

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DETERMINAÇÃO DE COBRE, MANGANÊS E CÁDMIO EM MEL POR  
ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE  
GRAFITE**

**LORENA CRISTINE PAES \***

Orientadora: **Profa. Dra. Solange Cadore**

\* Bolsista CAPES

Campinas SP

**2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

P138d Paes, Lorena Cristine.  
Determinação de cobre, manganês e cádmio em mel por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite / Lorena Cristine Paes. -- Campinas, SP: [s.n], 2007.

Orientadora: Solange Cadore.

Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Mel. 2. GF-AAS. 3. Tratamento da amostra. I. Cadore, Solange. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Determination of copper, manganese and cadmium in honey by graphite furnace atomic absorption spectrometry

**Palavras-chaves em inglês:** Honey, GF-AAS, Sample preparation

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Mestre em Química na área de Química Analítica

**Banca examinadora:** Solange Cadore (Orientadora), José Anchieta Gomes Neto (IQ-UNESP), Nivaldo Baccan (IQ-UNICAMP)

**Data de defesa:** 19/10/2007

***Dedico este trabalho aos meus pais, irmão e amigos que tanto me apoiaram e aos professores que despertaram em mim a paixão pela química.***

## **AGRADECIMENTOS**

À UNICAMP, pela formação de alta qualidade e pelo Programa de Moradia Estudantil;

À minha orientadora, Solange, pela dedicação e amizade;

Aos colegas do grupo de pesquisa: Rafael, Greice, Tereza, Rita, Thiago, Patrícia, Mirian, Sabrina, Heitor e Camila, pela colaboração em diversos momentos durante a realização deste trabalho;

Aos professores Nivaldo Baccan e Jarbas Rohwedder pelos esclarecimentos e sugestões;

Aos técnicos, Helena e Paulo, pela ajuda e amizade;

Aos programas CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro;

Ao programa PROCAD/CAPES, por possibilitar que eu conhecesse e colaborasse com o desenvolvimento de outras instituições de ensino e pesquisa brasileiras;

Ao professor Marco T. Grassi, da UFPR, e suas alunas Vanessa, Daniela e Carolina pela ajuda na realização de parte do trabalho;

A todos os meus familiares e amigos pelo constante incentivo, apoio e dedicação;

Ao meu namorado André pelo companheirismo e apoio;

A todos aqueles que colaboraram para a realização deste trabalho e que agora não me vêm à memória;

E especialmente a Deus pela vida e proteção.

A todos, muito obrigada!

# CURRICULUM VITAE

## Lorena Cristine Paes

### Dados pessoais

Filiação	Maria Ivonilda Botelho Paes e Luiz Carlos Paes
Data de nascimento	24 de outubro de 1980
Nacionalidade	Brasileira
Estado civil	Solteira
Endereço	R.: Jundiaí, nº 167 A, Mogi Guaçu - SP
E-mail	lorenapaes@gmail.com

### Formação Acadêmica

#### 1- Graduação

Curso	Bacharelado em Química
Instituição	Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Período	Março de 2000 a agosto de 2004

#### 2- Graduação

Instituição	Bacharelado em Química Tecnológica Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Período	Março de 2000 a janeiro de 2005

#### 3- Mestrado

Departamento	Química Analítica
Título da dissertação	Determinação de Cu, Mn e Cd em mel por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
Instituição	Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
Orientadora	Solange Cadore
Período	Março de 2005 a outubro de 2007

#### 4- Cursos

4.1- Título	Novos Avanços no Tratamento de Efluentes: Tecnologias de Oxidação Avançada
Local	Faculdade de Ciências Químicas da Universidade de Concepcion do Chile
Período	6 a 13 de setembro de 2002
Carga horária	15 horas
4.2- Título	II Encontro Sobre Preparo de Amostras
Local	Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP
Período	25 de novembro de 2005
Carga horária	8 horas

### Produção Científica

#### 1- Iniciação Científica

Local	Laboratório de Química Ambiental – IQ - UNICAMP
Título	Otimização do uso de fotoreatores anulares em Processos Oxidativos Avançados
Orientador	Wilson de Figueiredo Jardim
Período	Mai de 2002 a abril de 2004

## 2- Participações em eventos

- |                                |   |
|--------------------------------|---|
| 2.1- Título do evento          | 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química  |
| Local                          | Poços de Caldas, MG   |
| Período                        | 26 a 29 de maio de 2003   |
| Título do trabalho apresentado | Otimização do uso de fotoreatores anulares em Processos Oxidativos Avançados  |
| 2.2- Título do evento          | X Encontro Nacional Sobre Contaminantes Inorgânicos e V Simpósio Sobre Essencialidade de Elementos na Nutrição Humana |
| Local                          | CETEC - MG  |
| Data                           | 25 a 27 de outubro de 2006  |
| Título do trabalho apresentado | Desenvolvimento de método para determinação de Cu e Mn por GF AAS   |
| 2.3- Título do evento          | Nono Rio Simpósio em Espectrometria Atômica   |
| Local                          | Barquisimeto, Venezuela.  |
| Período                        | 5 a 10 de novembro de 2006  |
| Título do trabalho apresentado | “Determination of Copper and Manganese in Honey by GFAAS Using Different Sample Treatments”                           |

## Experiência Profissional

Cargo	Químico estagiário
Função	Químico analítico. Montagem de laboratório, desenvolvimento e implantação de métodos analíticos clássicos para determinação de macro e micro nutrientes em fertilizantes foliares. Treinamento e supervisão de técnico em química.
Empresa	Juma Agro Indústria e Comércio LTDA, Mogi Guaçu, SP
Período	Julho de 2004 à junho de 2005

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO DE COBRE, MANGANÊS E CÁDMIO EM MEL POR ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM FORNO DE GRAFITE

Mestranda: Lorena Cristine Paes

Orientadora: Profa. Dra. Solange Cadore

Visando o desenvolvimento de um método analítico para uma matriz heterogênea de interesse comercial e ambiental e, também, a fim de acrescentar novas informações sobre o mel nacional, este trabalho avaliou diferentes estratégias de tratamento do mel, diferentes modificadores químicos e otimizou os parâmetros instrumentais para a determinação de cobre, manganês e cádmio, por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite. O tratamento do mel com banho de ultrassom foi o procedimento mais adequado para o preparo da amostra, quando comparado às mineralizações em forno de microondas e em placa de aquecimento, bem como à solubilização com hidróxido de tetrametilamônio, devido à simplicidade e rapidez. Foi necessário o uso de peróxido de hidrogênio como modificador químico para aumentar a eficiência da eliminação da matriz nas determinações dos analitos de interesse, além do uso de  $10 \mu\text{g}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  como modificador químico para determinação de Mn e de  $5 \mu\text{g}$  de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  como modificador químico para determinação de Cd. Os métodos otimizados apresentaram precisão, sensibilidade e repetibilidade adequadas e foram obtidas recuperações entre 70 e 90 %, o que indica uma exatidão satisfatória. As quantidades dos analitos nos méis brasileiros de diferentes procedências variaram entre  $0,020$  e  $0,17 \mu\text{g g}^{-1}$  de Cu, entre  $0,39$  e  $11,9 \mu\text{g g}^{-1}$  de Mn e foram menores que  $6 \text{ ng g}^{-1}$  no caso do Cd. Observou-se que as amostras analisadas não são contaminadas com Cd e as altas concentrações de Mn confirmam que o mel brasileiro pode ser considerado uma boa fonte nutritiva deste elemento.

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF COPPER, MANGANESE AND CADMIUM IN HONEY BY GRAPHITE FURNACE ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

Candidate: Lorena Cristine Paes

Supervisor: Dr. Solange Cadore

Different strategies for sample preparation, the optimization of instrumental parameters and the evaluation of different chemical modifiers for the determination of cadmium, copper and manganese in honey by graphite furnace atomic absorption spectrometry were developed. Honey is a heterogeneous matrix, which has great commercial and environmental importance. However, few studies concerning its mineral content have been carried out in Brazil.

In this work the use of an ultra sonic bath was compared with digestion by microwave radiation or on a hot plate as well as solubilization with tetramethylammonium hydroxide. The best procedure for honey is that using ultrasound, considering its simplicity and speed of analysis.

Hydrogen peroxide was used as chemical modifier together with 10  $\mu\text{g}$   $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  or 5  $\mu\text{g}$  de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  for the determination of Mn or copper, respectively.

Satisfactory precision, sensitivity and accuracy as well as recoveries in the range of 70-90 % were obtained. Analyte concentrations in Brazilian honey, from different regions, varied between 0.020 to 0.17  $\mu\text{g g}^{-1}$  for Cu, and 0.3 to 11.9 for Mn. For Cd, values below 6  $\text{ng g}^{-1}$  were found.

Brazilian honeys were not contaminated with Cd and may be considered a good source of manganese.

## ÍNDICE

1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. O mel.....	3
2.2. Determinação de Constituintes Inorgânicos no Mel.....	3
2.3. Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite .....	4
2.3.1. Interferências em GF AAS.....	6
2.3.2. Condições Estabilizadas de Temperatura na Plataforma do Forno de Grafite – STPF.....	7
2.3.2.1. Modificadores Químicos.....	7
2.4. Tratamento da amostra.....	9
2.4.1. Mineralização assistida por microondas.....	10
2.4.2. Solubilização em banho de Ultra-som.....	11
2.4.3. Solubilização com hidróxido de tetrametilamônio.....	13
3. Objetivos.....	14
4. Parte Experimental.....	15
4.1. Equipamentos e Reagentes.....	15
4.2. Procedimentos Analíticos.....	15
4.3. Amostras.....	16
4.4. Tratamentos da amostra.....	17
4.4.1. Mineralização ácida em forno de microondas.....	17
4.4.2. Mineralização ácida em chapa de aquecimento.....	18
4.4.3. Solubilização com hidróxido de tetrametilamônio.....	18
4.4.4. Solubilização em banho de Ultra-Som.....	19
4.5. Avaliação do uso de modificadores químicos.....	20
4.6. Programa de Aquecimento do Forno de Grafite.....	20
5. Resultados e Discussão.....	22
5.1. Tratamentos da amostra.....	23
5.1.1. Mineralização em chapa de aquecimento.....	23
5.1.2. Mineralização assistida por microondas.....	26
5.1.3. Solubilização do mel com TMAH.....	28

5.1.4. Solubilização do mel em banho de Ultra-Som.....	30
5.1.5. Foto-oxidação do mel.....	32
5.2. Medidas de carbono orgânico total.....	33
5.3. Avaliação de diferentes modificadores químicos.....	33
5.3.1. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> como modificador químico.....	33
5.3.2. Uso dos modificadores químicos Pd e/ou Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .....	35
5.4. Otimização do programa de aquecimento do forno de grafite.....	37
5.5. Determinação de Cd no mel.....	39
5.5.1. Avaliação do uso de modificadores químicos para a determinação de Cd.....	40
5.5.2. Otimização do programa de aquecimento do forno de grafite para determinação de Cd.....	43
5.6. Avaliação da qualidade dos métodos propostos.....	45
5.7. Determinação de Cu, Mn e Cd em méis de diferentes regiões do Brasil.....	49
6. Conclusão.....	51
7. Referências Bibliográficas.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAS</b>	Espectrometria de Absorção Atômica
<b>ET AAS</b>	Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica
<b>GF AAS</b>	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
<b>ICP OES</b>	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado
<b>ICP-MS</b>	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
<b>LOQ</b>	Limite de Quantificação
<b>m<sub>0</sub></b>	Massa característica
<b>MG</b>	Minas Gerais
<b>MW</b>	Microondas
<b>PR</b>	Paraná
<b>PTFE</b>	Politetrafluoretileno
<b>RR</b>	Roraima
<b>SC</b>	Santa Catarina
<b>SP</b>	São Paulo
<b>STPF</b>	Condições Estabilizadas de Temperatura na Plataforma do Forno de Grafite
<b>TMAH</b>	Hidróxido de tetrametilamônio
<b>TOC</b>	Carbono Orgânico Total
<b>US</b>	Ultra Som
<b>UV</b>	Ultra Violeta
<b>VRD</b>	Valor Recomendado por Dia

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Produtor, origem geográfica e botânica das amostras analisadas..	17
<b>Tabela 2</b>	Programa de aquecimento do forno de microondas.....	18
<b>Tabela 3</b>	Programa de aquecimento do forno de grafite indicado pelo fabricante do equipamento para determinação de Cu, Mn e Cd.....	21
<b>Tabela 4</b>	Concentração e desvio padrão obtidos nas determinações de Cu e Mn após solubilização da amostra em banho de US.....	31
<b>Tabela 5</b>	Programa de aquecimento do forno de grafite otimizado, para as determinações de Cu e Mn.....	39
<b>Tabela 6</b>	Programa de aquecimento do forno de grafite, otimizado, para a determinação de Cd no mel.....	45
<b>Tabela 7</b>	Porcentagens de recuperação e algumas figuras de mérito.....	46
<b>Tabela 8</b>	Comparação das concentrações dos analitos no mel obtidas por calibração com adição de analito e por calibração externa.....	47
<b>Tabela 9</b>	Porcentagens de recuperação e algumas figuras de mérito, após mineralização com microondas.....	48
<b>Tabela 10</b>	Comparação das concentrações dos analitos no mel obtidas por calibração com adição de analito e por calibração externa após mineralização com microondas.....	48
<b>Tabela 11</b>	Concentrações de Cu, Mn e Cd em méis de diferentes regiões do Brasil.....	50
<b>Tabela 12</b>	Intervalos de concentração de Cu, Mn e Cd encontrados em amostras de mel de diferentes países.....	51

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Valores de concentração e desvio padrão ( $n = 3$ ) obtidos nas medidas de Cu após mineralização da amostra em chapa de aquecimento.....	24
<b>Figura 2</b>	Valores de concentração e desvio padrão ( $n = 3$ ) obtidos nas medidas de Mn após mineralização do mel em chapa de aquecimento.....	25
<b>Figura 3</b>	Valores de concentração e desvio padrão obtidos nas medidas de Cu após mineralização do mel em forno microondas com diferentes proporções de $\text{HNO}_3$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ e mel.....	26
<b>Figura 4</b>	Valores de concentração e desvio padrão obtidos nas medidas de Mn após mineralização do mel em forno microondas com diferentes proporções de $\text{HNO}_3$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ e mel.....	27
<b>Figura 5</b>	Concentração e desvio padrão ( $n = 3$ ) obtidos nas medidas de Cu no mel após solubilização com TMAH.....	29
<b>Figura 6</b>	Sinal de absorvância integrada em função do tempo de atomização, obtido na determinação de Cu com 40 % v/v de TMAH, sendo a absorvância do analito representada pela linha contínua e a do fundo, pela linha pontilhada.....	29
<b>Figura 7</b>	Concentração e desvio padrão ( $n = 3$ ) obtidos nas medidas de Mn no mel após solubilização com diferentes quantidades de TMAH...	30
<b>Figura 8</b>	Concentração de Cu em amostras submetidas ao banho de US, durante 5 a 30 minutos.....	31
<b>Figura 9</b>	Curva analítica para determinação de Cu (A) na presença do modificador químico $\text{H}_2\text{O}_2$ e (B) apenas com 0,2 % v/v de $\text{HNO}_3$ .....	34
<b>Figura 10</b>	(A) Absorvância integrada em função da massa de Pd ou $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ usada na determinação de Cu. (B) Absorvância integrada do sinal e do fundo na determinação de Cu com diferentes quantidades de Pd e/ou $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ .....	35

<b>Figura 11</b>	(A) - Absorbância integrada em função da massa de Pd ou $Mg(NO_3)_2$ nas determinações de Mn. (B) - Absorbância integrada do sinal e do fundo nas determinações de Mn com diferentes quantidades de Pd e/ou $Mg(NO_3)_2$ .....	36
<b>Figura 12</b>	A - Curvas de atomização e pirólise para as medidas de Cu usando 5 $\mu L$ de $H_2O_2$ 30 % m/v como modificador químico. B - Curvas de atomização e pirólise para as medidas de Mn usando 5 $\mu L$ de $H_2O_2$ 30 % m/v e 10 $\mu g$ de $Mg(NO_3)_2$ como modificadores químicos.....	37
<b>Figura 13</b>	Sinais de absorbância integrada em função do tempo, obtidas com diferentes temperaturas de atomização nas determinações de Mn no mel.....	38
<b>Figura 14</b>	Curvas de atomização e pirólise para determinação de Cd utilizando diferentes modificadores químicos combinados com $H_2O_2$ .....	40
<b>Figura 15</b>	Absorbância integrada do sinal (A) e do fundo (B) em função da quantidade de $NH_4H_2PO_4$ utilizada na determinação de Cd no mel.	41
<b>Figura 16</b>	Absorbância integrada em função da quantidade de Pd usada na determinação de Cd no mel.....	42
<b>Figura 17</b>	Absorbância integrada do sinal e do fundo obtidas na determinação de Cd com diferentes modificadores químicos.....	43
<b>Figura 18</b>	Curvas de atomização e pirólise obtidas na determinação de Cd no mel.....	44

# 1. INTRODUÇÃO

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

Além de ser um alimento apreciado pelo homem desde a antiguidade, o mel também teve importante papel na medicina tradicional por apresentar propriedades antioxidantes, antibactericidas, antifúngicas, dentre outras [2]. Atualmente, o mel é muito usado como insumo na indústria alimentícia.

O Brasil possui reservas florais que podem proporcionar milhares de toneladas de saboroso mel. Segundo os apicultores, a produção de mel brasileira é feita em sua maioria por pequenos produtores. Em 2005, o Brasil exportou 14,4 mil toneladas de mel, o que gerou uma receita de US\$ 18,9 milhões para o país, sendo que São Paulo, Ceará, Piauí e Santa Catarina foram os principais estados produtores [3].

Apesar deste sucesso na produção e exportação do mel brasileiro, em março de 2006 a União Européia suspendeu a importação deste produto devido à não implementação dos compromissos anteriormente firmados em relação ao monitoramento da qualidade do mel. Dentre estes compromissos está a implantação de um Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos (PNCR), desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) [4]. Este plano visa dar garantias de controle dos resíduos e contaminantes dos produtos pecuários brasileiros destinados à exportação e ao mercado interno, o que inclui o monitoramento de resíduos de vários antibióticos e de contaminantes inorgânicos, além do aumento do número de amostras a serem analisadas [5,6].

Como o mel é resultado de um processo de bio-acumulação ele pode ser usado para recolher informações relacionadas ao ambiente em que as abelhas vivem. As abelhas entram em contato não somente com o ar, mas também com o solo e a água de uma área maior que 7 km<sup>2</sup> [7,8]. Assim, as concentrações dos elementos químicos presentes no mel refletem as quantidades presentes em toda a região, o que fez com que o mel seja reconhecido como um bom indicador biológico de poluição ambiental.

Além do monitoramento ambiental a determinação de espécies inorgânicas potencialmente tóxicas no mel também é interessante para o controle da qualidade e dos aspectos nutricionais. Já a determinação dos elementos químicos considerados essenciais à dieta humana é importante para classificar o mel como uma fonte rica ou boa destes minerais [9].

A determinação de constituintes inorgânicos em alimentos ricos em açúcar é um desafio analítico, devido à interferência da matriz. A diluição da amostra pode minimizar este efeito, mas por outro lado, pode reduzir a concentração das espécies abaixo do limite de quantificação. Assim, o pré-tratamento é usualmente necessário para destruir a matriz orgânica e/ou extrair os elementos metálicos dos complexos orgânicos [10]. Obviamente, a seleção do procedimento de tratamento deve, sempre, levar em conta as espécies químicas de interesse, a matriz e a frequência analítica.

Em contraste com a variedade de floradas e com um mercado cada vez mais exigente, poucos registros da composição mineral do mel brasileiro são encontrados na literatura. Os poucos trabalhos envolvendo mel brasileiro e sua composição mineral utilizam a técnica de emissão atômica, visando um conhecimento abrangente de um grande número de constituintes, relacionado à origem e autenticidade do mel. Entretanto, a técnica de absorção atômica também pode ser bastante útil, uma vez que apresenta características importantes como: seletividade, sensibilidade, baixos limites de detecção, repetibilidade e reprodutibilidade.

A Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS) é uma das técnicas analíticas mais usadas para determinação de traços e ultratraços (concentrações da ordem de micrograma a nanograma por grama) de diferentes espécies químicas em diferentes amostras. Além disso, alguns autores relatam a análise direta do mel sem a necessidade de pré-tratamento da amostra, o que evita problemas como a contaminação e a perda do analito (espécie de interesse) por minimizar a manipulação da amostra [11-13].

Visando o desenvolvimento de um método analítico para uma amostra de interesse comercial e ambiental e também, a fim de acrescentar novas informações sobre o mel nacional, este trabalho propõe a avaliação de diferentes estratégias analíticas para a determinação de cobre, manganês e cádmio, por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O mel

O mel contém uma mistura complexa de carboidratos como frutose (25-45 % m/m), glicose (25-37 % m/m), maltose (2-12 % m/m), sacarose (0,5-3 % m/m), além de água (15-20 % m/m), minerais (0,04-0,2 % m/m), traços de muitos outros açúcares, dependendo da origem botânica, traços de ácidos orgânicos, enzimas, aminoácidos, pigmentos, pólen, cera, dentre outros, que são adicionados pelas abelhas ou se devem à manipulação ou à maturação do mel [7].

As diferenças na composição dos méis devem-se à origem, ou seja, variam de acordo com sua origem botânica, geológica, variações climáticas, processamento e armazenamento [14]. Assim, a concentração de elementos metálicos, geralmente, é maior no mel de melato que no mel floral [2].

### 2.2. Determinação de Constituintes Inorgânicos no Mel

A literatura descreve a determinação de elementos metálicos em mel de abelhas procedentes de vários países, utilizando técnicas e métodos diversos [8,11,15-17].

Ioannidou *et al.* [8] apresentaram um método para determinação de traços de contaminantes em mel e açúcares por ICP OES. Neste trabalho a amostra não foi mineralizada, mas diluída (2 % m/v de mel) e sonicada em banho de ultra-som, tornando o método rápido e adequado para análises de rotina. No entanto, os autores relataram que a repetibilidade do método não foi adequada para Pb e Zn, e em alguns casos o desvio padrão relativo foi maior que 50 %.

Rodríguez *et al.* [11] descreveram a determinação de Cr, Cu e Ni em mel por ET AAS. Após a otimização dos parâmetros experimentais para a determinação das espécies individualmente, um método combinado foi desenvolvido, utilizando a ferramenta estatística das superfícies de resposta, para a determinação direta das três

espécies. O método proposto foi aplicado na caracterização de amostras do noroeste da Espanha.

O monitoramento ambiental e a avaliação de abelhas melíferas e seus produtos como bioindicadores, foi descrito por Conti e Botré [18], que avaliaram a concentração de Cd, Cr e Pb por ET AAS em abelhas melíferas, méis, polens, própolis e cera. Os autores constataram que as abelhas, e em menor proporção alguns de seus produtos (pólen, própolis e cera), podem ser considerados bioindicadores representativos da poluição ambiental.

Dentre os estudos envolvendo o mel nacional, está o de Mendes *et al.* [17] que utilizaram digestão assistida por microondas e por banho de ultra-som para o pré-tratamento de mel de diferentes regiões do Brasil, visando à determinação de constituintes inorgânicos por ICP OES. Neste trabalho, foi possível observar que o mel brasileiro, de uma forma geral, não é contaminado por espécies potencialmente tóxicas (dependendo da concentração), como chumbo e cádmio e pode ser considerado uma boa fonte nutritiva de Mn (VRD = 2 mg/dia).

A literatura também reporta alguns trabalhos de diferentes grupos de pesquisa brasileiros, cujo objetivo é a caracterização do mel a partir da determinação de compostos voláteis [19,20], compostos não voláteis [21], oligossacarídeos [22], conteúdo de cinzas [23] e outras propriedades físico-químicas [24].

### **2.3. Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite**

Em 1955, Alan Walsh [25] reportou um método de análise química baseado na absorção de energia radiante por átomos neutros, não excitados, no estado gasoso. A absorção de radiação por átomos isolados está associada à promoção de elétrons de seus níveis fundamentais para níveis quânticos de mais alta energia ao mesmo tempo em que a emissão se associa ao retorno destes elétrons ao nível fundamental.

A quantidade de radiação absorvida está relacionada à quantidade de átomos presentes no atomizador, desconsiderando radiações de fundo como a absorção molecular e o espalhamento da radiação. Com o uso de uma fonte de radiação específica e a seleção de um comprimento de onda adequado, pode-se determinar um

elemento químico na presença de outros. Os átomos, necessários para a quantificação em absorção atômica, são produzidos através do fornecimento de energia térmica suficiente para dissociar os compostos químicos em átomos livres, processo que é denominado de atomização [26].

A atomização em chama fornece uma medida rápida e de fácil execução para uma variedade de elementos metálicos, mas os limites de detecção são relativamente baixos, geralmente da ordem de partes por bilhão a partes por milhão, devido, principalmente, ao sistema de nebulização, à presença da matriz e de uma atmosfera com componentes altamente reativos [27].

Uma importante alternativa para substituir a chama é o uso de atomizadores eletrotérmicos em Espectrometria de Absorção Atômica. Estes atomizadores, geralmente, são tubos de grafite de 3 a 6 mm de diâmetros interno e de 20 a 40 mm de comprimento, aquecidos por resistência elétrica com alta corrente (alternada) e baixa voltagem, que possibilitam o uso de pequenos volumes de amostra (microlitros) e fornecem limites de detecção menores que aqueles da chama, da ordem de partes por trilhão a partes por bilhão.

A alta sensibilidade da GF AAS resulta de sua facilidade em reter uma porção significativa da espécie de interesse, atomizada, no caminho óptico do equipamento, por um período suficiente de tempo. O requisito básico para conseguir essa condição foi postulado por L'vov: "A taxa de formação de átomos livres deve ser igual ou grandemente maior que sua remoção do caminho óptico" [28].

A técnica de GF AAS permite a análise de amostras líquidas, dissolvidas ou sólidas. Para a determinação, uma quantidade medida ou pesada da amostra é introduzida no forno de grafite e submetida a uma série de etapas de aquecimento e, tanto quanto possível, a matriz é removida antes da etapa de atomização, a qual ocorre após um acréscimo rápido da temperatura. Durante as etapas de eliminação do solvente e da matriz é usado um fluxo de gás inerte, o qual é interrompido na etapa de atomização [26].

O programa de aquecimento do forno de grafite deve ser cuidadosamente selecionado, de acordo com o elemento metálico a ser determinado, para garantir a reprodutibilidade das medidas e diminuir a absorção de fundo (absorção não seletiva).

Estas importantes características têm garantido a continuação do desenvolvimento e a aplicação da GF AAS para uma grande variedade de áreas da ciência desde sua introdução, por L'vov [29], em 1959.

A GF AAS é uma das técnicas analíticas mais usadas e mais poderosas para a determinação de elementos ao nível de traços e ultra traços nas mais diversas amostras [28]. As áreas mais exploradas atualmente são de interesse ambiental, clínico e biológico.

### **2.3.1 Interferências em GF AAS**

Apesar de existir uma etapa específica para a eliminação da matriz, desde sua introdução a técnica de GF AAS tem mostrado uma susceptibilidade à interferências de matriz, as quais podem causar severas reduções ou aumentos no sinal analítico. As interferências podem ser de três tipos: espectrais, físicas e químicas [26].

As interferências espectrais podem ser de dois tipos: interferências de emissão e de absorção de fundo.

As interferências de emissão são causadas pela radiação emitida pelo tubo ou plataforma de grafite que atinge o detector. Estas levam a um aumento no ruído e ainda podem “cegar” a fotomultiplicadora provocando medidas incorretas. Interferências deste tipo podem ser evitadas através do uso de uma etapa de limpeza eficiente e de uma temperatura de atomização adequada [26].

A absorção de fundo é a atenuação da radiação no comprimento de onda do analito pela absorção molecular e/ou pelo espalhamento da radiação por componentes da amostra não dissociados (efeito de matriz). Tais interferências podem ser atenuadas através do tratamento da amostra, do uso de corretor de fundo adequado ou do uso de modificador químico [26].

Interferências físicas tendem a alterar o perfil do pico de absorção devido a mudanças no tempo de aparecimento dos átomos livres, o que resulta em mudanças na resposta do analito às variações na temperatura. Alguns mecanismos sugeridos para interferências físicas são a covoatilização do analito com a matriz [30] e a oclusão do analito nos cristais da matriz [31].

Interferências químicas podem ser causadas pela reação entre a espécie de interesse e as paredes quentes do forno de grafite formando carbetos refratários e pela formação de moléculas gasosas estáveis que são perdidas antes de serem decompostas em átomos. Para evitar este tipo de interferência é feito o tratamento químico da superfície do forno de grafite [32].

### **2.3.2. Condições Estabilizadas de Temperatura na Plataforma do Forno de Grafite**

Um importante passo para melhorar a sensibilidade da técnica de GF AAS foi o conceito de temperatura estabilizada na plataforma do forno STPF, que inclui:

- O aquecimento da plataforma de maneira homogênea, obtido com o uso da plataforma integrada de L'vov;

- O cálculo da concentração do analito baseado na absorbância integrada ao invés da altura do pico de absorção;

- O uso de forno com revestimento de grafite pirolítico para diminuir a reatividade e a intercalação do analito com as paredes e/ou plataforma de grafite;

- O uso de amostrador automático para garantir precisão e repetibilidade na introdução da amostra no forno de grafite;

- Aquecimento e eletrônica rápidos para obter medidas mais precisas do sinal de absorbância e minimizar interferências;

- O uso de correção de fundo, baseada no efeito Zeeman, ou seja, na divisão das linhas espectrais na presença de um campo magnético;

- O uso de modificadores químicos para minimizar interferências [27].

#### **2.3.2.1. Modificadores Químicos**

A definição de modificadores químicos foi formulada por Ediger em 1973 [32]. “Modificadores químicos podem ser definidos como compostos introduzidos no atomizador de grafite juntamente com a amostra para diminuir drasticamente o efeito de matriz”.

A utilização dos modificadores químicos baseia-se na remoção da matriz em uma etapa diferente daquela em que o analito é atomizado. Isso pode ser alcançado de duas maneiras: convertendo os compostos da matriz em substâncias mais voláteis ou diminuindo a volatilidade dos compostos do analito [33].

A maneira de selecionar um modificador químico adequado para uma determinada análise é estudar os mecanismos de ação do mesmo. Porém, existe um grande número de processos químicos e físicos que ocorrem no sistema grafite – amostra - modificador químico, nas faixas de temperatura de 20 a 120°C (secagem), de 110 a 1400°C (pirólise) e de 1400 a 2500°C (atomização). Isso leva a consideráveis contradições entre as descrições dos mecanismos de ação de modificadores químicos por diferentes autores.

Uma grande variedade de compostos pode ser usada como modificadores químicos. Entretanto, os mais eficientes e versáteis podem ser agrupados da seguinte forma: (1) ácidos nítrico e oxálico e seus sais de amônio, (2) nitratos de espécies metálicas (exceto as espécies do grupo da platina), (3) fosfato de amônio, (4) carbeto de alto ponto de fusão, (5) compostos orgânicos (como ácido ascórbico, ácido etilenodiaminotetracético e seus sais), (6) íons de metais de transição com alto número de oxidação (sais de W(VI), Mo(VI), Zr(IV), dentre outros) e (7) compostos de metais do grupo da platina (exceto ósmio) [33].

O ácido nítrico elimina interferências provocadas pela presença de cloro na matriz, por formar HCl, que é evaporado. O cloro pode formar cloretos voláteis do analito (por exemplo, a sublimação de cloretos de cádmio que ocorre a 320-353 °C) ou provocar a evaporação da matriz no momento da atomização, excedendo a capacidade do corretor de fundo, ou ainda, pode reagir com o analito na fase gasosa, no momento da atomização [33].

O fosfato de amônio é mais usado como modificador químico nas determinações de Pb, Cd, Zn e Sn, porque pode formar fosfatos insolúveis com o metal de interesse, fosfatos estes que, com o acréscimo da temperatura, são convertidos a pirofosfatos, os quais são mais estáveis termicamente permitindo aumentar a temperatura de pirólise [33].

O paládio forma ligas metálicas termicamente estáveis com vários íons metálicos, o que evita a volatilização do analito antes da etapa de atomização.

Os modificadores químicos podem ser divididos em duas classes de acordo com o procedimento de uso dos mesmos. Os modificadores químicos convencionais são introduzidos no atomizador juntamente com a amostra, sempre que esta for analisada. Já os modificadores de uso prolongado (conhecidos como modificadores permanentes) são adicionados em grande quantidade, no atomizador, antes do início da análise das amostras ou são aplicados sobre a superfície do atomizador por um procedimento especial (como por exemplo, por eletrodeposição).

## 2.4. Tratamento da amostra

Tanto os métodos clássicos quanto os métodos espectroquímicos de análise exigem um tratamento da amostra antes da determinação propriamente dita, o qual pode envolver a solubilização ou a decomposição da mesma. Em tratamentos por solubilização a amostra é dissolvida em reagentes adequados a baixas temperaturas e pode ou não envolver reações químicas. Por outro lado, nos tratamentos por decomposição, provocam-se transformações químicas da amostra, que geralmente envolvem a eliminação da matriz a fim de obter a espécie de interesse o mais livre possível, em solução.

Durante a seleção de um método de preparo de amostra devem ser levadas em consideração algumas características que são desejáveis: simplicidade, robustez, baixo custo, frequência analítica elevada, aplicação multielementar, além de baixa acidez residual e geração da menor quantidade possível de resíduos e efluentes.

Métodos de decomposição por via seca ou úmida, envolvendo o aquecimento das amostras em sistemas abertos ou fechados, utilizando várias formas de energia como térmica, ultra-som ou radiante (infravermelho, ultravioleta e microondas) são empregados. Atualmente, também são consideradas: a solubilização em linha de amostras, a lixiviação dos analitos de interesse, a especiação, a análise de suspensão, a análise *in situ*, *in vivo*, entre outras [34].

Assim, é necessário selecionar a forma mais adequada para o tratamento da amostra de interesse, entre os diferentes procedimentos possíveis, a fim de garantir a confiabilidade das medidas.

### 2.4.1. Mineralização assistida por microondas

Microondas são ondas eletromagnéticas com frequência entre 300 e 300.000 MHz. A radiação na faixa das microondas possui energia não ionizante que causa a movimentação de íons e a rotação de dipolos, mas não afeta a estrutura molecular. A frequência de 2450 MHz é a mais usada em fornos de microondas domésticos, fornecendo potências entre 600 e 700 W [35].

A mineralização ácida de amostras assistida por microondas se baseia no aquecimento da amostra pela energia das microondas. Esta técnica geralmente apresenta vantagens em relação aos procedimentos convencionais de mineralização (via úmida, oxidação a seco, etc.), que incluem: o aumento da velocidade das reações como resultado das altas temperaturas e pressões atingidas nos vasos fechados. Os vasos geralmente são feitos de polímeros, que não levam a contaminações, não adsorvem a amostra e não absorvem as microondas. Além disso, o uso de vasos fechados torna o tratamento da amostra menos susceptível a contaminações pelo ambiente e evita a perda de analitos voláteis [35].

Os equipamentos comerciais disponíveis são de dois tipos: forno de microondas focalizadas, que utiliza um sistema de guia de ondas e opera à pressão atmosférica, e forno de microondas convencional, que utiliza um sistema tipo cavidade e opera à altas pressões [34].

Atualmente, a mineralização ácida assistida por microondas é uma técnica bem estabelecida, usada para diversos tipos de amostras (biológicas, botânicas, metalúrgicas, etc.) para determinação, principalmente, de espécies metálicas por diferentes técnicas de análise.

Moreira *et al.* [36] investigaram a eficiência de procedimentos de mineralização usando forno de microondas em comparação com bloco aquecedor, para determinação de chumbo em líquens por ET AAS. Neste trabalho, as porcentagens de recuperação encontradas pelos dois métodos não foram estatisticamente diferentes e o método com forno de microondas foi mais rápido (20 min) que aquele em bloco aquecedor (20 h).

Vinte e cinco amostras de mel turco de diferentes origens botânicas foram utilizadas por Tuzen *et al.* [37] na determinação de constituintes metálicos por AAS, após três diferentes tratamentos da amostra: obtenção de cinzas, digestão assistida por microondas e digestão via úmida. Nesse trabalho, a digestão do mel em forno de

microondas forneceu as recuperações mais adequadas (de 98 a 102 %), quando comparadas às dos demais tratamentos avaliados. Observou-se que o ferro foi o elemento mais abundante e o cádmio o elemento minoritário nos méis turcos analisados.

Ajtony *et al.* [38] elaboraram um método para determinação simultânea de As, Cd, Cr, Cu e Pb em amostras de mel por GF AAS. Os tratamentos da amostra testados foram a análise direta (sem digestão) e a digestão assistida por microondas. Como as recuperações obtidas com os dois tratamentos foram bastante próximas (por exemplo: 97 e 101 % para Cd após as análises direta e indireta, respectivamente) os autores selecionaram a análise direta do mel como o procedimento mais adequado.

#### **2.4.2. Solubilização em banho de Ultra-Som**

Ultra-som é a denominação dada a ondas mecânicas (ondas que se propagam através de uma sucessão de compressões e rarefações, som) com frequência superior a 16 kHz.

A ciência do ultra-som pode ser dividida em duas áreas: alta potência e baixa potência. As ondas ultra-sonoras de alta potência (de  $< 1 \text{ W}$  a milhares de  $\text{W cm}^{-2}$ ) causam mudança física e química porque produzem cavitação e microfluxos nos líquidos, aquecimento e ruptura nos sólidos e instabilidade na superfície de sistemas líquido-líquido e líquido-gás [39]. As ondas ultra-sonoras de baixa potência (frequência maior que 20 kHz) são usadas em muitos campos da ciência, engenharia e medicina para testes e diagnósticos técnicos (exame de fetos, inspeções de soldas e medidas de espessuras).

O estudo da influência das ondas ultra-sônicas sobre sistemas químicos é chamado de sonoquímica e sua aplicação de sonicação.

A sonoquímica se desenvolveu devido ao fenômeno da cavitação. A cavitação é a criação e a implosão de microbolhas de gás no interior de um líquido.

A interação das ondas sonoras com sistemas químicos pode favorecer diferentes tipos de reação (adição, oxidação, redução de ésteres, etc), tanto em meio homogêneo quanto heterogêneo. Entre as principais vantagens dos métodos de sonicação, destacam-se: a redução do tempo de reação; a redução da quantidade de reagente; a

seletividade; o favorecimento de reações que não ocorrem em condições normais e a simplificação de alguns sistemas reacionais (redução de custos) [39].

Na química analítica a sonicação pode ser um modo efetivo de extração das espécies químicas em diversos tipos de amostras, uma vez que o processo de cavitação gera altas temperaturas (aproximadamente 5000 °C) pela ação mecânica entre partículas sólidas e fluídas, que podem facilitar processos como dissociação, fusão e lixiviação [17].

No entanto, um rigoroso controle das condições experimentais é fortemente recomendado para evitar perdas na precisão e na exatidão dos métodos [40]. Neste sentido, Nascentes *et al.* [41] propuseram algumas condições de otimização para a obtenção de máxima intensidade de cavitação em banhos de ultra-som. Os resultados obtidos permitiram estabelecer as seguintes condições para máxima intensidade de cavitação, nos banhos avaliados: 1 L de água à temperatura ambiente, 0,2 % (v/v) de detergente, posição central e ao fundo do banho e somente uma amostra deve ser sonicada por vez.

Atualmente, a sonicação tem sido bastante usada na homogeneização de amostras sólidas finamente pulverizadas em um líquido (suspensão), antes de sua introdução no forno de grafite, na homogeneização de amostras heterogêneas e também em pré-tratamentos de amostras sólidas que envolvem a lixiviação ácida de metais de um sedimento para um meio líquido (extração sólido – líquido) [42,43].

Maduro *et al.* [44] estudaram três diferentes métodos para o tratamento de amostras baseados em ultra-som: a ultra-sonicação automatizada para amostragem de suspensões, a extração sólido – líquido assistida por ultra-som e o uso de enzimas em conjunto com a ultra-sonicação, para a determinação de Pb e Cd em amostras biológicas por ET AAS. Os autores relataram que o método de amostragem de suspensões pode ser usado com sucesso para a determinação de elementos traço em diferentes matrizes. No entanto, os outros dois métodos não apresentaram eficiência satisfatória no processo de extração das espécies de interesse em várias das amostras testadas.

### 2.4.3. Solubilização com hidróxido de tetrametilamônio:

O TMAH é um reagente com a fórmula química  $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ , fortemente alcalino, que provoca a cisão hidrolítica e a metilação em ésteres, amidas e alguns éteres em temperaturas entre 250 e 300 °C. É capaz de dissociar as espécies químicas e de complexar-se efetivamente com muitos elementos metálicos, além de ser solúvel em água e comercializado com elevado grau de pureza. O TMAH tem se mostrado adequado para tratamentos de amostras que envolvem a digestão, extração, ou a formação de suspensões, para determinações por técnicas espectroanalíticas [45,46].

A hidrólise alcalina de amostras utilizando TMAH é um tipo de tratamento simples, rápido, que necessita de pequenas quantidades do reagente, geralmente não necessita aquecimento da solução e tem se mostrado especialmente adequado para determinação por GF AAS, ou por emissão atômica (ICP), uma vez que estas técnicas não requerem a mineralização completa da amostra [47].

Silva *et al.* [48] apresentaram um método alternativo à mineralização ácida para o preparo de diferentes tipos de amostras biológicas de origem marinha. Foram avaliadas solubilizações com TMAH a temperatura ambiente, com aquecimento e com agitação ultrasônica, para posterior determinação de Cu, Cd, Ni, Pb, Mn e Cr por GF AAS. Os autores encontraram concentrações com concordância satisfatória, em materiais biológicos de referência certificados e relataram que as amostras preparadas com TMAH podem ser armazenadas a temperatura ambiente por até três anos.

Nóbrega *et al.* [45] fizeram uma revisão sobre o preparo de amostras em meio alcalino, com foco em determinações por espectrometria atômica, onde são apresentados vários trabalhos da literatura que utilizam o TMAH em diferentes tratamentos de amostras biológicas de diferentes tipos, para a determinação de várias espécies metálicas. Os autores concluem que o meio alcalino pode melhorar o desempenho de técnicas como ICP-MS e GF AAS, apesar de alguns casos necessitarem do uso de métodos de adição de analito para fornecerem resultados exatos.

### **3. OBJETIVOS**

Desenvolver um método adequado para o tratamento do mel, para análise por GF AAS. Para isso, investigar diferentes procedimentos para o tratamento da amostra, buscando uma forma simples e com menor manipulação.

Avaliar o uso de diferentes reagentes como modificadores químicos nas determinações de Cu, Mn e Cd.

Otimizar as temperaturas e tempos de cada etapa de aquecimento do forno de grafite para cada analito.

Quantificar Cu, Mn e Cd em amostras de mel brasileiro de diferentes procedências.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1. Equipamentos e Reagentes

- Espectrômetro de Absorção Atômica – Perkin-Elmer, modelo AAnalyst 600, equipado com corretor de fundo Zeeman, com atomizador de grafite aquecido transversalmente, com plataforma de L'vov e com amostrador automático.
- Lâmpadas de catodo oco operando a 324,8 nm, 20 mA de corrente aplicada e 0,7 nm de abertura da fenda para determinação de Cu, e 279,5 nm, 20 mA e 0,2 nm para determinação de Mn.
- Lâmpada de Eletrodo sem descarga (EDL) operando a 228,8 nm, 230 mA e 0,7 nm para determinação de Cd.
- Argônio (pureza > 99,999 %) – White Martins.
- Banho de Ultra-som – Unique, modelo USC 1400, 120 W.
- Forno de microondas – Provecto, modelo DGT 100.
- Desionizador de água – Milli-Q, Millipore.
- Analisador de Carbono Orgânico Total – Shimadzu, modelo TOC 5000.
- Soluções padrão estoque de Cu, Mn e Cd 1,000 g L<sup>-1</sup>.
- Ácido nítrico (65% m/v) – Merck, previamente bidestilado em Destilador sub-ebulição (Marconi, modelo MA 075).
- Peróxido de hidrogênio (30% m/v) – Merck.
- Hidróxido de tetrametilamônio (25% m/v) – Fluka.
- Cloreto de paládio puro (60 % de Pd) – Reagen.
- Diidrogenofosfato de amônio – Ecibra
- Nitrato de magnésio hexahidratado - Acros

### 4.2. Procedimentos analíticos

Sabe-se que a determinação de traços é muito susceptível à contaminação pela manipulação, por isso tomou-se um cuidado especial com a limpeza das vidrarias, que

foram preenchidas com uma solução de HCl 10% v/v e HNO<sub>3</sub> 20% v/v, deixadas em repouso por 24 horas e enxaguadas várias vezes com água desionizada.

Logo nas primeiras determinações por GF AAS verificou-se a necessidade de utilizar ácido nítrico purificado (bidestilado), uma vez que soluções de HNO<sub>3</sub> 2 % v/v, de diferentes marcas, com grau de pureza p.a. (adequado para análise) apresentaram absorvâncias maiores que 0,0044 s<sup>-1</sup> indicando que os ácidos apresentam contaminação por íons metálicos, o que pode dificultar a obtenção das curvas analíticas e levar a falsos resultados.

Para avaliação dos desvios padrão dos métodos analíticos estudados as amostras foram preparadas em triplicada e as medidas foram feitas em duplicata.

O programa de aquecimento do forno de grafite utilizado na etapa de otimização do tratamento da amostra foi aquele indicado pelo fabricante do equipamento para cada analito. Uma vez selecionado o tratamento da amostra, foi feita a otimização das temperaturas e dos tempos de rampa e permanência em cada etapa do programa de aquecimento.

Foram feitas medidas de carbono orgânico residual em amostras tratadas com microondas e com US, a fim de avaliar a destruição da matriz e de estabelecer uma possível relação entre este resultado e o desempenho analítico de cada tratamento da amostra. Para isso, foram preparadas amostras em triplicata usando os tratamentos descritos nos itens 4.4.1 e 4.4.4, as quais foram diluídas adequadamente e levadas ao analisador de carbono orgânico total.

### **4.3. Amostras**

Uma única amostra comercial, produzida pelo Departamento de Ecologia Geral do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (origem botânica: laranjeira), foi utilizada, como amostra modelo para o estudo dos diferentes tratamentos e para a otimização dos parâmetros instrumentais. Uma vez definido o procedimento analítico mais adequado para a determinação das espécies de interesse na matriz em questão, foram determinadas as concentrações de Cu, Mn e Cd nas amostras de mel brasileiro de diferentes procedências, descritas na Tabela 1:

**Tabela 1:** Produtor, origem geográfica e botânica das amostras analisadas.

<b>Apiário</b>	<b>Origem botânica predominante</b>	<b>Cidade / Estado</b>
Departamento de Ecologia Geral do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo	Laranjeira	São Paulo / SP
Departamento de Ecologia Geral do IB - USP	Cipó-uva	São Paulo / SP
Fazenda Canta Galo	Eucalipto	Águas de São Pedro / SP
Apiários Girassol	Laranjeira	Uberlândia / MG
Apiários Girassol	Eucalipto	Uberlândia / MG
Apiários Girassol	Silvestre	Uberlândia / MG
Apisomer (Divino Mel)	Não definida	Curitiba / PR
Agreco	Eucalipto	Gravatal / SC
Oquilder R. Silva	Acácia	Boa Vista / RR

#### **4.4. Tratamentos da amostra**

Diferentes estratégias de tratamento da amostra foram estudadas, a fim de se encontrar um procedimento simples, rápido, com a menor manipulação da amostra possível e que fornecesse resultados precisos e exatos. Tais estratégias envolveram tanto a mineralização quanto apenas a solubilização do mel, antes de sua análise por GF AAS.

##### **4.4.1. Mineralização ácida em forno de microondas.**

No frasco adequado para o forno de microondas (bomba de PTFE), pesou-se 1 g de mel e adicionaram-se 2 mL de HNO<sub>3</sub> 65 % m/v e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % m/v. Essa mistura foi submetida às etapas de aquecimento apresentadas na Tabela 2 e a seguir, avolumada para 10 mL [17]. Para efeito de comparação entre os resultados das

diferentes modificações deste procedimento é importante notar que com este, obtém-se uma solução contendo uma razão percentual  $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2:\text{mel}$  igual a 20 : 20 : 10 v/v:v/v:m/v.

**Tabela 2.** Programa de aquecimento do forno de microondas.

<b>Etapa</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Potência, W</b>	320	0	320	520	740
<b>Tempo, min.</b>	1	5	5	5	5

Na tentativa de minimizar os efeitos de degradação do ácido sobre o tubo de grafite foi avaliada uma modificação do procedimento anterior, na qual foram usados 0,2 mL de  $\text{HNO}_3$  ao invés de 2 mL. Neste caso, obtém-se uma solução contendo uma razão percentual  $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2:\text{mel}$  igual a 2 : 20 : 10 v/v:v/v:m/v.

Também foram avaliadas mineralizações utilizando massas menores de mel. Para isso, pesou-se 0,5 ou 1 g de solução de mel 50 % m/m, adicionou-se 1 mL de  $\text{HNO}_3$  65 % m/v e 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % m/v, submeteu-se as amostras ao programa de aquecimento (Tabela 2) e completou-se o volume da amostra mineralizada para 10 ou 25 mL, o que resultou em soluções contendo razões percentuais  $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2:\text{mel}$  iguais a 10 : 10 : 2,5 ou 4 : 4 : 2 v/v:v/v:m/v, respectivamente.

#### **4.4.2. Mineralização ácida em chapa de aquecimento.**

Em béqueres de 100 mL, pesou-se 1 g da solução de mel (50 % m/m), adicionou-se 0,05 mL de  $\text{HNO}_3$  e 0,05; 0,1; 1 ou 2,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , aqueceu-se à ebulição por 1 hora e avolumou-se para 25 mL, ou seja, utilizou-se soluções de mel contendo  $\text{HNO}_3$  0,2 % v/v, mel 2 % m/v e  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,2; 0,4; 4 e 10 % v/v.

#### **4.4.3. Solubilização com hidróxido de tetrametilamônio:**

Foram utilizadas diferentes quantidades de TMAH para a solubilização do mel. Para isso, pesou-se 1 g de solução de mel (50 % m/m), em balão de 25 mL, adicionou-

se 5, 50 ou 500  $\mu\text{L}$  de TMAH, para obter soluções com TMAH 0,02; 0,2 e 2 % v/v, completou-se o volume e aqueceu-se em banho-maria a 60  $^{\circ}\text{C}$ , por uma hora.

Também foi avaliado o uso de uma maior quantidade de TMAH (40 % v/v) para solubilizar a amostra. Neste caso, pesou-se 0,5 g de mel, dissolveu-se com 2 mL de TMAH, aqueceu-se por 4 horas em chapa de aquecimento e completou-se o volume para 5 mL. Para determinação de Mn, esta solução foi diluída 10 vezes (TMAH 4 % v/v).

#### **4.4.4. Solubilização em banho de Ultra-Som:**

Transferiu-se 1 g da solução de mel (50 % m/m), previamente filtrada em papel de filtro quantitativo (Whatman 40), para balão de 25 mL, adicionou-se 0,5 mL de  $\text{HNO}_3$  (solução  $\text{HNO}_3$  2 % v/v), submeteu-se a solução ao banho de US por 20 minutos e completou-se o volume [17].

Foram avaliadas algumas modificações deste tratamento com US, como o uso de uma menor concentração de ácido (solução  $\text{HNO}_3$  0,2 % v/v), a não filtração da solução de mel (50 % m/m), a sonicação desta solução de mel seguida da sonicação da solução amostra ( $\text{HNO}_3$  0,2 % v/v e mel 2 % m/v) durante 5 a 30 minutos.

Logo nos primeiros experimentos utilizando o tratamento com US observou-se rápida deposição de grande quantidade de carbono, na plataforma do forno de grafite, o que diminui a sua vida útil. Para contornar este problema, foi avaliado o uso de peróxido de hidrogênio, para uma oxidação mais efetiva da matriz na etapa de pirólise, e o uso de uma amostra duas vezes mais diluída ( $\text{HNO}_3$  0,2 % v/v e mel 1 % m/v).

A fim de melhorar a pirólise, foi feita a co-injeção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e amostras solubilizadas com US. Para isso, utilizou-se 5 ou 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  15 ou 30 % m/v junto com 20  $\mu\text{L}$  da amostra. Comparou-se o desempenho do sistema na presença e na ausência deste oxidante durante a obtenção da curva analítica.

#### **4.5. Avaliação do uso de modificadores químicos**

Uma vez selecionado o tratamento da amostra mais adequado, foi feita uma avaliação do uso de diferentes modificadores químicos, a fim de melhorar as etapas de pirólise e atomização.

Foram avaliados os modificadores químicos Pd e  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  tanto combinados quanto de forma individual, nas determinações de Cu e Mn. Para isso, as determinações de Cu e Mn foram feitas com co-injeção de soluções de Pd 0,1 ou 1  $\text{g L}^{-1}$  e/ou  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  1 ou 2  $\text{g L}^{-1}$ , de modo a adicionar massas de 0,5 a 20  $\mu\text{g}$  destes modificadores em 20  $\mu\text{L}$  de amostra, e de solução de Cu e Mn (com concentração igual à do ponto central da curva analítica).

Nas determinações de Cd, avaliou-se o uso de Pd (de 5 a 20  $\mu\text{g}$ ) e  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (de 5 a 50  $\mu\text{g}$ ) como modificadores químicos, de modo individual e combinados com 3  $\mu\text{g}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ .

Além dos modificadores químicos descritos anteriormente utilizou-se 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % m/v, uma vez que o tratamento da amostra selecionado foi a solubilização em banho de US, que leva a produção de carbono na superfície da plataforma do forno de grafite, como descrito em 4.4.4.

#### **4.6. Programa de Aquecimento do Forno de Grafite**

O programa de aquecimento do forno de grafite é constituído por duas etapas de secagem, uma etapa de pirólise, uma de atomização e uma última etapa de limpeza.

Durante a seleção do procedimento mais adequado para o tratamento da amostra, o programa de aquecimento do forno de grafite utilizado foi aquele indicado pelo fabricante do equipamento, para cada analito (Tabela 3).

**Tabela 3.** Programa de aquecimento do forno de grafite indicado pelo fabricante do equipamento para determinação de Cu, Mn e Cd.

Etapa	Parâmetro	Elemento		
		Cu	Mn	Cd
1 <sup>a</sup> secagem	Temperatura, °C	110	110	110
	Rampa, s	1	1	1
	Permanência, s	30	30	30
2 <sup>a</sup> secagem	Temperatura, °C	130	130	130
	Rampa, s	15	15	15
	Permanência, s	30	30	30
Pirólise	Temperatura, °C	1200	1300	500
	Rampa, s	10	10	10
	Permanência, s	20	20	20
Atomização	Temperatura, °C	2000	1900	1500
	Rampa, s	0	0	0
	Permanência, s	5	5	5
Limpeza	Temperatura, °C	2450	2450	2450
	Rampa, s	1	1	1
	Permanência, s	3	3	3

Para a otimização do programa de aquecimento, as temperaturas e os tempos de rampa e permanência de cada etapa foram avaliados de forma univariada, observando-se os valores de absorvância integrada ( $s^{-1}$ ) e o perfil dos picos de absorção.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sabe-se que o mel é uma matriz heterogênea, devido principalmente à presença de resíduos de cera, própolis e materiais orgânicos insolúveis em água, em sua composição. Além disso, o mel verdadeiro (não adulterado) cristaliza com o passar do tempo, o que faz da amostragem uma etapa muito importante na determinação de espécies que podem estar na forma de complexos nesta amostra.

Neste trabalho o mel foi submetido a aquecimento em banho-maria a 60°C sempre que o mesmo apresentou-se cristalizado.

Para facilitar a manipulação da amostra durante as pesagens, antes de alguns dos experimentos, 5 ou 10 g de mel foram usados para preparar uma solução aquosa 50 % m/m. Quando esta solução é preparada, observa-se que não ocorre a solubilização completa do mel, uma vez que restam sólidos finos, com aparência de fibras, em suspensão. Provavelmente, tais sólidos são resíduos de cera de abelha.

Este problema de heterogeneidade pode ser contornado fazendo-se a filtração da solução. No entanto, uma avaliação do efeito da filtração da solução de mel (50 % m/m) sobre os resultados da determinação de Cu por GF AAS mostrou que, apesar de minimizar a dispersão das medidas (o desvio padrão relativo das amostras filtradas foi 10 vezes menor do que o das não filtradas), ocorre diminuição do sinal analítico, resultando em uma medida de concentração 8,5 % menor. Além disso, a filtração é uma etapa adicional e lenta.

Na tentativa de se obter uma solução de mel (50 % m/m) homogênea, sem necessidade da etapa de filtração, testou-se a adição de HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e TMAH 0,2 % v/m, para promover a solubilização total do mel, após agitação a frio ou com aquecimento em banho-maria, a 60 °C. No entanto, em nenhum destes procedimentos foi observada a dissolução dos sólidos.

Estudou-se, então, a homogeneização com US, em que a solução de mel (50 % m/m) foi submetida a banho de US, por 20 minutos. Neste caso, obteve-se uma solução homogênea, mesmo na presença de partículas sólidas menores que aquelas observadas anteriormente. A eficiência deste procedimento foi avaliada através da medida de seis amostras obtidas a partir de uma solução de mel (50 % m/m), não filtrada nem sonicada, e de seis amostras sonicadas obtidas a partir de solução de mel

não filtrada e submetida a US por 20 min. Os resultados mostraram que a sonicação da solução de mel (50 % m/m) leva à diminuição do desvio padrão em uma ordem de grandeza (de 0,02 para 0,004  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Assim, nos experimentos em que a amostragem do mel foi feita utilizando uma solução aquosa 50 % m/m, esta foi previamente submetida ao banho de US por 20 min.

Neste trabalho foi feito o desenvolvimento de um método analítico para a determinação de Cu e de Mn em mel por GF AAS e, em seguida, o método desenvolvido foi adaptado para a determinação de Cd.

## **5.1. Tratamentos da Amostra**

Nesta etapa do trabalho foi feita a avaliação de diferentes procedimentos para o tratamento do mel, considerando-se o sinal analítico e o desvio padrão das medidas de Cu e Mn por GF AAS. O procedimento mais adequado foi selecionado para a determinação de Cu e Mn em diferentes amostras de mel.

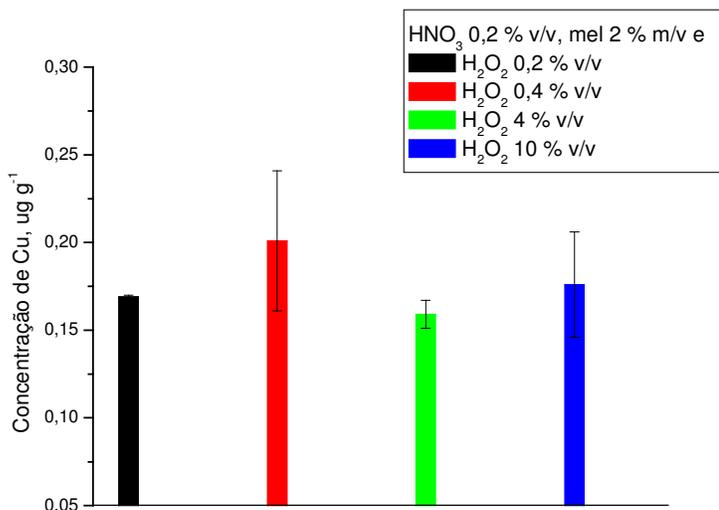
### **5.1.1. Mineralização em chapa de aquecimento**

Quando se trabalha com mineralização em chapa de aquecimento tem-se a vantagem de poder usar uma massa de mel maior que a máxima adequada para forno de microondas (1 g de mel [17]). Isso pode ser bastante útil para a determinação de espécies presentes em baixas concentrações.

Em experimentos preliminares, testou-se a mineralização de 3 g de mel com 6 mL de  $\text{HNO}_3$  e 6 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em béquer de 250 mL, coberto com vidro de relógio. Após a ebulição da mistura, observou-se o desprendimento rápido de grande quantidade de vapores vermelhos (comportamento esperado, dada a alta reatividade envolvida [12]). A mineralização prosseguiu em aquecimento brando e estava completa após 3 horas.

Como o tempo necessário para a mineralização de massas de mel maiores que 1 g foi bastante elevado avaliou-se diferentes procedimentos utilizando 0,5 g de mel.

A Figura 1 mostra as concentrações de Cu no mel em  $\mu\text{g g}^{-1}$ , encontradas fixando-se a concentração de  $\text{HNO}_3$  em 0,2 % v/v, a quantidade de mel em 2 % m/v e variando-se a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  entre 0,2 e 10 % v/v, para a mineralização em chapa de aquecimento.



**Figura 1.** Valores de concentração e desvio padrão ( $n = 3$ ) obtidos nas medidas de Cu após mineralização da amostra em chapa de aquecimento.

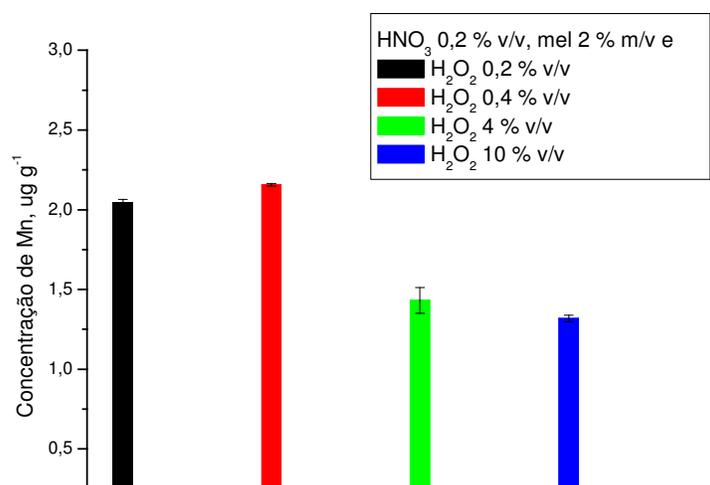
O uso de 0,2 % v/v de  $\text{H}_2\text{O}_2$  forneceu o sinal analítico com o menor desvio padrão. Quando a quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi aumentada para 0,4 % v/v obteve-se uma maior dispersão nos resultados. Já com 4 % v/v de  $\text{H}_2\text{O}_2$  observa-se uma menor dispersão dos resultados e uma medida de concentração menor, e com 10 % v/v de  $\text{H}_2\text{O}_2$  observa-se novamente, um acréscimo de desvio padrão. Tais variações não podem ser relacionadas ao aumento da quantidade de peróxido usada, e provavelmente, se devem às variações operacionais inerentes ao método de mineralização em chapa de aquecimento, uma vez que a chapa pode não ter um aquecimento homogêneo (em toda sua extensão) levando à taxas de mineralização diferentes nas três amostras de cada tratamento.

Não foi possível comparar os resultados das determinações utilizando maiores quantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com aquele obtido quando se utiliza uma menor quantidade do reagente, uma vez que as precisões obtidas foram significativamente diferentes, de acordo com o teste F com 95 % de confiança.

Nas medidas de Cu, após tratamento em chapa de aquecimento, não há uma tendência de aumento ou diminuição do sinal analítico com acréscimos consecutivos da quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizada.

Assim, o uso da menor quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi considerado o tratamento mais adequado, dentre as diferentes condições de mineralização em chapa de aquecimento avaliadas para determinação de Cu.

Para a determinação de Mn, foram obtidos melhores sinais analíticos após a mineralização com menores quantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 2). O uso de 0,4 % v/v de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi a condição mais adequada, dentre as testadas.



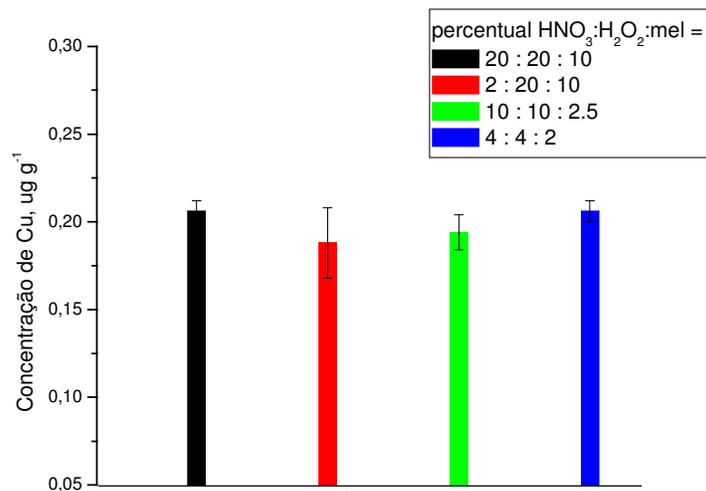
**Figura 2.** Valores de concentração e desvio padrão (n = 3) obtidos nas medidas de Mn após mineralização do mel em chapa de aquecimento.

Esperava-se que o aumento da quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levasse a uma destruição da matriz mais efetiva e, conseqüentemente, seriam obtidos maiores valores de concentração. No entanto, para nenhum dos analitos este comportamento foi observado. Provavelmente, a menor quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avaliada, 0,2 % v/v, é suficiente para o tratamento da quantidade de mel utilizada (2 % m/v) em chapa de aquecimento.

### 5.1.2. Mineralização assistida por microondas

Para mineralização do mel assistida por microondas foram feitos testes iniciais utilizando um procedimento otimizado em trabalhos anteriores deste laboratório para a determinação de constituintes inorgânicos em mel por ICP OES [17]. Em seguida, foram feitas algumas modificações neste procedimento.

Os resultados da determinação de Cu após mineralização do mel em forno de microondas usando diferentes quantidades de ácido, oxidante ( $H_2O_2$ ) e mel estão apresentados na Figura 3.



**Figura 3.** Valores de concentração e desvio padrão obtidos nas medidas de Cu após mineralização do mel em forno microondas com diferentes proporções de  $HNO_3$ ,  $H_2O_2$  e mel.

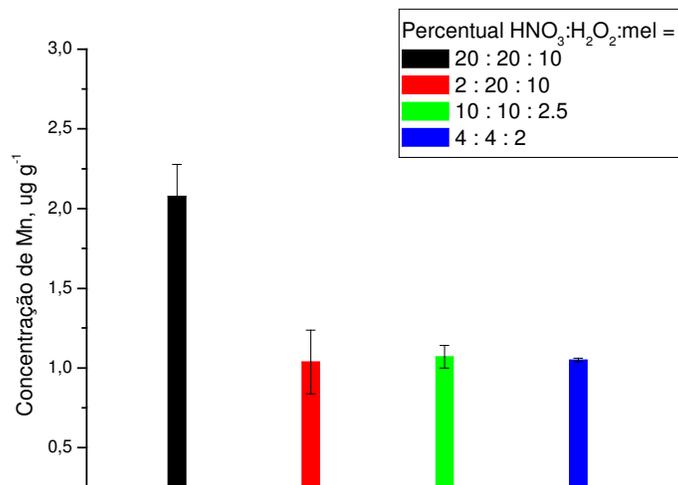
Os dois primeiros pontos (da esquerda para a direita) se referem à mineralização com quantidades fixas de  $H_2O_2$  e mel, e com 20 e 2 % de  $HNO_3$ , respectivamente. Dentre estes resultados o uso de 20 % v/v de  $HNO_3$  proporcionou o melhor sinal analítico com o menor desvio padrão.

Sabe-se que uma alta concentração de ácido facilita a reação deste com as paredes e a plataforma do forno de grafite, diminuindo a vida útil do mesmo. No entanto, o uso de  $HNO_3$  2 % v/v foi insuficiente para a mineralização completa da amostra no forno de microondas, mesmo com alta concentração de  $H_2O_2$  (20 % v/v), o

que resultou na diminuição do sinal e no aumento do desvio padrão das medidas de Cu, com relação às aquelas com 20 % v/v de HNO<sub>3</sub> (Figura 3).

O uso de 10 % m/v de mel (1 g) na mineralização por MW levou a uma sobrepressão em alguns frascos, devido a grande quantidade de gás gerada nas reações deste sistema, durante o aquecimento, provocando a perda de algumas amostras. Decidiu-se, então, avaliar a mineralização em MW utilizando massas menores de mel (2 e 2,5 % m/v). Neste caso, observou-se que o uso da proporção de HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:mel igual a 4:4:2 % v/v:v/v:m/v levou ao melhor sinal analítico e ao menor valor de desvio padrão, ou seja, foi a condição de tratamento da amostra mais adequada, para determinação de Cu, dentre as mineralizações em MW avaliadas.

A Figura 4 mostra os resultados das medidas de Mn após mineralização da amostra assistida por MW. Assim como observado nas medidas de Cu, a diminuição da quantidade de ácido leva a um menor sinal analítico.



**Figura 4.** Valores de concentração e desvio padrão obtidos nas medidas de Mn após mineralização do mel em forno microondas com diferentes proporções de HNO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e mel.

Quando a quantidade de mel a ser mineralizada foi diminuída para 2 ou 2,5 % m/v, observou-se menores valores de concentração de Mn no mel (µg g<sup>-1</sup>), ou seja, o sinal analítico medido foi menor. A proporção HNO<sub>3</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:mel em porcentagem

v/v:v/v:m/v mais adequada para a determinação de Mn após mineralização do mel com radiação microondas foi 20:20:10.

Comparando-se os procedimentos de mineralização em forno microondas com aqueles em chapa de aquecimento, observa-se que o tratamento em forno microondas leva a uma menor dispersão dos resultados para Cu, provavelmente devido à menor manipulação da amostra, o que torna o procedimento com MW menos susceptível a contaminação e devido ao aquecimento não homogêneo da chapa.

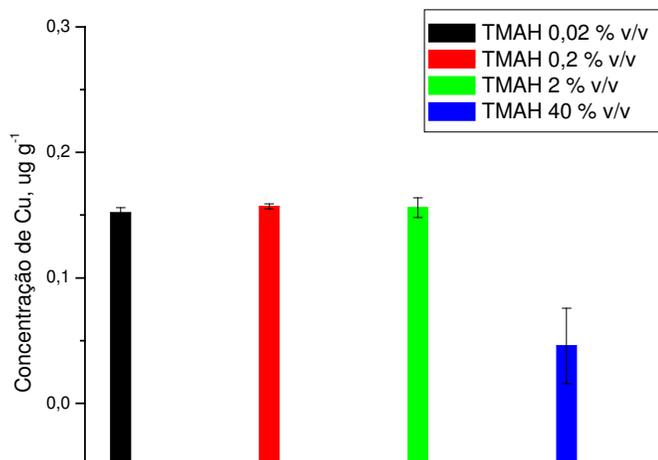
Este comportamento não foi observado nas medidas de Mn, provavelmente, porque a concentração de Mn presente na amostra é cerca de 10 vezes maior que a de Cu, e quanto menor a concentração maior o desvio padrão das medidas [49].

Com relação à simplicidade e rapidez, os tratamentos do mel são semelhantes, uma vez que a mineralização em chapa de aquecimento exige um tempo maior de aquecimento (1 hora) que em forno de microondas (20 minutos), mas essa diferença de tempo é compensada pelo tempo necessário para esfriamento das bombas de PTFE (2 horas), que é maior que o dos béqueres (20 minutos).

Dentre os procedimentos de mineralização avaliados a mineralização assistida por microondas é o mais adequado, devido aos melhores sinais analíticos, menor dispersão dos resultados e à menor manipulação da amostra.

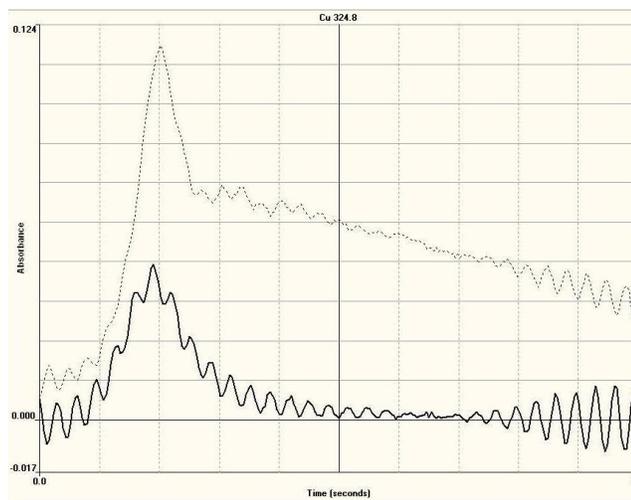
### **5.1.3. Solubilização do mel com TMAH**

Os resultados da determinação de Cu, após tratamentos de solubilização da amostra com TMAH estão apresentados na Figura 5.



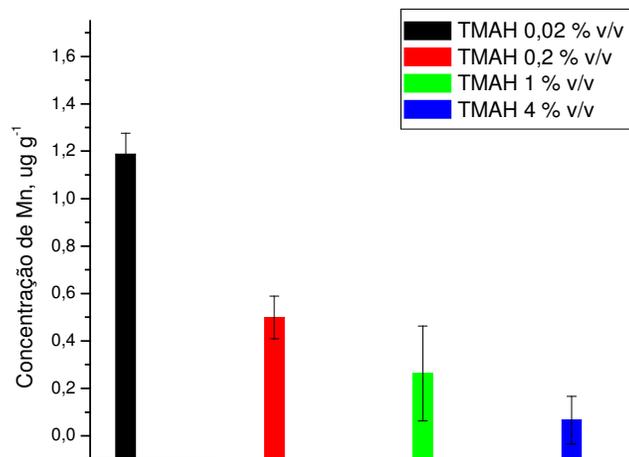
**Figura 5.** Concentração e desvio padrão ( $n = 3$ ) obtidos nas medidas de Cu no mel após solubilização com TMAH.

Quando se usa uma grande quantidade de TMAH observa-se redução do sinal analítico com picos disformes, como mostra a Figura 6, altos valores de absorvância de fundo (background) e do branco, provavelmente o excesso de TMAH leva à saturação da capacidade do corretor de fundo. Para concentrações de TMAH entre 0,02 e 2 % v/v, os resultados das determinações de Cu não foram significativamente diferentes, de acordo com o teste t pareado, com média global igual a  $0,155 \pm 0,002 \mu\text{g g}^{-1}$  de Cu e com 95 % de confiança, e apresentaram baixos valores de desvio padrão.



**Figura 6.** Sinal de absorvância integrada em função do tempo de atomização, obtido na determinação de Cu com 40 % v/v de TMAH, sendo a absorvância do analito representada pela linha contínua e a do fundo, pela linha pontilhada.

Nas determinações de Mn em amostras solubilizadas em meio alcalino (Figura 7), observa-se aumento do sinal de Mn à medida que a concentração de TMAH diminui. Provavelmente, isso ocorre devido à interferência de matriz, verificada através das altas absorbâncias de fundo e da alta absorção do branco (solução aquosa de TMAH 4 % v/v). Já com concentrações de TMAH menores que 1 % v/v, tanto a absorção do branco quanto o background diminuiram significativamente.



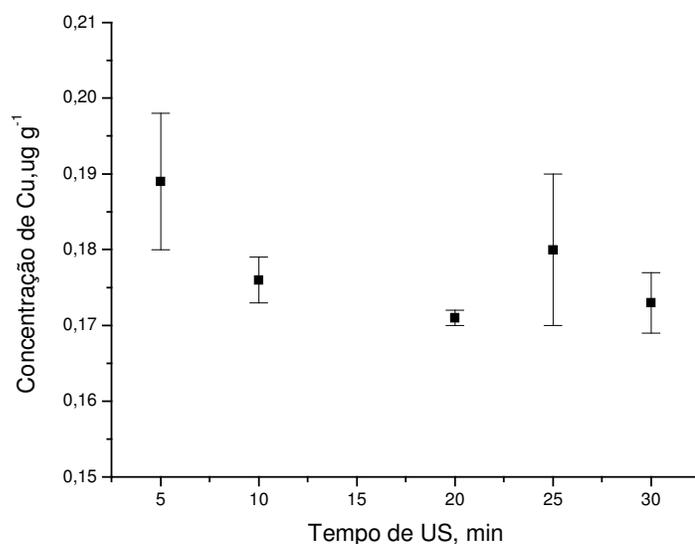
**Figura 7.** Concentração e desvio padrão (n = 3) obtidos nas medidas de Mn no mel após solubilização com diferentes quantidades de TMAH.

#### 5.1.4. Solubilização do mel em banho de Ultra-Som

A variação do tempo de US para a solubilização da solução HNO<sub>3</sub> 0,2 % v/v e mel 2 % m/v foi feita usando-se 5, 10, 20, 25 e 30 minutos de sonicação. A figura 8 mostra o efeito deste procedimento na determinação de Cu.

A variação aleatória de concentração e desvio padrão observada provavelmente está relacionada a baixa reprodutibilidade da intensidade de cavitação proporcionada pelo banho de US.

Foi adotado o menor tempo de sonicação (5 minutos), porque os resultados não mostraram uma tendência de acréscimo do sinal, nem de diminuição do desvio padrão com o aumento do tempo de sonicação.



**Figura 8.** Concentração de Cu em amostras submetidas ao banho de US, durante 5 a 30 minutos.

Os resultados das determinações de Cu e Mn, após solubilização do mel em banho de US com as duas concentrações de HNO<sub>3</sub> avaliadas, estão mostrados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Concentração e desvio padrão obtidos nas determinações de Cu e Mn após solubilização da amostra em banho de US.

<b>Cu</b>		
<b>% de HNO<sub>3</sub></b>	<b>Concentração, µg g<sup>-1</sup></b>	<b>Desvio padrão</b>
<b>0,2</b>	0,23	0,01
<b>2</b>	0,24	0,01
<b>Mn</b>		
<b>0,2</b>	2,25	0,02
<b>2</b>	1,42	0,09

Comparando-se os resultados das solubilizações em banho de US com aqueles com TMAH, observa-se que com os tratamentos em banho de US, tanto utilizando a solubilização com HNO<sub>3</sub> 0,2 % quanto com 2 % v/v levaram a desempenhos analíticos

melhores que aqueles do tratamento com TMAH, tanto para Cu (TMAH =  $0,155 \pm 0,002 \mu\text{g g}^{-1}$  de Cu) quanto para Mn (TMAH =  $1,2 \pm 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$  de Mn).

Entre o tratamento de mineralização assistida por MW e a solubilização em banho de US, a solubilização em banho de US usando  $\text{HNO}_3$  0,2 % v/v mostrou-se mais eficiente, considerando-se o sinal analítico, a simplicidade, a rapidez e a menor manipulação da amostra, características deste tratamento.

Por esta razão, os experimentos seguintes foram feitos após o tratamento da amostra com US, exceto quando descrita a utilização de outro tratamento.

### **5.1.5 Foto-oxidação do mel**

Além dos procedimentos de tratamento da amostra já apresentados, foram feitos testes de mineralização utilizando radiação ultra-violeta (UV) e peróxido de hidrogênio.

Foi utilizado um foto-reator com lâmpada UV de 125 W, com diferentes massas (0,5 a 2 g) de solução de mel 50 % (m/m) em tubos de ensaio de quartzo [50]. Adicionaram-se 0,05 mL de  $\text{HNO}_3$ , diferentes quantidades de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (de 1 a 3 mL de forma intermitente) e as misturas foram submetidas à radiação UV por 110 minutos, de forma intermitente, com ciclos de 10 minutos de irradiação e avolumadas para 25 mL.

Após a adequada diluição das amostras, foi feita a determinação da concentração de carbono orgânico total, a fim de avaliar a taxa de degradação da matriz proporcionada por este tratamento. Foram encontradas porcentagens de degradação do carbono orgânico entre 60 e 75 % (m/m). Provavelmente estes resultados poderiam ser melhorados com a otimização do procedimento experimental, apesar disso, os mesmos indicam que a foto-oxidação pode ser uma alternativa interessante para mineralização de amostras de mel.

Também foi utilizado um fotoreator ativado por microondas, para a mineralização do mel [51]. Neste caso, 10 mL de solução aquosa de mel a  $5 \text{ g L}^{-1}$  foram transferidos para o foto-reator, adicionou-se 0,01 mL de  $\text{HNO}_3$ , 0,25 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (de forma intermitente), submeteu-se a mistura às radiações UV e microondas por 63 minutos, em ciclos de 3 minutos de irradiação, seguidos por refrigeração à temperatura ambiente. As amostras mineralizadas foram avolumadas a 10 mL para a determinação de Cu e Cd por Polarografia e por GF AAS. Observou-se concordância em 50 % das concentrações

de Cu e Cd determinadas em 6 amostras diferentes de mel, utilizando as duas técnicas. O tempo total para o preparo da amostra foi de 6 à 7 horas, resultando em uma baixa frequência analítica o que é indesejável. Por esta razão, este procedimento foi considerado inadequado.

## **5.2. Medidas de carbono orgânico total**

As concentrações médias de carbono orgânico total e o desvio padrão das medidas de amostras tratadas em forno de microondas e em banho de US foram  $1584 \pm 806$  e  $7735 \pm 108$  mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Notou-se que o tratamento com MW promove uma destruição mais efetiva da matriz orgânica (redução de 90 % da concentração de carbono orgânico total) do que o tratamento com US. Porém, observou-se baixa precisão nas medidas de carbono orgânico em amostras tratadas com MW. A presença da matriz em amostras tratadas com US pode ocasionar interferências de matriz, as quais podem ser evitadas com o uso de modificadores químicos.

## **5.3. Avaliação de diferentes modificadores químicos**

Uma vez selecionado o tratamento da amostra mais adequado, solubilização em banho de US com 0,2 % v/v de HNO<sub>3</sub>, foi avaliado o uso de alguns modificadores químicos.

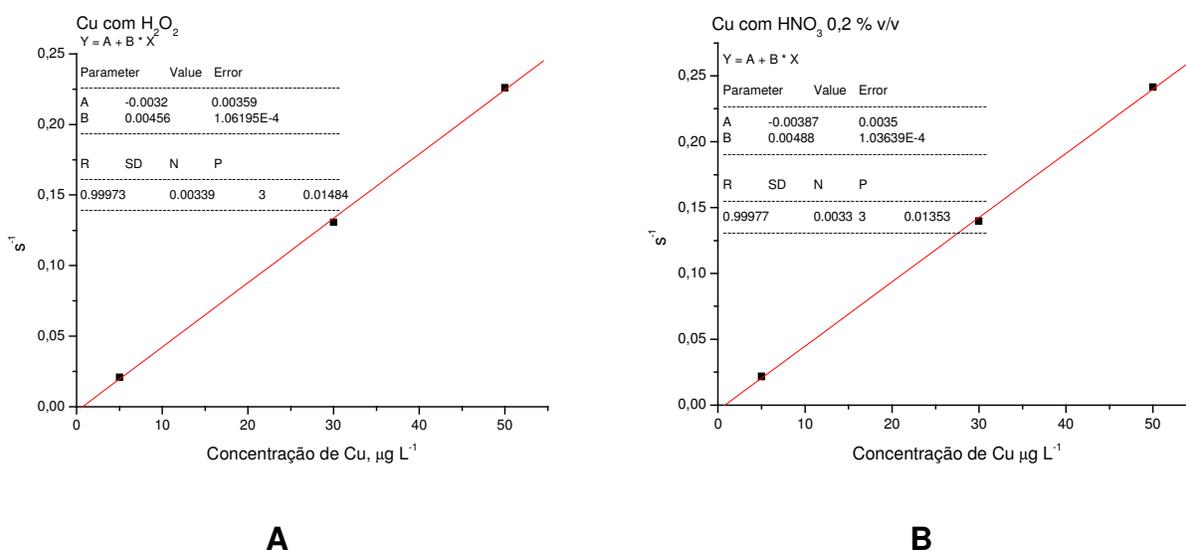
### **5.3.1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como modificador químico**

Tratamentos que envolvem apenas a solubilização ou diluição da amostra são mais rápidos e simples que aqueles em que a amostra é completamente mineralizada.

No entanto, logo nas primeiras determinações com amostras solubilizadas por US, observou-se rápida deposição de resíduos de carbono sobre a plataforma do forno de grafite. Esse problema foi solucionado pela adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , juntamente com a amostra, no forno de grafite, uma vez que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  age como modificador químico, promovendo uma oxidação mais efetiva dos carboidratos do mel durante a etapa de pirólise.

A quantidade de  $\text{H}_2\text{O}_2$  adequada para o uso direto no forno foi avaliada em medidas de Cu e Mn, a partir de amostra solubilizada por US. Para ambos os elementos, os resultados não variaram com o aumento da concentração deste oxidante. Observaram-se aumento do sinal do branco para concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  mais altas, na determinação de Cu, e valores negativos e decrescentes com a concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no caso do Mn. Assim, 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 % v/v) foi a quantidade selecionada para o seu uso como modificador químico.

Também foi verificado o efeito do uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na obtenção da curva analítica para determinação de Cu (Figura 9). Os parâmetros da calibração ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) na ausência e na presença do oxidante foram bastante semelhantes, uma vez que, com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  a inclinação da curva analítica foi apenas 6,4 % menor que aquela obtida utilizando apenas 0,2 % v/v de  $\text{HNO}_3$ . Assim, no decorrer do trabalho as curvas analíticas foram obtidas usando apenas os padrões diluídos em  $\text{HNO}_3$  0,2 % v/v.

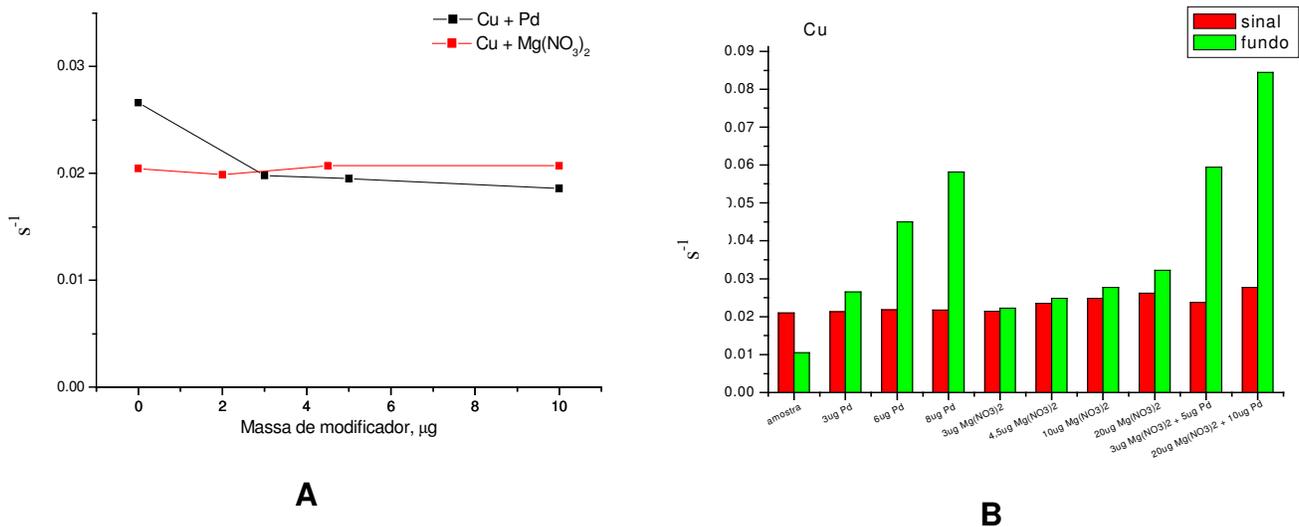


**Figura 9.** Curva analítica para determinação de Cu (A) na presença do modificador químico  $\text{H}_2\text{O}_2$  e (B) apenas com 0,2 % v/v de  $\text{HNO}_3$ .

### 5.3.2. Uso dos modificadores químicos Pd e/ou $Mg(NO_3)_2$ .

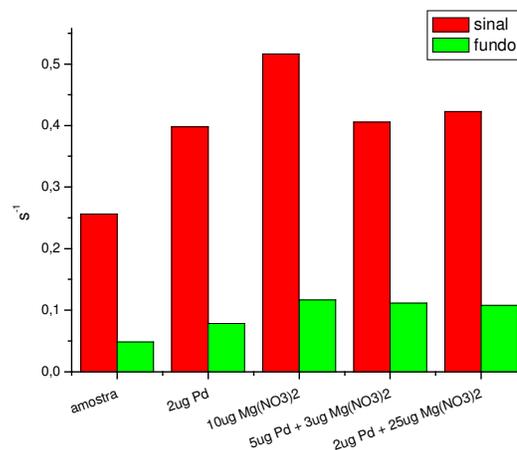
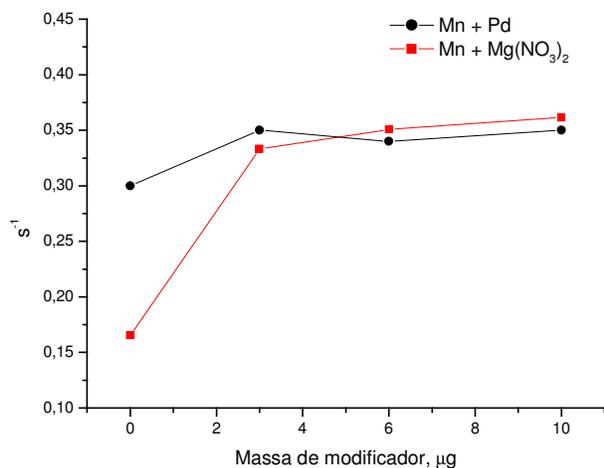
Para aumentar a temperatura da etapa de pirólise, foi avaliada a adição de Pd, de  $Mg(NO_3)_2$  e da mistura dos dois reagentes, como modificador químico, na determinação de Cu e Mn.

O uso de Pd ou de  $Mg(NO_3)_2$  como modificador químico não alterou o sinal analítico do Cu (Figura 10 A). Além disso, altos valores de absorvância de fundo foram encontrados nas medidas de Cu com Pd e com combinações dos dois modificadores (Figura 10 B). Assim, optou-se por não usar Pd e/ou  $Mg(NO_3)_2$  como modificadores químicos na determinação de Cu.



**Figura 10.** (A) Absorbância integrada em função da massa de Pd ou  $Mg(NO_3)_2$  usada na determinação de Cu. (B) Absorbância integrada do sinal e do fundo na determinação de Cu com diferentes quantidades de Pd e/ou  $Mg(NO_3)_2$ .

Nas medidas de Mn, observou-se acréscimo significativo de sinal na presença de  $Mg(NO_3)_2$  e um leve acréscimo de sinal com Pd (Figura 11 A). No entanto, o uso de Pd provoca deformações no pico de absorção (picos duplos ou múltiplos).



**A**

**B**

**Figura 11.** (A) - Absorvância integrada em função da massa de Pd ou Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> nas determinações de Mn. (B) - Absorvância integrada do sinal e do fundo nas determinações de Mn com diferentes quantidades de Pd e/ou Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

Ambos os modificadores levam a acréscimos de sinal em proporções diferentes para o padrão e para a amostra. Por exemplo, na presença de 10 μg de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> observa-se aumento de 120 % no sinal de uma solução padrão de Mn 20 μg L<sup>-1</sup> e de 54 % no sinal da amostra. Isso ocorre devido à maior facilidade de reação do modificador com o Mn na ausência da matriz.

Nas determinações de Mn, não foi observado acréscimo do sinal de fundo na presença dos modificadores (Figura 11 B). O uso de 10 μg de Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> foi a condição mais adequada para a determinação de Mn no mel.

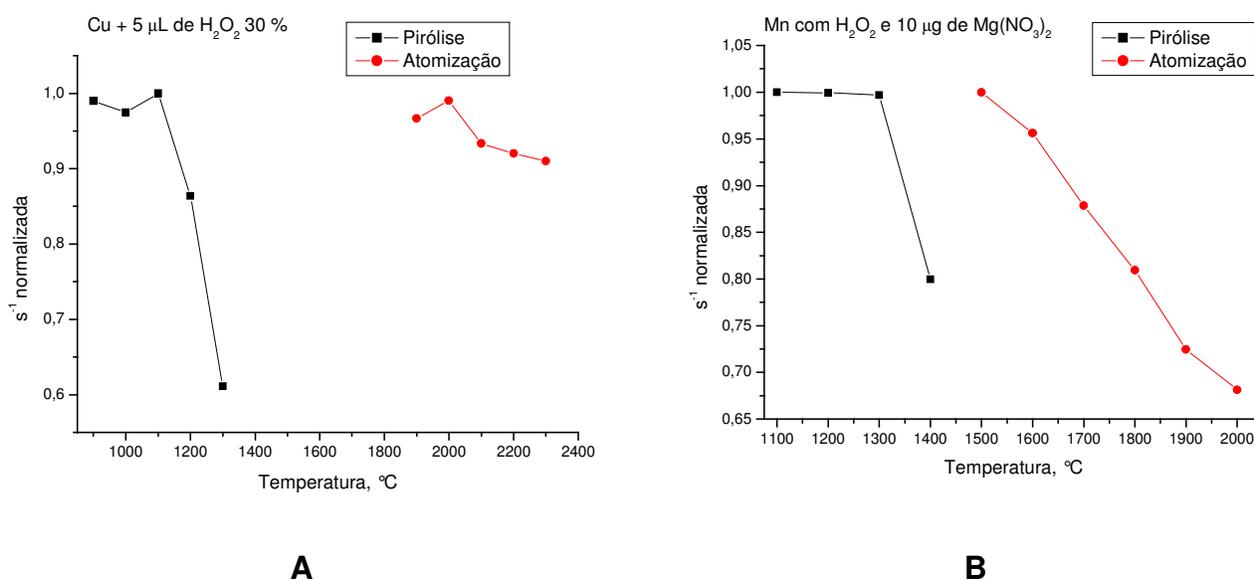
Observou-se certa dificuldade em obter soluções dos modificadores químicos livres de contaminação pelos analitos. Assim, foram selecionados os reagentes que apresentaram menor contaminação.

Os comportamentos dos sinais analíticos perante os acréscimos das quantidades dos modificadores químicos foram os mesmos para os brancos, as amostras e os padrões, nos diferentes experimentos realizados.

## 5.4. Otimização do programa de aquecimento do forno de grafite

Uma vez selecionados o tratamento da amostra e os modificadores químicos mais adequados para a determinação de Cu e Mn no mel, ou seja, a solubilização em banho de US com 0,2 % v/v de  $\text{HNO}_3$ , usando 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % m/v como modificador químico para Cu e 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % v/v mais 10  $\mu\text{g}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  como modificadores químicos para a determinação de Mn, foi feita a otimização do programa de aquecimento do forno de grafite.

Para encontrar as melhores temperaturas de atomização e pirólise foram construídas curvas de absorvância integrada, normalizada, em função da temperatura (Figura 12) utilizando a amostra.

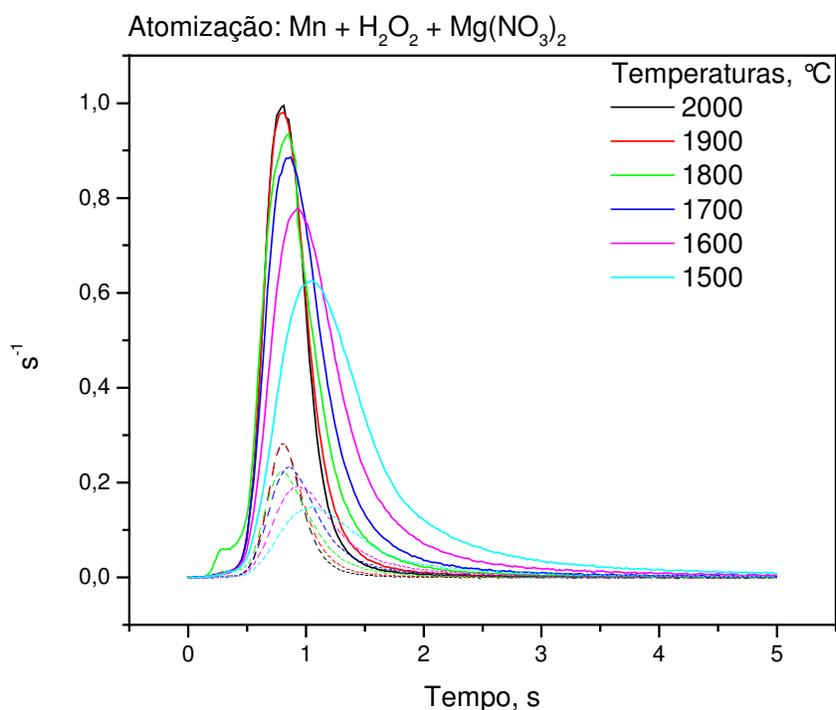


**Figura 12:** A - Curvas de atomização e pirólise para as medidas de Cu usando 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % m/v como modificador químico. B - Curvas de atomização e pirólise para as medidas de Mn usando 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % m/v e 10  $\mu\text{g}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  como modificadores químicos.

As curvas de pirólise e atomização obtidas nas medidas de Cu estão apresentadas na Figura 12 A, mostrando que as temperaturas de 1000 e 2000 °C são as mais adequadas para as etapas de pirólise e atomização, respectivamente.

Para a determinação de Mn, as temperaturas de pirólise e atomização mais adequadas foram 1200 e 1800 °C, respectivamente.

Apesar do acréscimo de sinal observado na figura 12 B, para temperaturas de atomização menores que 1800 °C foram obtidos picos menores e mais largos (Figura 13).



**Figura 13.** Sinais de absorvância integrada em função do tempo, obtidas com diferentes temperaturas de atomização nas determinações de Mn no mel.

Durante todas as etapas de aquecimento, exceto na de atomização, foi usado um fluxo de argônio igual a 250 mL min<sup>-1</sup>.

As temperaturas e os tempos das demais etapas do programa de aquecimento também foram otimizados observando-se o sinal analítico. Os programas selecionados como os mais adequados para Cu e Mn estão apresentados na Tabela 5.

**Tabela 5.** Programa de aquecimento do forno de grafite otimizado, para as determinações de Cu e Mn.

Etapa	Parâmetro	Elemento	
		Cu	Mn
1 <sup>a</sup> secagem	Temperatura, °C	100	110
	Rampa, s	1	1
	Permanência, s	10	20
2 <sup>a</sup> secagem	Temperatura, °C	130	140
	Rampa, s	1	10
	Permanência, s	20	30
Pirólise	Temperatura, °C	1000	1200
	Rampa, s	10	15
	Permanência, s	20	30
Atomização	Temperatura, °C	2000	1800
	Rampa, s	0	0
	Permanência, s	4	4
Limpeza	Temperatura, °C	2450	2450
	Rampa, s	1	1
	Permanência, s	3	3

### 5.5. Determinação de Cd no mel

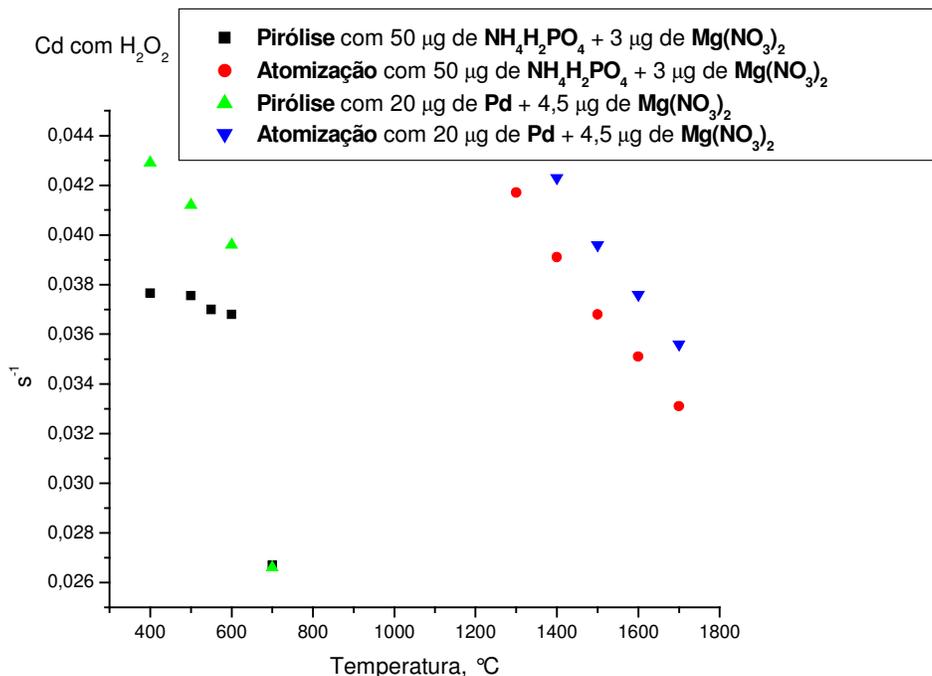
O tratamento da amostra otimizado para a determinação de Cu e Mn no mel (solubilização em US com 0,2 % v/v de HNO<sub>3</sub> e com 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % m/v) foi expandido para a determinação de Cd. Para isso foi feita a avaliação dos modificadores químicos Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> e/ou NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ou Pd, e a otimização do programa de aquecimento do forno de grafite.

Como a amostra de mel utilizada para a otimização dos parâmetros experimentais não apresentava sinal analítico para Cd, ou melhor, a concentração de

Cd nesta é menor que o limite de quantificação da técnica, fez-se a dopagem da amostra com  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd, para que fosse possível desenvolver um método de determinação deste analito no mel.

### 5.5.1. Avaliação do uso de modificadores químicos para a determinação de Cd

Em experimentos preliminares, foi avaliada a condição de modificador químico indicada pelo fabricante do equipamento,  $50 \mu\text{g}$  de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  e  $3 \mu\text{g}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , e uma outra condição indicada por Rodríguez *et al.* [13],  $20 \mu\text{g}$  de Pd e  $4,5 \mu\text{g}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ , que em seu trabalho, comparou o desempenho analítico de Pd ou  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  combinados com  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  na determinação de Cd em mel por GF AAS. Para isso, foram construídas curvas de atomização e de pirólise para a determinação de Cd. Os resultados estão apresentados na Figura 14.

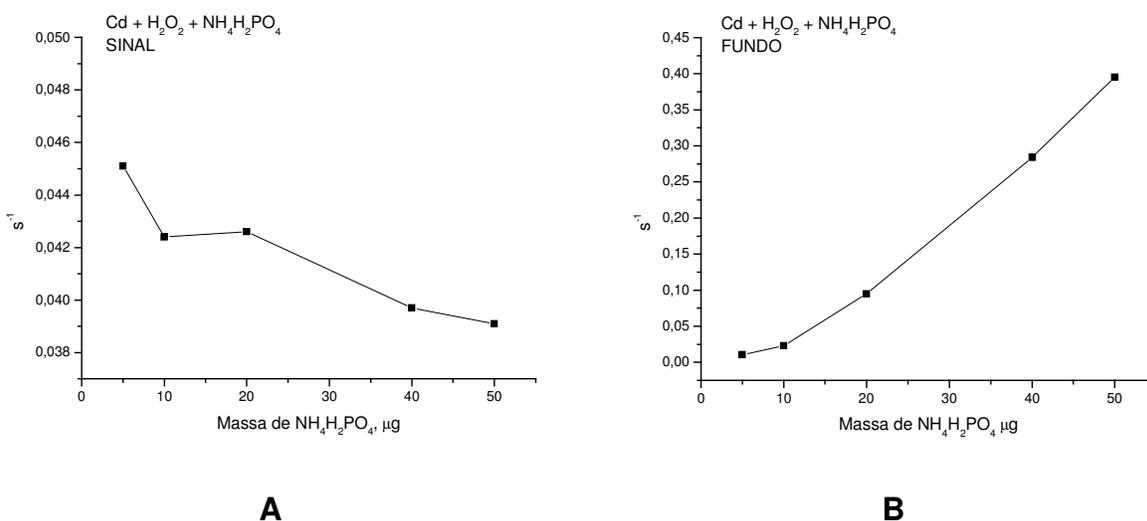


**Figura 14.** Curvas de atomização e pirólise para determinação de Cd utilizando diferentes modificadores químicos combinados com  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

O uso de Pd e  $Mg(NO_3)_2$  levou aos maiores valores de absorvância. No entanto, a temperatura mais adequada para a pirólise com Pd e  $Mg(NO_3)_2$  (400 °C) foi menor que aquela com  $NH_4H_2PO_4$  e  $Mg(NO_3)_2$  (550 °C).

Também foi avaliado o uso destes modificadores químicos separadamente, ao invés das misturas. Os resultados destes experimentos mostraram que a determinação de Cd nas amostras dopadas com  $1 \mu g L^{-1}$  deste analito só foi possível na presença dos modificadores químicos  $NH_4H_2PO_4$  ou Pd individualmente ou combinados com  $Mg(NO_3)_2$ . Quando foi usado apenas o  $Mg(NO_3)_2$  em quantidades de 2 a 20  $\mu g$  não foi observado o sinal analítico do Cd.

Os resultados das determinações de Cd com diferentes quantidades de  $NH_4H_2PO_4$  estão apresentados na Figura 15.

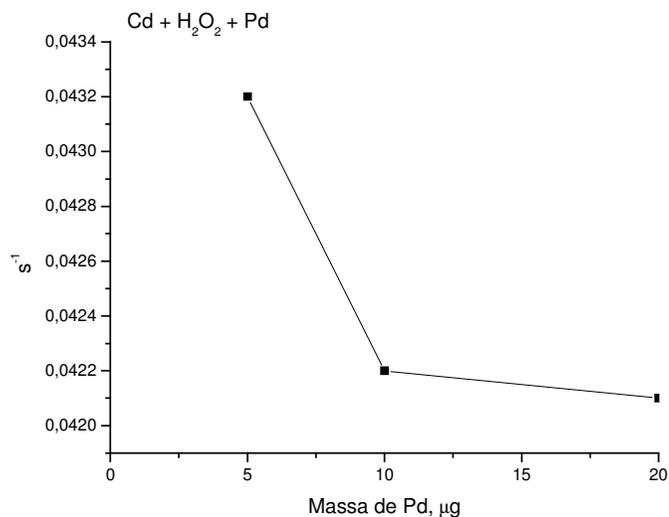


**Figura 15.** Absorvância integrada do sinal (A) e do fundo (B) em função da quantidade de  $NH_4H_2PO_4$  utilizada na determinação de Cd no mel.

Aumentando a massa de  $NH_4H_2PO_4$ , observa-se uma diminuição do sinal analítico (Figura 15 A) e um aumento da absorvância de fundo (Figura 15 B).

Observou-se, também, que o sinal analítico obtido usando apenas 50  $\mu g$  de  $NH_4H_2PO_4$  foi igual àquele obtido com o uso da combinação de 3  $\mu g$  de  $Mg(NO_3)_2$  com 50  $\mu g$  de  $NH_4H_2PO_4$ .

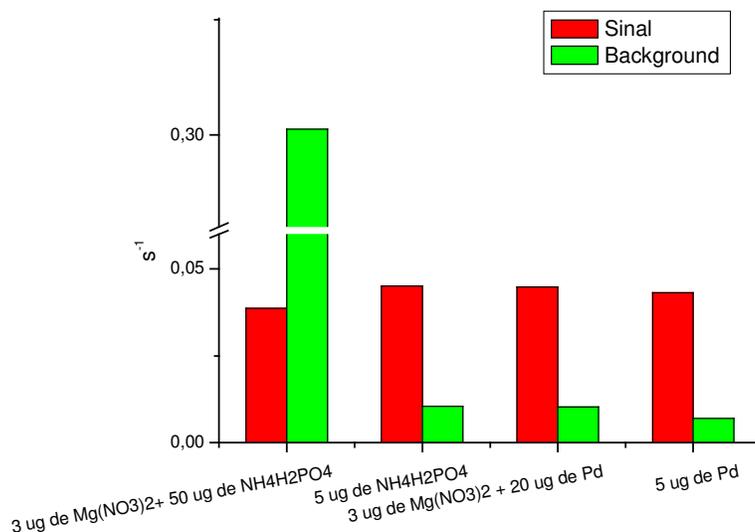
A Figura 16 apresenta os resultados da determinação de Cd com diferentes quantidades de Pd.



**Figura 16.** Absorvância integrada em função da quantidade de Pd usada na determinação de Cd no mel.

Analogamente ao observado com o uso de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , quanto maior a massa de Pd menor o sinal analítico (Figura 16), porém o uso de quantidades entre 5 e 20 µg de Pd não afeta o sinal de fundo (Figura 17).

Quando foram utilizados 3 µg de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  combinados com 20 µg de Pd o sinal analítico obtido foi semelhante àquele observado com 5 µg de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  e àquele observado com 5 µg de Pd (Figura 17), porém com picos mais baixos e alargados.



**Figura 17.** Absorbância integrada do sinal e do fundo obtidas na determinação de Cd com diferentes modificadores químicos.

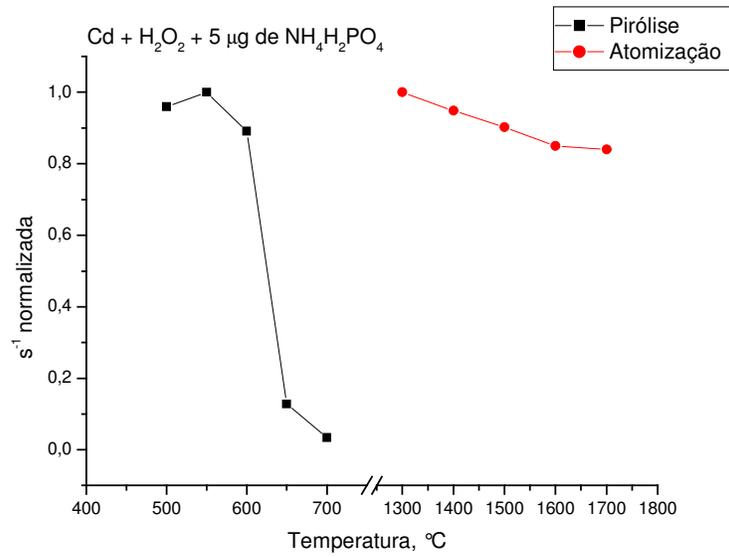
Optou-se por usar  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ao invés de Pd porque a temperatura de pirólise deve ser a maior possível para garantir a máxima eliminação da matriz, e como descrito anteriormente, a temperatura de pirólise ótima para a determinação de Cd no mel é maior na presença do  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  do que na presença do Pd.

Assim, a condição de modificador químico mais adequada para determinação de Cd no mel foi o uso de 5  $\mu\text{g}$  de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ .

### 5.5.2. Otimização do programa de aquecimento do forno de grafite para determinação de Cd.

Utilizando amostras solubilizadas em banho de US com as condições otimizadas de modificador químico (5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e 5  $\mu\text{g}$  de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ) foram construídas curvas de absorbância integrada, normalizada, em função da temperatura, para encontrar as melhores temperaturas de atomização e de pirólise.

Os resultados da Figura 18 mostram que as temperaturas de pirólise e atomização mais adequadas para a determinação de Cd foram 550 e 1500  $^\circ\text{C}$ , respectivamente.



**Figura 18.** Curvas de atomização e pirólise obtidas na determinação de Cd no mel.

As demais etapas do programa de aquecimento foram avaliadas construindo-se curvas semelhantes às aquelas de atomização e pirólise. O programa otimizado para determinação de Cd está apresentado na Tabela 6.

**Tabela 6.** Programa de aquecimento do forno de grafite, otimizado, para a determinação de Cd no mel.

Etapa	Parâmetro	Elemento
		Cd
1ª secagem	Temperatura, °C	100
	Rampa, s	10
	Permanência, s	20
2ª secagem	Temperatura, °C	130
	Rampa, s	15
	Permanência, s	30
Pirólise	Temperatura, °C	550
	Rampa, s	10
	Permanência, s	20
Atomização	Temperatura, °C	1500
	Rampa, s	0
	Permanência, s	3
Limpeza	Temperatura, °C	2450
	Rampa, s	1
	Permanência, s	3

## 5.6. Avaliação da qualidade dos métodos propostos

Os métodos desenvolvidos foram avaliados por meio de experimentos de adição e recuperação dos analitos, uma vez que não existe material de referência certificado disponível comercialmente.

Foram encontradas recuperações médias entre 70 e 90 % (Tabela 7), nas determinações de Cu, Mn e Cd, adicionando-se três concentrações diferentes dos analitos, 2,4 ; 5,1 e 10,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cu, 1 ; 2 e 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Mn e 1 ; 5 e 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Cd,

sendo que a concentração dos analitos presentes na amostra é de  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cu,  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  de Mn e  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de Cd.

**Tabela 7:** Porcentagens de recuperação e algumas figuras de mérito.

	Recuperação, %			LOQ, $\text{ng g}^{-1}$	$m_0$ , $\text{pg}$	$m_0$ rec, $\text{pg}$	Faixa de trabalho na calibração, $\mu\text{g L}^{-1}$	Sensibilidade $\text{Abs L } \mu\text{g}^{-1}$
	a	b	c					
<b>Cu</b>	90	91	87	50	16,7	17	1 a 10	0,005
<b>Mn</b>	86	74	73	90	3,6	6,3	10 a 40	0,02
<b>Cd</b>	71	75	68	6	1,3	1,3	0,5 a 2	0,04

Sendo: a = dopagem com a concentração mais baixa, b = com a concentração intermediária e c = com a concentração mais alta. rec = recomendada pelo fabricante do equipamento.

A precisão de cada método foi observada por meio dos parâmetros de repetibilidade e reprodutibilidade, utilizando-se os valores de desvio padrão de medidas realizadas em um mesmo dia e em dias diferentes. Os métodos apresentaram boa repetibilidade, uma vez que os valores de desvio padrão relativo das medidas da amostra em triplicata foram menores que 6 %, e boa reprodutibilidade [57], pois os valores de desvio padrão relativo das medidas da amostra em dias diferentes foram menores que 5 %.

As sensibilidades dos métodos propostos foram verificadas calculando-se os Limites de Quantificação (LOQ – dez vezes o desvio padrão de seis medidas da amostra, dividido pela inclinação da curva de calibração) e as massas características ( $m_0$ ) de cada elemento estudado. A massa característica é um parâmetro usado para avaliar a sensibilidade de métodos que utilizam GF AAS, esse parâmetro representa a massa de analito, em picograma, necessária para produzir um sinal de  $0,0044 \text{ AA s}^{-1}$  ou 1 % de absorção.

Os métodos apresentaram sensibilidades adequadas, uma vez que os valores de massa característica obtidos foram menores que aqueles recomendados pelo fabricante

do equipamento (Tabela 7). Porém, as porcentagens de recuperação obtidas foram pouco satisfatórias indicando uma provável presença de efeito de matriz.

Para verificar a existência de efeito de matriz foram feitas determinações dos analitos de interesse utilizando o método da calibração por adição de padrão e esses resultados foram comparados com aqueles das medidas diretas por calibração externa (Tabela 8).

**Tabela 8.** Comparação das concentrações dos analitos no mel obtidas por calibração com adição de analito e por calibração externa.

	Concentração $\pm$ Intervalo de confiança 95 %, $\mu\text{g g}^{-1}$	
	Calibração externa	Calibração por adição de analito
Cu	$0,17 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,01$
Mn	$1,09 \pm 0,02$	$1,723 \pm 0,001$
Cd	$0,20 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,01$

Como pode ser observado na Tabela 8, a determinação por calibração com adição de analito forneceu concentrações maiores do que as medidas contra uma calibração externa, o que indica a presença de efeito de matriz. De acordo com estes resultados, as determinações de Cu, Mn e Cd no mel após solubilização em banho de US devem ser feitas pelo método de calibração com adição de analito. No entanto, o uso deste procedimento diminui de 4 a 5 vezes a frequência analítica dos métodos em questão, o que é indesejável.

A fim de evitar o efeito de matriz e manter uma frequência analítica elevada foi feita a avaliação do método após mineralização do mel em forno de microondas. Para isso, foi feita uma otimização das temperaturas de pirólise e atomização. Em seguida, foram feitos experimentos de adição e recuperação dos analitos e determinações pelo método de calibração por adição de analito, utilizando amostras mineralizadas por microondas. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 9 e 10.

**Tabela 9:** Porcentagens de recuperação e algumas figuras de mérito, após mineralização com microondas.

	Recuperação, %			LOQ, ng g <sup>-1</sup>	m <sub>0</sub> , pg	m <sub>0</sub> rec, pg	Faixa de trabalho na calibração, µg L <sup>-1</sup>	Sensibilidade Abs L µg <sup>-1</sup>
	a	b	c					
<b>Cu</b>	54	82	81	30	17,6	17	5 a 20	0,005
<b>Mn</b>	79	89	82	120	2,3	6,3	10 a 40	0,02
<b>Cd</b>	74	89	92	7	0,6	1,3	5 a 20	0,08

Sendo: a = dopagem com: 2 µg L<sup>-1</sup> de Cu, 1 µg L<sup>-1</sup> de Mn e 1 µg L<sup>-1</sup> de Cd, b = dopagem com: 5 µg L<sup>-1</sup> de Cu, 2,5 µg L<sup>-1</sup> de Mn e 2,5 µg L<sup>-1</sup> de Cd e c = dopagem com: 10 µg L<sup>-1</sup> de Cu, 5 µg L<sup>-1</sup> de Mn e 7,5 µg L<sup>-1</sup> de Cd. rec = recomendada pelo fabricante do equipamento.

Após a mineralização do mel com microondas foram obtidas recuperações entre 55 e 90 %, ou seja, as recuperações não melhoraram comparando os resultados com aqueles obtidos após solubilização com ultra-som. Na verdade, as porcentagens de recuperação foram um pouco mais baixas na determinação de Cu e um pouco maiores nas determinações de Mn e Cd. As demais figuras de mérito avaliadas foram bastante semelhantes para ambos os tratamentos da amostra.

**Tabela 10.** Comparação das concentrações dos analitos no mel obtidas por calibração com adição de analito e por calibração externa após mineralização com microondas.

	Concentração ± Intervalo de confiança 95 %, µg g <sup>-1</sup>	
	Calibração externa	Calibração por adição de analito
Cu	0,20 ± 0,01	0,23 ± 0,01
Mn	0,96 ± 0,02	1,29 ± 0,01
Cd	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01

Comparando-se as concentrações dos analitos no mel obtidas por calibração com adição de analito e por calibração externa, após mineralização com microondas, observa-se que a concentração de Mn obtida pelo método de calibração por adição de analito foi maior que aquela obtida com a medida direta. Tal resultado indica que, mesmo com a mineralização do mel, ocorre efeito de matriz na determinação de Mn.

Observando-se as concentrações de Cu e Mn obtidas por medida direta (calibração externa), após os tratamentos da amostra por solubilização com ultra-som e por mineralização com microondas, constata-se que estas não são significativamente diferentes, de acordo com o teste t pareado com  $n = 3$  e com 90 % de confiança. Os valores para Cd não devem ser comparados, pois este analito foi intencionalmente adicionado na amostra.

Assim, pode-se concluir que o método mais adequado foi a determinação direta após solubilização do mel com ultra-som, por ser um método simples, com uma frequência analítica elevada e com exatidão comparável à obtida após a mineralização do mel.

## **5.7. Determinação de Cu, Mn e Cd em méis de diferentes regiões do Brasil**

As concentrações de Cu, Mn e Cd encontradas nas amostras de mel de diferentes regiões do Brasil estão apresentadas na Tabela 11.

As quantidades dos analitos de interesse no mel variaram entre 0,04 e 0,17  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Cu e entre 0,78 e 11,9  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Mn.

Observa-se que as amostras analisadas não são contaminadas com Cd, uma vez que as concentrações deste analito ficaram abaixo do limite de quantificação, 6  $\text{ng g}^{-1}$ . Além disso, as altas concentrações de Mn encontradas confirmam que o mel brasileiro pode ser considerado uma boa fonte nutritiva de Mn [17].

**Tabela 11:** Concentrações de Cu, Mn e Cd em méis de diferentes regiões do Brasil.

<b>Amostra</b>		<b>Concentração ± Intervalo de confiança 95 %, <math>\mu\text{g g}^{-1}</math></b>		
<b>Origem geográfica</b>	<b>Origem botânica</b>	<b>Cu</b>	<b>Mn</b>	<b>Cd</b>
<b>São Paulo SP</b>	<b>Laranjeira</b>	0,17 ± 0,01	1,09 ± 0,02	< LOQ
<b>São Paulo SP</b>	<b>Cipó-uva</b>	0,10 ± 0,04	2,31 ± 0,09	< LOQ
<b>Águas de S. Pedro SP</b>	<b>Eucalipto</b>	0,020 ± 0,008	0,480 ± 0,009	< LOQ
<b>Uberlândia MG</b>	<b>Laranjeira</b>	0,09 ± 0,02	0,394 ± 0,009	< LOQ
<b>Uberlândia MG</b>	<b>Eucalipto</b>	0,06 ± 0,02	6,3 ± 0,5	< LOQ
<b>Uberlândia MG</b>	<b>Silvestre</b>	0,12 ± 0,02	1,55 ± 0,06	< LOQ
<b>Carvalhópolis MG</b>	<b>Assa-peixe</b>	0,09 ± 0,01	0,78 ± 0,03	< LOQ
<b>Curitiba PR</b>	-	0,100 ± 0,005	1,20 ± 0,06	< LOQ
<b>Gravatal SC</b>	<b>Eucalipto</b>	0,08 ± 0,01	11,9 ± 0,7	< LOQ
<b>Taquara RS</b>	-	0,04 ± 0,01	1,19 ± 0,08	< LOQ
<b>Boa Vista RR</b>	<b>Acácia</b>	0,04 ± 0,01	1,4 ± 0,2	< LOQ

A Tabela 12 mostra as faixas de concentração de Cu, Mn e Cd encontradas nos méis de diferentes países. Tais valores concordam que aqueles encontrados em méis brasileiros, neste trabalho, e de maneira geral, as concentrações de Cu e Cd são menores nos méis brasileiros do que nos méis de outros países. Vale ressaltar que esta comparação é meramente informativa, uma vez que as quantidades das espécies metálicas presentes no mel variam de acordo com sua origem geográfica e botânica.

**Tabela 12:** Intervalos de concentração de Cu, Mn e Cd encontrados em amostras de mel de diferentes países.

Amostra	Intervalo de concentração, $\mu\text{g g}^{-1}$		
	Cu	Mn	Cd
Espanha <sup>52</sup>	0,36-1,36	0,98-10,9	
Egito <sup>53</sup>	1,0-1,75	0,5-5,7	0,01-0,50
Grécia <sup>8</sup>	0,28-0,48	0,11-7,22	0,09-0,22
Jordânia <sup>54</sup>	3,37-34,56	25,09-52,53	0,003-5,79
Índia <sup>55</sup>	8,86-13,25		
Alemanha <sup>17</sup>		0,8-1,5	
Itália <sup>10</sup>	0,05-0,90		0,12-0,31
Ilhas Canárias <sup>56</sup>	0,20-0,44		
Este trabalho	0,020-0,17	0,394-11,9	< 0,006

Os desvios padrões relativos foram menores que 10 %.

## 6. CONCLUSÃO

A solubilização do mel em banho de US mostrou ser o procedimento mais adequado para o tratamento da amostra, nas determinações de Cu e Mn, quando comparado com as mineralizações em forno de microondas e em placa de aquecimento e às solubilizações com diferentes quantidades de TMAH, devido à simplicidade, rapidez, menor manipulação da amostra e bom desempenho analítico, apesar de apresentar exatidão levemente menor que aquela da mineralização em forno de microondas.

O uso do peróxido de hidrogênio como modificador químico evita a deposição de resíduos de carbono no tubo de grafite, o que aumenta sua vida útil e diminui os valores de absorvância de fundo. Além disso, a curva analítica pode ser feita na ausência deste reagente sem prejuízo às concentrações medidas.

A digestão assistida por microondas exige altas concentrações de ácido nítrico, o qual reage com a superfície do forno de grafite, diminuindo sua vida útil. Uma alternativa para eliminar o excesso de ácido é evaporá-lo, mas esse procedimento demanda tempo adicional e manipulação da amostra, que são indesejáveis.

As solubilizações com pequenas quantidades de TMAH (0,2% v/v para Cu e para Mn) e os procedimentos de foto-oxidação do mel forneceram bons resultados, que podem ser melhorados com a otimização dos parâmetros experimentais e do programa de aquecimento do forno de grafite, mas exigem longos períodos de aquecimento e/ou irradiação, o que aumenta o tempo de preparo da amostra com relação à solubilização em banho de US (25 minutos).

O uso de Pd ou  $Mg(NO_3)_2$  como modificadores químicos nas determinações de Cu não apresentou efeito no sinal analítico, mostrando que a matriz não interfere neste caso.

Para o Mn, a presença do modificador químico é importante e o uso de 10  $\mu g$  de  $Mg(NO_3)_2$  foi a condição mais adequada para a determinação de Mn no mel, dentre aquelas testadas.

A temperatura de pirólise ótima para a determinação de Cd no mel é maior na presença do  $NH_4H_2PO_4$  (550 °C) do que na presença do Pd (400 °C). A condição de modificador químico mais adequada para determinação de Cd no mel foi o uso de 5  $\mu g$  de  $NH_4H_2PO_4$ .

Os métodos otimizados para a determinação de Cu, Mn e Cd em mel por GF AAS apresentaram precisão, sensibilidade e repetibilidade adequadas. Foram obtidas porcentagens de recuperação entre 70 e 90 %, o que indica uma exatidão satisfatória, considerando-se a complexidade da amostra e as baixas concentrações medidas, da ordem de  $\mu g g^{-1}$ .

As quantidades dos analitos de interesse no mel brasileiro variaram entre 0,020 e 0,17  $\mu g g^{-1}$  de Cu e entre 0,394 e 11,9  $\mu g g^{-1}$  de Mn. Observou-se também, que as amostras analisadas não são contaminadas com Cd, e as altas concentrações de Mn encontradas confirmam que o mel brasileiro pode ser considerado uma boa fonte nutritiva de Mn (VRD = 2 mg/dia). Tais resultados fornecem novas informações sobre a composição mineral do mel nacional e poderão ser úteis para a formação de uma base de dados de sua composição.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Campos, G. R. C.; Della-Modesta, T. J.; Silva, K. E.; Baptista, M. F.; Gomides, R. L.; Godoy, R. L., "Classification of Honey as Floral or Honeydew Honey". *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **23**, 2003, 1-5.
2. Lachman, J.; Koliňová, D.; Miholová, D.; Kosata, J.; Titera, D.; Kult K. "Analysis of Minority Honey Components: Possible Use for the Evaluation of Honey Quality". *Food Chem.*, **101**, 2007, 973-979.
3. [www.otempo.com.br](http://www.otempo.com.br), acessado dia 04/03/2006.
4. Instrução normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa).
5. [www.iea.sp.gov.br](http://www.iea.sp.gov.br), acessado dia 02/07/2007.
6. [www.portaldoagronegocio.com.br](http://www.portaldoagronegocio.com.br), acessado dia 02/07/2007.
7. Anklan, E. "A Review of the Analytical Methods to Determine the Geographical and botanical Origin of Honey". *Food Chem.*, **63**, 1998, 549-562.
8. Ioannidou, M. D.; Zachariadis, G. A.; Anthemidis, A. N.; Stratis, J. A. "Direct Determination of Toxic Trace Metals in Honey and Sugars Using Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry". *Talanta*, **65**, 2005, 92-97.
9. Miller-Ihli, N. J. "Atomic Absorption and Atomic Emission Sepectrometry for the Determination of the Trace Element Content of Selected Fruits Consumed in the United States". *J. Food Comp. Anal.*, **9**, 1996, 301-311.
10. Buldini, P. L.; Cavalli, S.; Mevoli, A.; Sharma, J. L.; "Ion Chromatographic and Voltammetric Determination of Heavy and Transition Metals in Honey". *Food Chem.*, **73**, 2001, 487-495.
11. Rodríguez, G. J. C.; Barciela, G. J.; Herrero, L. C.; García, M. S.; Peña, C. R. M. "Direct and Combined Methods for the Determination of Chromium, Copper, and Nickel in Honey by Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy". *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 2005, 6616-6623.
12. Viñas, P.; López-García, I.; Lanzón, M.; Hernández-Córdoba, M. "Direct Determination of Lead, Cadmium, Zinc, and Copper in Honey by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry using Hydrogen Peroxide as a Matrix Modifier". *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 3952-3956.

13. Rodríguez, J. C. G.; Bariela J. G.; Herrero, C. L.; Freire, M. R. S.; García, S. M.; Pena R. M. C. "Comparison of Palladium-magnesium Nitrate and Ammonium Dihydrogenphosphate Modifiers for Cadmium Determination in Honey Samples by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry". *Talanta*, **61**, 2003, 509-517.
14. Sanna, G.; Pilo, M. I.; Piu, P. C.; Tapparo, A.; Seeber, R. "Determination of Heavy Metals in Honey by Anodic Stripping Voltametry at Microeletrodes". *Anal. Chim. Acta*, **415**, 2000, 165-173.
15. Merin, U.; Bemstein, S.; Rosenthal, I. "A Parameter for Quality of Honey". *Food Chem.*, **63**, 1998, 241-242.
16. Paker, A. P.; Giné, M. F. "Analysis of Undigested Honey Samples by Isotope Dilution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with Direct Injection Nebulization (ID-ICP-MS)". *Spectrochim. Acta Part B*, **56**, 2001, 69-75.
17. 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". *J. Braz. Chem. Soc.* **17**, **1**, 2006, 168-176.
18. Conti, M. E.; Botré, F. "Honeybees and Their Products as Potential Bioindicators of Heavy Metals Contamination" *Environ. Monit. Assess.*, **69**, 2001, 267-282.
19. Bastos, D. H. M. "Compostos Voláteis de Méis de Eucalipto e Laranja". Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 1996.
20. Moreira, R. F. A.; Trugo, L. C.; Pietrolungo, M.; De Maria, C. A. B.; "Flavor Composition of Cashew (*Anacardium occidentale*) and Marmeleir (*Cróton* species) Honeys". *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 2002, 7616-7621.
21. Costa, L. S. M.; Albuquerque, M. L. S.; Trugo, L. C.; Quinteiro, L. M. C.; Barth, O. M.; Ribeiro, M.; De Maria, C. A. B. "Determination of Non-volatile Compounds of Different Botanical Origin Brazilian Honeys". *Food Chem.*, **65**, 1999, 347-352.
22. Da Costa, L. J. M.; Trugo, L. C.; Costa, L. S. M.; Quinteiro, L. M. C.; Barth, O. M.; Dutra, V. M. L.; De Maria, C. A. B. "Determination of Oligosaccharides in Brazilian Honeys of Different Botanical Origin". *Food Chem.*, **70**, 2000, 93-98.
23. Felsner M. L.; Cano, C. B.; Matos, J. R.; Almeida-Muradian, L. B.; Bruns, R. E.; "Optimization of Thermogravimetric Analysis of Ash Content in Honey", *J. Braz. Chem. Soc.*, **15**, 2004, 797-802.
24. Pamplona, B. C. "Exame dos Elementos Químicos Inorgânicos Encontrados em Méis Brasileiros de *Apis mellifera* e suas Relações Físico-Biológicas". Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. São Paulo, 1989.

25. Walsh, A., "The Application of Atomic Absorption Spectra to Chemical Analysis". *Spectrochim. Acta*, **7**, 1955, 108-117.
26. Welz, B., "Atomic Absorption Spectrometry". 2<sup>nd</sup> ed., Spring Verlag, Weinheim, 1985.
27. Butcher, D. J., "Advances in Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry: Instrumentation, Methods, and Applications", *Applied Spectrosc. Rev.*, **41**, 2006, 15-34.
28. Koirtiyohann, S. R.; Kaiser, M. L., "Furnace Atomic Absorption- a Method Approaching Maturity". *Anal. Chem.*, **54**, 1982, 1515A-1524A.
29. L'vov, B. V., "Atomic Absorption Spectrochemical Analysis". English translation: Adam Hilger, London, 1970.
30. Welz, B.; Schlemmer, G.; Mudakavi, R., 'Palladium-nitrate-magnesium nitrate modifier for Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. Part 5: Performance for the Determination of 21 Elements". *J. Anal. At. Spectrom.*, **7**, 1992, 1257-1271.
31. Churella, D. J.; Copeland, T. R. "Interference of Salt Matrices in the Determination of Copper by Atomic Absorption Spectrometry with Electrothermal Atomization", *Anal. Chem.*, **50**, 1978, 309-314.
32. Ediger, R. D., *At. Absorpt. Newslett.*, **14**, 1975, 127.
33. Volynskii, A. B., "Chemical Modifiers in Modern Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry". *J. Anal. Chem.*, **58**, 2003, 905-921.
34. Oliveira, E. "Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends" *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**, (2), 2003, 174-182.
35. Kingston, H. M.; Jassie, L. B. "Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and Practice" American Chemical Society, Washington, DC, 1988.
36. Moreira, F. R.; Borges, R. M.; Oliveira, R. M., "Comparison of two Digestion Procedures for the Determination of Lead in Lichens by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry". *Spectrochim. Acta Part B*, **60**, 2005, 755-758.
37. Tuzen, M.; Silici, S.; Mendil, D.; Soylak, M."Trace Element Levels in Honeys from Different Regions of Turkey" *Food Chem.* **103**, 2007, 325-330.
38. Ajtony, Z.; Bencs, L.; Haraszi, R.; Szigeti, J.; Szoboszlai, N. "Study on the Simultaneous Determination of Some Essential and Toxic Trace Elements in Honey by Multi-Element Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry." *Talanta*, **71**, 2007, 683-690.

39. Barboza, J. C. S.; Serra, A. A. "Ultra-Som (I): Influência do Ultra-Som na Química". *Quím. Nova*, **15**, 1992, 302-316.
40. Junior, D. S.; Krug, F. J.; Pereira, M. D.; Korn, M. "Currents on Ultrasound-Assisted Extration for Sample Preparation and Spectroscopic Analytes Determination." *Appl. Spectrosc. Rev.*, **41**, (3), 2006, 305-321.
41. Nascentes, C. C.; Korn, M.; Sousa, C. S.; Arruda, M. A. Z. "Use of Ultrasonic Baths for Analytical Applications: A New Approach for Optimization Conditions." *J. Braz. Chem. Soc.*, **12**, (1), 2001, 57-63.
42. Elik, A. "Ultrasonic-assisted Leaching of Trace Metals from Sediments as a Function of pH". *Talanta*, **71**, 2007, 790-794.
43. Manutsewee, N.; Aeungmaitrepirom, W.; Varanusupakul, P.; Imyim, A. "Determination of Cd, Cu, and Zn in Fish and Mussel by AAS after Ultrasonic-assisted Acid Leaching Extraction". *Food Chem.*, **101**, 2007, 817-824.
44. Maduro, C.; Vale, G.; Alves, S. Galesio, M.; Gomes da Silva, M. D. R.; Fernandez, C.; Catarino, S. Rivas, M. G.; Mota, A. M.; Capelo, J. L. "Determination of Cd and Pb in Biological Reference Materials by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry: A Comparison of Three Ultrasonic-based Sample Treatment Procedures". *Talanta*, **68**, 2006, 1156-1161.
45. Nóbrega, J. A.; Santos, M. C.; Sousa, R. A.; Cadore, S. "Sample Preparation in Alkaline Media" *Spectrochim. Acta Part B*, **61**, 2006, 465-495.
46. Ribeiro, A. S.; Moretto, A. L.; Arruda, M. A. Z.; Cadore, S. "Analysis of Powdered Coffee and Milk by ICP OES after Sample Treatment with Tetramethylammonium Hydroxide". *Microchim. Acta*, **141**, 2003, 149-155.
47. Ribeiro, A. S.; Curtius, A. J.; Pozebon, D. "Determination of As, Cd, Ni and Pb in Human Hair by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry after Sample Treatment with Tetramethylammonium Hydroxide". *Microchem. J.*, **64**, 2000, 105-110.
48. Silva, R. G. L.; Willie, S. N.; Sturgeon, R. E.; Stanelli, R. E.; Sella, S. N. "Alkaline Solubilization of Biological Materials for Trace Element Analysis by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry". *Analyst*, **124**, 1999, 1843-1846.
49. Leite, F. "Validação em Análise Química" pág. 80, 4ª ed. Editora Átomo, Campinas, SP, 2002.
50. Gianeti, T. M. R.; Macarovscha, G. T.; Cadore, S. "Construção e Emprego de um reator fotodigestor *Lab Made* para a Determinação de Espécies Metálicas em Amostras de Mel de Abelhas por ICP OES". CD ROM da 30ª reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

51. Sodré, F. F.; Peralta-Zamora, P. G.; Grassi, M. T. "Digestão Fotoquímica, Assistida por Microondas, de Águas Naturais: Aplicação em Estudos de Partição e Especificação do Cobre" *Quim. Nova*, **25**, 5, 2004, 695-700.
52. Paramás, A. M. G.; Báñez, J. A. G.; Garcia-Vilanova, R. J.; Pala, T. R.; Albajar, R. A.; Sánchez, J. S. "Geographical Discrimination of Honey by Using Mineral Composition Chemical Quality Parametres". *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 2000, 157-165.
53. Rashed, M. N.; Soltan, M. E. "Major and Trace Elements in Different Types of Egyptian Mono-floral and Non-floral Bee Honeys". *J. Food Comp. Anal.*, **17**, 2004, 725-735.
54. Atrouse, O. M.; Oran, S. A.; Al-Addadi, S. Y. "Chemical Analysis and Identification of Pollen Grains from Different Jordanian Honey Samples". *Inter. J. Food Sci. Technol.*, **39**, 2004, 413-417.
55. Nanda, V.; Sarkar, B. C.; Sharma, H. K.; Bawa, A. S. "Physico-chemical Properties and Estimation of Mineral Content in Honey Produced from Different Plants in Northern India". *J. Food Comp. Anal.*, **16**, 2003, 613-619.
56. Hernández, O. M.; Fraga, J. M. G.; Jiménez, A. I.; Arias, J. J. "Characterization of Honey from the Canary Islands: Determination of the Mineral Content by Atomic Absorption Spectrophotometry". *Food Chem.*, **93**, 2005, 449-458.
57. Burgess, C. "Valid Analytical Methods & Procedures". Ed.: The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2000.