emissão de um fóton, tais como a fluorescência e fosforescência, a quimiluminescência, a radioluminescência e a eletroluminescência;

- de todos os processos que desativam o estado excitado através da conversão da sua energia diretamente em calor (conhecidos como transições não radiativas);

- dos mecanismos de transferência da energia de excitação de uma molécula doadora para uma molécula aceptora;

- das transformações químicas sofridas pelo estado excitado, que resultam na formação de novas espécies químicas. As transformações químicas típicas de estados excitados incluem a fragmentação homo- ou heterolítica da molécula, com a produção de intermediários reativos (radicais livres, carbenos, cátions), rearranjos estruturais da molécula, reações bimoleculares como substituição ou dimerização e reações de óxido-redução.

2.4.2. Alguns aspectos teóricos e práticos sobre processos fotoquímicos

A radiação ultravioleta compreende a região do espectro eletromagnético entre 400 e 100 nm. O Comitê Internacional de Iluminação ("Comission Internacional de l'Eclairage") recomenda a classificação em UV-A (400-315 nm) chamado de ultravioleta próximo, UV-B (315-280 nm) e UV-C (280-100 nm) denominado como ultravioleta extremo ou de vácuo^{48,49}.

A denominação ultravioleta de vácuo deve-se a necessidade de eliminar o ar atmosférico quando se trabalha nesta faixa, pois o O_2 absorve a radiação em λ < 200 nm⁴⁹.

17

Os mecanismos fotoquímicos de reação envolvem várias etapas que podem ser agrupadas em processos primários e secundários. Nos processos primários ocorre a interação direta entre a radiação e as espécies químicas presentes no meio, sejam elas próprias os alvos da reação, sejam outras substâncias adicionadas ou presentes naturalmente (como O₂ dissolvido)⁴⁹.

O primeiro passo é sempre uma transição eletrônica, ou seja, a passagem para um estado excitado. A reatividade de espécies excitadas eletronicamente é, evidentemente, bem diferente daquela de moléculas no estado fundamental e, portanto, sua subseqüente evolução através de mecanismos proibidos às reações térmicas as leva a formar produtos que seriam impossíveis alcançar a partir da molécula no estado não excitado^{48, 49}.

As espécies excitadas (AB*) logo evoluem de várias maneiras:

Dissociação	$AB^* \rightarrow AB^{**}$
$AB^* \rightarrow A + B$	$AB^* + CD \rightarrow AB + CD^*$

lonização		
$AB^* \rightarrow AB^+ + e^-$	Luminescência (fluorescência ou	
	fosforescência)	
Reação com outras espécies	$AB^{\star} \rightarrow AB + h\nu$	
$AB^* + E \rightarrow ABE$		
$AB^* + E \rightarrow AE + B$	"Quenching"	
	$AB^* + M \rightarrow AB$	
Isomerização	(a energia é dissipada por M na forma de	
$AB^* \rightarrow BA$	energia vibracional ou translacional)	

Transferência de energia intra ou intermolecular

Os processos secundários são reações térmicas convencionais, que permitem converter espécies intermediárias geradas durante a primeira etapa e são fotoquímicos somente no sentido de que envolvem espécies formadas por efeito da radiação. Tais intermediários incluem espécies que são típicas das reações fotoquímicas, como átomos e radicais livres, que apresentam uma reatividade elevada e peculiar, gerando reações em cadeia. Por exemplo:

$$R\bullet + O_2 \rightarrow ROO\bullet$$
$$ROO\bullet + RH \rightarrow ROOH + R\bullet$$

Neste contexto, destaca-se o papel do O₂ e a formação de espécies altamente reativas como o radical hidroxila, apontado como o maior responsável no processo de destruição de moléculas orgânicas:

$$O_2 + hv \rightarrow 2O$$

$$O_2 + O \rightarrow O_3$$

$$O_3 + H_2O \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

$$H_2O_2 + hv \rightarrow HO^{\bullet}$$

ou, ainda, o radical superóxido:

$$H_2O_2 \quad \leftrightarrows \quad HO_2^- + H^+$$

$$HO_2^- + O_3 \rightarrow O_3^- \bullet + HO_2^\bullet \quad \leftrightarrows \quad O_2^- \bullet + H^+$$

Aqui, merece destaque a formação intermediária de oxidantes característicos, como H₂O₂ e O₃.

Foram evidenciados diversos esquemas de ação envolvendo HO•, seja de propagação radicalar, adição ou substituição:

 $HO\bullet + RH \rightarrow R\bullet + H_2O$
Processos fotoquímicos empregados para a decomposição de amostras orgânicas fazem parte de uma tendência da química analítica que se iniciou entre a década de 1960 e 1970. Segundo Golimowski e Golimowska⁵⁰, autores de ampla revisão sobre o assunto, no ano de 1966 foi publicado o trabalho pioneiro que utilizou radiação ultravioleta para promover a decomposição de matéria orgânica em água do mar visando a determinação de elementos e compostos inorgânicos.

Nos anos seguintes essa metodologia foi aplicada com grande freqüência em amostras de águas naturais (rios, lagos, chuva, neve, mar, orvalho, etc.) para a determinação voltamétrica do conteúdo de elementos metálicos⁴⁹⁻⁵².

3. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi desenvolver um método para o pré-tratamento de amostras de mel e posterior quantificação dos elementos metálicos por ICP OES.

Este estudo propõe a investigação da decomposição enzimática e da fotólise oxidativa que serão comparadas com o método de digestão por via úmida, utilizando ácidos minerais tradicionalmente empregados para preparo de amostras de méis e açúcares.

Para as medidas por ICP OES foi avaliada a influência da utilização de padrão interno em cada um dos diferentes métodos, assim como a precisão e exatidão para as diferentes espécies.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiais e Métodos

Foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica, ICP OES Perkin-Elmer, modelo Optima 3000 DV, com configuração de tocha axial e radial, equipado com uma fonte de rádio freqüência (RF) de 40 MHz, um detector multielementar de estado sólido do tipo SCD (*segmented array charge coupled device*), uma bomba peristáltica, uma câmara de nebulização duplo-passo do tipo "Scott", um nebulizador com ranhura em V ("cross-flow"), e um tubo injetor da tocha com 2,0 mm de diâmetro interno. O sistema é totalmente controlado por computador, com o software "PE Winlab".

Empregou-se argônio com 99,996 % de pureza (White Martins). As condições experimentais de operação do ICP OES estão descritas na Tabela 1.

É válido ressaltar que para o presente estudo optou-se por fixar o método otimizado por Mendes²⁶ para análise de mel e apenas variar as diferentes formas de preparo das amostras.

Tabela T. Condições experimentais	
Potência de RF (kW)	1,3
Vazão de nebulização (L min ⁻¹)	0,6
Vazão do argônio auxiliar (L min ⁻¹)	15,0
Vazão do argônio principal (L min ⁻¹)	0,5
Vazão de bombeamento (mL min ⁻¹)	1,0
Altura da visão radial (mm)	15
Correção de fundo	3,0 pontos
Tempo de integração (s) e leitura (s)	1-5; 30
Número de replicatas	3
Elementos (comprimentos de onda /nm) I – Linha atômica ou II – Linha iônica	Ca(317,933 ^a ; 315,887)II, K(766,490)I, Mg(279,553)II, Mn(257,610)II, Cd(214,438)II, Pb(220,353)II, Se(196,026)I, Zn(213,856)I, Ba(233,572)II, Cu(324,754)I, Co(228,616)II, Fe(238,204)II, Cr(205,560)II, Ni(232,003)I, As(193,696)I, Mo(202,031)II, Na(330,237)I, Y ^b (371,029)II

Tabela 1: Condições experimentais utilizadas no ICP OES²⁶

(ª) Comprimento de onda utilizado apenas na quantificação de Ca nas amostras.

(^b) Utilizado como padrão interno (1 mg L⁻¹) nas análises de mel.

Soluções-estoque de Mn, Cd, Pb, Se, Zn, Ba, Cu, Co, Fe, Al, Cr, Ni, Tl, As, Sb, Mo, V, Na, Mg, Ca e K na concentração de 1000 mg L⁻¹ em HNO₃ 2 % v/v foram empregadas no preparo de padrões multielementares contendo os elementos de interesse e diluídos em HNO₃ 1 % v/v. Para tal, foi usado HNO₃ concentrado (Merck, P.A.) e água deionizada pelo sistema Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, USA), apresentando condutividade de 18,2 M Ω cm.

Todas as curvas analíticas foram preparadas de acordo com o procedimento de cada experimento. Ou seja, foram usadas curvas na mesma matriz da solução final de cada protocolo analítico estudado para evitar efeitos de matriz.

Foram utilizadas 02 amostras de mel (laranjeira), certificadas pelo IB-USP/SP durante todo o desenvolvimento do trabalho. Amostras de outras origens foram analisadas após a otimização do procedimento de tratamento da amostra.

4.2. Decomposição Enzimática utilizando a enzima Invertase

A invertase, utilizada neste estudo, foi obtida de acordo com procedimento adaptado, descrito por Mendes²⁶ para obtenção de uma solução de invertase.

Foram triturados 20,0 g de fermento de pão liofilizado em um almofariz, transferindo-se a massa para um erlenmeyer de 125 mL com a adição de 80 mL de água deionizada. A mistura foi submetida a um banho de ultrassom por 30 minutos para que o material citoplasmático passasse para a solução. Em seguida centrifugou-se a solução, descartou-se o resíduo sólido e ao sobrenadante adicionou-se 100 mL de acetona a -10 °C. A mistura foi deixada em repouso por aproximadamente 5 minutos e filtrada, descartando-se o filtrado. O resíduo da filtração, constituído por um mosto enzimático rico em invertase foi pesado e diluído para 25,0 mL com água deionizada.

No tratamento da amostra, os reagentes foram adicionados em um balão volumétrico de 25,0 mL na seguinte ordem e quantidades: 3,5 g de uma solução de mel aproximadamente 50 % (m/m), 14,5 mL de água deionizada, 2,0 mL de uma solução tampão (ácido acético/acetato de sódio) com pH igual a 4,6 e 1,0 mL da solução de enzima invertase parcialmente purificada. A mistura foi colocada em banho maria, a 37°C, por 24 horas. O volume da mistura foi ajustado para 25,0 mL e diluído cinco vezes para a análise.

A avaliação dos resultados foi feita em experimentos de adição e recuperação dos analitos em dois níveis de concentração, para uma única amostra de mel e foram também comparados com os resultados de leituras de mel preparado após diluição simples em água ultrapura, mineralização em ácido sulfúrico e procedimento de fotólise oxidativa.

4.3. Mineralização com Ácido Sulfúrico

Em um béquer de 250 mL, previamente limpo, pesou-se cerca de 6,0 g do mel de abelhas utilizado nos estudos e adicionaram-se os reagentes na seguinte ordem e quantidades: 0,25 mL de uma solução de Y⁺ 100 mg L⁻¹ (utilizado como padrão interno) e 10 mL de HNO₃. As soluções foram mantidas em pré-digestão por cerca de 8 horas com posterior adição de 2,5 mL de H₂SO₄. Os béqueres foram levados a 80 °C, em chapa de aquecimento, para a redução do volume das soluções até aproximadamente 20% do volume inicial (aproximadamente 4 horas).

As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, adicionaram-se 5,0 mL de H_2O_2 e retomou-se o aquecimento a 80°C, por mais 2 horas. As soluções foram transferidas para balões de 25,0 mL.

A avaliação dos resultados foi feita por experimentos de adição e recuperação de analitos em dois níveis de concentração, para a mesma amostra utilizada na condução de todos os trabalhos.

4.4. Fotólise Oxidativa

No estudo de fotólise oxidativa, utilizou-se um reator construído no próprio laboratório, com a possibilidade de trabalho em potências de 125 W ou 400 W.

O fotoreator foi construído utilizando para o corpo principal um cilindro de aço inoxidável com 38 cm de altura e 12,5 cm de diâmetro interno. O controle de temperatura do sistema foi projetado para resfriar o tubo de aço através de uma serpentina de circulação ao redor do corpo do reator e por um microventilador (110/220V, 15 W) na parte inferior do tubo, que força a circulação de ar dentro do equipamento (Figura 5).



Figura 5: Representação esquemática da construção do reator.

As fontes de radiação ultravioleta usadas para o reator foram de lâmpadas de vapor de mercúrio (Philips, 220V), uma com potência de 125 W e outra de 400 W. As lâmpadas tiveram seu bulbo externo retirado e a mudança no tipo da lâmpada é feita com a troca do conjunto soquete + lâmpada. Tanto o sistema de ventilação quanto o reator da lâmpada possuem controles acionados por chaves independentes.

Para a digestão da amostra, cerca de 60 g de mel foram pesados e diluídos para um balão volumétrico de 100 mL. As alíquotas foram transferidas para os tubos de quartzo utilizando uma pipeta volumétrica de 10 mL. Os padrões foram adicionados nas amostras utilizando-se micropipeta Gilson (100 – 1000 μ L⁻¹).

As amostras receberam, então, os volumes adequados de peróxido de hidrogênio (Carlo Erba 30%) e HNO₃ concentrado (Merck, P.A.), equivalente a cada experimento. Além disso, foram testados experimentos sem a adição de ácido nítrico.

As amostras foram transferidas para tubos de quartzo com 11 cm de altura e 1,2 cm de diâmetro (capacidade de 10 mL) ou 2,0 cm de diâmetro (capacidade de 25 mL).

Foi desenvolvido um sistema simples de refluxo individual em cada um dos tubos para evitar perda dos elementos voláteis e evaporação do solvente da solução contendo a amostra. Para esta finalidade, prepararam-se tampas de vidro com formato cônico, que evitavam perda por projeção de respingos e condensavam de maneira eficiente os vapores gerados durante o procedimento de exposição à radiação.

Foi construído um suporte de aço para os tubos (Figura 6), que possibilita a disposição radial das amostras ao redor da lâmpada. As dimensões permitem o pré-tratamento simultâneo de 9 frascos de amostras para os tubos de 25 mL ou de 13 frascos, para os tubos de 10 mL.

Outros aspectos do fotoreator estão detalhadamente descritos no capítulo de Resultados e Discussão.



Figura 6: Suporte construído para acomodar frascos de quartzo contendo as amostras de mel (60 % m/v)

4.5. Determinação do Conteúdo de Carbono

Para a determinação do conteúdo de carbono nas amostras (Total TOC-5000, Shimadzu), preparou-se uma solução diluindo aproximadamente 60 g da amostra de mel para 100 mL, com água deionizada. Esta solução foi denominada de *solução intermediária*.

Transferiu-se 10 mL da *solução intermediária* para os tubos de quartzo, pesou-se, em seguida adicionaram-se 6,0 mL de peróxido de hidrogênio 30% e homogeneizou-se. Os tubos foram acomodados na estante do reator e iniciou-se a contagem do tempo de exposição à radiação. Cada determinação foi realizada em triplicata.

A curva analítica foi construída utilizando-se 3 curvas para carbono inorgânico (IC) e 3 curvas para carbono total (TC), para 10, 100 e 300 mg L⁻¹. Foi feita a verificação da curva analítica utilizando padrão misto cuja validade é de aproximadamente uma semana, para checagem da análise.

Os estudos mais detalhados de conteúdo de carbono residual foram feitos apenas para avaliar o procedimento da fotólise oxidativa.

4.6. Irradiação das amostras

Para melhor compreensão dos processos que ocorrem durante a decomposição da amostra por radiação UV, foi utilizado um espectrofluorímetro, montado em laboratório, com os seguintes componentes (figura 7):

- Monocromador Hamamatsu, modelo 6256 B

- Conjunto de filtros de absorção/barreira/neutros/interferência, da Oriel Eletrooptics

- Eletrômetro Keithley 510C

- Amplificador "lock-in" EG&G Princeton Applied Research 5290 / obturador eletromecânico (chopper) EG&G 129

Para o registro dos resultados foi utilizado um microcomputador HP Vectra/VL2 (AT 486 66MHz) equipado com placa de comunicação GPIB e software Microsoft Basic 3.0 Professional Version.



Figura 7: Esquema de montagem do espectrofluorímetro utilizado.

4.7. Figuras de Mérito

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados para os diferentes elementos e diferentes métodos de preparo de amostra de acordo com Thomsen *et al.*⁵³:

$$LOD = \frac{3 \times BEC \times rsd}{100}; \ LOQ = \frac{10 \times BEC \times rsd}{100}; \ BEC = \frac{Csr}{SBR}; \ SBR = \frac{Isr - Ib}{Ib}$$

Sendo:

BEC = Concentração equivalente ao sinal de fundo.;

Csr = Concentração da solução padrão utilizada na calibração;

Isr e Ib = Intensidade de sinal da solução padrão utilizada na calibração (referência) e Intensidade de sinal da solução do branco, respectivamente;

rsd = Desvio padrão relativo para 10 medidas da solução do branco analítico do método.

Os LOD's para os diferentes procedimentos de preparo de amostra foram calculados multiplicando-se 3 vezes o desvio padrão relativo para 10 medidas do branco analítico pela concentração equivalente ao sinal de fundo e dividindo-se o produto por 100. Os LOQ's foram calculados multiplicando-se 10 vezes o desvio padrão relativo para 10 medidas do branco analítico pela concentração equivalente ao sinal de fundo e dividindo-se o produto por 100.

Em virtude de não haver materiais certificados de referência para amostras de mel, avaliou-se a exatidão dos diferentes métodos de tratamento das amostras através de experimentos de adição e recuperação dos analitos, estudados em dois níveis de concentração.

28

Todos os valores calculados foram obtidos utilizando as condições experimentais descrita na Tabela 1.

4.8. Aplicação analítica

Após a avaliação das figuras de mérito dos métodos estudados, promoveuse a análise de mel proveniente de diferentes regiões do país. Para isso, foi utilizado o método da fotólise oxidativa na condição otimizada de irradiação no pré-tratamento e nas condições instrumentais descritas na Tabela 1.

Com os dados obtidos, espera-se acumular novas informações sobre a composição mineral do mel de diferentes origens, pois no Brasil ainda são poucos os registros contendo este tipo de informação^{19,54-56}.

4.9. Tratamento dos resíduos gerados

O procedimento para o tratamento dos resíduos gerados nos experimentos executados é aquele seguido no Instituto de Química da Unicamp, o qual adota o procedimento de separação por precipitação em pH controlado.

As soluções de amostras enriquecidas e os resíduos das soluções-padrão foram estocados em galões de polipropileno para que o tratamento e o descarte fossem feitos de uma única vez, ao término deste trabalho.

O procedimento consistiu em tratar resíduos aquosos que contêm vários metais e separá-los da fase aquosa, por precipitação controlada. Resíduos ácidos contendo Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu, Al, Ni, Pb e Cd foram tratados com solução de NaOH (1 mol L⁻¹) até a faixa de pH entre 7 a 8 e FeCl₃ (1 mol L⁻¹); desta forma, os elementos metálicos em solução co-precipitaram na forma de hidróxidos com o Fe(OH)_{3 (s)}⁵⁷.

Os sais precipitados foram separados da fase aquosa por filtração comum, empregando papel de filtro qualitativo. A solução restante foi condicionada em pH 7, aproximadamente, com o auxílio de solução de H₂SO₄ a 1 mol L⁻¹ e a ela foi adicionada uma solução de Na₂S (78 g L⁻¹). Nesta etapa, precipita o selênio que, por filtração, foi retirado da fase aquosa, a qual foi posteriormente descartada diretamente na rede de esgoto⁵⁴.

Os resíduos sólidos obtidos foram mantidos nos papéis de filtro utilizados e, depois de secos, foram enviados para o depósito de resíduos sólidos do Instituto de Química da UNICAMP.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Decomposição Enzimática

Inicialmente, foram avaliados o desempenho e a potencialidade da decomposição enzimática, comparando os resultados obtidos com amostras sem tratamento algum, utilizando os mesmos fatores de diluição.

Para a redução de possíveis problemas ocasionados pela heterogeneidade da matriz no ato da amostragem, uma solução de mel 60% (m/v) foi preparada e homogeneizada em banho de ultrassom, por 30 minutos, utilizando-se 3,25 g desta solução intermediária da amostra de mel para a bateria de testes de digestão enzimática.

A maior dificuldade deste estudo foi obter a enzima invertase parcialmente purificada, pois o material isolado sofre rápida oxidação, além de ser de difícil manipulação. A solução gerada a partir do mosto enzimático também não poderia ser estocada e reutilizada por longos períodos, pois a mesma sofre deterioração, ficando escura e turva em menos de 48 horas.

Outra consideração importante relaciona-se ao ambiente propício para o crescimento de fungos criados nos frascos de amostras que sofrem o tratamento enzimático, fato esperado para uma solução rica em açúcares que é mantida em temperatura fisiológica, em pH controlado. Observou-se o surgimento de cepas de fungos não identificadas além de precipitação das soluções submetidas a períodos de digestão superiores a 24 horas, termostatizadas em 37 °C.

Após a otimização das condições de preparo, foi avaliada a influência da diluição das amostras que sofreram tratamento enzimático para determinar o melhor fator de diluição, levando em consideração a taxa de recuperação e os RSD's. Observou-se que sem diluição, as amostras apresentam RSD's maiores para alguns elementos e taxas de recuperação menores na maioria dos casos, fato esperado pela complexidade do ambiente espectral gerado no plasma, em função da utilização de solução tampão no preparo das amostras.

5.1.1 Limites de detecção, quantificação e resultados para a digestão enzimática:

Para cada procedimento estudado, foram determinados experimentalmente os valores de LOD e LOQ, com o método descrito no item 4.7.

Na Tabela 2 encontram-se descritos os valores obtidos para o método da digestão enzimática.

Tabela 2: Limites de detecção e limites de quantificação para o método da digestão enzimática:

Elemento (λ nm)	LOD (mg L)	LOQ (mg L)
Mn (257,610)II	0,003	0,01
Cd (214,438)II	0,003	0,010
Pb (220,353)II	0,05	0,2
Se (196,026)I	0,05	0,2
Zn (213,856)I	0,2	0,5
Ba (233,527)II	0,005	0,02
Cu (324,754)I	0,004	0,01
Co (228,616)II	0,004	0,01
Fe (234,204)II	0,02	0,06
Ca (317,933)II	0,02	0,07
K (766,490)I	0,1	0,4
AI (396,153)I	0,07	0,2
Cr (205,560)II	0,005	0,02
Ni (232,003)I	0,02	0,06
Mg (279,553)II	0,01	0,04
As (193,696)I	0,08	0,3
Mo (202,031)II	0,01	0,03

Os resultados obtidos para os experimentos de decomposição enzimática encontram-se organizados na Tabela 3.

Tabela	3 :	Resultados	obtidos	para	а	análise	de	mel	usando	0	método	de
decomp	osiç	ção enzimátio	ca (n=3).									

Elemento	Concentração	Nível Adição	% Recuperação	Nível Adição	% Recuperação
(λ,nm)	(µg g⁻') (RSD)	(mg L ⁻ ')	(RSD)	(mg L ⁻ ')	(RSD)
Mn (257,610)II	4,00 (1,1)	0,053	94,5 (2,0)	0,26	89,0 (0,7)
Se (196,026)I	1,45 (21,5)	0,13	99,0 (6,9)	0,65	97,5 (1,2)
Zn (213,856)I	0,65 (6,7)	0,11	96,1 (6,9)	0,53	85,2 (1,3)
Ba (233,527)II	0,19 (69,3)	0,13	119,2 (11,0)	0,65	90,3 (0,5)
Cu (324,754)I	0,075 (0)	0,27	93,1 (2,0)	1,32	91,8 (1,3)
Co(228,616)II	0,088 (49,5)	0,53	94,3 (0,5)	2,66	97,2 (0,3)
Fe (238,204)II	1,93 (5,9)	0,27	94,8 (1,7)	1,33	88,4 (1,3)
Ca (317,933)II	109,8 (0,7)	0,53	141,4 (8,5)	2,66	89,0 (1,1)
AI (394,091)I	2,67 (10,2)	1,32	102,2 (5,5)	6,6	93,1 (0,8)
Mg (279,553)II	67,9 (0,1)	0,40	222,5 (26,2)	2,0	89,4 (0,6)
Mo (202,031)II	0,1 (43,3)	0,26	88,2 (4,7)	1,3	90,4 (0,9)
Cd (214,438)II	< LOD	0,13	92,4 (4,9)	0,65	96,5 (0,5)
Pb (220,353)II	< LOD	1,33	84,0 (1,1)	6,64	87,9 (0,7)
Cr (205,560)II	< LOD	0,53	96,0 (4,4)	2,6	98,8 (0,2)
Ni (232,003)I	< LOD	0,53	88,0 (1,3)	2,6	89,8 (0,6)
As (193,696)I	< LOD	0,8	93,5 (4,2)	3,98	102,8 (0,6)

Os valores das recuperações obtidas ficaram entre 88 e 96% e RSD's, em sua maioria, abaixo de 10%. Contudo, observou-se que os elementos Se, Ba, Mg, Mo, Cu e Co não apresentaram RSD's aceitáveis nem resultados analíticos que pudessem ser considerados seguros, pois todos estão presentes na matriz em baixa concentração, com exceção do Mg.

A Tabela 4 mostra os resultados do experimento de decomposição enzimática, avaliando-se o emprego de padrão interno (1 mg L⁻¹ Y⁺). Observa-se

que a utilização do padrão interno promoveu um acréscimo nas taxas de recuperação (obtidas entre 93 e 98%, para a maioria dos elementos) e redução dos RSD's para alguns elementos.

Tabela 4: Resultados o	obtidos com o	método de	decomposição	enzimática	com	а
utilização de Y ⁺ padrão i	interno (n=3).					

Elemento (λ, nm)	Concentração (µg g⁻¹) (RSD)	Nível adição (mg L ⁻¹)	% Recuperação (RSD)	Nível adição (mg L ⁻¹)	% Recuperação (RSD)
Mn (257.610)II	4.35 (5.0)	0.053	93.3 (3.0)	0.26	97.2 (0.5)
Se (196.026)	0 39 (44 7)	0.13	99.7 (10.4)	0.65	106.2 (0.9)
Zp (010.956)		0,10	90 C (C 0)	0,00	
211 (213,000)1	< LOD	0,11	09,0 (0,9)	0,53	91,4 (1,1)
Ba (233,527)II	0,15 (86,6)	0,13	123,8 (14,9)	0,65	98,5 (0,4)
Cu (324,754)I	< LOD	0,27	93,0 (4,9)	1,32	99,5 (0,5)
Co(228,616)II	< LOD	0,53	87,4 (1,3)	2,66	88,5 (0,7)
Fe (238,204)II	1,88 (6,9)	0,27	97,9 (4,2)	1,33	96,6 (0,3)
Ca (317,933)II	116,1 (4,9)	0,53	133,5 (8,9)	2,66	97,5 (0,9)
AI (394,091)I	2,5 (4,6)	1,32	106,1 (4,9)	6,6	101,6 (0,9)
Mg (279,553)II	69,7 (4,9)	0,40	217,4 (24,6)	2,0	97,9 (0,4)
Mo (202,031)II	< LOD	0,26	90,7 (9,5)	1,3	98,6 (0,7)
Cd (214,438)II	< LOD	0,13	86,4 (1,4)	0,65	87,9 (0,7)
Pb (220,353)II	< LOD	1,33	90,1 (5,0)	6,64	96,5 (0,6)
Cr (205,560)II	< LOD	0,53	89,8 (1,5)	2,6	90,0 (0,4)
Ni (232,003)I	< LOD	0,53	93,6 (4,0)	2,6	98,4 (0,4)
As (193,696)I	< LOD	0,8	87,9 (1,2)	3,98	93,8 (0,8)

A utilização de padrão interno promoveu uma melhora significativa nos resultados para este experimento, minimizando flutuações do sinal analítico.

Podemos observar também que os elementos Ba, Ca e Mg (alcalinos terrosos) possuem valores de recuperação perturbados em ambos os experimentos. Possivelmente tais perturbações são ocasionadas por efeitos ambipolares que são os efeitos de alteração nas propriedades no plasma quando há uma alta população de elementos facilmente ionizáveis.

Elementos facilmente ionizáveis causam uma redução na temperatura de excitação ou promovem uma difusão dos analitos para fora da região analítica do plasma.

Contudo, a redução na massa de amostra nas soluções finais pelas etapas de diluição prejudicou a quantificação de elementos que estão presentes na matriz em baixas quantidades, tais como o Zn e Cu.

A principal tendência atual no desenvolvimento das operações em química analítica é a simplificação do processo, com a redução máxima dos custos envolvidos, com o objetivo de obtenção de mais quantidade e qualidade da informação desejada.

O processo enzimático envolve algumas variáveis de difícil controle, como por exemplo, a quantidade de enzima extraída, a cinética da reação envolvida, além do conhecimento em processos biológicos que deve ser desenvolvido pelo operador. Tais parâmetros, quando não controlados com o rigor necessário, resultam em desvios entre as medidas e baixa reprodutibilidade do método, inviabilizando sua utilização em operações de rotina.

Pensando desta forma, apesar dos resultados promissores obtidos com a digestão enzimática, foi avaliado um procedimento alternativo para o tratamento da amostra.

35

5.2 Decomposição com ácido sulfúrico e HNO₃

O método mais utilizado para o tratamento de amostras de açúcares e mel é o procedimento clássico por via úmida, empregando uma mistura ácida contendo H₂SO₄, H₂O₂ e HNO₃.

A digestão ácida foi conduzida de forma branda para evitar o superaquecimento das soluções e, conseqüentemente, perdas de amostra por projeção.

Os frascos foram cobertos com vidros de relógio para manter o refluxo da solução e evitar a contaminação das soluções por partículas de poeira (Figura 8).

A temperatura da digestão foi monitorada com amostras-controle, situadas em diferentes posições sobre a chapa de aquecimento. Os experimentos foram conduzidos de maneira que não fosse superada a temperatura máxima de 85 °C prevenindo, desta forma, a perda de elementos com características voláteis, como o Se e As.





Figura 8: Amostras em processo de digestão ácida

O uso de massa maior de amostra foi adequado para o monitoramento das concentrações dos elementos minoritários como o Mn, Cu e Zn, mas inviabilizou a determinação de Mg e K, na configuração axial da tocha, pela saturação das linhas. Ou seja, existem casos onde a visualização radial ainda é melhor. O Sódio pode ser determinado com boa precisão e exatidão usando este método.

5.2.1 Limites de detecção, quantificação e resultados para o método da decomposição ácida:

Os valores de LOD e LOQ, para o método da decomposição ácida, foram determinados (como descrito no item 4.7) e estão apresentados na Tabela 5.

Elemento (λ nm)	LOD (mg L)	LOQ (mg L)
Mn (257,610)II	0,0007	0,002
Cd (214,438)II	0,001	0,002
Pb (220,353)II	0,008	0,03
Se (196,026)I	0,009	0,03
Zn (213,856)I	0,2	0,5
Ba (233,527)II	0,003	0,01
Cu (324,754)I	0,002	0,006
Co (228,616)II	0,002	0,006
Fe (234,204)II	0,02	0,07
Ca (317,933)II	0,02	0,07
K (766,490)I	0,1	0,4
AI (396,153)I	0,15	0,5
Cr (205,560)II	0,003	0,01
Ni (232,003)I	0,02	0,05
Mg (279,553)II	0,01	0,04
As (193,696)I	0,02	0,06
Mo (202,031)II	0,00	0,01

Tabela 5: Limites de detecção e limites de quantificação para o método da decomposição ácida:

A Tabela 6 mostra os resultados obtidos para os elementos de interesse após a decomposição das amostras de mel usando o procedimento de digestão ácida.

Elemento (λ)	Concentração	Nível Adição	% Recuperação	Nível Adição	%Recuperação
	(µg g ⁻¹) (RSD)	(mg L ⁻¹)	(RSD)	(mg L ⁻¹)	(RSD)
Mn (257,610)II	4,09 (0,7)	0,02	342,5 (1,6)	0,26	120,6 (1,0)
Se (196,026)I	0,05 (20,4)	0,05	120,0 (14,5)	0,65	87,8 (8,6)
Zn (213,856)I	0,87 (1,0)	0,04	103,8 (1,6)	0,53	95,4 (2,8)
Ba (233,527)II	0,84 (12,4)	0,05	124,0 (25,9)	0,65	-
Cu (324,754)I	0,2 (9,7)	0,1	95,3 (2,1)	1,32	99,1 (2,3)
Co(228,616)II	0,06 (0)	0,2	98,3 (0)	2,66	95,3 (0,6)
Fe (238,204)II	2,29 (3,9)	0,1	113,4 (2,4)	1,3	94,8 (1,4)
Ca (317,933)II	114,7 (0,6)	0,2	747 (1,6)	2,65	161,7 (1,3)
AI (394,091)I	3,64 (5,7)	0,51	95,5 (2,3)	6,6	104,1 (1,2)
Na (330,833)I	17,61 (2,0)	1,0	124,5 (3,9)	13	146,5 (1,6)
Mo (202,031)II	0,05 (0)	0,1	103,7 (5,3)	1,3	100,6 (1,2)
Cd (214,438)II	< LOD	0,05	89,3 (1,3)	0,65	94,6 (1,5)
Pb (220,353)II	< LOD	0,51	3,07 (454)	6,64	46,6 (2,6)
Cr (205,560)II	< LOD	0,2	93,7 (1,1)	2,63	97,7 (1,6)
Ni (232,003)I	< LOD	0,2	99,4 (0,5)	2,66	101,1 (2,0)
As (193,696)I	< LOD	0,3	84,2 (4,3)	3,98	99,7 (0,3)

Tabela 6: Resultados obtidos com o método da mineralização ácida. Experimentos de adição e recuperação em dois níveis, sem padrão interno.

Neste experimento, foram observados grandes desvios nas recuperações de Mn, Ba, Ca e Pb, em ambos os níveis de adição. Para os elementos Mn e Ca os valores de recuperação foram elevados e para os elementos Ba e Pb foram obtidos valores dispersos, sendo em sua maioria valores muito baixos.

As suspeitas iniciais destes resultados para Mn e Ca foram direcionadas para possíveis fontes de contaminações, mas foram descartadas na repetição do experimento. Para o Ba e o Pb, os resultados obtidos podem ser atribuídos à interferências decorrentes do método de decomposição.

Observou-se também que o emprego do padrão interno pode contribuir na correção de possível interferência física de transporte de amostra, especialmente para Mn, além da redução dos RSD's para alguns casos. Estes efeitos podem ser melhor observados a partir dos resultados descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Resultados obtidos com o método de mineralização ácida. Experimentos de adição e recuperação em dois níveis, utilizando Y⁺ como padrão interno.

Elemento (λ)	Concentração (µg g ⁻¹) (RSD)	Adicionado (mg L ⁻¹)	% Recuperação (RSD)	Adicionado (mg L ⁻¹)	%Recuperação (RSD)
Mn (257,610)II	4,43 (0,4)	0,02	122,9 (0,8)	0,26	103,2 (0,3)
Se (196,026)I	0,06 (16,9)	0,05	120,7 (13,5)	0,65	90,3 (8,0)
Zn (213,856)I	1,11 (1,0)	0,04	66,2 (1,0)	0,53	94,5 (1,6)
Ba (233,527)II	0,94 (12,3)	0,05	97,3 (24,1)	0,65	-
Cu (324,754)I	0,2 (7,8)	0,1	94,7 (0,8)	1,32	101,6 (1,3)
Co(228,616)II	< LOD	0,2	90,2 (0,3)	2,66	97,1 (0,6)
Fe (238,204)II	2,6 (4,8)	0,1	62,7 (4,1)	1,3	92,8 (0,4)
Ca (317,933)II	124,8 (0,5)	0,2	120,8 (0,7)	2,65	107,9 (0,6)
AI (394,091)I	3,94 (6,8)	0,51	90,3 (3,5)	6,6	106,2 (0,6)
Na (330,833)I	15,99 (3,0)	1,0	156,2 (3,8)	13	143,6 (2,7)
Mo (202,031)II	0,03 (27,7)	0,1	105,33 (4,1)	1,3	103,3 (0,8
Cd (214,438)II	< LOD	0,05	87,3 (1,3)	0,65	96,8 (0,7)
Pb (220,353)II	< LOD	0,51	-	6,64	47,9 (3,0)
Cr (205,560)II	< LOD	0,2	92,2 (0,8)	2,63	100,0 (0,8)
Ni (232,003)I	< LOD	0,2	101,0 (0,7)	2,66	103,4 (1,1)
As (193,696)I	< LOD	0,3	79,6 (7,3)	3,98	101,9 (0,6)

As recuperações para Pb e Ba foram inadequados também neste experimento, com altos RSD's. Entretanto, estes resultados já eram esperados para estes elementos, neste método, pois ambos formam sulfatos insolúveis que podem inviabilizar a sua determinação quando é utilizado H₂SO₄ como reagente de mineralização.

A alta concentração de íons SO₄²⁻ na solução favorece a formação de BaSO₄ e PbSO₄ insolúveis, prejudicando a determinação destes elementos.

$$Ba^{2+} + SO_4^{2-} \longleftarrow BaSO_4(s)$$
 $K_{ps} = 1.0 \times 10^{-10}$

$$Pb^{2+} + SO_4^{2-} \longleftarrow PbSO_{4(S)}$$
 $K_{ps} = 1.6 \times 10^{-8}$

De uma forma geral, a mineralização ácida é um método de preparo fácil e acessível, mas demorado e susceptível a desvios e interferências devido aos fenômenos físicos de transporte e interação entre as espécies. É recomendada para a análise dos macronutrientes por volumetria, gravimetria ou por espectrometria de absorção atômica, mas não para a análise multielementar de elementos-traços.

5.3 Fotólise Oxidativa

5.3.1 Construção e uso do Fotorreator

Os principais fatores planejados para a construção do equipamento usado nos experimentos foram (Figura 9):

 Tubo de aço inoxidável alongado para focalizar a radiação fora do alcance visual do operador;

- Possibilidade de troca do soquete da lâmpada para trabalhos com fontes de potências diferentes;
- ✓ Possibilidade de uso de tubos com diferentes volumes para digestão;
- Sistema de refrigeração por convecção forçada, com o uso de ventoinha e troca de calor por serpentina de cobre;
- Prateleira e peças de aço inoxidável para maior durabilidade das partes móveis;



Figura 9: Sequência de montagem do fotoreator

Após a conclusão da montagem, foram feitos experimentos preliminares de exposição de amostras à radiação ultravioleta. Inicialmente, foram utilizadas soluções contendo 1,0 grama de mel e 25 mL de peróxido de hidrogênio, onde foi possível decompor mais de 85 % da matriz orgânica, determinados através de avaliação do conteúdo de carbono residual.

Nesta etapa, percebemos a necessidade de construção de um planejamento estatístico, que possibilitasse otimizar as melhores condições de tratamento e verificar quais fatores principais influenciam diretamente os resultados da análise. O tipo de planejamento escolhido e as variáveis estudadas serão melhor discutidas no item a seguir.

5.3.2 Planejamento estatístico 2⁵⁻¹

Levando em consideração que não existem muitos estudos explorando a potencialidade da técnica de fotodecomposição com o uso de radiação ultravioleta em amostras com alto teor de matéria orgânica, foram feitos diversos experimentos preliminares para estabelecer a melhor condição de exposição das amostras, avaliando a resposta analítica em função da potência da lâmpada utilizada e do tempo de exposição das amostras. Outros fatores, como controle de temperatura da serpentina refrigerante e freqüência de ventilação interna do reator, não foram alterados.

Foram otimizadas as variáveis que poderiam influenciar o desempenho do reator e este estudo preliminar foi feito utilizando ferramentas estatísticas de planejamento fatorial, onde é possível determinar a melhor condição de preparo de amostra variando-se vários fatores ao mesmo tempo e, através de programas apropriados, estabelecer aqueles que são significativos para a melhora do sinal analítico¹⁹.

A Tabela 8 mostra as variáveis utilizadas, e seus valores, no planejamento para os níveis mais (+) e menos (-).

Tabela 8: Valores das variáveis para os níveis menos (-) e mais (+) dos cinco fatores principais.

	Fator	(-)	(+)
Α	Volume de peróxido (mL)	1	5
В	Volume de amostra* (mL)	1	2
С	Tempo de exposição (min)	30	60
D	Potência da lâmpada (W)	125	400
Е	Volume de HNO3 (mL)	1	2

* Volume de uma solução de mel em água deionizada a 90 % (m/m)

Os experimentos foram realizados em ordem aleatória e o número de experimentos foi determinado de forma a obter o máximo de informações sobre as variáveis que afetam diretamente o resultado analítico.

Para o planejamento por fração meia 2⁵⁻¹, o cálculo do número de experimentos que devem ser realizados está demonstrado abaixo:

N° de Experimentos =
$$\frac{2^5}{2} = 2^4 = 16$$

Em contrapartida, o número reduzido de experimentos determinará o número de grandezas independentes que poderão ser estimadas. Ou seja, com 16 experimentos, será calculado o valor da média, dos 5 efeitos principais que foram calculados em função da recuperação do analito em cada experimento.

A Tabela 9 apresenta os resultados da porcentagem de recuperação obtida para os 16 experimentos para os elementos bário, arsênio e sódio, a partir da equação:

%Recuperação = <u>Recuperação da amostra submetida à FOTOLISE</u>X100 Recuperação da amostra direta

Como para este planejamento não foram feitas replicatas, não é possível calcular a variância por meio dos desvios entre as medidas. Sendo assim, para avaliar quais efeitos são mais importantes será feita uma análise por gráficos normais.

Através desse tipo de gráfico é possível distinguir os efeitos importantes ou não, uma vez que os efeitos que não são significativos se distribuem em torno do valor zero na escala de efeito padronizado e também podem ser ajustados por uma regressão linear. Valores significativos se distribuem distantes do valor zero.

Experimento	Resultados				
	Ba	As			
1	104,74	97,71			
2	98,94	94,95			
3	100,00	97,34			
4	98,95	97,09			
5	97,35	95,69			
6	99,47	98,41			
7	100,00	97,80			
8	100,53	98,90			
9	103,68	96,48			
10	101,58	100,09			
11	113,16	102,38			
12	101,06	99,36			
13	102,12	99,17			
14	106,35	98,90			
15	104,74	103,35			
16	101,59	102,48			

Tabela 9: Resultados da recuperação para Bário e Arsênio (em porcentagem).

As Figuras 10 e 11 apresentam os gráficos normais para os efeitos dos estudos para bário e para arsênio, respectivamente.

Para cada um dos elementos foram destacados em vermelho os efeitos que não estão agrupados próximos ao valor zero. Assim, para o bário, foram selecionados os efeitos **D** e **AC** (potência da lâmpada e interação entre peróxido e tempo de exposição, respectivamente), para o arsênio foram selecionados os efeitos **B** e **D** (**B** equivale ao volume da amostra).



Figura 10: Gráfico normal para os efeitos do planejamento fatorial do elemento Bário.



Figura 11: Gráfico normal para os efeitos do planejamento fatorial do elemento Arsênio.

De uma forma geral, é encontrado como efeito comum o fator potência da lâmpada (efeito **D**). O valor deste efeito é positivo indicando que a maior potência da lâmpada resultará em uma maior recuperação para os elementos. Tal resultado era esperado, pois em ensaios preliminares exploratórios verificamos que a lâmpada mais potente era responsável pela maior clarificação de mel.

Entretanto, quando usamos a fonte de 400 W, o experimento deve ser conduzido com mais cautela, pois empiricamente observa-se que tempos muito longos de irradiação mais potente podem carbonizar completamente a amostra dentro do tubo.

No decorrer do trabalho foi possível perceber visualmente a influência no tempo de irradiação sobre o aspecto das soluções. A Figura 12 mostra a evolução do aspecto das soluções em função do tempo de irradiação.



Figura 12: Aspecto das soluções após períodos contínuos de exposição a radiação UV.

Os frascos 1 e 2 são soluções de mel em água, T1, T2, T3, T4, T5, T6 e T7 são amostras obtidas após 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 minutos de irradiação, respectivamente.

Utilizando o planejamento fatorial 2⁵⁻¹ foi possível identificar quais entre as cinco variáveis estudadas: Volume de Peróxido, Volume de Amostra, Tempo de

Exposição, Potência da Lâmpada e Volume de Ácido Nítrico, bem como as suas interações, eram importantes para a melhora na porcentagem de recuperação dos elementos metálicos em amostras de mel, submetidas a fotólise em um reator construído no laboratório.

Para o elemento bário, verificou-se que a variável de maior efeito na sua recuperação é a potência da lâmpada (maior potência gera maior recuperação), sendo que as demais variáveis não se apresentaram significativas.

Para o elemento arsênio, duas variáveis se destacaram em meio às cinco estudadas. O volume da amostra e também a potência da lâmpada devem ser considerados para a recuperação do arsênio na amostra, sendo que a maior potência e um maior volume levam a melhores resultados.

Para o elemento sódio, foram observados como significativos o efeito principal da potência da lâmpada e também interações entre diferentes fatores, como descrito anteriormente.

Convém ressaltar ainda a observação da diminuição significativa da viscosidade das soluções após os períodos de irradiação. Por outro lado, também foi possível observar que períodos longos de exposição à radiação e ao calor do reator podem levar os frascos à secura, carbonizando totalmente as amostras.

5.3.3 Determinação do Conteúdo de Carbono

Uma das principais fontes de interferências em determinações de elementos metálicos por ICP OES é o conteúdo de carbono residual¹³. Além disso, na espectrometria de emissão óptica em plasma a presença de compostos orgânicos na amostra pode levar a um baixo desempenho analítico, pois as emissões do carbono e de seus compostos aumentam a radiação de fundo⁵⁸.

Existe um aparato comercial denominado 705 UV Digester (Metrohm), amplamente utilizado para tratamento de amostras com moderados e baixos teores de matéria orgânica (como águas de rios, alguns tipos de efluentes, bebidas, etc.) para posterior análise por técnicas eletroanalíticas ou espectroanalíticas. Porém, não há nenhuma referência de aplicação do equipamento para amostras com altos teores de matéria orgânica, para avaliar o comportamento deste tipo de matriz após períodos de exposição à radiação.

Desta forma, foi importante verificar o comportamento de soluções de mel, que contém elevado teor de matéria orgânica, após o tratamento de decomposição por UV.

Inicialmente, foi feita uma análise da amostra de mel usada no estudo para conhecer qual a concentração média de carbono orgânico, obtendo-se um valor médio de 387 mg $C_{ORGÂNICO}/g_{MEL}$.

Para soluções de amostras de mel diluídas (aproximadamente 0,1 % de mel ou menos) a decomposição da matéria orgânica supera os 75 % após 30-40 minutos de irradiação com a adição de peróxido de hidrogênio como catalisador. Este resultado, porém, não se repete para soluções contendo 50-90 % de mel em água.

O resultado de diferentes testes mostrou que para massas altas de amostra, o maior efeito era o de transformação da matriz com possível quebra das moléculas maiores de sacarídeos em fragmentos menores, com redução não linear da porcentagem da matéria orgânica, como é possível observar nas Figuras 13 e 14.



Figura 13. Porcentagem de redução do carbono orgânico total utilizando lâmpada de 125 W e exposição variando de 0 a 150 minutos.



Figura 14. Porcentagem de redução do carbono orgânico total utilizando lâmpada de 400 W e exposição variando de 0 a 40 minutos.

Considerando a faixa ótima de trabalho do analisador de TOC (10 a 100 mg L⁻¹) e sabendo que há cerca de 387 mg $C_{ORGÂNICO}/g_{MEL}$, as soluções a serem avaliadas foram diluídas em um fator de 1,25 x, ou seja, uma alíquota de 20 µL foi transferida para um balão de 25 mL, o volume foi completado com água deionizada e procedeu-se a determinação de carbono orgânico total remanescente na amostra após o tratamento por fotólise oxidativa, utilizando potência da fonte de 125 W e de 400 W, em diferentes tempos de exposição. As Tabelas 10 e 11 descrevem os resultados obtidos, que estão mostrados nas Figuras 12 e 13.

Tabela 10. Resultados o	la fotólise	oxidativa	para a	potência	de 125	5 W e	exposição
variando de 0 a 150 min	utos.						

FOTÓLISE OXIDATIVA - LÂMPADA DE 125W							
Massa (g)	Exposição (min)	TOC (mg L ⁻¹)	IC (mg L ⁻¹)	Massa:TOC	% Redução		
11,4520	0	55,91	0,2058	0,2048	0		
11,5498	10	61,90	0,2181	0,1866	-8,91		
11,5539	20	59,32	0,2464	0,1948	-4,91		
11,5858	30	54,48	0,2446	0,2127	3,83		
11,7829	45	60,20	0,2130	0,1957	-4,44		
11,7853	60	60,45	0,1999	0,1950	-4,81		
11,7347	90	56,22	0,1935	0,2087	1,91		
11,6281	120	56,94	0,2017	0,2042	-0,30		
11,5828	150	52,00	0,1892	0,2227	8,75		

Tabela 11. Resultados da fotólise oxidativa para a potência de 400 W e exposição variando de 0 a 40 minutos.

FOTÓLISE OXIDATIVA - LÂMPADA DE 400W							
Massa (g)	Exposição (min)	TOC (mg L ⁻¹)	IC (mg L ⁻¹)	Massa:TOC	% Redução		
11,6119	0	52,87	0,2565	0,2196	0		
11,5763	15	49,54	0,2830	0,2337	6,39		
11,5919	20	62,79	0,3157	0,1846	-15,94		
11,5924	30	55,00	0,2905	0,2108	-4,03		
11,5919	40	48,52	0,2852	0,2389	8,77		

Após a quantificação do carbono orgânico total nas amostras, os resultados foram avaliados a fim de poder estabelecer um grau comparativo entre as mesmas. Nessas condições, analisando-se, individualmente, os resultados obtidos para os tratamentos por fotólise oxidativa, empregando lâmpadas de 125 e de 400 W, notou-se que nos respectivos casos, as melhores porcentagens de degradação da matéria orgânica total ocorreram em 10 e 20 minutos, correspondendo a 8,91 e 15,94 % respectivamente.

Assim, com todo o exposto, para dar continuidade à determinação de minerais em mel por ICP OES após tratamento da amostra com fotólise oxidativa, optou-se por empregar como fonte de radiação eletromagnética a lâmpada de 400 W, com tempo de exposição das amostras de 20 minutos.

5.3.4 Irradiação das amostras:

Com o objetivo de verificar quais os comprimentos de onda responsáveis pela cisão homolítica das moléculas de peróxido de hidrogênio na geração dos radicais hidroxila, foram feitos alguns experimentos que resultaram nos espectros de emissão das lâmpadas mostrados nas Figuras 15 e 16.

Infelizmente, por limitações da construção do equipamento utilizado para as medidas (faixa espectral de cobertura >250 nm), não foi possível avaliar possíveis emissões de linhas no UV-C.

Com a avaliação dos espectros, percebe-se que para as fontes avaliadas, a maioria dos comprimentos de onda (acima de 436 nm) não contribuem na formação de radicais hidroxila. Provavelmente, o emprego de uma fonte de Deutério (com linhas mais intensas no UV) possa promover decomposições mais rápidas e energéticas.



Figura 15: Espectro de Emissão da Lâmpada de 125 W.



Figura 16: Espectro de Emissão da Lâmpada de 400 W.

Analisando os espectros, verificam-se maiores intensidades de emissão para a fonte de 400 W, em todos os comprimentos de onda avaliados, além de uma linha em 297 nm que certamente contribui para a formação de radicais hidroxila. No caso da fonte de 125 W, o valor de intensidade para o comprimento de onda de 297 nm é mais discreto do que na fonte com maior potência.

Decomposição é um processo cinético que ocorre em etapas e gera novas moléculas menores⁵⁹. Na fotólise oxidativa, dificilmente é obtida a oxidação total em CO₂ e H₂O, porém, ocorre a formação de compostos orgânicos menores. Do ponto de vista meramente analítico, o que importa não é necessariamente a mineralização completa dos compostos orgânicos, mas sim a perda da capacidade complexante perante os íons metálicos, ou pelo menos a formação de adutos lábeis. Desta forma, é possível fazer a determinação analítica por ICP OES mesmo na presença de uma matriz complexa como o mel.

5.3.5 Resultados para a Fotólise

Após o estudo dos parâmetros que possuem maior influência no tratamento das amostras por fotólise oxidativa, foi estabelecida a condição de trabalho com o uso de uma fonte de 400 W e exposição das amostras por 20 minutos, antes das leituras por ICP OES.

5.3.6: Limites de detecção, quantificação e resultados para o método da fotólise oxidativa:

A Tabela 12 descreve os valores de LOD e de LOQ obtidos para o método da fotólise oxidativa, com o método descrito no capítulo 4.7.

Tabela 12: Limites de detecção e limites de quantificação para o método da fotólise oxidativa:

Elemento (λ nm)	LOD (mg L)	LOQ (mg L)
Mn (257,610)II	0,0007	0,002
Cd (214,438)II	0,0001	0,0003
Pb (220,353)II	0,01	0,03
Se (196,026)I	0,02	0,07
Zn (213,856)I	0,005	0,02
Ba (233,527)II	0,002	0,006
Cu (324,754)I	0,0007	0,002
Co (228,616)II	0,0004	0,001
Fe (234,204)II	0,01	0,04
Ca (317,933)II	0,2	0,8
K (766,490)I	0,1	0,4
Al (396,153)I	0,01	0,04
Cr (205,560)I	0,002	0,008
Ni (232,003)I	0,0009	0,003
Mg (279,553)II	0,07	0,2
As (193,696)I	0,02	0,07
Mo (202,031)II	0,01	0,04

Esta condição otimizada foi utilizada em experimentos de adição e recuperação dos analitos, na ausência e na presença do padrão interno ítrio (Tabelas 13 e 14).
Tabela 13:	Resultados	obtidos	com o	método	da	fotólise	oxidativa.	Experimentos
de adição e	recuperação	o em doi	s níve	is, sem p	adr	ão interi	10.	

Elemento (λ)	Concentração	Nível Adição	el Adição % Recuperação		%Recuperação
	(µg g⁻¹) (RSD)	(mg L ⁻¹)	(RSD)	(mg L ⁻¹)	(RSD)
Mn (257,610)II	0,89 (2,8)	0,20	59,8 (2,2)	2,00	65,1 (2,5)
Se (196,026)I	4,29 (75,5)	0,25	258,0 (0,7)	2,5	97,4 (2,3)
Zn (213,856)I	0,47 (14,3)	0,06	35,6 (0,8)	0,6	50,6 (1,8)
Ba (233,527)II	0,13(1,8)	0,05	64,0 (3,6)	0,5	53,9 (2,3)
Cu (324,754)I	< LD	0,10	51,3 (2,3)	1,00	60,7 (3,2)
Co(228,616)II	< LD	0,20	59,3 (1,1)	2,00	57,9 (1,4)
Fe (238,204)II	0,35 (2,5)	0,10	48,3 (0,4)	1,00	63,0 (1,0)
Ca (317,933)II	-	-	-	-	-
AI (394,091)I	0,48 (7,3)	0,50	49,7 (7,9)	5,00	56,8 (3,1)
Na (330,833)I	-	1,0	-	10,0	40,3 (1,8)
Mo (202,031)II	1,11 (3,7)	0,10	105,3 (0,1)	1,00	73,7 (1,9)
Cd (214,438)I	0,05 (10,2)	0,05	64,0 (1,3)	0,50	59,9 (1,8)
Pb (220,353)II	0,71 (7,7)	0,50	49,5 (1,1)	5,00	48,3 (1,8)
Cr (205,560)II	0,22 (5,1)	0,20	67,3 (1,1)	2,00	65,3 (2,2)
Ni (232,003)I	0,10 (23,4)	0,20	58,0 (0,8)	2,00	55,3 (1,5)
As (193,696)I	17,5 (2,8)	0,30	125,3 (0,3)	3,00	82,1 (1,4)

Elementos como magnésio, cálcio e o sódio não tiveram boa resposta em virtude da saturação do sinal destes elementos. Tal situação era prevista para o magnésio em função do que observamos nos experimentos onde foram determinadas as concentrações e discutidos os resultados para os mesmos elementos no capítulo 5.2 com a mesma massa de amostra, mas promovendo-se a digestão em chapa de aquecimento.

Entretanto, para os elementos sódio e cálcio, acredita-se que a complexidade do ambiente espectral, quando são introduzidas no equipamento soluções com elevados teores de matéria orgânica, favoreceu o comprometimento do sinal de alguns elementos.

Na Tabela 14 observam-se os resultados obtidos na avaliação da mesma amostra com a presença de padrão interno.

Elemento (λ)	Concentração	Nível Adição	% Recuperação	Nível Adição	%Recuperação
	(µg g ⁻¹) (RSD)	(mg L ⁻¹)	(RSD)	(mg L ⁻¹)	(RSD)
Mn (257,610)II	1,4 (3,3)	0,20	100,0 (0,5)	2,00	93,7 (0,3)
Se (196,026)I	10,0 (3,9)	0,25	207,2 (3,5)	2,5	114,2 (4,3)
Zn (213,856)I	0,8 (9,7)	0,06	78,9 (3,4)	0,6	72,4 (3,9)
Ba (233,527)II	0,3 (3,7)	0,05	110,7 (1,6)	0,5	72,7 (4,9)
Cu (324,754)I	0,3 (2,5)	0,10	97,7 (3,9)	1,00	86,9 (0,2)
Co(228,616)II	0,3 (4,6)	0,20	99,7 (1,2)	2,00	88,9 (4,2)
Fe (238,204)II	2,1 (0,4)	0,10	116,3 (3,2)	1,00	91,5 (1,0)
Ca (317,933)II	-	-	-	-	-
AI (394,091)I	0,5 (7,3)	0,50	49,7 (7,9)	5,00	56,8 (5,0)
Na (330,833)I	33,5 (6,2)	1,0	280,8 (1,0)	10,0	75,3 (5,9)
Mo (202,031)II	1,4 (5,0)	0,10	151,0 (4,5)	1,00	116,1 (3,9)
Cd (214,438)II	0,2 (4,3)	0,05	106,0 (4,7)	0,50	96,5 (4,1)
Pb (220,353)II	2,9 (4,2)	0,50	91,1 (4,7)	5,00	82,8 (3,9)
Cr (205,560)II	0,6 (3,9)	0,20	111,2 (3,9)	2,00	101,1 (4,1)
Ni (232,003)I	0,9 (4,9)	0,20	102,8 (4,4)	2,00	90,8 (4,3)
As (193,696)I	26,17 (3,3)	0,30	321,8 (3,1)	3,00	326,2 (3,5)

Tabela 14: Resultados obtidos com o método da fotólise oxidativa. Experimentos de adição e recuperação em dois níveis utilizando Y⁺ como padrão interno.

Em virtude da redução dos valores de LOD, principalmente na presença de brancos mais limpos, como neste procedimento, foram obtidas a detecção e boas recuperações para os elementos Cu e Co.

Outro elemento que despertou grande interesse foi o Selênio. Os resultados das determinações foram bastante intrigantes, pois era esperado que o tempo de residência deste elemento no plasma fosse muito curto, inviabilizando qualquer determinação que não fizesse uso de geração de vapor. Entretanto, foram obtidos

resultados para estes elementos que levaram a uma investigação mais detalhada do fenômeno observado.

Conforme discutido anteriormente, espera-se que a fotólise em soluções de açúcares não elimine a matriz, mas a transforme. Redução de viscosidade, extração dos íons e quebra das moléculas maiores que compõe a matriz, são as principais transformações. Como a emissão do selênio ocorre em linha muito próxima da emissão de carbono, foi feito um estudo para verificar se estava sendo feita a leitura de emissões de carbono, equivocadamente (Figura 17).



Figura 17: Investigação do espectro de emissão do Selênio e das amostras que sofreram fotólise.

Avaliando o espectro, percebe-se que a emissão de carbono realmente estava contribuindo para resultados equivocados. Portanto, é necessário buscar outras estratégias analíticas para o Selênio, tais como a geração de vapor.

5.4 Aplicação Analítica

5.4.1. Análise de méis de diferentes regiões

Além da amostra utilizada nos estudos de otimização, mais quatro amostras de méis de diferentes origens foram preparadas conforme procedimento descrito no item 4.4 - Fotólise Oxidativa, usando ítrio como padrão interno.

Na Tabela 15 encontram-se os valores obtidos para alguns elementos em cada uma das seguintes amostras:

Amostra 1 SP: Flores do campo (USP – Instituto de Biociências).

Amostra 2 MG: Flores Silvestres; Unidade Apícola - Claúdio Franco L. Silva; Lote 120405; MG.

Amostra 3 SP: Flores Silvestres; Mel das Montanhas; Campos de Jordão – SP.

Amostra 4 RS: Flores Silvestres; Apiários Côrrea Miller; Taquara – RS.

Elemento (λ)	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
	SP	MG	SP	RS
Mn (257,610)II	1,9 (1,8)	2,4 (1,7)	1,0 (3,3)	1,9 (0,5)
Cu (324,754)I	0,2 (12,6)	0,2 (11,8)	0,2 (11,5)	0,1 (0,8)
Zn (213,856)I	0,4 (6,5)	0,4 (4,8)	0,5 (5,2)	0,02 (0,8)
Fe (238,204)II	2,0 (2,4)	2,4 (2,0)	0,6 (10,0)	0,5 (0,8)
Na (330,833)I	4,9 (6,0)	7,1 (8,7)	5,9 (50,8)	20,8 (0,8)
AI (394,091)I	2,8 (4,5)	4,3 (6,5)	2,7 (18,9)	2,0 (0,8)
Mo (202,031)II	0,07 (7,7)	< LOQ	0,1 (8,3)	< LOD

Tabela 15: Concentrações (µg g⁻¹) e RSD's de alguns méis investigados

De acordo com alguns autores, o conteúdo mineral do mel pode ser usado como indicador da região e/ou florada de origem, além de fornecer subsídios para comprovação de adulteração e fraude²⁶. Neste trabalho não foi possível verificar este efeito, uma vez que poucas amostras foram analisadas. De uma forma geral, observam-se valores de concentrações semelhantes para o mel das diferentes regiões, para quase todos os elementos encontrados. Em alguns casos, como Zn e Na, a amostra 4 RS mostrou valores diferentes, o que pode estar associado ao tipo de solo, clima e outros fatores que afetam a concentração dos elementos no mel.

6. CONCLUSÕES

O procedimento de digestão enzimática mostrou-se inviável por possuir variáveis que não são facilmente controladas e/ou monitoradas (ex. taxa de crescimento de fungos e preparo da solução de enzima a ser utilizada). Além de ser um procedimento extremamente lento que, certamente inviabilizaria a implementação em rotina. Há a necessidade do uso de solução tampão, que aumenta o teor de sólidos dissolvidos na amostra e contribui para desestabilizar o plasma.

A análise por digestão ácida é recomendada para os macroconstituintes da matriz, entretanto é demorada e usa ácidos minerais agressivos e perigosos. Além disso, não é possível determinar chumbo e bário quando se usa ácido sulfúrico.

O procedimento de fotólise oxidativa, mostrou-se uma ferramenta excelente para o pré-tratamento de amostras de mel de abelhas na análise dos elementos metálicos por ICP OES possibilitando um aumento significativo do sinal analítico, além da melhora da taxa de recuperação dos elementos adicionados comparado com amostras não tratadas.

Comparando com procedimentos clássicos (decomposição ácida) e alternativos (digestão enzimática) a fotólise oxidativa é mais rápida, com pouca manipulação da amostra e bons resultados para a maioria dos elementos estudados.

A fotólise oxidativa para amostras com altos teores de matéria orgânica é uma técnica moderna que ainda não teve seus limites de aplicação totalmente desvendados. É interessante que novos experimentos sejam elaborados, testando outras fontes de radiação ultravioleta como, por exemplo, lâmpadas de deutério. O estudo despertou o interesse em empregar a fotólise no preparo de outros tipos de amostras com alto teor de matéria orgânica, como xaropes, açúcares, alguns tipos de óleos, etc.

A diminuição da viscosidade da solução de mel é fator determinante para que o transporte, assim como a nebulização da solução aconteça sem maiores problemas.

Foi possível montar o fotodigestor empregando materiais adquiridos em ferro-velho, com um baixo investimento. Consequentemente, o custo da análise é também consideravelmente menor, uma vez que só é usado peróxido de hidrogênio e água.

Considerando-se os resultados obtidos com o estudo, a aplicação dos métodos de análise, e vantagens como velocidade e praticidade no preparo de mel para a determinação de macro e microconstituintes, o método proposto mostra potencialidade para ser aplicado a outros elementos e para utilização em análises de rotina, como as de controle de qualidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - León, M. C.; Burgos, A.; Hernández-Velazquez, A; Hardisson, A., "Alimentation, nutrition y salud". *Alimentaria*, **34**, 1996, 29-39.

2 - Mertz, W. (Ed) "Trace Elements in Human and Animal Nutrition", 5th ed., vol. 1, Academic Press, San Diego, 1987, cap. 1.

3 - Pedro, N. A. R., "Determinação de Nutrientes Minerais em Alguns Alimentos por ICP OES". Tese de Doutorado, IQ-USP, São Paulo, 1998.

4. TACO – Tabela de Brasileira de Composição de Alimentos. <u>http://www.unicamp.br/nepa/taco/home.php</u>

5 - <u>http://pt.wikipedia.org/wiki/Mel</u> (Acessada em 11/04/08).

6 - Park, Y. K.; Alencar, S. M.; Aguiar, C. L.; Scamparini; A. R. P.; González, M.; Lolina, M. A. A., "Comparação das características físico químicas nas própolis produzidas na região subtropical da América do sul: Evidência fitoquímica de sua origem botânica." *Mensagem Doce*, **61**, 2001.

7 - <u>http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/index.htm</u> (acessado em 11/04/2009).

8 - Reilly, C., "Metal Contamination of Food", Elsevier, 1991, New York.

9 - Tuzen M., "Determination of some metals in honey samples for monitoring environmental pollution". *Fresenius Environmental Bulletin*, **11**, 2002, 366-370.

10 - Przybylowski, P.; Wilczynska, A., "Honey as an environmental marker". *Food Chemistry*, **74**, 2001, 289-291.

11 - Celli, G.; Maccagnani B., "Honey bees as bioindicators of environmental pollution". *Bulletin of Insectology*, **56**, 2003, 137-139.

12 - <u>http://www.anvisa.gov.br/rotulos/manual_industrial_es.pdf;</u> http://www.usdabrazil.org.br/ consultado em 28/01/08.

13 - Krug, F. J. (Org.). Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre métodos de preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. Piracicaba. CENA/USP, 2008.

14 - Pohl, P., "Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries". *TRAC-Trends in Analytical Chemistry*, **28**, 2009, 1117-128.

15 - Tuzen, M.; Silici, S.; Mendil, D.; Soylak, M., "Trace element levels in honey from different regions of Turkey". *Food Chemistry*, **103**, 2007, 325-330.

16 - Garcia, J. C. R.; Garcia, J. B.; Latorre, C. H.; Martin, S. G.; Crecente, R. M. P., "Comparison of palladium-magnesium nitrate and ammonium dihydrogenphosphate modifiers for lead determination in honey by electrothermal atomic absorption spectrometry". *Food Chemistry*, **91**, 2005, 593-600.

17 - Camina, J. M.; Cantarelli, M. A.; Lozano, V. A.; Boeris, M. S.; Irimia, M. E.; Gil, R. A.; Marchevsky, E. J., "Chemometric tools for the characterization of honey produced in La Pampa, Argentina, from their elemental content, using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES)". *Journal of Apicultural Research*, **47**, 2008, 102-107.

18 - Lachman, J.; Kolihova, D.; Miholova, D.; Kosata, J.; Titera, D.; Kult, K., "Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality". *Food Chemistry*, **101**, 2007, 973-979.

19 - Mendes, T. M. F. F.; Baccan, N.; Cadore, S. "Sample treatment procedures for the determination of mineral constituents in honey by inductively coupled plasma optical emission spectrometry". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **17**, 2006, 168-176.

20 - Frazzoli, C.; D'Illio, S.; Boca, B., "Determination of Cd and Pb in honey by SF-ICP-MS: Validation figures and uncertainty of results". *Analytical Letters*, **40**, 2007,1992-2004.

21 - Enrich, C.; Boeykens, S.; Caracciolo, N.; Custo, G.; Vazquez, C., "Honey characterization by total reflection x-ray fluorescence: evaluation of environmental quality and risk for the human health". *X-Ray Spectrometry*, **36**, 2007, 215-220.

22 - Sanna, G.; Pilo, M. I.; Piu, P. C.; Tapparo, A.; Seeber, R., "Determination of heavy metals in honey by anodic stripping voltammetry at microelectrodes". *Analytica Chimica Acta*, **415**, 2000, 165-173.

23 - Buldini, P. L., Cavalli, S., Mevoli, A. and Sharma, J. L., "Ion Chromatographic and voltammetric determination of heavy and transition metals in honey.", *Food Chemistry*, **73**, 2001, 487 – 495.

24 - Viñas, P.; García, I. L.; Meroño, B. M.; Campillo, N.; Córdoba, M. H., "Speciation of arsenic in baby foods and the raw fish ingredients using liquid chromatography-hydride generation-atomic absorption spectrometry". *Chromatographia*, **57**, 2003, 611-616. **25** - Ioannidou, M. D.; Zachariadis, G. A.; Anthemidis, A. N.; Stradis, J. A., "Direct Determination of toxic trace metals in honey and sugars using inductively coupling plasma atomic emission spectrometry". *Talanta*, **65**, 2005, 92-97.

26 - Mendes, T. M., "Determinação de espécies metálicas em mel de abelhas por ICP OES.", Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, 2003.

27 - Crane, E., "O livro do mel". 2^a ed., Editora Nobel, São Paulo, 1987.

28 - Azeredo, M. A. A.; Azeredo, L. C.; Damasceno, J. G., "Características físicoquímicas dos méis do município de São Fidelis-RJ." *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **19**, 1999, 3-7.

29 - Skoog, D. A.; Holler, F. J. e Nieman, T. A., "Principles of Instrumental Analysis". 5th ed., Harcourt Brace College Publishers, Philadelphia, 1998, 230 - 252.

30 - Giné, M. F., "Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente". Série didática, vol. 3, CENA/USP, Piracicaba, 1998, cap. 2.

31 - Boss, C. B.; Fredeen, K. J., "Concepts, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry". 2rd ed., Perkin-Elmer Corp., USA, 1999, cap. 2-4.

32 - Garcia, E. E.; Nogueira, A. R. A.; Nogueira, J. A., "Matrix effects on the determination of disprosium, europium and ytterbium used as animal faecal markers by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axially and radially-viewed configurations", *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **16**(8), 2001, 825-830.

33 - Brenner, I. B.; Zander, A. T. "Axially and radially viewed inductively coupled plasmas – a critical review". *Spectrochimica Acta Part B*, **55**, 2000, 1195-1240.

34 - Silva, J. C. J.; Santos, D. M.; Cadore, S.; Nóbrega J. A.; Baccan, N., "Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axial configuration in organic medium. Interfaces with end-on gas and shear gas". *Microchemical Journal*, **177**, 2004, 185-190.

35 - Trevizan, L. C.; Nóbrega, J. A., "Inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axially viewed configuration: an overview of applications", *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **18**, 2007, 678-690.

35 - G. Campos, R. C.; Della-Modesta, T. J.; Silva, K. E.; Baptista, M. F.; Gomides,
R. L.; Godoy, R. L., "Classificação do mel em floral ou mel de melato". *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, 2003, 1-5.

37 - Schepartz, A. I.; Subers, M. H., "Catalase in honey". *Journal of Apicultural Research*, **5**, 1966, 37-43.

38 - White, J. W.; Kushinir, I., "The enzimes of honey: examination by ionexchange chromatography, gel filtration, and starch-gel electrophoresis". *Journal of Apicultural Research*, **6**, 1967, 69-89.

39 - Huidobro, J. F.; Santana, F. J.; Sanches, M. P.; Sancho, M. T.; Muniategui, S.; Simal-Lozano, J., "Diastase, invertase and ß-glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain". *Journal of Apicultural Research*, **34**, 1995, 39-44.

40 - Serrano, R. B.; Villanueva, M. T. O.; Marquina, A. D., "La miel. Edulcorante natural por excelência". *Alimentaria*, **253**, 1994, 25-35.

41 - Weston, R. J.; Brocklebank, K. L.; Lu, Y., "Identification and quantitative levels of antibacterial componentes of some New Zealand honeys". *Food Chemistry*, **70**, 2000, 427-35.

42 - White, J. W.; Subers, M. H.; Shepartz, A. I., "The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose oxidase system". *Biochimica et Biophysica Acta*, **73**, 1963, 57-70.

43 - Mascanzoni, D., "Chernobyl challenge to the environment - a report from Sweden". *Science of the Total Environment*, **67**, 1987, 133-148.

44 - Caroli, S.; D'Ilio, S.; Forte G., "Honey as a candidate reference material for trace elements". *Journal of AOAC International*, **84**, 2001, 1972-1975.

45 - 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.

46 - Altman, T. A., "FDA and USDA Nutrition Labeling Guide – Decision Diagrams, Checklists and Regulations". Tecnomic Publishing Co., Pennsylvania, 1998.

47 - "Casca de coco e cereais revestem móveis", Pesquisa FAPESP, 79, 2002, 64.

48 - Neumann, M. G.; Quina, F. H., "A Fotoquímica no Brasil". *Química Nova*, **2**5, 2002, 34-38.

49 - Cavicchioli, A.; Gutz, I. G. R., "O uso de radiação ultravioleta para o prétratamento de amostras em análise inorgânica". *Química Nova*, **26**, 2003, 913-921. **50 -** Golimowski, J.; Golimowska, K., "UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples". *Analytica Chimica Acta*, **325**, 1996, 111-133.

51 - Cavicchioli, A.; Gutz, I. G. R., "In-line TiO₂-assisted photodigestion of organic matter in aqueous solution for voltammetric flow analysis of heavy metals in water samples". *Analytica Chimica Acta*, **445**, 2001, 127-138.

52 - Campos, M. L. A. M.; Mello, L. C.; Zanette, D. R.; Sierra, M. M.; Souza e Bendo, A., "Construção e otimização de um reator de baixo custo para a fotodegradação da matéria orgânica em águas naturais e sua aplicação no estudo da especiação do cobre por voltametria". *Química Nova*, **24**, 2001, 257-261

53 - Thomsen, V.; Roberts, G.; Burgess, K., "The concept of background equivalent concentration in spectroscopy". *Spectroscopy*, **15**, 2000, 33.

54 - dos Santos, J. S.; dos Santos, N. S.; Pires dos Santos, M. L. P., dos Santos, S. N.; Lacerda, J. J. J., "Honey classification from Semi-arid, Atlantic and Transitional forest zones in Bahia, Brazil". *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **19**, 2008, 502-508.

55 - Sodre, G. D.; Marchini, L. C.; Zucchi, O. L. A. D., Nascimento Filho, V. F.; Otsuk, I. P.; Moreti, C. C. C., *Química Nova*, **30**, 2007, 920-924.

56 - Packer, 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)". *Spectrochimica Acta Part B*, **56**, 2001, 69-75.

- 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.

- Pan, C.; Zhu, G.; Browner, R. F., "Role of auxiliary gas flow in organic sample introduction with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **7**, 1992, 1231-1237.

59 - Gromboni, C. F.; Ferreira, A. G.; Kamogawa, M. Y.; Nogueira, A. R. A., Avaliação da reação foto-fenton na decomposição de resíduos de carrapaticida. *Química Nova*, **30**, 2006, 264-267.