

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

“ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DE MÊIS BRASILEIROS”

ANA BEATRIZ PERRIELLO LEME*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA ANALÍTICA.

Orientadora: Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira

Co-orientador: Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro

*** bolsista: FAPESP**

**São Carlos - SP
2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

L551aq

Leme, Ana Beatriz Perriello.

Análise quimiométrica de méis brasileiros / Ana Beatriz Perriello Leme. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
99 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Quimiometria. 2. ICP-MS. 3. Espectroscopia no infravermelho próximo. 4. Mel de abelha. I. Título.

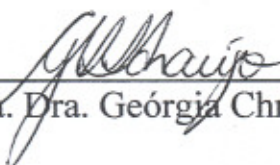
CDD: 543.072 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
Curso de Mestrado Acadêmico

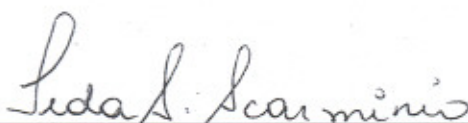
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de dissertação de mestrado acadêmico da candidata Ana Beatriz Perriello Leme, realizada em 27 de fevereiro de 2012:



Dra. Ana Rita de Araújo Nogueira



Profa. Dra. Geórgia Christina Labuto Araújo



Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio

*"Se podemos sonhar, também podemos tornar nossos sonhos
realidade".*

Walt Disney

*Dedico este trabalho à
minha mãe e ao Guilherme,
pelo amor, incentivo e por
acreditarem nos meus
sonhos.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela essência da vida.

Em especial, agradeço a Dr^a. Ana Rita de Araujo Nogueira pela orientação, amizade, confiança em mim depositada e pela oportunidade de realizar esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Renato L. Carneiro pela parceria estabelecida, dedicação e grande ajuda no tratamento e interpretação de dados.

À Prof^a. Dr^a. Solange Cadore do Instituto de Química da UNICAMP pela doação de várias amostras de mel.

Ao Sr. José Alfredo Batista dos Santos, técnico do Instituto Agropecuário do Paraná (IAPAR), pela coleta de diversas amostras provenientes do Estado do Paraná.

Ao pesquisador Dr. Vanderlei D. A. Reis, da Embrapa Pantanal, pelo fornecimento de amostras provenientes do Estado do Mato Grosso do Sul.

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega e ao Prof. Dr. Edénir Rodrigues Pereira-Filho pelas sugestões durante a execução desse trabalho.

À minha querida amiga Silmara pela amizade, risadas, conselhos, conversas, ideias e por sempre me ajudar muito.

À minha amiga Poliana pelas conversas, ideias e sugestões que foram de grande valia.

Aos meus amigos Théo e Mário por sempre me ajudarem quando eu precisei, pelas ideias e amizade.

Aos amigos que fazem ou já fizeram parte do Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA), George, Sidnei, Alex, Amália, Amanda, Caio, Carla, Carol, Catarinie, Clarice, Kelber, Luana, Renata, Rodrigo, Érica, Jenny, Luciana, Natália, Roberto, João, Nayara, Monise, Natália, Paula, Adriana, Alexandra, Daniela, Edivaldo, Eveline, Larissa, Marcelo, Mirian, Patrícia, Rodolfo, Silvéria e Wladiana pelas sugestões e pela receptividade.

A minha mãe Malú, minha avó Guiomar, meus padrinhos, Elisa e Francisco e minhas primas, Gabriela e Júlia por serem meu porto seguro e me apoiarem sempre.

Ao Guilherme por ser meu melhor amigo, pelas risadas, broncas, conselhos, conversas, pela dedicação, amor, incentivo, compreensão e por acima de tudo acreditar nos meus sonhos e me ajuda a concretiza-los.

As minhas amigas Amanda, Laís, Marília, Suelen e Stela por entenderem minha ausência, pelos muitos anos de amizade verdadeira e por sempre me apoiarem, incentivarem e torcerem por mim.

À Aline e a Claudinha por compartilharem comigo não somente a casa, mas também muitos momentos felizes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (Processo 2009/12557-4) e pelos recursos recebidos no âmbito de Projetos de Auxílio à Pesquisa (Processo 2006/59083-9).

À Embrapa Pecuária Sudeste pela infraestrutura fornecida para que fosse possível desenvolver este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade e aos professores deste programa por terem contribuído com minha formação acadêmica.

Às secretárias da pós-graduação: Ariane, Cristina e Luciane pelo atendimento e ajuda.

Aos membros da banca pelas correções e preciosas sugestões.

A todos que contribuíram de forma direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Sinceramente,
Muito obrigada.

LISTA DE ABREVIATURAS

CRI	Interface de Reação e Colisão (<i>Collision Reaction Interface</i>)
CRM	Materiais de Referência Certificados (<i>Certified Reference Materials</i>)
DIN	Nebulizador de Injeção Direta (<i>Direct Injector Nebulizer</i>)
FT-NIR	Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Infrared</i>)
ICP	Plasma Acoplado Indutivamente (<i>Inductively Coupled Plasma</i>)
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>)
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Acoplado Indutivamente (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>)
LOD	Limite de detecção (<i>Limit of Detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (<i>Limit of Quantification</i>)
NIRS	Espectrometria no Infravermelho Próximo (<i>Near Infrared Spectrometry</i>)
PCA	Análise de Componentes Principais (<i>Principal Components Analysis</i>)

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.2.1 Representação do mecanismo de migração iônica [20].....	12
Figura 3.2.2 Representação do alinhamento de uma molécula de água com o campo elétrico [20].....	12
Figura 3.4.1 (a) Diagrama esquemático da interface 900 do ICP-MS Varian e (b) Representação da trajetória das espécies geradas no ICP (VARIAN 820-MS - CRI) [38].	21
Figura 3.4.2 Região da interface do ICP-MS da Varian [38].	23
Figura 3.6.1.1 Projeção das Componentes Principais (PC's)	27
Figura 4.2.3.1 Esquema do bloco digestor e dos frascos utilizados nesse experimento	32
Figura 4.3.3.1 Melhores e piores resultados para carbono residual de acordo com as variáveis potência e concentração do ácido.	44
Figura 4.3.3.2 Gráfico da desejabilidade individual para acidez final.....	45
Figura 4.3.3.3 Gráfico da desejabilidade individual para carbono residual.....	47
Figura 4.3.3.4 Gráfico da desejabilidade global	48
Figura 5.3.1 Gráfico de escores da PC1 vs. PC2 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países.....	65
Figura 5.3.2 Gráfico de loadings da PC1 vs. PC2 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países.....	65
Figura 5.3.3 Gráfico de escores da PC1 vs. PC3 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países.....	66

Figura 5.3.4 Gráfico de loadings da PC1 vs. PC3 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países.....	66
Figura 5.3.5 Gráfico de escores da PC1 vs. PC2 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países, excluindo-se algumas amostras.	69
Figura 5.3.6 Gráfico de loadings da PC1 vs. PC2 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países, excluindo-se algumas amostras.	69
Figura 5.3.7 Gráfico de escores da PC2 vs. PC3 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países, excluindo-se algumas amostras	70
Figura 5.3.8 Gráfico de loadings da PC2 vs. PC3 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países, excluindo-se algumas amostras.	70
Figura 5.3.9 Gráfico de escores da PC2 vs. PC4 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países, excluindo-se algumas amostras.	71
Figura 5.3.10 Gráfico de loadings da PC2 vs. PC4 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países, excluindo-se algumas amostras.	71
Figura 6.2.1.1 Espectro de uma amostra de mel e da mesma amostra adulterada com 50% de água, glicose e melaço de cana.	76
Figura 6.3.1.1.1 Gráfico de escores das amostras adulteradas com água em diferentes proporções; (a) amostra coletada em Outubro de 2009; (b) amostra coletada em Janeiro de 2010; (c) amostra coletada em Junho de 2010; (d) todas as amostras juntas.	78

Figura 6.3.1.1.2 Gráfico de loadings das amostras adulteradas com água em diferentes proporções; (a) amostra coletada em Outubro de 2009; (b) amostra coletada em Janeiro de 2010; (c) amostra coletada em Junho de 2010; (d) todas as amostras juntas. 79

Figura 6.3.1.2.1 Gráfico de escores das amostras adulteradas com glicose em diferentes proporções; (a) amostra coletada em Outubro de 2009; (b) amostra coletada em Janeiro de 2010; (c) amostra coletada em Junho de 2010; (d) todas as amostras juntas. 81

Figura 6.3.1.2.2 Gráfico de loadings das amostras adulteradas com glicose em diferentes proporções; (a) amostra coletada em Outubro de 2009; (b) amostra coletada em Janeiro de 2010; (c) amostra coletada em Junho de 2010; (d) todas as amostras juntas. 82

Figura 6.3.1.3.1 Gráfico de escores das amostras adulteradas com melado de cana-de-açúcar em diferentes proporções ; (a) amostra coletada em Outubro de 2009; (b) amostra coletada em Janeiro de 2010; (c) amostra coletada em Junho de 2010; (d) todas as amostras juntas. 84

Figura 6.3.1.3.2 Gráfico de loadings das amostras adulteradas com melado de cana-de-açúcar em diferentes proporções; (a) amostra coletada em Outubro de 2009; (b) amostra coletada em Janeiro de 2010; (c) amostra coletada em Junho de 2010; (d) todas as amostras juntas. 85

Figura 6.3.2.1 Gráfico de escores das amostras de diferentes regiões brasileiras. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.3.1 Concentração de K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn e Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$) em méis de diferentes países [14].	17
Tabela 3.3.2 Concentração de Al, Cd, Co, Cr, Ni e Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$) em méis de diferentes países [14].	18
Tabela 3.3.3 Espécies inorgânicas em amostras de mel brasileiro (mg kg^{-1}) [25]	19
Tabela 3.4.1 Isótopos, abundância natural relativa e interferente: casos típicos	22
Tabela 4.2.3.1 Condições operacionais do ICP OES com configuração Radial.	33
Tabela 4.2.3.2 Condições operacionais para as medidas por ICP-MS	34
Tabela 4.2.6.1 Planejamento composto central modificado com variáveis codificadas	36
Tabela 4.2.6.2 Planejamento composto central modificado	37
Tabela 4.3.2.1 Acidez final e carbono residual para a amostra de mel digerida em bloco, nas diferentes concentrações ácidas.	40
Tabela 4.3.3.1 Acidez final e carbono residual para a amostra de mel após digestão assistida por radiação micro-ondas.	41
Tabela 4.3.3.2 Continuação	42
Tabela 5.2.1.1 Origem geográfica e botânica das amostras de mel analisadas	52
Tabela 5.3.1 Melhores condições obtidas em ICP-MS para determinação de Se, Mg, Ca, V, As, Al, P, Mn, Fe, Cr e Cd.	59
Tabela 5.3.2 Melhores condições obtidas em ICP-MS para determinação de Cu, Zn, Cd, Ba e Pb.	60

Tabela 5.3.3 Espécies inorgânicas em amostras de méis ($\mu\text{g kg}^{-1}$).....	62
--	----

RESUMO

ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DE MÉIS BRASILEIROS. Neste trabalho estão propostos procedimentos analíticos para determinação de constituintes inorgânicos em amostras de méis de diferentes regiões brasileiras, empregando a técnica de espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Foram investigados como os métodos de preparo da amostra: a diluição com água, e a digestão ácida em bloco digestor e assistida por radiação micro-ondas com cavidade. Após a determinação da acidez final e do teor de carbono residual, a digestão empregando radiação micro-ondas em meio HNO_3 2 mol L^{-1} foi o método que se mostrou mais adequado para as determinações por ICP-MS. Na sequência, foram determinados os analitos Se, Mg, Ca, Al, P, Mn, Fe, Cu, Zn, Ba e Pb em 60 amostras de méis por ICP-MS, sendo avaliadas as condições adequadas para esta determinação, como a necessidade de utilizar a interface de reação e colisão (CRI) e/ou o emprego de padrão interno. A exatidão deste procedimento foi avaliada utilizando dois materiais de referência certificados, sendo que as recuperações variaram de 82% a 115%. Os resultados obtidos foram analisados utilizando a análise de componentes principais (PCA), porém não foi possível obter uma boa separação, pois houve uma grande variação nos elementos de uma mesma classe. Além da determinação de diferentes elementos em mel, também foram realizadas análises em um espectrômetro na região do infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR) com o intuito de verificar adulterações em méis e identificar as regiões de origem das amostras. Foram utilizados 46 méis abrangendo todas as regiões do Brasil e também amostras de méis não adulteradas e adulteradas com glicose, melado de cana-de-açúcar e água, em proporções que variaram de 10 a 50% (m m^{-1}) e os resultados foram analisados utilizando PCA. Verificou-se a viabilidade de se utilizar a técnica de NIR para classificação de méis brasileiros e também para a

verificação da adulteração de méis, principalmente quando esta adulteração é realizada com água.

ABSTRACT

CHEMOMETRICS ANALYSIS OF BRAZILIAN HONEY. In this research, analytical procedures are proposed for the determination of inorganic constituents in honey samples from different Brazilian regions, by using the technique of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). Three different methods of sample preparation were evaluated: dilution with water, acid digestion in block and digestion assisted by microwave radiation. After determination of final acidity and residual carbon content, acid digestion with microwave radiation by using HNO_3 2 mol L^{-1} proved to be more appropriate. Next were determined the analyte Se, Mg, Ca, Al, P, Mn, Fe, Cu, Zn, Ba and Pb in sixty honey samples by ICP-MS and the best conditions to these determination such as the need to use the collision and reaction interface (CRI) and the addition of internal standard. The accuracy of this procedure was evaluated using two certified reference materials and recoveries ranged from 82% up to 115%. The results were evaluated using principal component analysis (PCA), but good separations were not well obtained, considering the wide variation in the components of the same class. Besides the determination of different analytes, the samples of honey were also analyzed by Fourier Transform Infrared (FT-NIR), in order to check possible adulteration and identify the regions of origin of the samples. This study used 46 honeys covering all regions of country, unadulterated honey samples and adulterated with glucose, cane sugar molasses and water in different proportions, from 10% to 50% (m m^{-1}) and the results were analyzed using PCA. The results proved that it was possible to verify the feasibility of using the technique of NIR for classification of Brazilian honeys and also in checking the adulteration of honey, especially when the samples were adulterated with water.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Apresentação.....	4
2. OBJETIVOS	6
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3.1. Mel.....	8
3.2. Preparo de amostras de mel	10
3.3. Determinação de constituintes inorgânicos em mel	15
3.4. Espectrometria de massa acoplada ao plasma indutivo (ICP-MS).....	20
3.5. Espectrometria no infravermelho próximo e a adulteração de méis	24
3.6. Análise multivariada de dados.....	26
3.6.1. Análise de Componentes Principais (PCA).....	27
4. Otimização do preparo de amostras de méis visando à determinação de elementos traço por ICP-MS	30
4.1. Objetivos Específicos	30
4.2. Materiais e Métodos.....	30
4.2.1. Amostra Utilizada.....	30
4.2.2. Reagentes e Soluções.....	30

4.2.3. Equipamentos e Acessórios.....	32
4.2.4. Diluição com Água.....	35
4.2.5. Digestão em bloco utilizando ácidos diluídos.....	35
4.2.6. Digestão Assistida por Radiação Micro-ondas com Cavidade empregando Ácidos Diluídos.....	35
4.2.7. Análise da Acidez Final.....	38
4.2.8. Análise de Carbono Residual.....	38
4.3. Resultados e Discussão.....	38
4.3.1. Diluição com água.....	38
4.3.2. Digestão em Bloco Digestor Utilizando Ácidos Diluídos.....	39
4.3.3. Digestão Assistida por Radiação Micro-Ondas com Cavidade empregando Ácidos Diluídos.....	40
4.4. Conclusões Parciais.....	48
5. Determinação de minerais e elementos traço em méis por ICP-MS e análise quimiométrica dos resultados.....	52
5.1. Objetivos Específicos.....	52
5.2. Materiais e Métodos.....	52
5.2.1. Amostras.....	52
5.2.2. Reagentes e Soluções.....	55
5.2.3. Equipamentos e Acessórios.....	56
5.2.4. Métodos.....	56

5.3. Resultados e Discussão.....	56
5.4. Conclusões Parciais	72
6. Análise de méis por FT-NIR e apreciação dos resultados utilizando quimiometria para a identificação da origem e detecção de adulterações	74
6.1. Objetivos Específicos	74
6.2. Materiais e Métodos.....	74
6.2.1. Méis adulterados.....	75
6.2.2. Méis de diferentes regiões	76
6.3. Resultados e Discussão.....	77
6.3.1. Méis adulterados.....	77
6.3.1.1. Adulteração com água.....	77
6.3.1.2. Adulteração com glicose	79
6.3.1.3. Adulteração com melado de cana-de-açúcar.....	82
6.3.2. Méis de diferentes regiões	85
6.4. Conclusões Parciais	86
7. CONCLUSÕES	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
APÊNDICE 1	100

Capítulo 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O mel é um dos alimentos mais complexos fabricados na natureza. Em sua produção as abelhas, geralmente da espécie *Mellifera*, coletam néctar e pólen da flora ao seu redor, em um área de aproximadamente 7 km² da distância da colmeia, e os altera com substâncias presentes em sua saliva, em seguida, essa mistura é armazenada em favos, onde ocorrerá o seu amadurecimento [1-4].

Na história da humanidade, o mel foi uma das primeiras fontes de açúcar utilizadas pelo homem, mas além de sua grande importância nutricional, este também apresenta qualidades medicinais, como ser antioxidante, fungicida, bactericida contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, podendo também ser utilizado como conservante alimentício [1-5].

A composição química dos méis é de aproximadamente 81% de carboidratos, entre eles, glicose (25-45%), frutose (25-37%), maltose (2-12%) e sacarose (0,5-3%), 18% de água e cerca de 1% de proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos e minerais. Sua origem tanto geográfica (solo) quanto botânica interfere diretamente em sua composição mineral, que é constituída majoritariamente por K, P, Ca e Na e também por elementos traço como Pb, Cd, Zn, Fe, Mg, Mn, Al, Si, B, Sn, Ba, Ag, Mo, Cr e As, que podem ou não estar presente nessa matriz. Outros fatores que também podem interferir nessa composição são: a espécie de abelha, o estado de maturação da colônia e as condições meteorológicas na colheita [1, 2, 6].

O interesse de países como Estados Unidos, Alemanha e Reino Unido pelo mel brasileiro vem aumentando no decorrer dos anos, o que levou o Brasil a exportar em 2010 cerca de 17 milhões de toneladas de mel, gerando uma receita de US\$ 49,5 milhões para o País, sendo que os principais estados produtores foram São Paulo, Ceará, Rio Grande do Sul e Santa Catarina [7].

Visto a grande expansão comercial do mel brasileiro e as exigências feitas para haver um controle alimentar, é necessário estabelecer critérios de qualidade para o mel exportado e consumido no País. Além disso, estudos na literatura relatam o uso deste alimento como indicador de poluição ambiental, sendo importante o conhecimento da origem geográfica e botânica e da composição mineral característica de cada região, para que seja possível monitorar alguns contaminantes que podem estar presentes no mel [2,6,8].

A determinação de constituintes inorgânicos em mel não é uma tarefa trivial, em função das baixas concentrações que os elementos são encontrados nessa matriz e também do alto teor de carboidratos que essa contém [9]. Assim, além de ser necessário um pré-tratamento da amostra também é necessário escolher uma técnica analítica que seja multielementar, tenha elevada sensibilidade e excelentes limites de detecção, razão da escolha da espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) como técnica de detecção. Essa técnica se destaca na análise de traços, pois apresenta além da característica multielementar, elevada sensibilidade e espectros de fácil análise [10].

A quimiometria faz uso de modelos matemáticos multivariados, baseados na álgebra linear, que podem ser aplicados à química para correlacionar variáveis. Em geral suas aplicações enfocam dois temas centrais: o planejamento experimental e a análise de dados multivariados [11]. Os métodos de análises multivariadas podem ser divididos em três classes: os de análise exploratória de dados, os de construção de modelos quantitativos de calibração e os modelos qualitativos de classificação [12]. Para auxiliar no processo de visualização dos dados, foi utilizada a análise de componentes principais (PCA), com isso, pretende-se classificar, caracterizar e distinguir a procedência das diferentes amostras de méis com base nos teores dos analitos quantificados.

1.1. Apresentação

Esta dissertação está dividida em três partes distintas: (1) Otimização do preparo de amostras de méis visando à determinação de elementos traço por ICP-MS; (2) Determinação de minerais e elementos traço em méis por ICP-MS e análise quimiométrica dos resultados; e (3) Análise de méis por FT-NIR e apreciação dos resultados utilizando quimiometria para a identificação da origem e detecção de possíveis adulterações nas amostras.

As duas primeiras partes são sequenciais. Na primeira foi otimizado um método de preparo da amostra e em seguida foram realizadas determinações em ICP-MS para verificar a presença de alguns constituintes inorgânicos em diferentes méis brasileiros.

Desta maneira, o capítulo de revisão bibliográfica (capítulo 3) relata trabalhos da literatura que enfocam as três partes da dissertação, assim como o objetivo geral (capítulo 2). Os objetivos específicos, procedimento experimental, resultados e discussão e conclusões parciais de cada parte foram descritos em três capítulos diferentes (capítulos 4, 5 e 6).

Capítulo 2

Objetivos

2. OBJETIVOS

As propostas deste trabalho são:

- 1) Investigar diferentes métodos de preparo da amostra de mel visando obter baixos teores de carbono residual e uma baixa acidez final;
- 2) Avaliar os teores de minerais e elementos traço em amostras de mel provenientes de diferentes regiões brasileiras e correlacionar os dados analíticos e as regiões brasileiras de origem das amostras através de quimiometria;
- 3) Analisar amostras de méis não adulteradas, adulteradas e amostras de diferentes regiões brasileiras através da técnica de FT-NIR e utilizar análise quimiométrica para a visualização e interpretação dos dados espectrais.

Capítulo 3

Revisão Bibliográfica

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Mel

Os méis comerciais são oriundos da atividade extrativista de apicultores que exploram abelhas, as quais, o produzem a partir do néctar de flores. Os néctares mais utilizados pelas abelhas na produção de mel são os de eucalipto, flores silvestres e citros, sendo que os méis recebem a denominação da origem da florada explorada, como por exemplo, o mel de flor de laranjeira. Mas além dos méis comerciais, existem os méis de origem não floral, que são pouco consumidos e muitas vezes classificados erroneamente como méis adulterados devido aos altos teores de dissacarídeos. Esses méis geralmente têm origem do exsudato de cana-de-açúcar e de excreções de insetos sugadores de plantas [13].

Além da grande importância nutricional do mel, este também apresenta qualidades medicinais, como ser antioxidante, fungicida, bactericida contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, podendo também ser utilizado como conservante alimentício [1-5].

O sabor dos méis é fortemente doce, e sua coloração característica pode variar do quase transparente ao âmbar escuro. Em trabalho de revisão feito por POHL [14], o autor descreve que a coloração do mel está diretamente relacionada aos elementos químicos presentes majoritariamente em sua composição (K, P, Ca e Na). O autor também menciona alguns elementos traço que podem estar presentes nos méis, como, Pb, Cd, Zn, Fe, Mg, Mn, Al, Si, B, Sn, Ba, Ag, Mo, Cr e As.

O Brasil é um excelente produtor de artigos apícolas, isso porque apresenta uma favorável condição climática, extensas áreas com cobertura vegetal diversificada e um elevado grau de tolerância das abelhas africanizadas

às pragas e doenças. Pensando na expansão comercial do mel brasileiro o Ministério da Agricultura e do Abastecimento aprovou a Instrução Normativa (IN) n° 11, de 20 de outubro de 2000, que teve como base a antiga Portaria n° 367 de 4 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura e também legislações internacionais, tais como as propostas pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e pelo *Codex Alimentarius Commission* (CAC). A IN n° 11 padroniza os métodos de determinação de alguns parâmetros tais como: umidade, acidez, teor de hidroximetilfurfural (HMF), quantidade de açúcares redutores, sacarose aparente, minerais (cinzas), atividade diastásica e sólidos insolúveis em água [15].

Além do Brasil, a Comissão da União Europeia estabeleceu a norma 2001/110/ECC, que delimita parâmetros para a comercialização de mel em toda Europa. Alguns desses parâmetros são: teor de glicose e frutose, umidade, atividade enzimática e níveis de pesticidas [16].

Como o Brasil é um dos maiores exportadores de mel para a Europa o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) firmou o compromisso de implementar o Programa Nacional de Controle de Resíduos Biológicos (PNCR). Este programa visa garantir o controle dos resíduos e contaminantes nos produtos pecuários 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. Mesmo assim houve problemas relacionados ao não atendimento de alguns desses compromissos, fato que em março de 2006 gerou a suspensão da importação de mel brasileiro pela União Européia [9, 15].

Visto a grande expansão comercial do mel brasileiro é necessário haver um melhor controle de qualidade do mel exportado e consumido no país. O conhecimento da origem geográfica e botânica e a composição mineral característica de cada região possibilitaria o monitoramento de contaminantes que podem estar presentes neste alimento.

Desta forma, um controle de qualidade eficiente que assegure à população um produto inspecionado e certificado é necessário, visto que méis podem ser contaminados por poluentes através do ar, do solo e da água, podendo este alimento ser utilizado como indicador de poluição ambiental [8, 17, 18, 19].

No trabalho de RASHED e colaboradores [8] foram determinados os teores dos seguintes elementos: Co, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn em 96 amostras de solo, 48 amostras de flores e 48 amostras de mel de regiões poluídas e não poluídas do Egito, sendo verificado que os méis de regiões poluídas continham teores superiores dos elementos em estudo.

TONG *et al.* [17] verificaram que houve um aumento das concentrações de Cd, Cu, Pb e Zn de amostras de mel coletadas em áreas próximas a rodovias, indústrias e mineração no estado de Nova York quando comparadas com uma amostra armazenada em 1899 da mesma localidade.

Teores de Cd, Cr e Pb foram determinados por CONTI e BOTRÉ [18] em méis, pólenes, cera, própolis e abelhas melíferas, sendo que os autores também constataram que as abelhas e em menor proporção alguns de seus produtos, podem ser considerados indicadores de poluição ambiental.

3.2. Preparo de amostras de mel

A determinação de constituintes inorgânicos em mel não é uma tarefa trivial, visto as baixas concentrações que os elementos são encontrados nessa matriz e também o alto teor de carboidratos contidos na mesma [9]. Para que seja possível determinar baixas concentrações, faz-se necessária a utilização de procedimentos adequados a esse tipo de análise, no intuito de se obter resultados confiáveis. Em adição, quanto menor o número de etapas de manipulação da amostra, menor será a possibilidade de contaminação da mesma.

É oportuno observar que, dentre todas as operações analíticas, a etapa de preparo das amostras é a mais crítica. Em geral, é nesta etapa que se cometem mais erros e na qual se gasta mais tempo e, além disso, é esta etapa que governa a precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), a exatidão, o tempo e, conseqüentemente, o custo das análises. Assim, durante a seleção de um método de preparo de amostra devem ser levadas em consideração algumas características desejáveis, como simplicidade, robustez, baixo custo, elevada frequência analítica, além de baixa acidez residual e geração da menor quantidade possível de resíduos e efluentes [20].

Na literatura, há muitos trabalhos que se referem à determinação de constituintes inorgânicos em mel e utilizam como método de preparo da amostra a digestão assistida por radiação micro-ondas com cavidade [21-25]. O emprego desse método proporciona redução de problemas com contaminação, evita perda de elementos voláteis e possibilita controlar a pressão e a temperatura nas diferentes etapas do processo [20].

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas, que cobrem uma faixa de frequências do espectro eletromagnético que varia de 300 a 300000 MHz. Particularmente os fornos de micro-ondas usados em laboratórios empregam a frequência de 2450 MHz [20].

O rápido aumento na temperatura interna do frasco de digestão se deve, principalmente, à interação da radiação eletromagnética com os íons dissolvidos e com o solvente, provocando os fenômenos de migração iônica (Figura 3.2.1) e rotação de dipolos (Figura 3.2.2), resultando em um movimento molecular no material, que contribui para o aquecimento do mesmo [20].

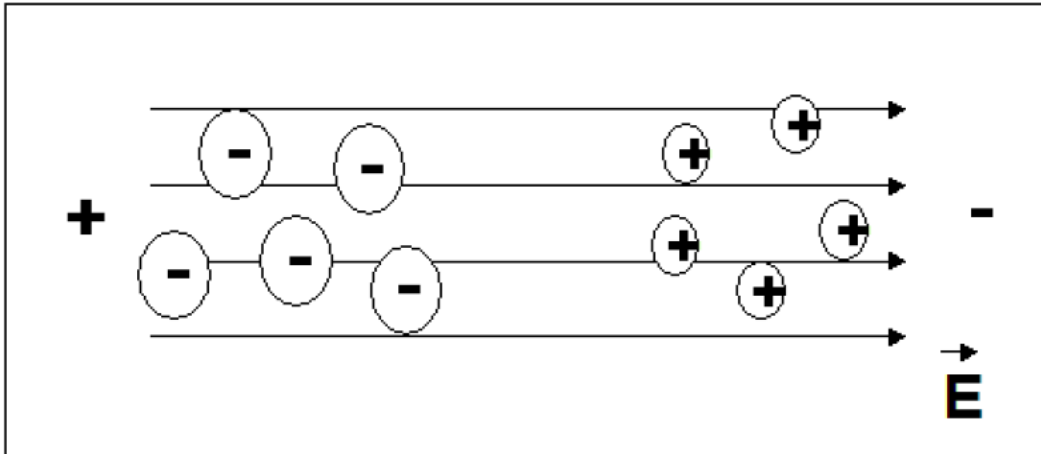


Figura 3.2.1 Representação do mecanismo de migração iônica [20].

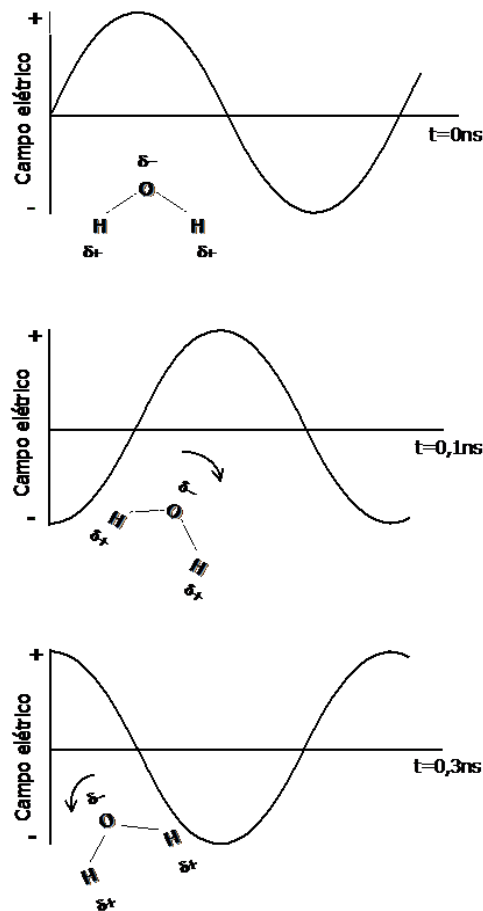


Figura 3.2.2 Representação do alinhamento de uma molécula de água com o campo elétrico [20].

Na decomposição de amostras assistida por radiação micro-ondas, o tipo de ácido, assim como sua quantidade, são parâmetros importantes a serem considerados, seja por razões de segurança ou mesmo de eficiência de decomposição. A possibilidade de se diminuir a quantidade de reagentes adicionados neste processo é interessante por aumentar a segurança no processo, por gerar soluções com menor acidez, reduzir os custos do processo, além de prevenir a ocorrência de danos aos equipamentos que utilizam sistema de nebulização na introdução da amostra [20,26,27].

O preparo de amostra de mel utilizado por SANNA *et al.* [21] foi um exemplo de digestão assistida por radiação micro-ondas com cavidade. Para isso, foram pesados 0,5 g de mel ao qual a seguir foram adicionados 4 mL de HNO₃ concentrado, sendo a mistura pré-digerida a temperatura ambiente por 24h. Posteriormente, a digestão foi efetuada com o emprego de programa que consistia em duas etapas (3 min a 25 W e 1 min a 50 W). Após o resfriamento, os frascos foram abertos, acrescentou-se 2 mL de H₂O₂ (85% m m⁻¹) e as amostras retornaram ao forno com a mesma programação [21].

Em amostras de mel húngaro, FODOR e MOLNAR [22] compararam diferentes formas de preparo de amostra, entre elas a diluição e a decomposição em sistemas abertos e fechados. As determinações foram realizadas utilizando a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) no intuito de caracterizar treze elementos presentes nessa matriz. O melhor resultado foi obtido com o emprego de sistema fechado, chegou-se a essa conclusão pela eficiência deste método de preparo e pela reprodutibilidade obtida nas análises.

TUZEN *et al.* [23] utilizaram três diferentes métodos de pré-tratamento de amostras de mel proveniente da Turquia: via seca utilizando mufla para a obtenção de cinzas, digestão assistida por micro-ondas e digestão por via

úmida e concluíram que quando comparados, a digestão assistida por radiação micro-ondas forneceu as recuperações mais adequadas (de 98 a 102 %).

No estudo realizado por HERRERO e PEÑA [24] foram utilizadas amostras de mel espanhol. Para homogeneização, as amostras foram aquecidas em banho-maria até 50 °C e sonicados por 10 min em banho ultrassônico. Na sequência, pesou-se 1,5g de mel, adicionou-se 6 mL de HNO₃ concentrado e 1 mL de H₂O₂. A mistura foi decomposta utilizando-se radiação micro-ondas com cavidade.

Na pesquisa de MENDES *et al.* [25] foram avaliados dois métodos diferentes de pré-tratamento de amostras de mel brasileiro para posterior determinação dos analitos por ICP OES. O primeiro pré-tratamento empregado foi uma digestão assistida por radiação micro-ondas com cavidade, sendo pesados 1,0 g da amostra, adicionou-se 2,0 mL de HNO₃ concentrado e 2,0 mL de H₂O₂ (30% m m⁻¹). Seguiu-se um programa de aquecimento com 5 etapas (1 min a 320 W, 2 min a 0 W, 5 min a 320 W, 5 min a 520 W e 5 min a 740 W). No segundo pré-tratamento, foram pesados 20,0 g de mel, que a seguir foram diluídas em 20,0 mL de água e sonicadas por 15 min em um banho em ultrassom. Desta solução foi retirada uma alíquota de 1 g, na qual foi adicionado 0,5 mL de HNO₃ e o volume foi completado com água para 25 mL. Os resultados indicaram que ao utilizar o banho em ultrassom houve um eficiente pré-tratamento, demonstrando ser um método simples para a determinação de espécies inorgânicas, onde os efeitos de matriz e as interferências espectrais não foram pronunciados. Além disso, o método demonstrou ser exato e preciso.

Sem estudar a digestão ácida, IOANNIDOU *et al.* [26] propuseram um método simples, onde a amostra de mel foi diluída em água na proporção de 2% (m v⁻¹) e sonicada em banho de ultrassom. Contudo, foi verificado que o método não apresentou uma adequada repetibilidade para os elementos Pb e Zn e que o desvio padrão relativo foi maior que 50% para algumas amostras.

3.3. Determinação de constituintes inorgânicos em mel

Com o objetivo de determinar minerais e elementos-traço em méis, diferentes técnicas vêm sendo utilizadas, entre elas a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) [2,5,8,23], a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GFAAS) [9,18,23,27], a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) [3,5,6,22,25,26], a espectrometria de massa acoplada ao plasma indutivo (ICP-MS) [2,3,16,24], a espectrometria de reflexão total por fluorescência de raios X (TXRF) [28,29], a cromatografia iônica [30], a análise potenciométrica [31] e a voltametria [21].

Estes estudos quantificaram méis de diferentes países e alguns dos teores determinados para os elementos considerados essenciais à dieta humana, i.e., K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn e Cu, cujos valores médios encontrados em diferentes países podem ser observados na Tabela 3.3.1. A presença desses elementos em mel pode classificá-lo como boa fonte nutritiva. Além dos elementos essenciais, também foram estudados os elementos potencialmente tóxicos, i.e. Al, Cd, Co, Cr, Ni e Pb. Seus teores podem ser observados na Tabela 3.3.2.

No Brasil, MENDES *et al.* [25] determinaram K, Ca, Mg, Mn, Zn e Fe em méis das cinco diferentes regiões brasileiras usando ICP OES. As recuperações obtidas variaram de 90 a 110%. Na Tabela 3.3.3 podem ser observados alguns dos teores determinados no referido trabalho.

A escolha apropriada da técnica para a determinação de minerais e elementos traço requer conhecimento das capacidades e limitações das diferentes técnicas disponíveis. Os principais parâmetros que devem ser considerados no momento da escolha da técnica são: a precisão, a sensibilidade, o tempo da análise e o custo da operação.

Por outro lado, quanto mais sensível a técnica escolhida, maiores devem ser as preocupações com a pureza dos reagentes e com a limpeza dos materiais utilizados, pois um dos fatores limitantes em uma análise de elementos-traço é o branco analítico, devido ao risco de contaminação que pode ocorrer durante o processo de preparo de amostra [20].

Outro problema na determinação de constituintes inorgânicos em mel é a falta de materiais de referência certificados (CRM), o que tem sido suprido utilizando-se outros materiais que tenham grande quantidade de carbono ou de carboidratos. Alguns comumente utilizados, apesar da diferença matricial são: Apple leaves (NBS 1515), Brown Bread (BCR 191), Corn (NBS 8413), Wheat (IPE 684), Wholemeal Flour (BCR 189) e Antarctic Krill (MURST-ISS-20). Além disso, tem sido utilizada a calibração externa, testes de adição e recuperação e uso de padrão interno para corrigir efeitos de matriz [14].

Na tentativa de suprir a falta de CRM de mel, CAROLI e colaboradores [32] produziram um CRM para elementos traço na matriz de mel. Os elementos analisados foram As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sn, V e Zn e as determinações foram realizadas usando técnicas com plasma acoplado indutivamente (ICP), porém, um dos maiores problemas no preparo deste material foi manter a homogeneidade da matriz mel, o que inviabilizou a produção do material. Como resultado foi possível perceber que os méis da espécie *Eucalyptus* tinham maiores teores dos elementos analisados, quando comparados com méis da espécie *Robinia*, evidenciando que diferentes origens botânicas têm habilidades diferentes de acumular elementos traço.

Tabela 3.3.1 Concentração de K, Na, Ca, Mg, Fe, Zn, Mn e Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$) em méis de diferentes países [14].

Origem	K	Na	Ca	Mg	Fe	Zn	Mn	Cu
Brasil	167-3353	139-509	7-237	ND-373	ND-15	ND-14	ND-24	ND
Chile	-	-	-	-	0,1-7,66	0,01-6,97	0,01-6,97	0,06-4,32
Egito	213-15550	378-2550	-	102-1325	58-3690	5-9,3	0,5-5,7	1-1,75
França	-	-	3-108	1,4-110	01-10	0,04-5,96	0,06-10,3	0,03-2,3
Grécia	-	-	-	-	-	-	0,11-7,22	ND-0,48
Hungria	-	-	-	-	-	-	-	0,04-0,44
Índia	490-932	97,9-304	32,6-84,6	-	3,6-28,4	1,1-29	-	1,06-2,9
Irlanda	410-714	41,3-196	74,9-175	18,9-53,3	1,7-36,3	1,6-22,5	0,9-10,2	1-2,3
Itália	147-4136	6,1-232	9,1-409	3,9-159	0,3-35,1	0,6-3,66	0,08-16,9	0,14-5,9
Macedônia	169-3323	5,9-150	4,1-170	4,4-182	0,03-7	0,31-15	0,16-82	0,02-5,9
Polónia	7,7-3659	0,38-89,6	3,3-159	1,1-19,8	ND-16,1	ND-22,3	-	ND-1,82
Romênia	-	-	-	-	2,04-2,91	0,2-7,5	1,75-2,23	-
Arábia Saudita	9,3-1367	10-133	1,5-27,7	18,4-23,2	0,31-8,39	0,2-3	0,03-0,37	0,21-0,6
Eslovênia	2910	-	-	-	<4,8	5,1	6,3	1,4
Espanha	14-6785	11-1221	13,8-341	3,6-230	ND-60	0,07-19,1	0,01-27	0,04-7,8
Turquia	143-6029	9,3-172	3,3-900	2-111	0,04-19,7	ND-20,2	ND-74,2	ND-3,5

*ND – não detectado

Tabela 3.3.2 Concentração de Al, Cd, Co, Cr, Ni e Pb ($\mu\text{g g}^{-1}$) em méis de diferentes países [14]

Origem	Al	Cd	Co	Cr	Ni	Pb
Brasil	-	ND	-	-	-	ND
Chile	0,04-22,1	0,01-0,05	0,01-0,62	0,01-1,98	0,01-1,48	0,01-0,11
Egito	-	0,01-0,5	1,75-3,2	-	1,25-4,1	4,2-9,3
França	0,05-1,44	-	0,03-0,25	0,05-0,52	-	-
Grécia	-	0,089-0,222	0,010-0,087	-	ND	-
Hungria	-	0,001-0,003	-	0,002-0,109	-	0,012-0,163
Índia	-	<0,050-0,550	<0,25	-	<0,05-0,65	<0,05-0,92
Itália	-	0,001-0,305	0,002-0,057	0,008-0,102	<0,05-2,76	0,003-0,62
Polónia	-	0,008-0,027	-	-	-	0,02-0,07
Romênia	-	0,008-0,032	-	0,03-0,71	0,9-2,03	0,03-0,18
Arábia Saudita	-	ND-0,037	-	-	-	0,03-0,24
Eslovênia	-	-	-	0,4	<1,3	<2,0
Espanha	<0,1-132	<0,001-0,365	<0,01-0,72	0,01-4,48	0,01-3,37	ND-1,2
Turquia	0,004-28,7	<0,001-0,340	0,001-1,60	0,001-0,94	ND-2,17	ND-1,2

*ND – não detectado

Tabela 3.3.3 Espécies inorgânicas em amostras de mel brasileiro (mg kg⁻¹) [25]

Regiões Brasileiras	Centro-Oeste	Norte	Nordeste	Sul	Sudeste
Nº Amostras	3	2	16	16	32
K	672-3353	900-1510	358-1402	344-2950	167-2500
Ca	18-38	15-30	7-214	17-201	5-234
Mg	48-57	38-53	<LOQ-245	<LOQ-195	<LOQ-373
Mn	0,9-2	1-17	<LOQ-5	0,8-11	<LOQ-24
Zn	<LOQ	<LOQ-14	<LOQ-12	<LOQ-11	<LOQ-7
Fe	0,7-3	<LOQ-2	<LOQ-4	0,6-15	<LOQ-15

*<LOQ – menor do que o limite de quantificação do equipamento.

3.4. Espectrometria de massa acoplada ao plasma indutivo (ICP-MS)

Uma técnica que se destaca na análise de constituintes inorgânicos presentes em baixas concentrações é a espectrometria de massa acoplada ao plasma indutivo (ICP-MS). Apresenta como vantagens o caráter multielementar, a alta frequência analítica, a elevada sensibilidade, excelentes limites de detecção, baixo consumo de amostra e a possibilidade de determinar razões isotópicas, sendo adequada para a determinação de concentrações da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ [33].

Em 1980, HOUK e FASSEL [10,34-36] obtiveram o primeiro espectro de massa gerado a partir do acoplamento com plasma induzido. Já em 1983 a Sciex lançou, no Canadá, o ELAN 250, que foi o primeiro equipamento comercial e desde então a técnica está em constante aprimoramento e evolução.

A fonte de plasma possibilitou a produção eficiente de íons de vários elementos, os quais são conduzidos sequencialmente ao detector para a determinação multielementar, de acordo com a razão massa-carga (m/z), considerando-se o reduzido número de isótopos estáveis para cada elemento da tabela periódica, o espectro de massa gerado é relativamente simples [33,37].

O plasma é um gás parcialmente ionizado e é nele que os átomos se ionizam. Os íons gerados à pressão atmosférica no plasma são transferidos para uma região de vácuo através de uma interface contendo cones metálicos com orifícios diminutos (cone de amostragem do inglês *sample* e *skimmer*). Em seguida, os íons passam pelas lentes iônicas onde são colimados. Esse processo é necessário devido à repulsão eletrostática que os íons da mesma carga sofrem. Dessa forma, os íons são focalizados para o espectrômetro de massa visando a separação em função da razão massa/carga. A seguir, os íons atingem um detector, que amplifica o sinal gerado [33,37].

Na Figura 3.4.1 podem ser observados os principais componentes de um ICP-MS: o sistema de introdução de amostras, a fonte de ionização, a

interface de extração dos íons, as lentes iônicas responsáveis pela condução e focalização dos íons, o analisador de massas quadrupolar e o sistema de detecção.

Obviamente o ICP-MS apresenta algumas limitações, entre elas, a baixa quantidade de sólidos dissolvidos (0,2 a 2%) e a baixa eficiência de nebulização. Além disso, o espectro de massas contém sinais indesejáveis provenientes principalmente de íons moleculares formados no plasma e na região da interface [39]. A Tabela 3.4.1 apresenta alguns casos típicos de interferências isobáricas não resolvidas em equipamentos com baixa resolução, i.e. ICP-MS baseado em quadrupolo (Q-ICP-MS).

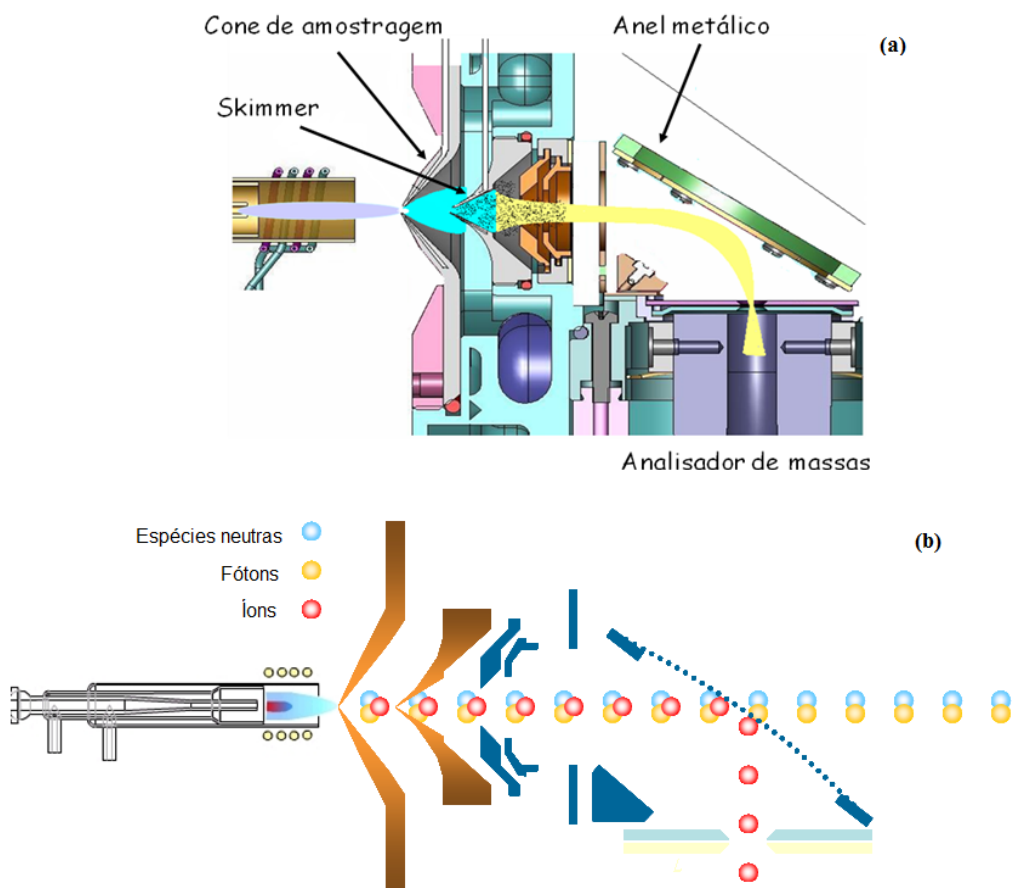


Figura 3.4.1 (a) Diagrama esquemático da interface 90° do ICP-MS Varian e **(b)** Representação da trajetória das espécies geradas no ICP (VARIAN 820-MS - CRI) [38].

Tabela 3.4.1 Isótopos, abundância natural relativa e interferente: casos típicos

Isótopo	Abundância natural relativa (%)	Interferente
^{24}Mg	78,7	$^{12}\text{C}_2^+$
^{51}V	99,76	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ e $^{37}\text{Cl}^{14}\text{N}^+$
$^{52}\text{Cr}^+$	83,76	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ e $^{36}\text{S}^{16}\text{O}^+$
$^{55}\text{Mn}^+$	100	$^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$ e $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$
$^{56}\text{Fe}^+$	91,66	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ e $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$
$^{64}\text{Zn}^+$	48,89	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$ e $^{32}\text{S}_2^+$
$^{66}\text{Zn}^+$	27,81	$^{32}\text{S}^{34}\text{S}^+$ e $^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$
$^{75}\text{As}^+$	100	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ e $^{40}\text{Ar}^{34}\text{S}^1\text{H}^+$
$^{80}\text{Se}^+$	49,82	$^{40}\text{Ar}_2^+$ e $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_3^+$

Em condições favoráveis, os processos de interferência podem ser corrigidos selecionando-se outro isótopo para execução da medida ou por correção matemática dos sinais gerados para o branco e para a amostra. A primeira alternativa não é aplicável para elementos monoisotópicos, sendo que para outros elementos pode implicar em perda de sensibilidade, considerando-se a abundância natural relativa de cada isótopo do elemento. Por outro lado, a correção matemática somente é eficaz quando a concentração do analito gera um sinal relativamente alto comparado ao sinal de fundo gerado pelo íon molecular. Entre as alternativas propostas para eliminação dessas interferências em Q-ICP-MS destacam-se o plasma frio (do inglês, *cool plasma*) e as interfaces com câmaras dinâmica de reações ou colisões [39-45].

Na interface com uma câmara dinâmica de reações ou colisões são inseridos gases que têm a capacidade de promover colisões com as espécies interferentes, que são gases He ou H₂, ou promover reações com as mesmas, que são os gases H₂, NH₃, N₂O, CO ou CH₄. Tudo isso, em uma câmara contendo um quadrupolo, hexapolo ou octapolo [40-43].

Existe também a possibilidade de se utilizar uma interface sem um espectrômetro de massas adicional e com a possibilidade de adicionar H₂ ou He no primeiro cone da interface (cone de amostragem) ou no segundo cone (*skimmer*), como pode ser observado na Figura 3.4.2. Essa interface é denominada interface de reação e colisão (CRI) e ela é simples, a análise é rápida e a desativação do sistema também. Argumenta-se que sua eficiência para eliminar as interferências poliatômicas decorre da promoção de colisões e reações em uma região sob condições de temperatura e pressão ainda elevadas [44,45].

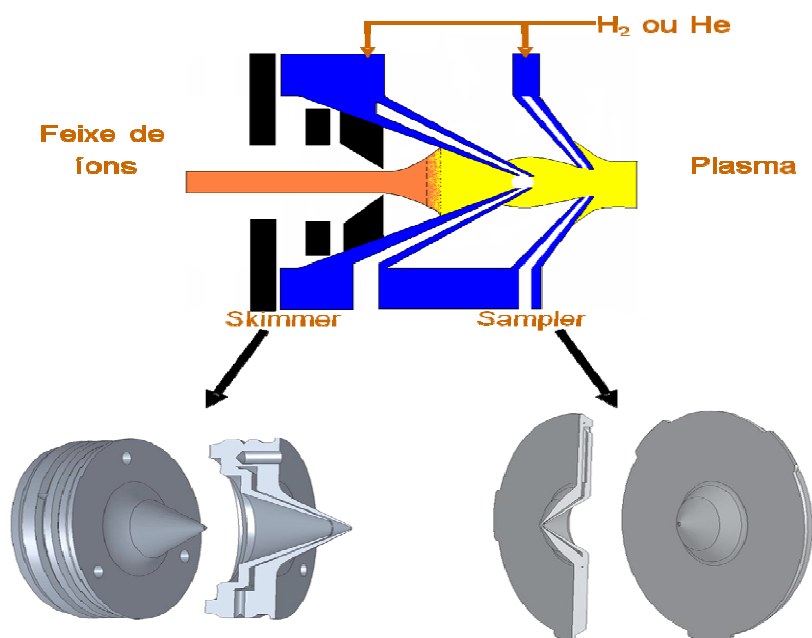


Figura 3.4.2 Região da interface do ICP-MS da Varian [38].

PACKER *et al.* [16] determinaram as razões isotópicas de ¹³⁵Ba/¹³⁸Ba, ⁶⁵Cu/⁶³Cu, ²⁰⁶Pb/²⁰⁸Pb, ⁶⁶Zn/⁶⁸Zn em méis utilizando um Q-ICP-MS

através de diluição isotópica (ID) e utilizando algumas modificações no sistema de introdução da amostras, utilizou-se um nebulizador de injeção direta (DIN). O uso de DIN aumentou a eficiência da introdução da amostra, levando a uma maior sensibilidade e precisão.

FRAZZOLI e colaboradores [46] avaliaram algumas figuras de mérito em um espectrômetro de massa com setor magnético acoplado ao plasma indutivo (SF-ICP-MS), como limites de detecção, quantificação, repetibilidade e reprodutibilidade na determinação de Cd e Pb em méis italianos e o método mostrou-se robusto em diferentes condições de trabalho.

HERRERO e PEÑA [24] utilizando ICP-MS conseguiram determinar $^{111}\text{Cd}^+$ e $^{208}\text{Pb}^+$. Para isso, utilizaram como padrão interno o ^{115}In e resolveram a interferência de $^{95}\text{Mo}^{16}\text{O}^+$ sobre $^{111}\text{Cd}^+$ com um fator de correção matemática.

Em pesquisa de CAROLI *et al.* [3] foram determinados os seguintes elementos: As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Pt, Sn, V e Zn. Para isso foi utilizada a técnica de ICP-MS. Quando se utilizou um Q-ICP-MS houve a interferência de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ na mesma massa do analito ^{75}As ; do $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$ na mesma massa do analito ^{56}Fe e a do $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ na mesma massa do analito ^{52}Cr , que foram resolvidas utilizando um ICP-MS de alta resolução. A presença de carbono foi explicada por não ter ocorrido a oxidação completa dos carboidratos a CO_2 no preparo da amostra.

3.5. Espectrometria no infravermelho próximo e a adulteração de méis

O mel é um produto alimentício que tem disponibilidade limitada e um preço relativamente alto, o que incentiva a sua adulteração. As principais características do mel verdadeiro são a presença de grãos de pólen e o fenômeno de cristalização, o que dificilmente ocorre em méis adulterados. Geralmente a adulteração de mel é feita com a adição de outros carboidratos, principalmente açúcares comerciais, solução ou xarope de sacarose, melado de cana-de-açúcar,

solução de sacarose invertida e água. A aparência dessas misturas pode ser melhorada com a adição de iodo, para ajustar a coloração, e/ou pelo acréscimo de aditivos químicos, melhorando a viscosidade da mistura [47-49].

Dentre as técnicas analíticas já utilizadas para a detecção de adulterações em mel destacam-se a análise de razão isotópica de carbono, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear, a cromatografia de alta eficiência, a espectrometria no infravermelho médio e a espectrometria no infravermelho próximo (NIRS) [50].

Em trabalho realizado por ROSSI *et al.* [49] foi avaliada a razão isotópica de carbono por ICP-MS com o propósito de averiguar a presença de carboidratos que não são comumente encontrados em amostras de mel. Foram analisadas 61 amostras de mel do estado de São Paulo e constatou-se que cerca de 8% das amostras tiveram sinais claros de adulteração.

A técnica de espectrometria na região do infravermelho próximo combinadas com ferramentas quimiométricas também pode ser utilizada na detecção de adulterantes em mel. O infravermelho próximo (NIR) compreende uma faixa do espectro eletromagnético que varia de 700 nm a 2500 nm. A espectroscopia no infravermelho apresenta uma absorbância em frequência particular característica de um grupo funcional presente no composto químico [51].

A técnica de NIR é ideal para substituir as análises de alto custo, demoradas, complexas, que usam reagentes tóxicos ou em grande volume. Isso porque as amostras não necessitam de um tratamento prévio, além de ser uma técnica não destrutiva, que pode ser utilizada para determinações qualitativas e quantitativas. O aparecimento dos espectrômetros com transformada de Fourier (FT-NIR) aumentaram notavelmente o número e o tipo de aplicações da radiação no infravermelho, mas como consequência, as relações entre sinal e ruído também foram aumentadas [51]. Para tratar os dados gerados pelo NIR é necessário fazer uso de ferramentas quimiométricas para extrair os dados

relevantes, pois os espectros gerados são complexos, contendo de 300 a 1500 variáveis.

Para determinação da origem botânica de méis, RUOFF *et al.* [52] calibraram parâmetros como frutose, glicose, sacarose, maltose, água, cinzas, condutividade elétrica e cor utilizando a técnica de infravermelho próximo com transformada de Fourier combinada com ferramentas quimiométricas de classificação. Os autores considerarão a rapidez e o fato da técnica não ser destrutiva, como vantagens para seu uso.

3.6. Análise multivariada de dados

A quimiometria, modelo matemático multivariado, baseia-se na álgebra linear e pode ser aplicada à química para correlacionar variáveis. Em geral suas aplicações enfocam dois temas centrais: o planejamento experimental e a análise de dados multivariados. Os métodos de análises de dados multivariados podem ser genericamente divididos em três classes distintas: os de análise exploratória de dados, os de construção de modelos quantitativos de calibração e os modelos qualitativos de classificação [12].

Na literatura podem ser encontrados diversos trabalhos relacionados com mel, que utilizaram a quimiometria como ferramenta no tratamento de dados. O intuito desses trabalhos é de relacionar as características físico-químicas das amostras com sua origem botânica ou com o local geográfico de coletas das mesmas. Entre estas características físico-químicas podem ser listadas: cor, minerais, elementos traço, compostos orgânicos, entre outros. Além disso, há trabalhos que fazem uso desta ferramenta matemática para tentar identificar a autenticidade de méis [4,6,53-60].

3.6.1. Análise de Componentes Principais (PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA) é utilizada principalmente para reduzir as dimensões do conjunto de dados originais, o que permite uma melhor visualização das informações mais relevantes deste conjunto, em um número menor de fatores, ou componentes principais. Além de simplificar e reduzir a dimensão dos dados originais, é possível detectar amostras anômalas (*outliers*), fazer uma seleção de variáveis importantes, classificar os dados e fazer algumas previsões [11,12,61,62].

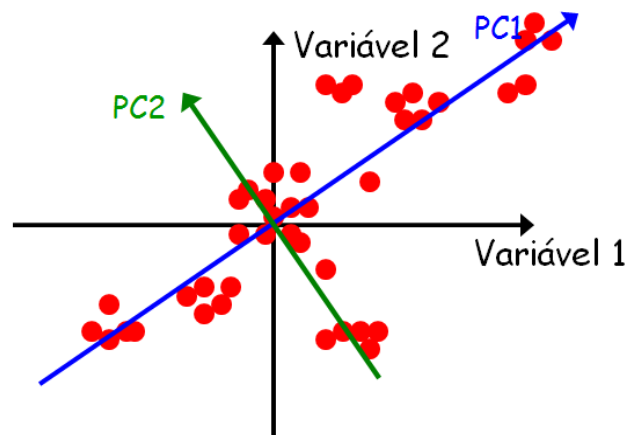


Figura 3.6.1.1 Projeção das Componentes Principais (PC's)

Matematicamente, a PCA corresponde à decomposição da matriz \mathbf{X} , de dimensão n (*amostras*) \times m (*variáveis*), em três matrizes menores: \mathbf{T} , \mathbf{P}^t e \mathbf{E} onde \mathbf{T} representa a matriz de “scores”, \mathbf{P}^t a matriz de “loadings”, sendo “ t ” a operação transposta e \mathbf{E} a matriz de resíduos não explicados pelo modelo, como pode ser observado na equação 3.6.1.1.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^t + \mathbf{E} \quad \text{Equação 3.6.1.1}$$

A partir da análise do gráfico de “scores” é possível verificar os agrupamentos e/ou tendências das amostras analisadas, e também destacar

amostras anômalas. A partir da análise do gráfico de “*loadings*”, é possível verificar as variáveis mais importantes na descrição do conjunto de dados [62].

Capítulo 4

**“Otimização do preparo de amostras de méis
visando à determinação de elementos traço por
ICP-MS.”**

4. Otimização do preparo de amostras de méis visando à determinação de elementos traço por ICP-MS

Este capítulo versa sobre três diferentes métodos de preparo de amostras de mel visando a análise em ICP-MS. O primeiro método investigado foi a diluição com água, o segundo foi a digestão ácida usando como fonte de aquecimento um bloco digestor e o terceiro método foi a digestão assistida por radiação micro-ondas com cavidade.

4.1. Objetivos Específicos

Investigar o preparo de amostra adequado para análise de mel por ICP-MS. Para isso, desejava-se reduzir simultaneamente o teor de carbono residual e da acidez final com um mínimo de diluição da solução.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Amostra Utilizada

Para o desenvolvimento desta parte do trabalho foi selecionada uma única amostra de mel coletada em Janeiro de 2010 e originária da cidade de Corumbá, Mato Grosso do Sul, gentilmente cedida pela Embrapa Pantanal.

4.2.2. Reagentes e Soluções

Para execução deste trabalho foram utilizadas vidrarias descontaminadas em ácido nítrico (HNO_3) 10% (v v^{-1}) e lavadas com água desmineralizada (Milli-Q[®] System Millipore, Bedford, MA, USA).

As incertezas relacionadas aos volumes medidos foram de $\pm 0,05$ mL quando utilizou-se bureta de 50 mL, de $\pm 0,01$ mL quando utilizou-se pipeta automática de 1 a 5 mL e de $\pm 0,001$ mL quando utilizou-se as pipetas

automáticas de 100 a 1000 μL e de 10 a 100 μL e, as incertezas relacionadas a massa foram de $\pm 0,0001\text{g}$.

As soluções de HNO_3 foram preparadas a partir de uma solução estoque 65% (MM: 63 g mol^{-1} , Carlo Erba, Itália) que passou pelo processo de destilação abaixo do ponto de ebulição (Milestone, Sorisole, Itália), e as diluições foram feitas com água desmineralizada para as seguintes concentrações: 1% (v v^{-1}), 2 mol L^{-1} , $3,8\text{ mol L}^{-1}$, 8 mol L^{-1} , $12,2\text{ mol L}^{-1}$ e 14 mol L^{-1} . Também foi utilizado peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , MM: 34 g mol^{-1} Vetec, Brasil, 30% m m^{-1}).

A solução de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} , utilizada na titulação para determinação de acidez final, foi obtida através da dissolução de pastilhas de NaOH (MM: 40 g mol^{-1} , Synth, Brasil) em água desmineralizada. A concentração final da solução obtida foi de $1,0\text{ mol L}^{-1}$ e este valor foi determinado após a padronização deste com biftalato de potássio anidro ($\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$, MM: $204,22\text{ g mol}^{-1}$, Synth, Brasil). O biftalato de potássio anidro também foi utilizado para preparar a curva de calibração de carbono utilizada no ICP-OES.

Como indicador ácido-base foi utilizado fenolftaleína ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$, MM: $318,32\text{ g mol}^{-1}$, Grupo Química, Brasil), essa substância foi pesada e diluída em etanol 95% ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, massa molecular: $46,06\text{ g mol}^{-1}$, Dinâmica, Brasil) até a concentração de 1% (m v^{-1}). A coloração deste indicador em meio básico é rosa e em meio ácido transparente, e o ponto de viragem deste indicador é na faixa de pH entre 8,2 e 9,8.

As soluções para a determinação dos elementos: Mg, Al, P, K, Ca, V, Cr, Fe, Mn, Cu, Zn, As, Se, Cd e Ba em ICP-MS, foram preparadas a partir de soluções monoelementares estoque de 1000 mg L^{-1} (TecLab, Jundiaí, Brasil) e as diluições foram feitas com água desmineralizada para as seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 20; 40; 80 e $160\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$.

4.2.3. Equipamentos e Acessórios

Neste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Balança analítica (APX-200, Denver Instrument Company, EUA);
- Agitador tipo vórtex (Thermolyne type 37600 mixer, Dubuque, EUA);
- Tubos do tipo Falcon de 15 mL e de 50 mL descontaminados em meio HNO_3 10% ($v v^{-1}$) durante 24 h e lavados com água destilada-deionizada;
- Banho Dubnoff (NT-232, Novatecnica, Brasil);
- Bloco digestor (Tecnal, Brasil), especialmente construído para se ajustar aos frascos de perfluoroalcoxi (PFA, Savillex, Minnetonka, USA). Na figura 4.2.3.1 é possível observar uma foto do bloco digestor e dos frascos utilizados nesse trabalho.



Figura 4.2.3.1 Esquema do bloco digestor e dos frascos utilizados nesse experimento

- Micro-ondas Ethos 1600 (Milestone, Itália) com frascos fechados de PFA.
- Software MatLab versão 2011a (Mathworks, Natick, EUA).
- Espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, ICP OES (Vista Radial – CCD Simultaneous, Varian, Mulgrave, Austrália). Na Tabela 4.2.3.1 encontram-se os parâmetros instrumentais do ICP OES empregados para a determinação do carbono residual [63].

Tabela 4.2.3.1 Condições operacionais do ICP OES com configuração Radial

Características	Parâmetros
Gerador de frequência (MHz)	40
Potência de radio-frequência (kW)	1,0
Fluxo do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Fluxo do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5
Fluxo do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,75
Altura de observação (mm)	10
Nebulizador	Ranhura em V
Câmara de nebulização	Sturman-Master
λ	C – 193,027

- Espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado, ICP-MS 820- MS (Varian, Mulgrave, Austrália). Na Tabela 4.2.3.2 encontram-se os parâmetros instrumentais utilizados no ICP-MS para a análise inorgânica de mel. Os isótopos monitorados foram: ²⁴Mg⁺, ²⁶Mg⁺, ²⁷Al⁺, ³¹P⁺, ³⁹K⁺, ⁴⁰Ca⁺, ⁴²Ca⁺, ⁴⁴Ca⁺, ⁵¹V⁺, ⁵²Cr⁺, ⁵³Cr⁺, ⁵⁴Fe⁺, ⁵⁵Mn⁺, ⁵⁶Fe⁺, ⁶³Cu⁺, ⁶⁴Zn⁺, ⁶⁵Cu⁺, ⁶⁶Zn⁺, ⁶⁸Zn⁺, ⁷⁵As⁺, ⁷⁶Se⁺, ⁷⁷Se⁺, ⁷⁸Se⁺, ⁸⁰Se⁺, ⁸²Se⁺, ¹¹⁰Cd⁺, ¹¹¹Cd⁺, ¹¹²Cd⁺, ¹¹⁴Cd⁺, ¹³⁷Ba⁺, ¹³⁸Ba⁺.

Tabela 4.2.3.2 Condições operacionais para as medidas por ICP-MS

Características	Parâmetros
Gerador de frequência (MHz)	40
Potência de radio-frequência (kW)	1,4
Fluxo do gás do plasma (L min ⁻¹)	18
Fluxo do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,8
Fluxo do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,44
Fluxo do “ <i>sheath gas</i> ” (L min ⁻¹)	0,17
Profundidade de amostragem (mm)	5,5
Pontos por pico	2
Varredura/replicata	5
Replicatas/amostra	5
Tempo de leitura (ms)	100
“ <i>Cone skimmer</i> ”	Ni com CRI
“ <i>Cone sampler</i> ”	Ni sem CRI
Nebulizador	Seaspray
Câmara de nebulização	Scott
Temperatura da câmara de nebulização	2°C
Processamento do sinal	“ <i>Peak Hopping</i> ”

4.2.4. Diluição com Água

Neste procedimento, pesou-se 1 g da amostra de mel e este foi diluído até 10 mL com água desmineralizada. Agitou-se durante 5 min. Dessa mistura extraiu-se 500 μL e ajustou-se para um volume final de 50 mL com HNO_3 1% (v v⁻¹), e o branco analítico foi feito da mesma maneira, porém, não houve a adição da amostra de mel. Todo o procedimento foi feito em triplicata para posterior análise em ICP-MS.

4.2.5. Digestão em bloco utilizando ácidos diluídos

Neste método, pesou-se 0,2 g da amostra de mel, adicionou-se 4 mL de HNO_3 nas seguintes concentrações: 2 mol L⁻¹, 3,8 mol L⁻¹, 8,0 mol L⁻¹, 12,2 mol L⁻¹ e 14 mol L⁻¹. Para cada concentração diferente foi preparado um branco e também uma triplicata da amostra. Após a adição de HNO_3 , a amostra passou por uma pré-digestão de 8h sob temperatura ambiente e com os frascos fechados. Deve ser observado que os frascos são apenas rosqueáveis, não havendo altas pressões internas. Em seguida, abriu-se os frascos, adicionou-se 1 mL de H_2O_2 (30% m m⁻¹) e a amostra passou por outra pré-digestão de 15h. Na sequência essa mistura foi aquecida em um bloco digestor a 90° C por 3h e ao final o volume de todas as amostras foi ajustado para 15 mL com água desmineralizada, esse método já havia sido utilizado por MOREIRA [64] no preparo de amostras de mexilhões. Todas as amostras preparadas segundo esse procedimento passaram por testes de acidez final e carbono residual.

4.2.6. Digestão Assistida por Radiação Micro-ondas com Cavidade empregando Ácidos Diluídos

Para otimização deste método de preparo da amostra foi construído um planejamento composto central modificado totalizando 13 experimentos,

onde os níveis avaliados foram a concentração de ácido nítrico (2 mol L^{-1} ; $3,8 \text{ mol L}^{-1}$; 8 mol L^{-1} ; $12,2 \text{ mol L}^{-1}$ e 14 mol L^{-1}) e a potência empregada no microondas durante a digestão (500 W , 573 W , 750 W , 927 W e 1000 W). Esse planejamento pode ser observado nas Tabelas 4.2.6.1 e 4.2.6.2.

Tabela 4.2.6.1 Planejamento composto central modificado com variáveis codificadas

Experimento	Potência (W)	Concentração Ácida (mol L^{-1})
1	+1	-1
2	+1	+1
3	-1	-1
4	-1	+1
5	0	-1,41
6	0	+1,41
7	-1,41	0
8	+1,41	0
9	0	0
10	+1,41	+1,41
11	+1,41	-1,41
12	-1,41	+1,41
13	-1,41	-1,41

Tabela 4.2.6.2 Planejamento composto central modificado

Experimento	Potência (W)	Concentração Ácida (mol L⁻¹)
1	927	3,8
2	927	12,2
3	573	3,8
4	573	12,2
5	750	2
6	750	14
7	500	8
8	1000	8
9	750	8
10	1000	14
11	1000	2
12	500	14
13	500	2

As respostas monitoradas e otimizadas foram: acidez final e carbono residual. Para interpretar essas duas respostas simultaneamente foi utilizado o método de otimização multiresposta e desejabilidade global de DERRINGER e SÜICH [65].

Neste método de preparo da amostra, foram adicionados 4 mL de HNO₃ nas diferentes concentrações e essa mistura foi pré-digerida por 15h. Em seguida, adicionou-se 1 mL de H₂O₂ 30% (m m⁻¹) e 3 mL de H₂O, totalizando os 8 mL necessários para se efetuar a digestão, para cada combinação diferente de concentração ácida e potência foi preparado um branco e também uma triplicata da amostra. O programa de aquecimento utilizado de decomposição da amostra consistia em uma etapa de rampa com 5 min e uma etapa de patamar com 10

min, ambas utilizando as potências propostas no planejamento e uma etapa de 10 min de refrigeração. O volume final da solução foi ajustado para 15 mL.

4.2.7. Análise da Acidez Final

Nessa análise foi retirada uma alíquota de 10 mL de cada uma das amostras digeridas tanto no bloco digestor como no micro-ondas e estas foram tituladas com NaOH ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$). Como indicador foi utilizado fenolftaleína.

4.2.8. Análise de Carbono Residual

A análise de carbono residual foi realizada em ICP OES [63]. As curvas de calibração foram construídas com biftalato de potássio nas seguintes concentrações de carbono: 0, 200, 400, 800, 1600, 2400 e 4000 (mg L^{-1}).

Para saber a porcentagem de carbono consumida no processo de oxidação da matéria orgânica a gás carbônico (CO_2) foi utilizada uma amostra de mel somente diluída em HNO_3 1% (v v^{-1}) até o volume de 15 mL, a concentração de carbono nessa amostra foi considerada como 100% de carbono.

As amostras digeridas em micro-ondas foram colocadas em um banho-maria à 100°C por 20 min para eliminação do CO_2 do meio. Esse procedimento também foi realizado para as amostras digeridas em bloco, porém, percebeu-se que não havia necessidade de eliminar o CO_2 destas.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Diluição com água

O ICP-MS utilizado para esta análise apresentava algumas limitações na introdução da amostra. Dentre estas limitações estão: a baixa

tolerância à quantidade de sólidos dissolvidos, que não deve ser superior a 2% e a acidez final da amostra analisada, a qual não deve ultrapassar 2%.

Para cumprir essas exigências foi necessário fazer uma diluição de 1000 vezes na amostra, e quando foi realizada a análise em ICP-MS, a concentração da maioria dos analitos de interesse ficou abaixo do limite de detecção (LOD), não sendo possível utilizar este método de preparo de amostra.

O procedimento de utilizar ultrassom não foi empregado, pois a diluição da amostra também seria de 1000 vezes e muito provavelmente os elementos de interesse também ficariam abaixo do limite de detecção, visto que estes elementos representam apenas 1% da massa do mel.

4.3.2. Digestão em Bloco Digestor Utilizando Ácidos Diluídos

A vantagem de se utilizar bloco digestor é a possibilidade de preparar 30 amostras simultaneamente e, além disso, este é um equipamento barato que pode ser utilizado na rotina em qualquer laboratório.

Mas quando a digestão foi feita em bloco não foi possível otimizar as duas respostas (acidez final e carbono residual) simultaneamente. Quando o carbono residual ficava baixo a acidez ficava muito alta, e vice-versa, como pode ser observado na Tabela 4.3.2.1. Isso provavelmente ocorria porque quanto maior a concentração do ácido, maior é o seu poder oxidante, assim, quando utilizou-se HNO_3 14 mol L^{-1} era mais fácil oxidar os carboidratos presentes no mel à gás carbônico (CO_2), reduzindo-se os teores de carbono residual e, provavelmente obtendo-se produtos com cadeias carbônicas menores, porém quando a concentração do ácido inicial é alta a acidez final tende a ser alta também. Desta forma, observou-se que este não seria o método mais adequado para uma análise em ICP-MS.

Tabela 4.3.2.1 Acidez final e carbono residual para a amostra de mel digerida em bloco, nas diferentes concentrações ácidas.

Concentração de HNO₃ inicial	Acidez (%)	Carbono residual (%)
14,0	28,7	40,0
12,2	25,7	40,7
8,00	16,8	50,9
3,76	7,78	58,8
2,00	4,79	83,1

4.3.3. Digestão Assistida por Radiação Micro-Ondas com Cavidade empregando Ácidos Diluídos

Quando a digestão foi feita em forno de micro-ondas foi possível obter as respostas de acidez final e carbono residual que estão contidos na Tabela 4.3.3.1, sendo que, as respostas de carbono residual foram feitas em triplicatas e para acidez final havia somente uma resposta para cada experimento.

A partir de observações experimentais e dos resultados encontrados na Tabela 4.3.3.1 percebeu-se que quando utilizou-se as potências de 500 W e 573 W as temperaturas atingidas no micro-ondas foram inferiores a 150 °C, que era a temperatura estabelecida como máxima, assim, como o programa de aquecimento era composto por apenas duas etapas que totalizavam 15 min., mesmo utilizando concentrações ácidas superiores não foi possível oxidar de maneira satisfatória a matéria orgânica presente nas amostras de mel, gerando resultados insatisfatórios para carbono residual, como também pode ser percebido na Figura 4.3.3.1.

Já quando utilizou-se potências de 750 W, 927 W e 1000 W foi possível atingir a temperatura de 150 °C em todas as digestões, propiciando um

ambiente favorável para ocorrer a oxidação da matéria orgânica, porém nos experimentos 1, 2, 8 e 9 não houve uma oxidação expressiva da matéria orgânica, gerando altos teores de carbono residual. Para os experimentos 5, 6, 10 e 11 foi possível perceber uma redução significativa dos valores de carbono residual, isso provavelmente ocorreu em função do emprego do HNO_3 14 mol L^{-1} , que oxidou os carboidratos presentes na matriz em função do elevado poder oxidante do ácido. Quando utilizou-se HNO_3 2 mol L^{-1} , havia no frasco digestor maior quantidade de moléculas de água, o que facilitou o aquecimento devido à sua alta capacidade calorífica, colaborando para que a temperatura interna destes frascos aumentasse rapidamente, o que auxiliou na decomposição mais eficiente do mel.

Tabela 4.3.3.1 Acidez final e carbono residual para a amostra de mel após digestão assistida por radiação micro-ondas.

Experimento	Potência (W)	Concentração Ácida (mol L^{-1})	Acidez (%)	Carbono residual (%)
				98,4
1	927	3,8	7,78	100
				101
				75,0
2	927	12,2	25,7	104
				95,7
				92,3
3	573	3,8	7,78	91,8
				91,2
				94,8
4	573	12,2	25,7	93,7
				91,3

Tabela 4.3.3.2 Continuação

Experimento	Potência (W)	Concentração Ácida (mol L⁻¹)	Acidez (%)	Carbono residual (%)
5	750	2	4,79	64,2
				61,8
				51,2
6	750	14	28,7	82,1
				78,2
				71,6
7	500	8	16,8	102
				84,5
				84,0
8	1000	8	16,8	77,3
				80,6
				81,9
9	750	8	16,8	71,5
				85,4
				85,5
10	1000	14	28,7	44,7
				47,6
				46,2
11	1000	2	4,79	49,1
				58,8
				60,4
12	500	14	28,7	92,8
				98,8
				84,4
13	500	2	4,79	96,7
				86,3
				102

Para otimizar simultaneamente as duas respostas foi necessário utilizar o método de otimização multirresposta e desejabilidade global de DERRINGER e SÜICH [64] sobre as equações preditivas obtidas por regressão linear múltipla. Para realizar o cálculo da desejabilidade global, as respostas (empíricas ou preditas pelas equações) foram normalizadas de modo que, a resposta mais desejável para acidez final, que era de 1% teria o valor atribuído de 1 e a resposta menos desejável que era 28% teria o valor atribuído de 0 e a resposta mais desejável para carbono residual, que era 0% teria o valor atribuído de 1 e a resposta menos desejável que era 100% teria o valor atribuído de 0. Após o cálculo da desejabilidade individual de cada uma das respostas calculou-se a desejabilidade global, que foi obtida através da média geométrica das desejabilidades individuais, como mostrado na equação 4.3.3.1.

$$D_{global} = \sqrt{d_{acidez} * d_{carbono}} \quad \text{Equação 4.3.3.1}$$

A partir dos valores de concentração do ácido e potência do micro-ondas foram calculados modelos por regressão linear múltipla para encontrar as equações preditivas para o valor de acidez final e do carbono residual. Foram construídas superfícies de resposta para cada uma delas, porém, para a construção destas superfícies utilizou-se somente a região positiva da variável potência, pois nesta área estavam inseridos os melhores resultados de carbono residual, como pode ser observado na Figura 4.3.3.1.

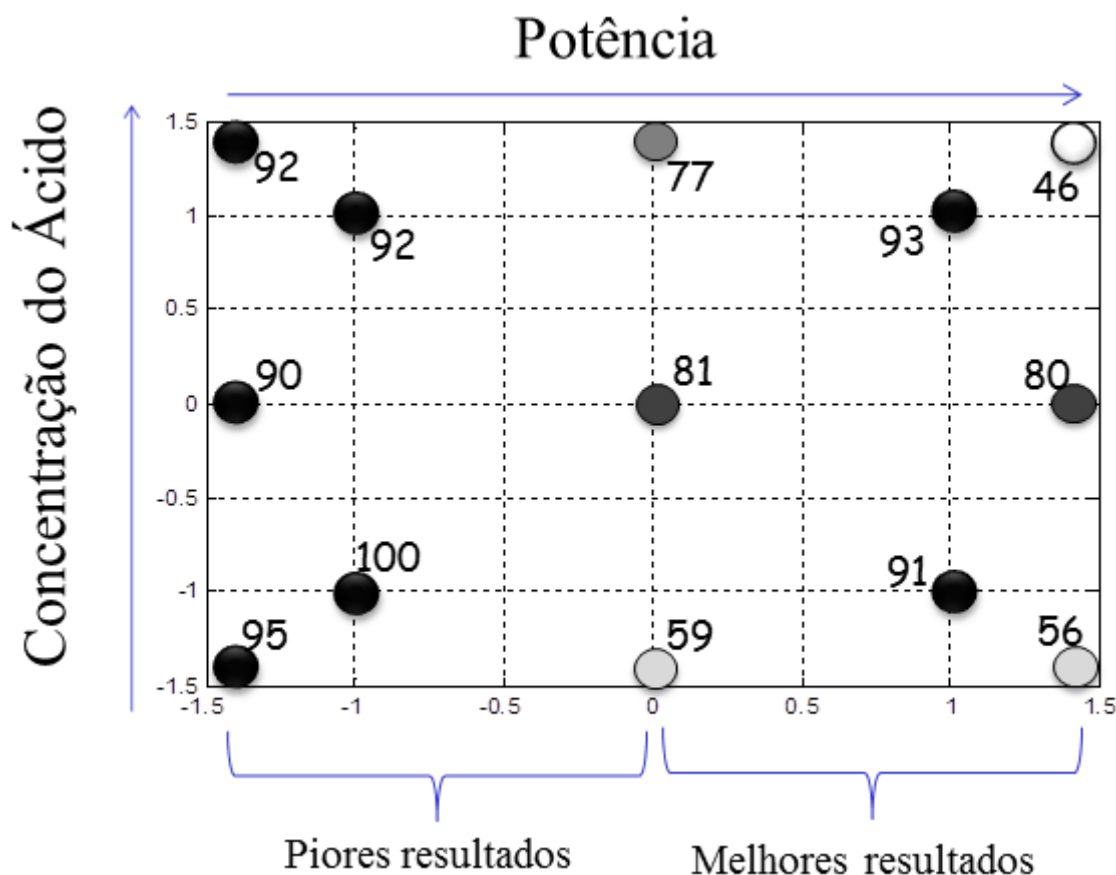


Figura 4.3.3.1 Melhores e piores resultados para carbono residual de acordo com as variáveis potência e concentração do ácido.

Selecionando-se apenas a região positiva da variável potência obteve-se a equação 4.3.3.2, referente à predição da acidez final em função dos parâmetros controlados (potência e concentração inicial do ácido). De acordo com a análise de variância (ANOVA) o r^2 obtido através dessa regressão foi 0,999 e o $F_{(1/11)}$ calculado para a média quadrática da regressão pela média quadrática dos resíduos foi de 18206, sendo ele maior que $F_{(1/11)}$ tabelado que é de 4,84, demonstrando assim, que a variância da regressão é maior do que a variância do resíduo. Para esse modelo não foi possível calcular a falta de ajuste e o erro puro, pois não havia replicata de nenhum experimento. Observando a equação 4.3.3.2 foi possível perceber que a acidez variava somente de acordo com a concentração inicial do ácido (x_2), isso porque, ao se calcular o intervalo

de confiança a 95% de probabilidade, verificou-se que era possível eliminar a variável potência (x_1) da regressão, pois o valor de b_1 encontrado não era significativo.

$$y = 16,76 + 8,61x_2 \quad \text{Equação 4.3.3.2}$$

($\pm 0,071$) ($\pm 0,064$)

A partir da equação de regressão construiu-se uma superfície de resposta para a desejabilidade individual da acidez, que pode ser observado na Figura 4.3.3.2. Através dessa superfície e da equação 4.3.3.2 foi possível perceber que quanto menor a concentração inicial do ácido melhores respostas para acidez final são observados, desta forma, a concentração de 2 mol L^{-1} seria a ideal em qualquer potência utilizada no micro-ondas.

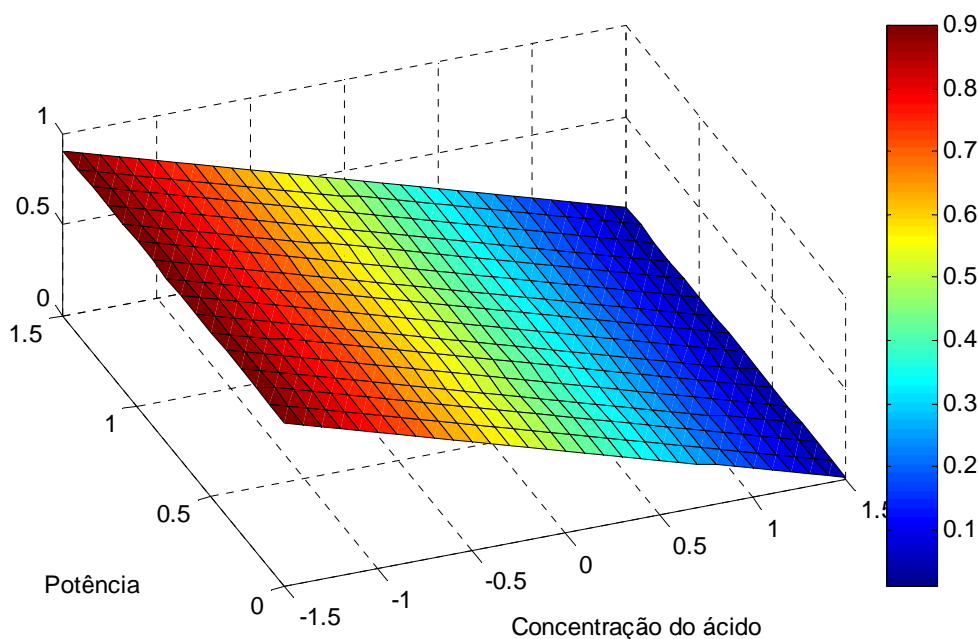


Figura 4.3.3.2 Gráfico da desejabilidade individual para acidez final

Novamente selecionando-se apenas a região positiva da variável potência foi obtida a equação 4.3.3.3 para predição do teor de carbono residual. De acordo com a análise de variância (ANOVA) o r^2 obtido através dessa regressão foi 0,85 e, o r^2 máximo explicável de 0,88, além disso, o $F_{(5/18)}$

calculado para a média quadrática da regressão pela média quadrática dos resíduos foi de 19,7, sendo ele 7 vezes maior que $F_{(5/18)}$ tabelado que é de 2,77, demonstrando assim, que a variância da regressão é maior do que a variância do resíduo e o $F_{(2/16)}$ calculado para a média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática do erro puro foi de 2,67, sendo ele menor que $F_{(2/16)}$ tabelado que é de 3,63, demonstrando assim, que a maior parte do resíduo deriva de erros aleatórios. Também foi possível perceber que o carbono residual variava de acordo com todos os parâmetros expressos pela equação, não sendo possível eliminar nenhum, chegou-se a essa conclusão ao se calcular o intervalo de confiança com 95% de probabilidade.

$$y = 86,20 + 76,23x_1 + 6,61x_2 - 59,73x_1^2 - 10,36x_2^2 - 6,86x_1x_2 \quad \text{Equação 4.3.3.3}$$

$(\pm 3,67)$ $(\pm 12,71)$ $(\pm 2,21)$ $(\pm 9,17)$ $(\pm 1,94)$ $(\pm 2,21)$

A partir desta equação, foi obtida a superfície de resposta para a desejabilidade individual do carbono residual. Neste caso, as respostas foram normalizadas como 0% de carbono sendo atribuído o valor de 1, e 111% sendo atribuído valor de zero, isso porque os valores previstos pela equação podem chegar a 100% devido a pequena falta de ajuste do modelo matemático. Através dessa superfície e da equação 4.3.3.3 foi possível perceber que a combinação dos níveis 750 W de potência e 8 mol L⁻¹ da concentração inicial do ácido e dos níveis 1000 W de potência e 14 mol L⁻¹ da concentração inicial do ácido foram os que apresentaram os menores teores de carbono residual.

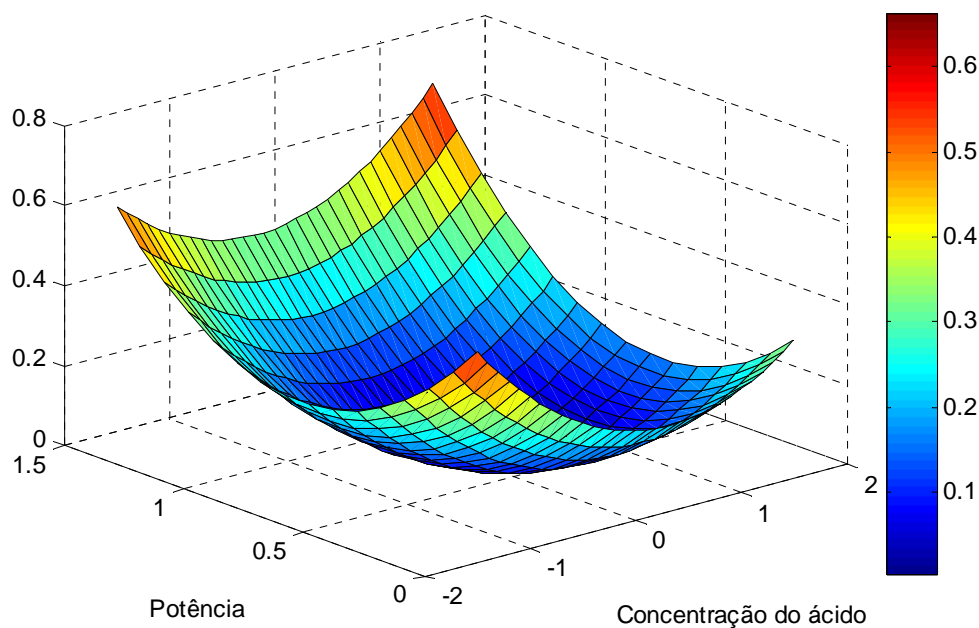


Figura 4.3.3.3 Gráfico da desejabilidade individual para carbono residual

Para a desejabilidade global, selecionando também somente a região positiva da variável potência construiu-se uma superfície de resposta, que pode ser observada na Figura 4.3.3.4. Através dessa superfície foi possível perceber que a combinação dos níveis 1000 W de potência e 14 mol L⁻¹ da concentração inicial do ácido foi a que apresentou o menor teor de carbono residual, porém altíssima acidez, não sendo apropriado para a análise proposta, já os níveis 750 W de potência e 2 mol L⁻¹ da concentração inicial do ácido e 1000 W de potência e 2 mol L⁻¹ da concentração inicial do ácido forneceram as melhores respostas combinadas para carbono residual e acidez final. Desta forma, selecionou-se a combinação de níveis 1000 W de potência e 2 mol L⁻¹ da concentração inicial do ácido para aplicar a todas as demais amostras de mel. Porém o carbono residual ainda estava alto utilizando a diluição final para 15 mL, desta forma, optou-se diluir as amostras para 20 mL.

Desta forma, este experimento pode ser considerado otimizado, visto que, a potência máxima que poderia ser utilizada no micro-ondas era de

1000W e também que ao utilizar um ácido ainda mais diluído provavelmente ele não seria capaz de oxidar a matéria orgânica presente no mel.

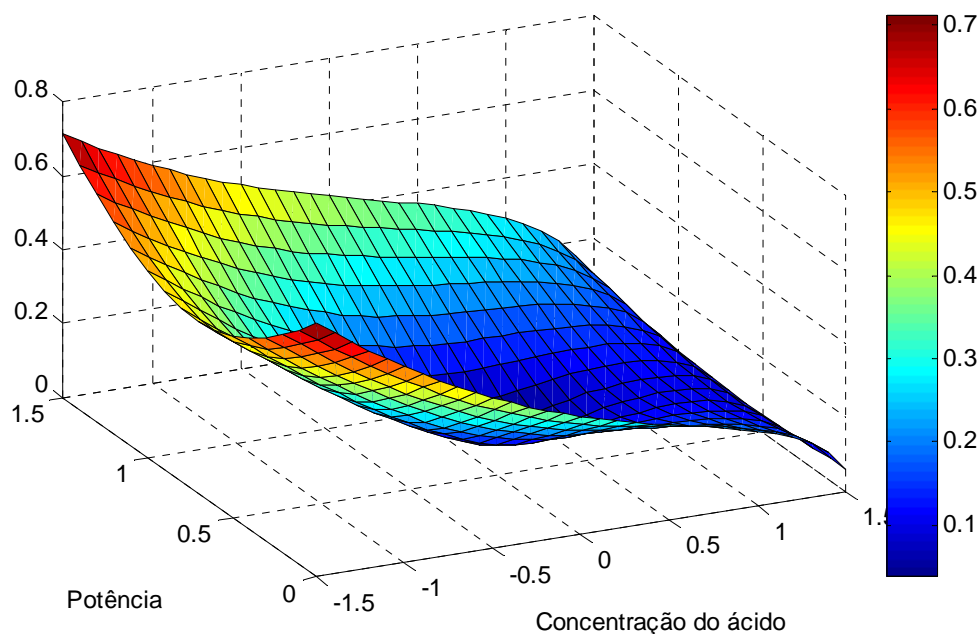


Figura 4.3.3.4 Gráfico da desejabilidade global

4.4. Conclusões Parciais

Para o método de diluição com água a amostra teve que ser diluída 1000 vezes. Com isso, quando foi realizada a análise em ICP-MS, a concentração da maioria dos analitos de interesse ficou abaixo do limite de detecção (LOD), não sendo este tipo de preparo de amostra adequado para a proposta deste trabalho.

Quando a digestão foi feita em bloco não foi possível otimizar as duas respostas (acidez final e carbono residual) simultaneamente, quando o carbono residual ficava baixo a acidez ficava muito alta, e vice-versa.

Quando foi utilizado como fonte de aquecimento o forno de micro-ondas, foi possível construir uma superfície de resposta para desejabilidade

global onde percebeu-se que a combinação dos níveis 1000 W de potência e 14 mol L⁻¹ da concentração inicial do ácido foi a que apresentou o menor teor de carbono residual, porém altíssima acidez, não sendo apropriado para a análise proposta. Já os níveis 750 W de potência e 2 mol L⁻¹ da concentração inicial do ácido e 1000 W de potência e 2 mol L⁻¹ da concentração inicial do ácido forneceram as melhores respostas combinadas para carbono residual e acidez final. Desta forma, selecionou-se a combinação de níveis 1000 W de potência e 2 mol L⁻¹ da concentração inicial do ácido para aplicar a todas as demais amostras de mel. Como diluição final, utilizou-se 20 mL para 0,2 g de amostra original.

Capítulo 5

**“Determinação de minerais e elementos traço em
méis por ICP-MS e análise quimiométrica dos
resultados.”**

5. Determinação de minerais e elementos traço em méis por ICP-MS e análise quimiométrica dos resultados

5.1. Objetivos Específicos

Avaliar os teores de minerais e elementos traço em amostras de mel provenientes de diferentes regiões brasileiras e correlacionar os dados analíticos com as regiões de origem através de quimiometria.

5.2. Materiais e Métodos

5.2.1. Amostras

Para este estudo, foram utilizadas 60 amostras de méis de diferentes estados brasileiros, entre eles, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Pará, Mato Grosso do Sul e Roraima, além de amostras de outros países, entre eles, Espanha, Áustria, Itália e Hungria. Na Tabela 5.2.1.1 é possível encontrar os municípios e as regiões de origem das amostras e também a sua origem floral.

Tabela 5.2.1.1 Origem geográfica e botânica das amostras de mel analisadas

Cidade	Estado	Região	Flora
Corumbá	Mato Grosso do Sul	Centro-Oeste	Nativa
Corumbá	Mato Grosso do Sul	Centro-Oeste	Nativa
Corumbá	Mato Grosso do Sul	Centro-Oeste	Nativa
Itaberaba	Bahia	Nordeste	Nativa
Aracaju	Sergipe	Nordeste	Nativa
Barra do Choça	Bahia	Nordeste	Nativa

Tabela 5.2.1.1 (continuação)

Cidade	Estado	Região	Flora
Jaguaquara	Bahia	Nordeste	Nativa
Tracuateua	Pará	Norte	Nativa
Tracuateua	Pará	Norte	Nativa
Tracuateua	Pará	Norte	Nativa
Pacaraima	Roraima	Norte	Nativa
Roraima	Roraima	Norte	Nativa
Boa Vista	Roraima	Norte	Nativa
Cantá	Roraima	Norte	Nativa
Cantá	Roraima	Norte	Nativa
Cantá	Roraima	Norte	Nativa
Caracaraí	Roraima	Norte	Nativa
São Paulo	São Paulo	Sudeste	Nativa
São Paulo	São Paulo	Sudeste	Nativa
São Paulo	São Paulo	Sudeste	Nativa
USP	São Paulo	Sudeste	Flor do Campo
Carvalhopólis	Minas Gerais	Sudeste	Floresta
Uberlândia	Minas Gerais	Sudeste	Laranjeira
São Carlos	São Paulo	Sudeste	Laranjeira
Cotia	São Paulo	Sudeste	Nativa
Descalvado	São Paulo	Sudeste	Nativa
Campos do Jordão	São Paulo	Sudeste	Nativa
São Carlos	São Paulo	Sudeste	Nativa
Carvalhopólis	Minas Gerais	Sudeste	Nativa
Águas de São Pedro	São Paulo	Sudeste	Nativa
Mogi das Cruzes	São Paulo	Sudeste	Nativa
Ponta Grossa	Paraná	Sul	Eucalipto
Gravatal	Santa Catarina	Sul	Eucalipto

Tabela 5.2.1.1 (continuação)

Cidade	Estado	Região	Flora
Taquara	Rio Grande do Sul	Sul	Eucalipto
Santana do Itararé	Paraná	Sul	Laranjeira
Taquara	Rio Grande do Sul	Sul	Laranjeira
Rolândia	Paraná	Sul	Mata
Cerro Azul	Paraná	Sul	Nativa
Maringá	Paraná	Sul	Nativa
Irati	Paraná	Sul	Nativa
Castro	Paraná	Sul	Nativa
Ortigueira	Paraná	Sul	Nativa
Vera Cruz do Oeste	Paraná	Sul	Nativa
Rio Azul	Paraná	Sul	Nativa
Taquara	Rio Grande do Sul	Sul	Nativa
Prudentópolis	Paraná	Sul	Nativa
União da Vitória	Paraná	Sul	Nativa
Guarapuava	Paraná	Sul	Nativa
Guarapuava	Paraná	Sul	Nativa
Itaiacoca	Paraná	Sul	Nativa
Ibaiti	Paraná	Sul	Nativa
Bracatinga	Paraná	Sul	Nativa
Curitiba	Paraná	Sul	Nativa
Curitiba	Paraná	Sul	Nativa
Áustria		Exterior	Nativa
Espanha		Exterior	Nativa
Espanha		Exterior	Nativa
Itália		Exterior	Nativa

Tabela 5.2.1.1 (continuação)

Cidade	Estado	Região	Flora
Itália		Exterior	Nativa
Hungria		Exterior	Nativa

Neste estudo, também foram utilizados dois materiais de referência certificados para avaliar a exatidão do método proposto. Os materiais selecionados foram o Tomato Leaves – NIST 1573a, utilizado para avaliar a recuperação do elemento cromo e o Peach Leaves - NIST 1547 para avaliar as recuperações dos demais elementos. Foram utilizados estes dois materiais de referência por não existir outro material mais adequado que fosse certificado para as espécies inorgânicas de interesse, como por exemplo, um material de mel ou de glicose.

5.2.2. Reagentes e Soluções

As soluções para a determinação dos elementos: Mg, Al, P, K, Ca, V, Cr, Fe, Mn, Cu, Zn, As, Se, Cd e Ba em ICP-MS, foram preparadas a partir de soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ (TecLab, Jundiaí, Brasil) de cada um destes analitos, e as diluições foram feitas com água destilada-deionizada para as seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 20; 40; 80 e 160 µg L⁻¹.

Também foram utilizadas as soluções de padrão interno Sc, Y e Bi (1000 mg L⁻¹, Fluka, EUA) que foram adicionadas em todas as amostras analisadas, nas curvas de calibração e nos brancos analíticos na mesma concentração (10 µg L⁻¹).

5.2.3. Equipamentos e Acessórios

Nesta parte do trabalho foi utilizado o espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado, ICP-MS 820-MS (Varian, Mulgrave, Austrália). Na Tabela 4.2.3.2 encontram-se os parâmetros instrumentais utilizados no ICP-MS para a análise inorgânica de mel e os isótopos monitorados foram: $^{24}\text{Mg}^+$, $^{26}\text{Mg}^+$, $^{27}\text{Al}^+$, $^{31}\text{P}^+$, $^{39}\text{K}^+$, $^{40}\text{Ca}^+$, $^{42}\text{Ca}^+$, $^{44}\text{Ca}^+$, $^{51}\text{V}^+$, $^{52}\text{Cr}^+$, $^{53}\text{Cr}^+$, $^{54}\text{Fe}^+$, $^{55}\text{Mn}^+$, $^{56}\text{Fe}^+$, $^{63}\text{Cu}^+$, $^{64}\text{Zn}^+$, $^{65}\text{Cu}^+$, $^{66}\text{Zn}^+$, $^{68}\text{Zn}^+$, $^{75}\text{As}^+$, $^{76}\text{Se}^+$, $^{77}\text{Se}^+$, $^{78}\text{Se}^+$, $^{80}\text{Se}^+$, $^{82}\text{Se}^+$, $^{110}\text{Cd}^+$, $^{111}\text{Cd}^+$, $^{112}\text{Cd}^+$, $^{114}\text{Cd}^+$, $^{137}\text{Ba}^+$, $^{138}\text{Ba}^+$. Neste caso também foram monitorados os isótopos dos seguintes padrões internos: $^{45}\text{Sc}^+$, $^{89}\text{Y}^+$ e $^{209}\text{Bi}^+$.

5.2.4. Métodos

O método quimiométrico utilizado nesta parte do trabalho foi a Análise de Componentes Principais (PCA), que foi realizada com o auxílio do Software Pirouette (Infometrix, versão 4.0, USA), e adotou-se como pré-processamento dos dados o auto-escalamento. Todos os dados foram analisados visualmente das PC's 1 até a 5.

5.3. Resultados e Discussão

Escolheu-se como técnica analítica a espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS), pois esta é uma técnica multielementar e devido a sua sensibilidade possibilita a análise de alguns elementos como Se, Al, P, Cu, Ba, Pb, V, Cr, Cd e As, que utilizando outras técnicas, também multielementares, como ICP OES os valores ficaram abaixo do limite de detecção[25], e também, porque seria necessário a maior quantidade de informações químicas possível, visto que o intuito deste trabalho é utilizar essas informações em uma análise quimiométrica.

Antes de efetuar as análises nas 60 amostras de mel, foram avaliadas em ICP-MS a necessidade ou não de se utilizar a interface de reação e colisão CRI, artefato instrumental que evitaria interferências isobáricas poliatômicas. Foram avaliados o emprego da adição de H₂ (60 mL min⁻¹) e de He (80 mL min⁻¹) [66], através da análise de materiais de referência certificados. Além disso, verificou-se a necessidade de se utilizar padrão interno nas medidas e também a linearidade das curvas de calibração (r^2).

Optou-se por utilizar dois materiais de referência certificados de plantas. Essa estratégia foi adotada porque não há materiais de referência de mel e no artigo de revisão de POHL [14] é descrito que a grande maioria dos trabalhos que faz determinação de constituintes inorgânicos em mel utiliza materiais de planta para certificar as análises. Essa estratégia também foi adotada em artigo recente de CHUDZINKA *et al.* [67], quando foram comparadas a utilização de matérias de referência de plantas e testes de adição e recuperação e obtidos resultados de recuperação considerados satisfatórios em ambos os métodos para os 13 elementos analisados.

Além de avaliar a porcentagem de recuperação dos materiais de referência, também realizou-se o teste *t* para saber se os valores obtidos poderiam ser considerados semelhantes ou diferentes dos valores certificados. Para realizar esse teste foi utilizada a equação 5.3.1. Foram efetuadas 3 replicatas o t_{tab} (2) utilizado foi, 4,30. Valores menores que o *t* tabelado significam que o valor obtido é semelhante e valores superiores ao *t* tabelado indicam que o resultado é diferente.

$$t_{\text{cal}} = \frac{\text{Valor medido} \times \text{Valor certificado}}{\text{desvio padrão das medidas} \cdot \sqrt{\text{número de réplicas}}} \quad \text{Equação 5.3.1}$$

A estratégia de utilizar o padrão interno deve-se ao fato de que na tese de BIANCHI [66] determinou-se 7 elementos em solo em um equipamento

de ICP-MS do mesmo modelo que o utilizado neste trabalho, e para isso foi utilizado como estratégia de calibração interna a utilização de diferentes padrões internos. Além disso, HERRERO e PEÑA [24] só conseguiram determinar $^{111}\text{Cd}^+$ e $^{208}\text{Pb}^+$ em mel por ICP-MS quando utilizaram $^{115}\text{In}^+$ como padrão interno.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados segundo a recomendação de THOMSEN *et al.* [68], que incorporaram os sinais da concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC) e os desvios relativos (RSD) no cálculo dos limites de detecção e quantificação. Assim, a equação 5.3.2 indicam como os LODs e LOQs foram calculados. Onde C_{rs} é a concentração da solução de referência (em $\mu\text{g L}^{-1}$), I_{sr} e I_{branco} são as intensidades de sinal para a solução de referência e da solução do branco, respectivamente. O RSD foi calculado a partir de 10 determinações da solução do branco analítico.

$$BEC = \frac{C_{sr}}{SBR} \quad SBR = \frac{I_{sr} - I_{branco}}{I_{branco}} \quad LOD = \frac{3 \times BEC \times R.S.D.}{100}$$

$$LOQ = \frac{10 \times BEC \times R.S.D.}{100} \quad \text{Equação 5.3.2}$$

Desta forma, os resultados de recuperação, do teste t , as melhores condições obtidas em ICP-MS, a linearidade das curvas de calibração e os limites de detecção e quantificação estão descritos nas Tabelas 5.3.1 e 5.3.2. O sinal do $^{39}\text{K}^+$ foi muito alto e desta forma não foi possível determinar esse elemento em ICP-MS.

Tabela 5.3.1 Melhores condições obtidas em ICP-MS para determinação de Se, Mg, Ca, V, As, Al, P, Mn, Fe, Cr e Cd.

ICP-MS	⁷⁷ Se ⁺	²⁶ Mg ⁺	⁴³ Ca ⁺	⁵¹ V ⁺	⁷⁵ As ⁺	²⁷ Al ⁺	³¹ P ⁺	⁵⁵ Mn ⁺	⁵⁶ Fe ⁺	⁵³ Cr ⁺
Recuperação (%)	93	112	99	110	95	101	92	105	100	115
t_{cal}	3,68	3,67	0,187	1,34	2,90	0,278	2,33	3,80	0,997	1,94
CRI	sem CRI	H ₂	H ₂	H ₂	H ₂	H ₂	H ₂	H ₂	H ₂	H ₂
Padrão Interno	⁸⁹ Y ⁺	sem padrão	sem padrão	sem padrão	sem padrão	⁴⁵ Sc ⁺	⁴⁵ Sc ⁺	⁴⁵ Sc ⁺	⁴⁵ Sc ⁺	⁴⁵ Sc ⁺
r²	0,998	0,993	0,951	0,994	0,998	0,998	0,987	0,999	0,999	0,996
LOD (µg L⁻¹)	0,498	2,46	28,1	0,0607	0,0867	3,92	0,854	0,0810	9,61	2,20
LOQ (µg L⁻¹)	1,66	8,19	93,6	0,203	0,289	13,1	2,85	0,270	32,0	7,35

(t_{cal} – t calculado para n=3 com 95% de confiança; CRI – interface de reação e colisão; LOD – Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação)

Tabela 5.3.2 Melhores condições obtidas em ICP-MS para determinação de Cu, Zn, Cd, Ba e Pb.

ICP-MS	⁶³ Cu ⁺	⁶⁵ Cu ⁺	⁶⁸ Zn ⁺	¹¹⁰ Cd ⁺	¹³⁸ Ba ⁺	²⁰⁶ Pb ⁺	²⁰⁷ Pb ⁺
Recuperação(%)	94	97	101	89	95	82	86
t_{cal}	1,17	1,06	0,280	4,73	3,67	5,01	6,51
CRI	He	He	He	He	He	He	He
Padrão Interno	sem padrão	sem padrão	sem padrão	sem padrão	⁴⁵ Sc ⁺	²⁰⁹ Bi ⁺	²⁰⁹ Bi ⁺
r²	0,997	0,997	0,999	0,999	0,998	1,00	1,00
LOD (µg L⁻¹)	0,142	0,098	1,72	0,131	0,501	0,0920	0,132
LOQ (µg L⁻¹)	0,469	0,326	5,73	0,442	1,67	0,301	0,440

(t_{cal} – t calculado para n=3 com 95% de confiança; CRI – interface de reação e colisão; LOD – Limite de detecção; LOQ – Limite de quantificação)

De acordo com as Tabelas 5.3.1 e 5.3.2 é possível observar que as recuperações obtidas nas melhores condições do equipamento variaram de 82% para $^{206}\text{Pb}^+$ à 115% para $^{53}\text{Cr}^+$. Essas recuperações podem ser consideradas adequadas de acordo com TAVERNIERS *et al.* [69], com exceção de $^{26}\text{Mg}^+$ (112%) e $^{53}\text{Cr}^+$ (115%), pois neste trabalho os autores indicam que concentrações da ordem de 1 mg L^{-1} permitem que sejam aceitas recuperações que variem de 80-110%.

Desta forma, optou-se por realizar o teste t destes resultados para saber se os valores encontrados eram semelhantes aos certificados ou diferentes, e através deste teste, percebeu-se que os valores de recuperação obtidos para $^{26}\text{Mg}^+$ e $^{53}\text{Cr}^+$ poderiam ser considerados semelhantes, visto que seus resultados ficaram abaixo de 4,30 que é o valor de t_{tab} . Porém, de acordo com esse teste, valores obtidos para $^{110}\text{Cd}^+$, $^{206}\text{Pb}^+$ e $^{207}\text{Pb}^+$ ficaram acima do valor de t_{tab} , sendo considerados diferentes, mas suas recuperações estavam dentro de uma faixa aceitável, de acordo com TAVERNIERS *et al.* [69] e foram realizadas análises das amostras de mel em todos os isótopos descritos nas Tabelas 5.3.1 e 5.3.2.

Como resultados das amostras, foi possível observar que em todos os méis analisados os teores de $^{51}\text{V}^+$, $^{53}\text{Cr}^+$, $^{75}\text{As}^+$ e $^{110}\text{Cd}^+$ ficaram abaixo do limite de detecção do equipamento. Assim, na Tabela 5.3.3 podem ser observados a faixa dos teores determinados neste trabalho e no apêndice 1 estão os resultados de todas as amostras analisadas e seus respectivos desvios padrão.

Tabela 5.3.3 Espécies inorgânicas em amostras de méis ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

Regiões	Centro-Oeste	Norte	Nordeste	Sul	Sudeste	Outros Países
Nº de amostras	3	10	4	23	14	6
Se	<LOD – 19,2	5,89 – 109	41,7 – 79,9	<LOD – 49,6	<LOD – 50,81	5,35 – 98,1
Mg	10183 – 35376	9838 – 90140	20156 – 48773	6728 – 295755	8641 – 162474	15561 – 38737
Al	479 – 15752	174 – 14888	320 – 941	195 – 8281	562 – 8413	1567 – 8685
P	16130 – 85972	11456 – 233410	78054 – 220574	4088 – 251635	<LOD – 306316	1528 – 159671
Ca	22520 – 48742	32480 – 1132271	60692 – 78657	13876 – 310649	22596 – 210672	74323 – 146984
Mn	573 – 6582	429 – 2853	431 – 1053	200 – 12672	653 – 10745	167 – 3451
Fe	<LOD – 1032	73,9 – 3122	194 – 1527	<LOD – 12744	234 – 5728	1323 – 2390
Cu	115 – 229	88,3 – 950	203 – 3533	<LOD – 2302	16,0 – 1893	105 – 635
Zn	688 – 2233	563 – 3353	556 – 1708	231 – 2420	344 – 8087	1749 – 2504
Ba	<LOD – 163	<LOD – 937,08	<LOD – 143	<LOD – 2538	<LOD – 910	<LOD – 394
Pb	<LOD	<LOD – 39,81	<LOD – 7,79	<LOD	<LOD – 7,68	<LOD – 2,35

Quando comparamos os valores obtidos para K, Ca, Mg, Mn, Zn e Fe neste trabalho com os valores previamente determinados por MENDES *et al.* [25] é possível perceber que estes são bastante similares. Da mesma forma, os valores encontrados para Al e Pb são semelhantes aos valores que já foram determinados e estão descritos na literatura [14].

Levando-se em conta as normas da *Codex Alimentarius* [70], da Instrução Normativa N° 11 [15] e do Mercosul GMC 89/99 [71], é possível perceber que a partir do valor estabelecido como máximo permitido de cobre em mel, que é de 10 mg kg^{-1} , todos os méis determinados neste trabalho encontram-se abaixo deste valor. Não há regulamentos para outros elementos que foram aqui avaliados, porém o máximo permitido de chumbo em outros alimentos (como por exemplo: balas, cacau, dextrose - glucose e peixes) é de 2 mg kg^{-1} , e desta forma, todos os méis analisados encontram-se abaixo deste valor, não havendo evidências de contaminações inorgânicas nas amostras analisadas para estes dois elementos.

Para o estudo quimiométrico foram utilizados os valores obtidos para as 60 amostras analisadas em triplicata, o que gerou uma matriz de 180 linhas por 12 colunas e realizou-se uma PCA dos dados, para isso, foi efetuado como pré-processamento o auto-escalamento. Nas Figuras 5.3.1 e 5.3.3 podem ser observados os gráficos de escores, das amostras de diferentes regiões, da PC1 vs. PC2 e PC1 vs. PC3, respectivamente. Nas Figuras 5.3.2 e 5.3.4 podem ser observados os gráficos de loadings, dos diferentes elementos determinados, da PC1 vs. PC2 e na PC1 vs. PC3, respectivamente.

Desta forma, quando a separação foi feita utilizando-se a PC1 vs. a PC2 foi possível separar pequenos grupos da região Norte, região Sudeste, região Sul e região Nordeste e quando a separação foi feita utilizando-se a PC2 vs. a PC3 foi possível separar pequenos grupos da região Nordeste com a região Norte, da região Sudeste, das amostras do exterior e dois grupos das amostras do

Sul, mesmo havendo uma separação destes grupos, foi possível perceber que alguns destes encontram-se sobrepostos a outros grupos.

Além disso, o gráfico de loadings das Figuras 5.3.2 e 5.3.4 permitem agrupar as amostras de acordo com os elementos presentes nas mesmas. Assim, é possível perceber que as amostras pertencentes a região Norte e Nordeste são caracterizadas pela presença dos elementos Pb, já as amostras pertencentes a região Sudeste e Sul são caracterizadas pela presença dos elementos Cu, Zn, Mn, Mg e Ca, isso de acordo com a PC1 vs. a PC2. Quando utilizamos as amostras da PC1 vs. a PC3 é possível perceber que as amostras pertencentes a região Sudeste são caracterizadas pela presença dos elementos P e Se, já as amostras do Sul pela presença dos elementos Mn, Ba, e Mg, as amostras do exterior, são caracterizadas pela presença de Pb e Al e os grupos da região positiva da PC3 e negativa da PC1, que contém os grupos das amostras do Sul, Nordeste e Norte não tem nenhum elementos que os caracteriza.

Desta forma, é possível concluir que mesmo utilizando componentes principais diferentes algumas regiões foram discriminadas por elementos semelhantes, como por exemplo, a região Sul que em ambas as PC's analisadas foram discriminadas pela presença dos elementos Mn e Mg.

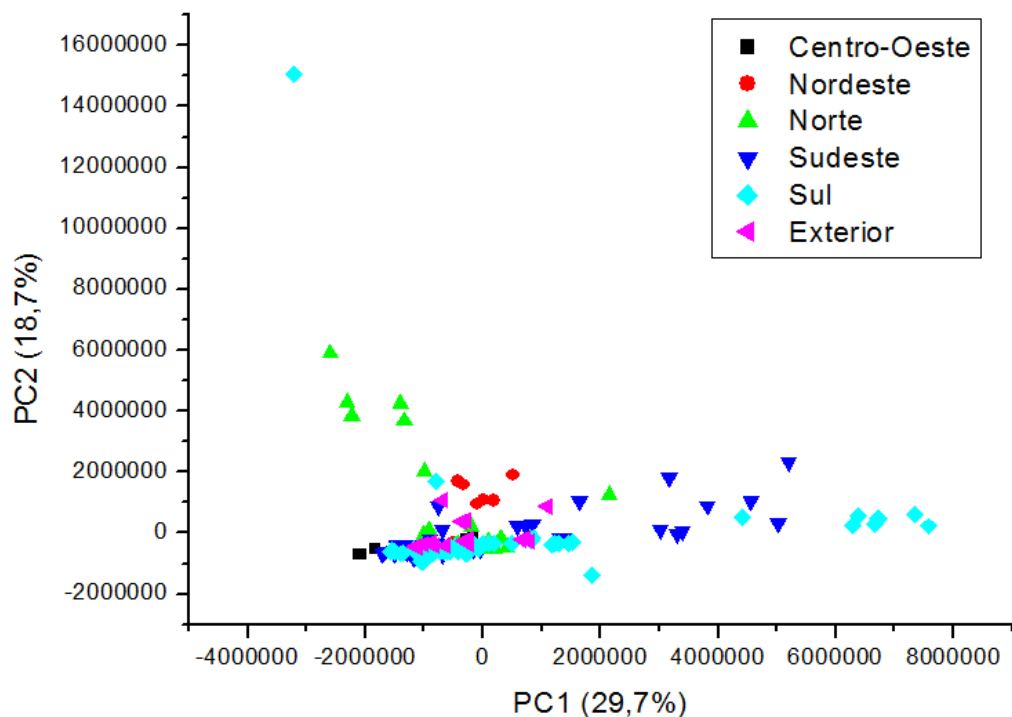


Figura 5.3.1 Gráfico de escores da PC1 vs. PC2 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países.

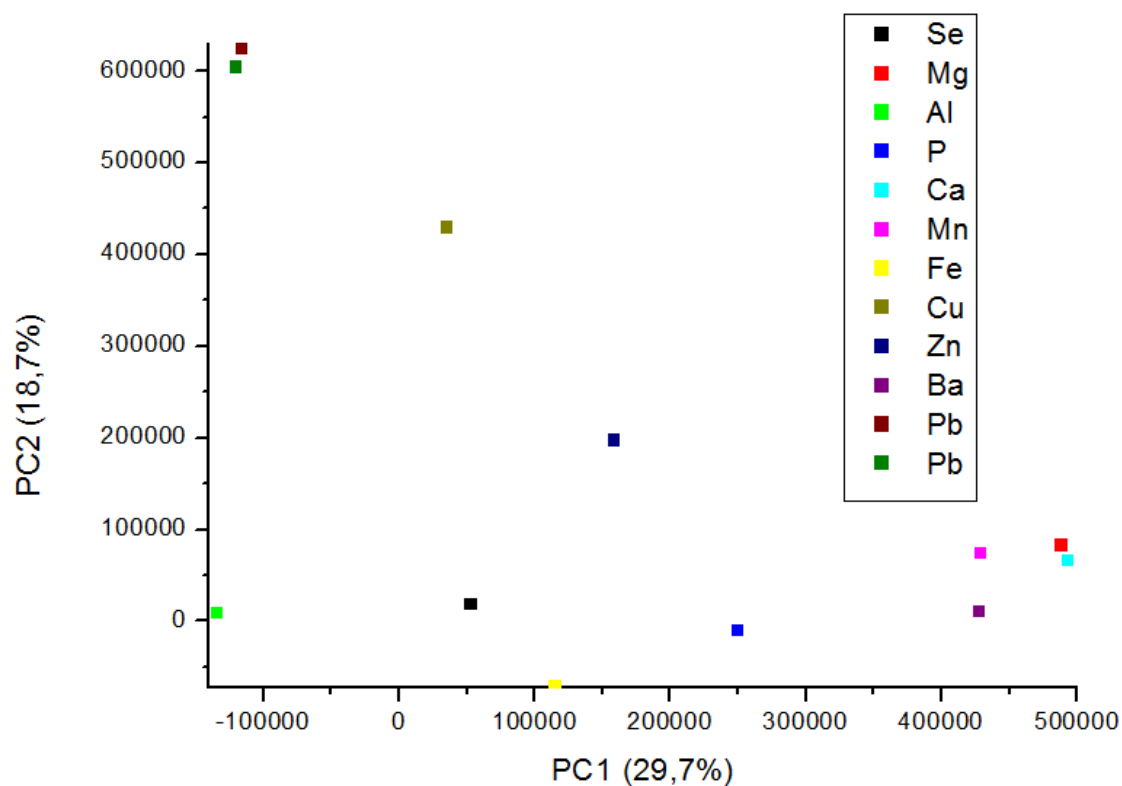


Figura 5.3.2 Gráfico de loadings da PC1 vs. PC2 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países.

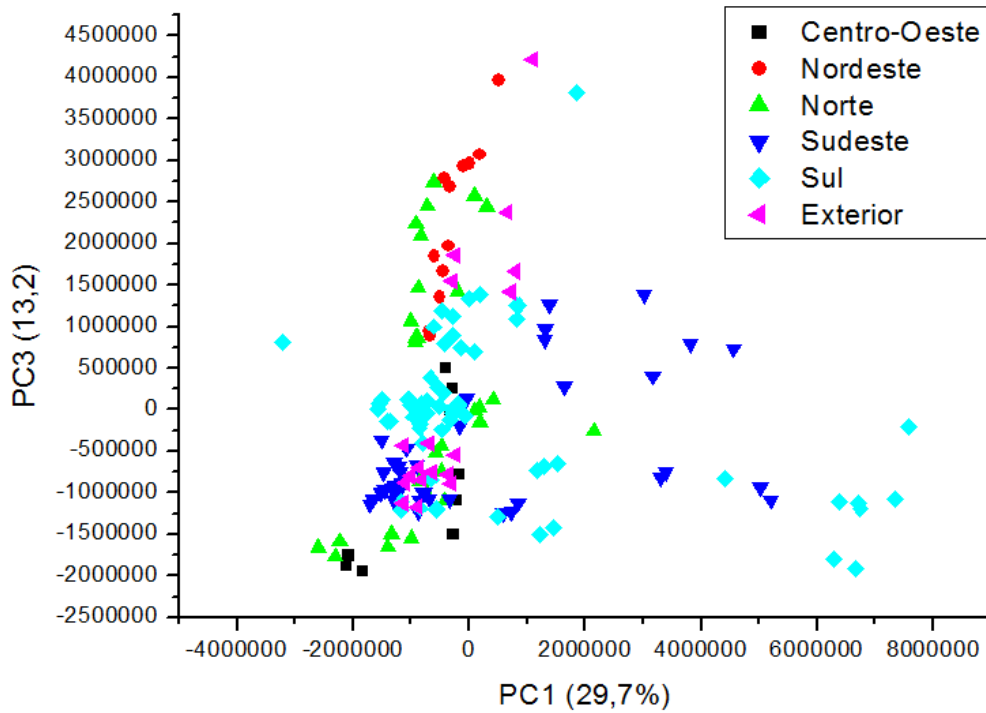


Figura 5.3.3 Gráfico de escores da PC1 vs. PC3 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países.

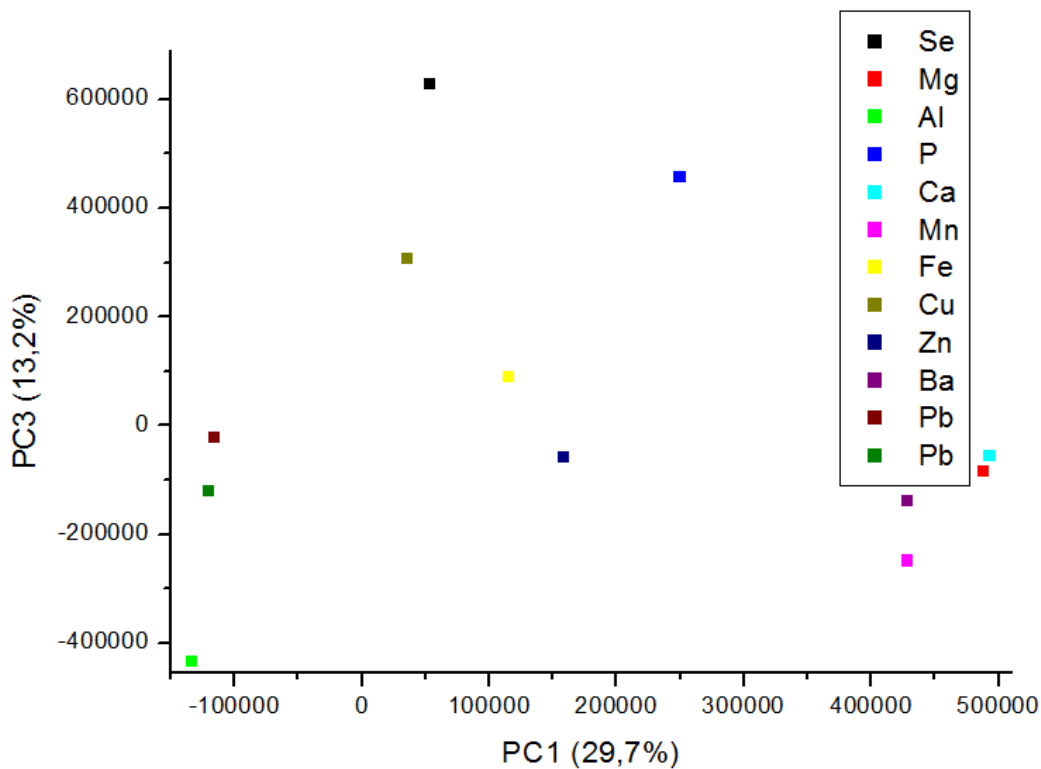


Figura 5.3.4 Gráfico de loadings da PC1 vs. PC3 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países.

Para prosseguir no estudo quimiométrico excluíram-se alguns valores, entre eles, os das amostras 1, 2, 3, 10, 11, 16, 17, 18, 40, 41, 42, 46, 62, 67, 68, 69, 79, 80, 81, 87, 89, 90, 91, 92, 93, 128, 130, 157, 158, 159, 170, 171, 174, 178, 179 e 180, referentes às amostras que se encontravam mais separadas na Figura 5.3.1, para que fosse possível avaliar a separação das amostras centrais que estavam aglomeradas, o que gerou uma matriz de 144 linhas por 12 colunas e realizou-se uma PCA dos dados. Para isso, foi efetuado como pré-processamento o auto-escalamento.

Nas Figuras 5.3.5, 5.3.7 e 5.3.9 podem ser observados os gráficos de escores das amostras de diferentes regiões e nas Figuras 5.3.6, 5.3.8 e 5.3.10 podem ser observados os gráficos de loadings dos diferentes elementos determinados.

Nas Figuras 5.3.5, 5.3.7 e 5.3.9 é possível perceber alguns agrupamentos. Desta forma, quando a separação foi feita utilizando-se a PC1 vs. a PC2 foi possível separar pequenos grupos da região Norte, região Nordeste, região Sudeste e do exterior, além de 2 grupos da região Sul e quando a separação foi feita utilizando-se a PC2 vs. a PC3 foi possível separar pequenos grupos da região Centro-Oeste, da região Sul e das amostras do exterior. Além disso, quando a separação foi feita utilizando-se a PC2 vs. a PC4 foi possível separar pequenos grupos da região Centro-Oeste, da região Sul, da região Nordeste, da região Norte e das amostras do exterior.

Utilizando o gráfico de loadings das Figuras 5.3.6, 5.3.8 e 5.3.10 é possível agrupar as amostras de acordo com os elementos presentes nas mesmas. Assim, de acordo com a PC1 vs. a PC2 é possível perceber que as amostras pertencentes à região Norte, Nordeste e Sul são caracterizadas pela presença dos elementos Pb, Se e P. Já as amostras pertencentes à região Sudeste não são caracterizadas por nenhum elemento específico e as amostras do exterior são caracterizadas pela presença dos elementos Pb, Mn, Zn e Ca. Quando utilizamos

as amostras da PC2 vs. a PC3 é possível perceber que as amostras pertencentes à região Centro-Oeste são caracterizadas pela presença dos elementos Al e Pb, já as amostras do Sul pela presença dos elementos Fe, P, Ca, Pb e Se, as amostras do exterior, são caracterizadas pela presença de Pb e Al. Quando utilizamos as amostras da PC2 vs. a PC4 é possível perceber que as amostras pertencentes à região Centro-Oeste são caracterizadas pela presença dos elementos Al, Pb e Mn, já as amostras do Sul pela presença de todos os elementos analisados, as amostras do exterior, são caracterizadas pela presença de Pb e Al e as amostras da região Nordeste e Norte são caracterizadas pela presença de Pb e Se.

Ao analisarmos todas as estas PC's simultaneamente foi possível concluir que, mesmo utilizando componentes principais diferentes algumas regiões foram discriminadas por elementos semelhantes, como por exemplo, a região Norte e Nordeste são caracterizadas pela presença dos elementos Pb e Se, a região Centro-Oeste é caracterizadas pela presença dos elementos Al e Pb, já as amostras do Sul Pb e P e as amostras do exterior, são caracterizadas pela presença de Pb.

As dificuldades de haver uma nítida separação se devem a fatores como o diferente número de amostras de cada região, a época de coleta das amostras e a origem botânica que não foram considerados. Outra alternativa, para a separação destas amostras, seria tentar separar essas amostras de acordo com a origem botânica. Porém, a maioria das amostras não apresentava essa informação. Acredita-se que a separação através de PCA seria mais eficiente se todas as amostras coletadas fossem de locais diferentes e com a mesma origem botânica, ou de origens botânicas diferentes de um mesmo local.

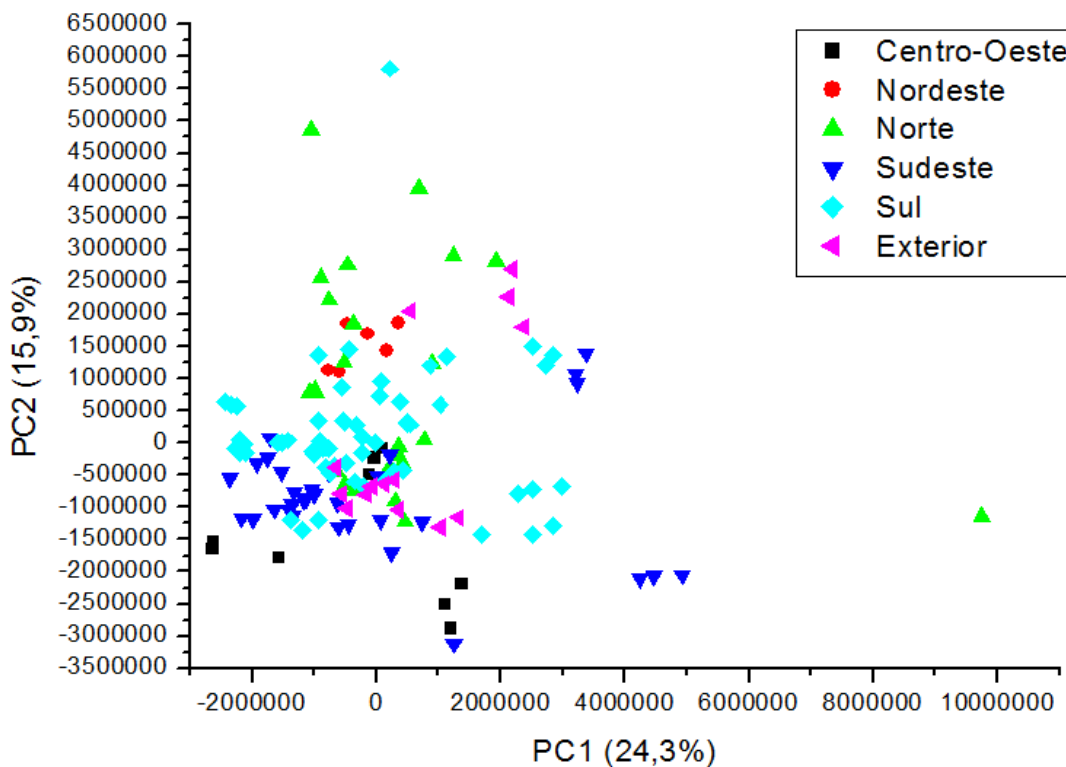


Figura 5.3.5 Gráfico de escores da PC1 vs. PC2 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países, excluindo-se algumas amostras.

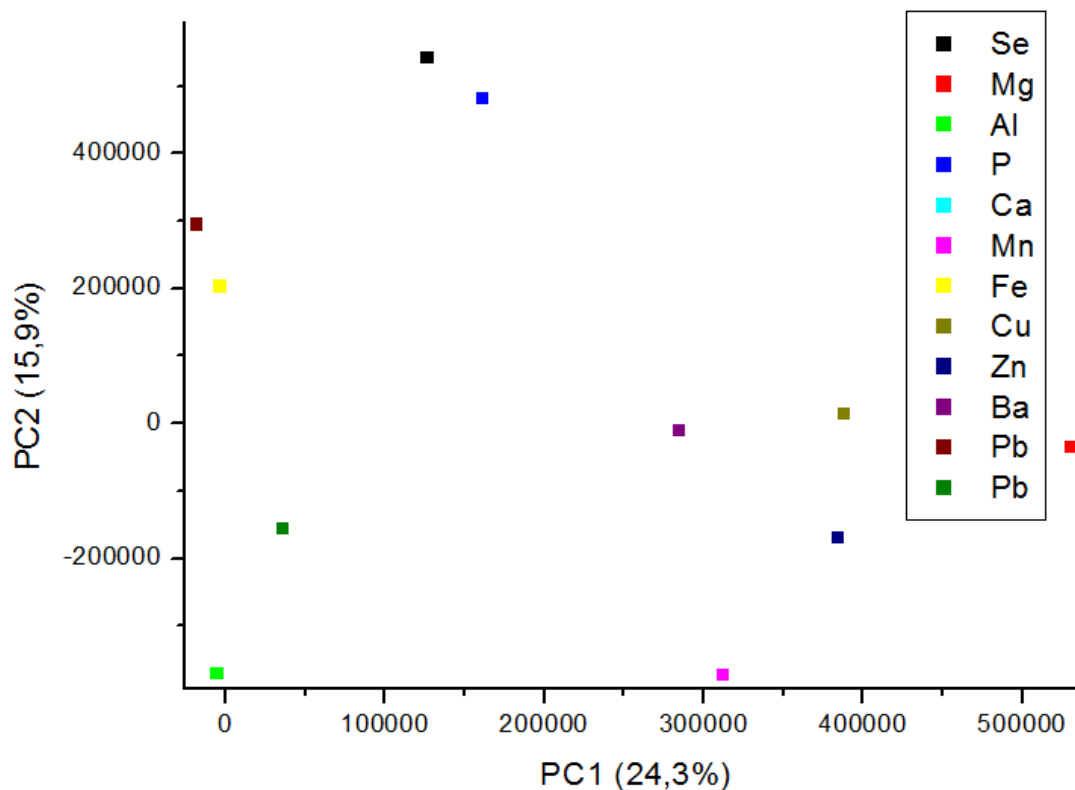


Figura 5.3.6 Gráfico de loadings da PC1 vs. PC2 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países, excluindo-se algumas amostras.

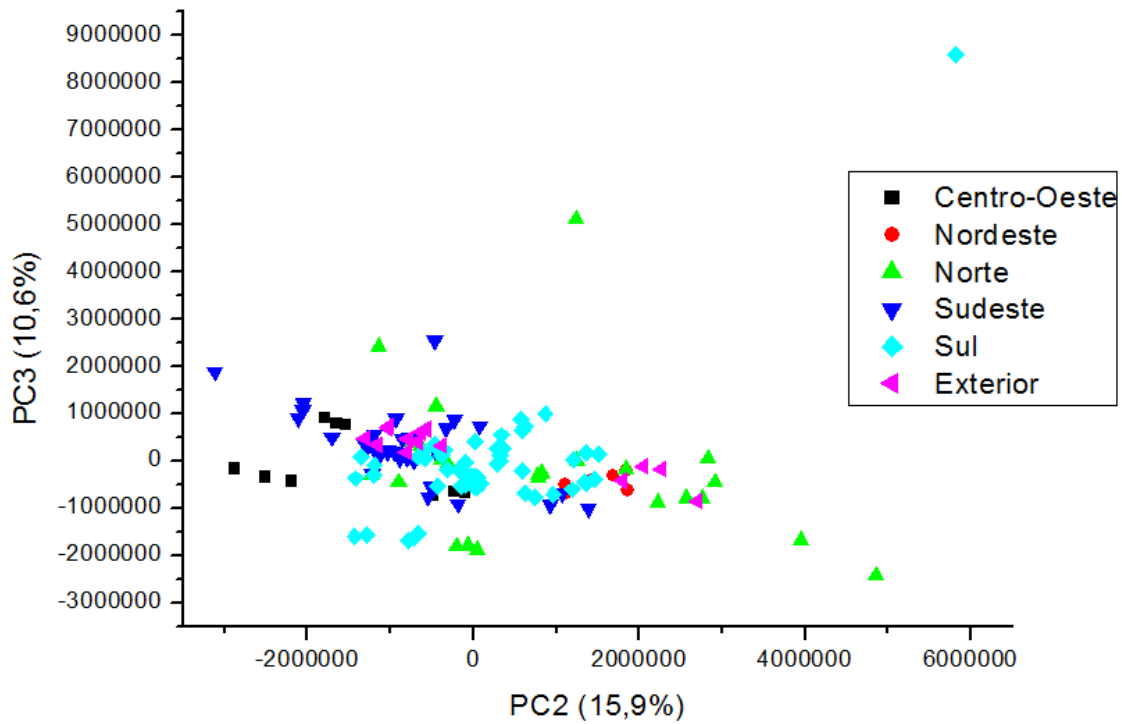


Figura 5.3.7 Gráfico de escores da PC2 vs. PC3 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países, excluindo-se algumas amostras

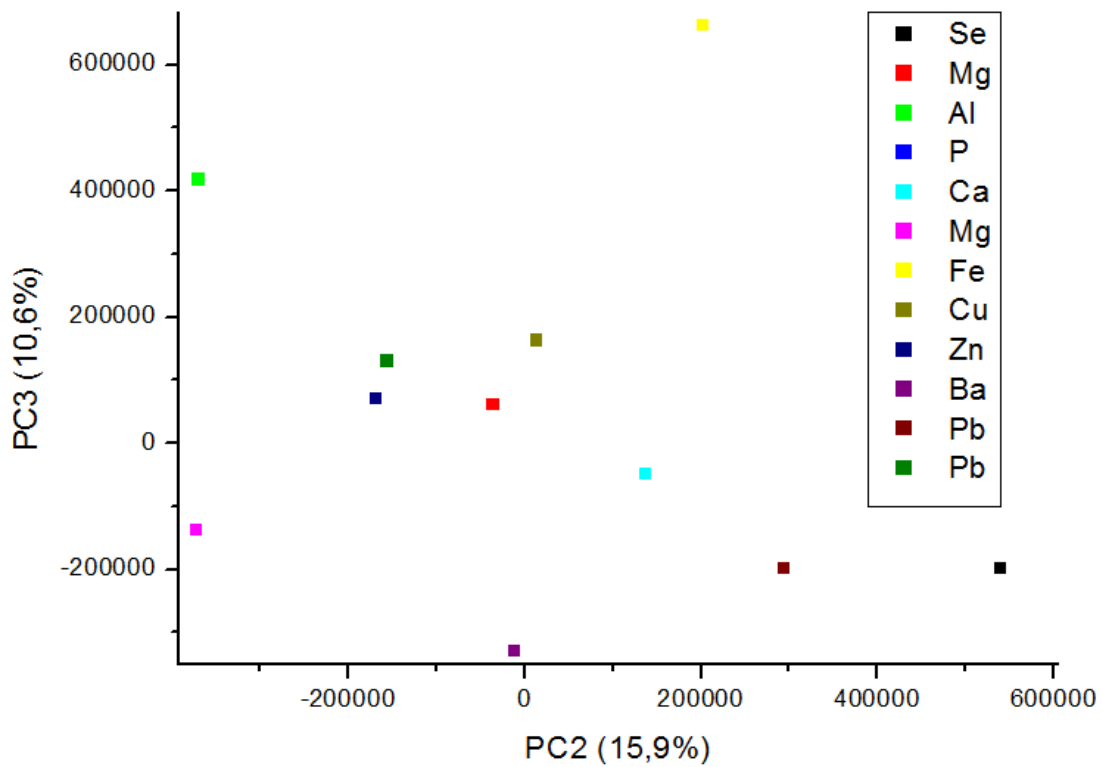


Figura 5.3.8 Gráfico de loadings da PC2 vs. PC3 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países, excluindo-se algumas amostras.

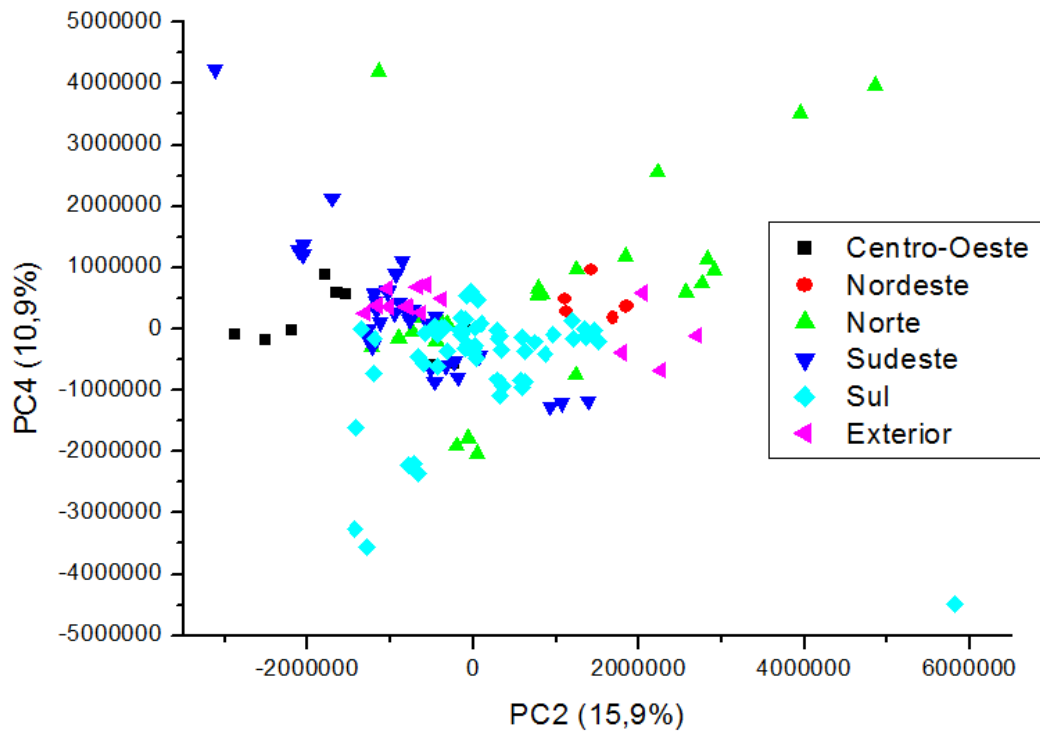


Figura 5.3.9 Gráfico de escores da PC2 vs. PC4 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países, excluindo-se algumas amostras.

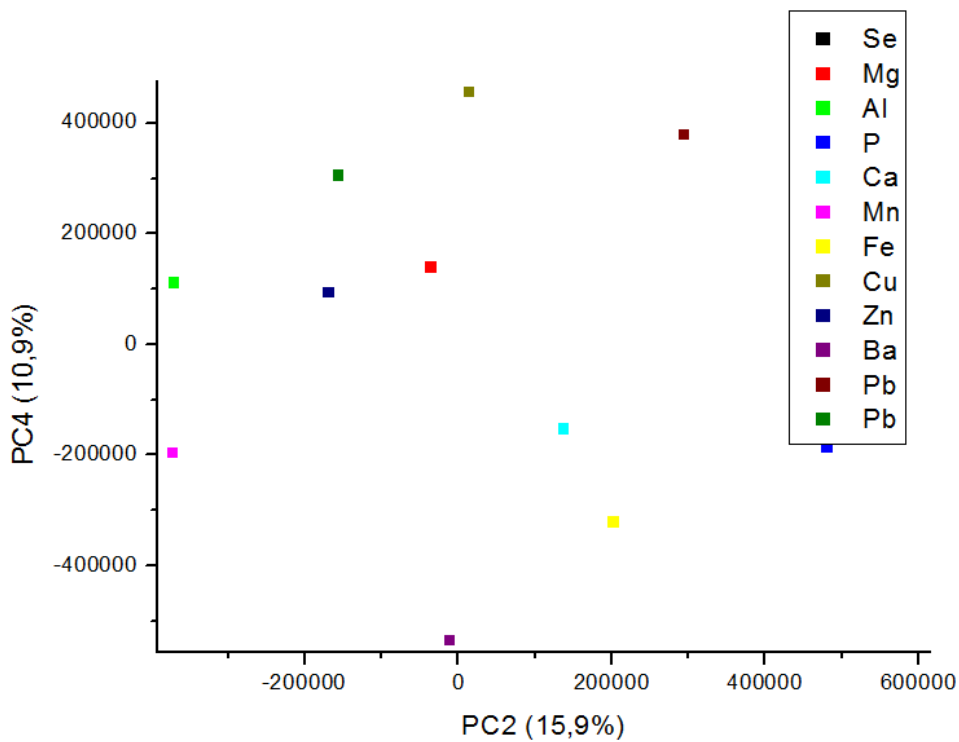


Figura 5.3.10 Gráfico de loadings da PC2 vs. PC4 das amostras de méis de diferentes regiões brasileiras e de outros países, excluindo-se algumas amostras.

5.4. Conclusões Parciais

Nesta parte do trabalho, foi possível determinar 12 isótopos em 60 méis de diferentes regiões brasileiras por ICP-MS, e através de PCA separou-se em pequenos grupos estes dados, sendo possível avaliar quais eram os elementos característicos de cada uma das regiões, como por exemplo, a região Norte e Nordeste são caracterizadas pela presença dos elementos Pb e Se, a região Centro-Oeste é caracterizadas pela presença dos elementos Al e Pb, já as amostras do Sul Pb e P e as amostras do exterior, são caracterizadas pela presença de Pb.

Capítulo 6

“Análise de méis por FT-NIR e apreciação dos resultados utilizando quimiometria para a identificação da origem e detecção de adulterações.”

6. Análise de méis por FT-NIR e apreciação dos resultados utilizando quimiometria para a identificação da origem e detecção de adulterações

O mel tem sido alvo de adulteração devido ao seu custo e sua disponibilidade limitada. Uma técnica que vem ganhando destaque em análises de alimentos é a espectroscopia na região do infravermelho (NIRS). O NIRS apresenta como principais vantagens, quando comparado com as demais técnicas, baixo custo e rapidez além de ser uma técnica não destrutiva e de não requerer o preparo prévio da amostra.

6.1. Objetivos Específicos

O objetivo desta parte do trabalho foi analisar amostras de méis não adulterados e adulterados, com glicose, melado de cana-de-açúcar e água e também amostras de diferentes regiões brasileiras através da técnica de FT-NIR e utilizar análise quimiométrica para a visualização e interpretação dos dados espectrais.

6.2. Materiais e Métodos

As amostras foram analisadas em um espectrômetro na região do infravermelho próximo com transformada de Fourier (FT-NIR flex N-500, Buchi, Suíça) no modo transfectância, de 10000 a 4000 cm^{-1} , com 4 cm^{-1} de resolução espectral, em dois dias diferentes. Em cada dia foram feitas 6 replicatas de cada amostra. Os dados obtidos foram submetidos a uma análise quimiométrica empregando Análise de Componentes Principais (PCA), utilizando para isso, o programa computacional MatLab versão 2011a para as amostras adulteradas e o programa computacional Pirouetti versão 4.0.

6.2.1. Méis adulterados

Amostras de méis, coletadas de um mesmo local (Corumbá - Mato Grosso do Sul), porém em épocas diferentes (Outubro de 2009, Janeiro e Junho de 2010) foram fornecidas pela Embrapa Pantanal e utilizadas neste estudo. Estas amostras foram inicialmente submetidas a um processo de adulteração utilizando os adulterantes: glicose, melado de cana-de-açúcar e água, em diferentes proporções, 10%, 25%, 40% e 50% (m m⁻¹). Para esta análise, aplicou-se a todos os espectros de NIR a primeira derivada para corrigir problemas com a linha de base e para os espectros de mel adulterado com água realizou-se uma seleção de variáveis de 8000 a 4000 cm⁻¹, já para os espectros de mel adulterados com glicose e melado de cana-de-açúcar realizou-se uma seleção de variáveis de 6800 a 4000 cm⁻¹ e em seguida os dados foram normalizados, foi realizada uma seleção de variáveis diferenciada para que fosse possível selecionar regiões do espectro que continham a maior parte da informação espectral e também para obter melhores resultados em termos de separação. A Figura 6.2.1.1 mostra espectros de uma amostra de mel pura e a mesma amostra adulterada com água, glicose e melado de cana.

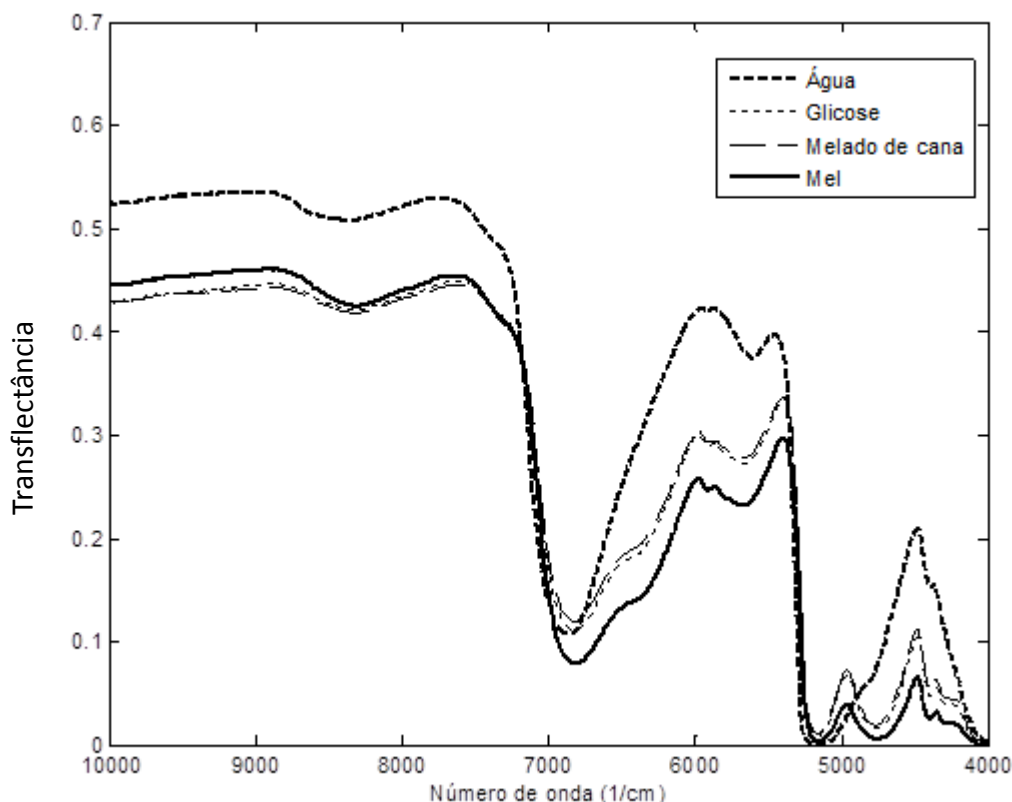


Figura 6.2.1.1 Espectro de uma amostra de mel e da mesma amostra adulterada com 50% de água, glicose e melaço de cana.

6.2.2. Méis de diferentes regiões

Amostras de 46 méis de 10 estados brasileiros abrangendo todas as regiões do Brasil foram utilizadas neste estudo. Essas amostras foram fornecidas por apicultores, por diferentes unidades da Embrapa e outras foram adquiridas em supermercados. Para esta análise aplicou-se a primeira derivada aos espectros de NIR para corrigir problemas com a linha de base.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Méis adulterados

6.3.1.1. Adulteração com água

Foi possível observar uma nítida separação das amostras não adulteradas e das amostras adulteradas em diferentes proporções utilizando os gráficos de escores, como apresentado na Figura 6.3.1.1.1. Tal separação foi verificada independente da amostra utilizada. Em todas as principais PC's responsáveis pela separação foram a PC1 e a PC2.

Ainda na Figura 6.3.1.1.1, observa-se que as amostras apresentaram uma tendência de separação em relação aos teores de adulterante presente, ou seja, quanto mais adulterante, mais distante do grupo de méis não adulterados. Quando uniu-se os espectros dos três méis (Figura 6.3.1.1.1- d), pôde-se observar que independente da amostra de mel foi possível detectar a adulteração nas diferentes proporções, mostrando assim, a possibilidade de se aliar FT-NIR e quimiometria para identificação de adulteração de mel com água. Isso foi possível porque o teor de água nos méis, em diferentes épocas do ano, foi aproximadamente a mesma, sendo qualquer variação detectada como adulteração em qualquer uma das amostras. Na Figura 6.3.1.1.2 está apresentado o gráfico de loadings de cada uma das amostras analisadas, sendo que a banca da água pode ser observada em torno do número de onde 5200 cm^{-1} .

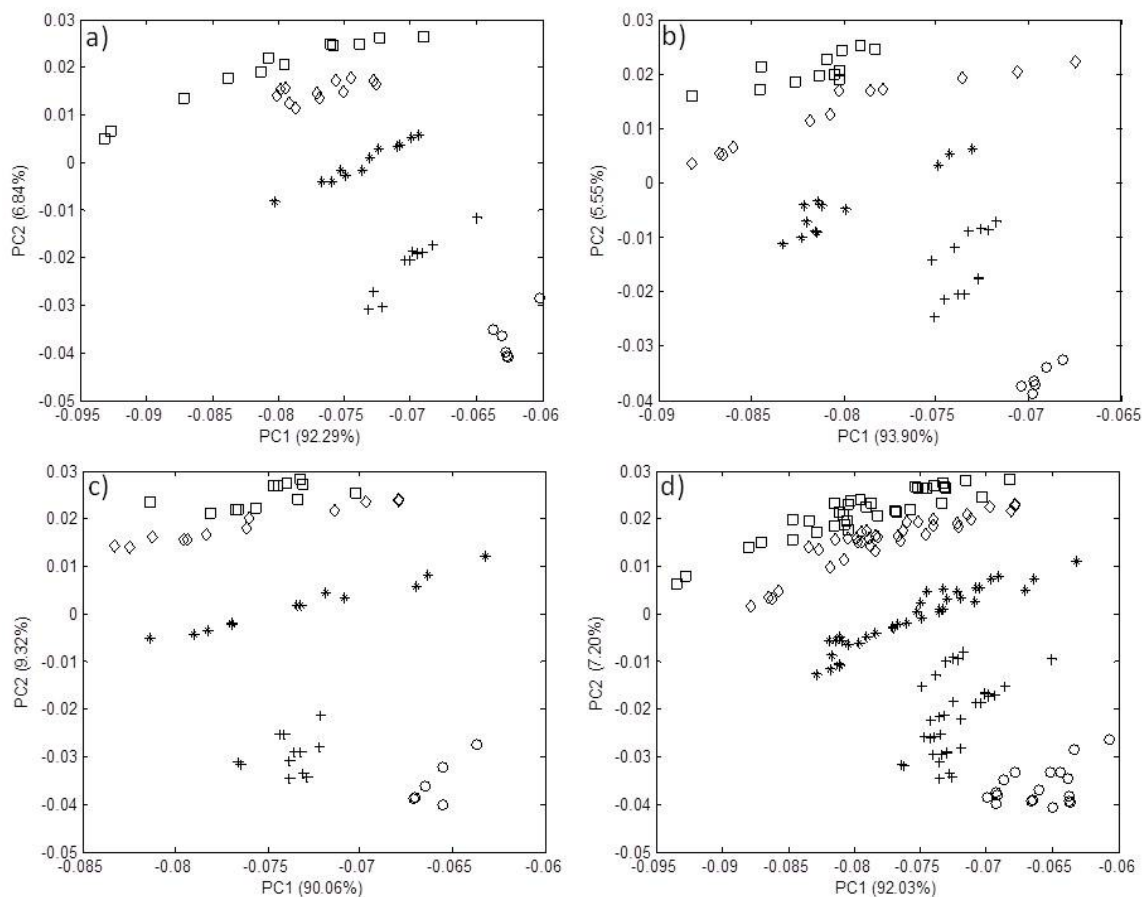


Figura 6.3.1.1.1 Gráfico de escores das amostras adulteradas com água em diferentes proporções; **(a)** amostra coletada em Outubro de 2009; **(b)** amostra coletada em Janeiro de 2010; **(c)** amostra coletada em Junho de 2010; **(d)** todas as amostras juntas.

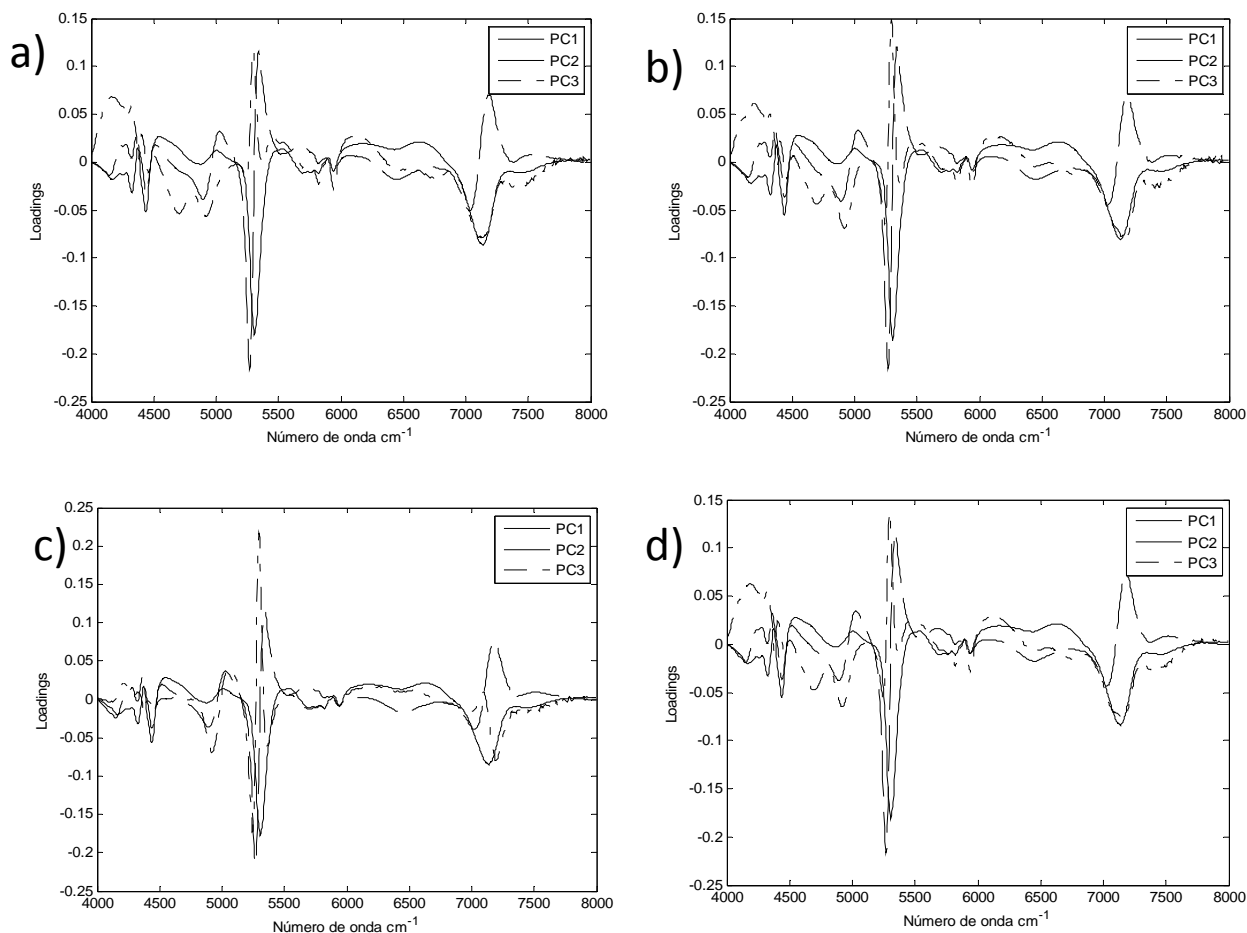


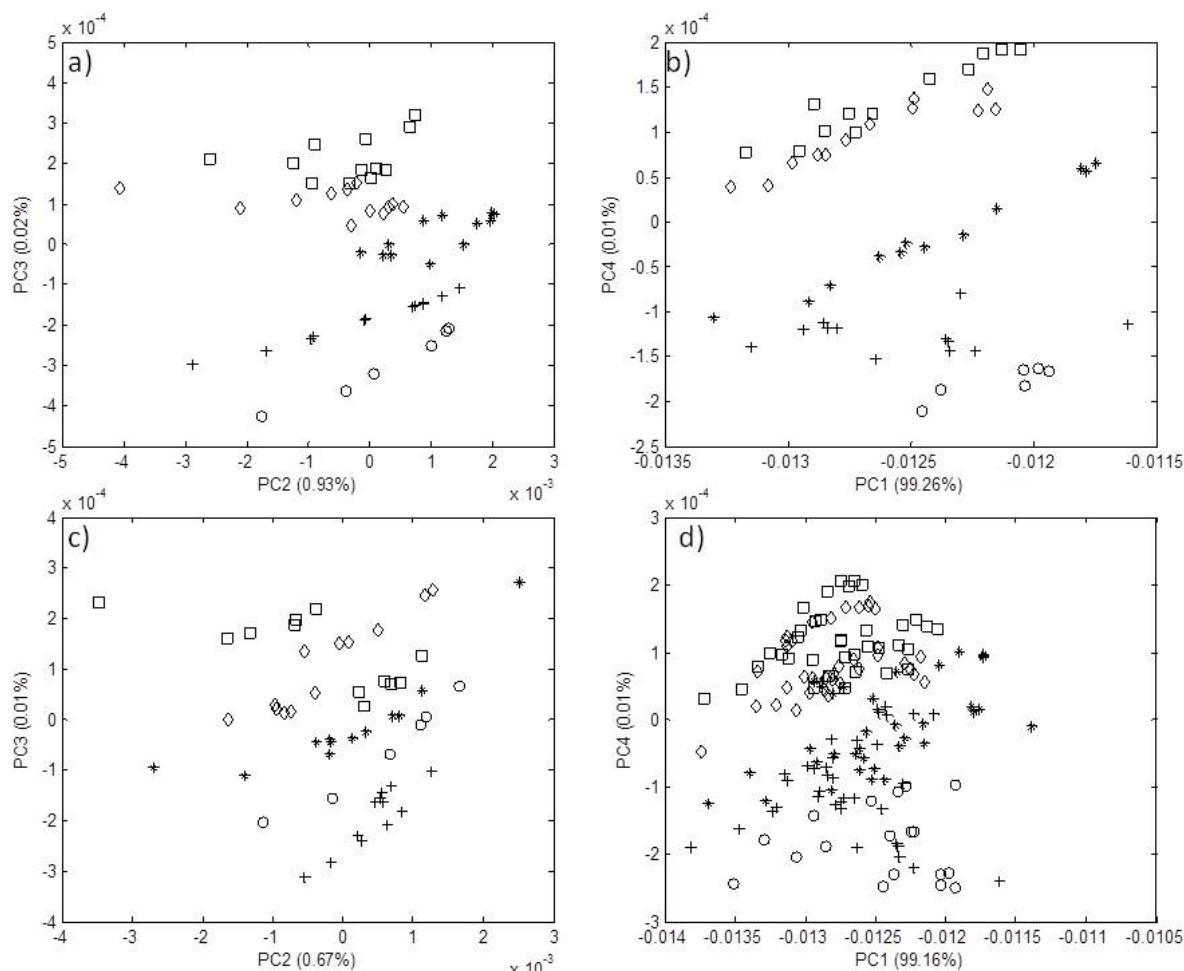
Figura 6.3.1.1.2 Gráfico de loadings das amostras adulteradas com água em diferentes proporções; **(a)** amostra coletada em Outubro de 2009; **(b)** amostra coletada em Janeiro de 2010; **(c)** amostra coletada em Junho de 2010; **(d)** todas as amostras juntas.

6.3.1.2. Adulteração com glicose

Nas amostras de mel adulteradas com glicose, foi possível observar uma boa separação das amostras não adulteradas e das amostras adulteradas em diferentes proporções, isso ocorreu para os três méis testados. Nos méis coletados em Outubro de 2009 e Junho de 2010 as PC's responsáveis pela separação foram a PC2 e a PC3 (Figuras 6.3.1.2.1 - a e 6.3.1.2.1 - c), já para o mel coletado em Janeiro de 2010 as PC's responsáveis pela separação foram a PC1 e a PC4 (Figura 6.3.1.2.1 -b).

Quando os três méis foram analisados simultaneamente, não foi possível visualizar uma boa separação, principalmente pela presença da amostra coletada em Janeiro de 2010, que provavelmente continha teores de açúcar maior dos que as demais amostras, pois esta amostra pertencia a uma florada diferente, inviabilizando a separação das demais. Este resultado é um indício de que o teor de glicose no mel apresenta grande variabilidade em relação à época do ano no qual ele é produzido. Tal fato dificulta a detecção de adulterações com glicose entre diferentes méis, já que esta ocorre naturalmente e em grande quantidade nos méis.

Na Figura 6.3.1.2.2 está apresentado o gráfico de loadings de cada uma das amostras analisadas porém, não é possível através de NIRS identificar qual é a banca característica da glicose.



○ - Sem adulerante; + - 10% de adulerante; * - 25% de adulerante; ◇ - 40% de adulerante; □ - 50% de adulerante

Figura 6.3.1.2.1 Gráfico de escores das amostras adulteradas com glicose em diferentes proporções; **(a)** amostra coletada em Outubro de 2009; **(b)** amostra coletada em Janeiro de 2010; **(c)** amostra coletada em Junho de 2010; **(d)** todas as amostras juntas.

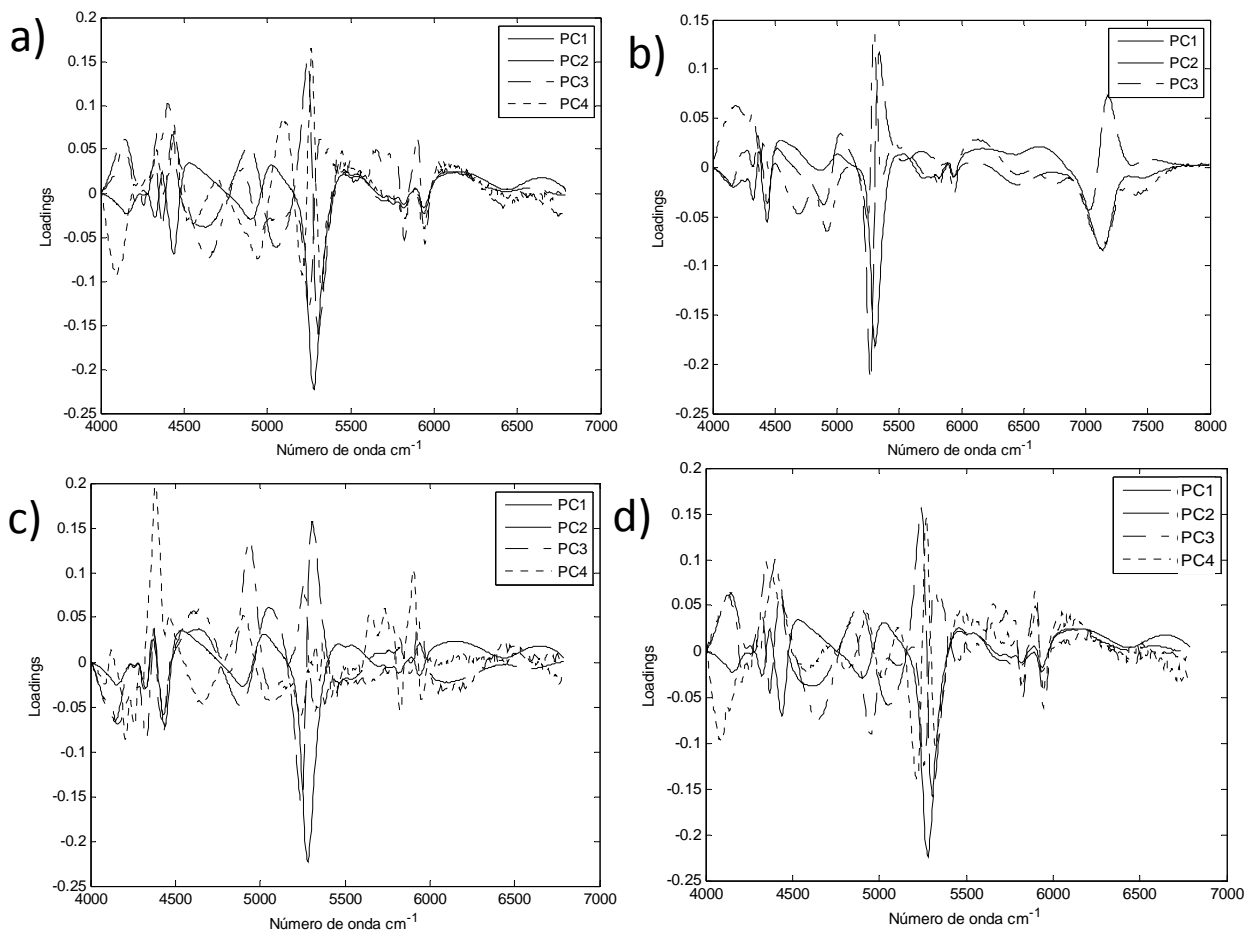


Figura 6.3.1.2.2 Gráfico de loadings das amostras adulteradas com glicose em diferentes proporções; **(a)** amostra coletada em Outubro de 2009; **(b)** amostra coletada em Janeiro de 2010; **(c)** amostra coletada em Junho de 2010; **(d)** todas as amostras juntas.

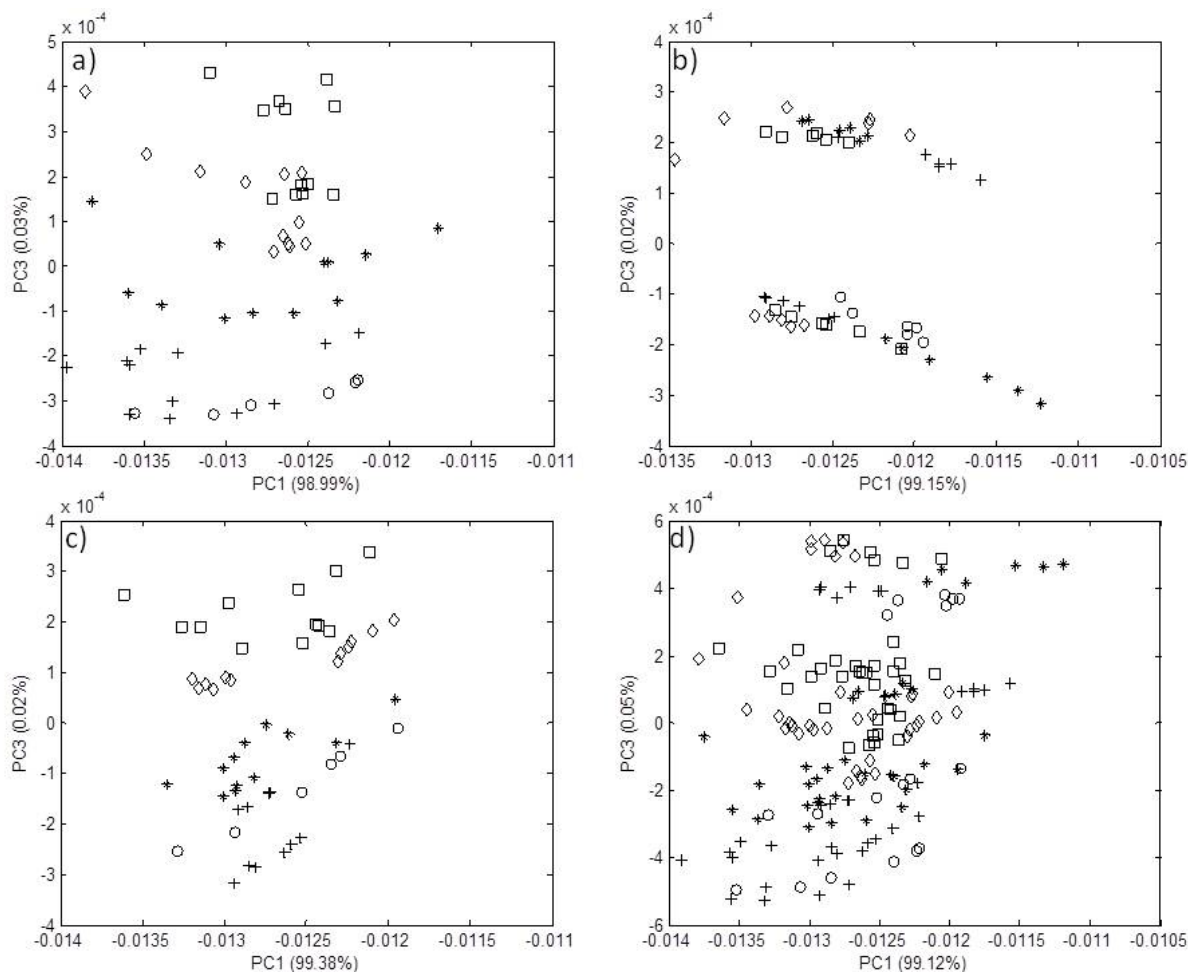
6.3.1.3. Adulteração com melado de cana-de-açúcar

Nas amostras de mel adulteradas com melado de cana-de-açúcar, foi possível observar uma boa separação das amostras não adulteradas e das amostras adulteradas em diferentes proporções, para as amostras de mel coletados em Outubro de 2009 e Junho de 2010 (Figura 6.3.1.3.1 - a e 6.3.1.3.1 - c), já para a amostra de mel coletada em Janeiro de 2010 (Figura 6.3.1.3.1 - b) não foi possível observar a mesma separação. Para os méis coletados em Outubro de 2009 e Junho de 2010 a PC responsável pela separação foi a PC3, já

no mel coletado em Janeiro de 2010, nenhuma PC foi capaz de separar bem as amostras.

Quando uniu-se os espectros dos três méis (Figura 6.3.1.3.1d), não foi possível visualizar uma boa separação, principalmente pela presença da amostra coletada em Janeiro de 2010, que provavelmente continha teores de açúcar maior dos que as demais amostras, inviabilizando a separação das demais.

Na Figura 6.3.1.3.2 está apresentado o gráfico de loadings de cada uma das amostras analisadas porém, não é possível através de NIRS identificar qual é a banca característica dos carboidratos presentes no melado de cana-de-açúcar.



○ - Sem adulterante; + - 10% de adulterante; * - 25% de adulterante; ◇ - 40% de adulterante; □ - 50% de adulterante

Figura 6.3.1.3.1 Gráfico de escores das amostras adulteradas com melado de cana-de-açúcar em diferentes proporções ; **(a)** amostra coletada em Outubro de 2009; **(b)** amostra coletada em Janeiro de 2010; **(c)** amostra coletada em Junho de 2010; **(d)** todas as amostras juntas.

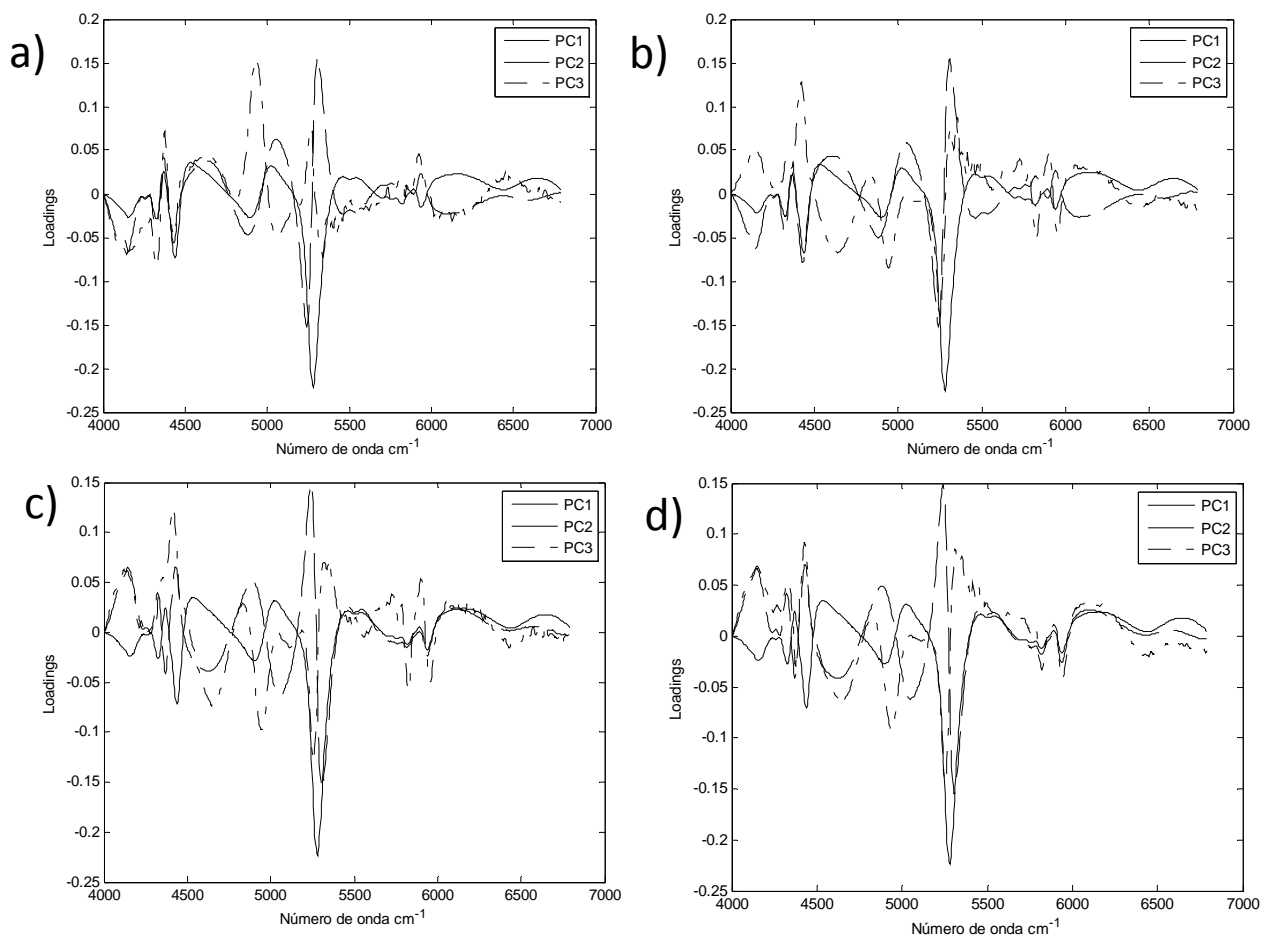
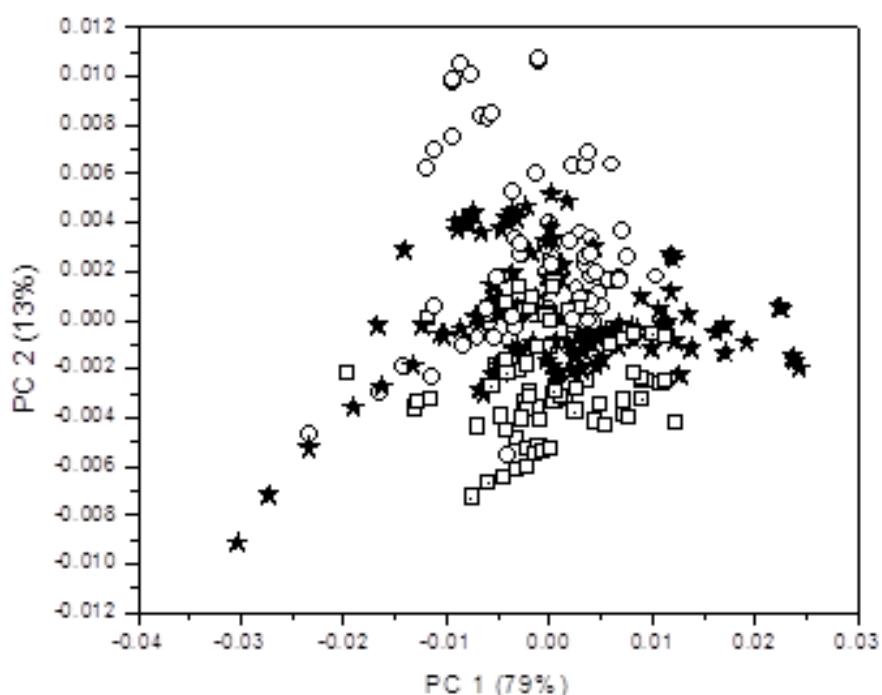


Figura 6.3.1.3.2 Gráfico de loadings das amostras adulteradas com melado de cana-de-açúcar em diferentes proporções; **(a)** amostra coletada em Outubro de 2009; **(b)** amostra coletada em Janeiro de 2010; **(c)** amostra coletada em Junho de 2010; **(d)** todas as amostras juntas.

6.3.2. Méis de diferentes regiões

Através do gráfico de escores da Figura 6.3.2.1, é possível verificar que não houve uma boa separação das amostras de acordo com as diferentes regiões, mas algumas tendências foram pronunciadas, como por exemplo, a separação das amostras pertencentes à região Sudeste e Nordeste das amostras das regiões Norte e Centro-Oeste, porém as amostras da região Sul encontram-se inseridas em ambos os grupos. A PC que mais separou este conjunto de dados foi a PC2.

A grande dificuldade de separar as amostras através da região é que outros fatores importantes não foram considerados, como o número diferente de amostras de cada região, a época de coleta de cada amostra e a origem botânica. Porém mesmo sem levar em conta todos estes fatores foi possível observar que a técnica NIR pode ser utilizada junto com ferramentas quimiométricas para classificar méis de diferentes regiões brasileiras.



★ Região Sul; □ Regiões Nordeste e Sudeste; ○ Regiões Norte e Centro-Oeste

Figura 6.3.2.1 Gráfico de escores das amostras de diferentes regiões brasileiras.

6.4. Conclusões Parciais

A partir dos resultados obtidos, foi possível verificar que a técnica NIRS é sensível a possíveis adulterações em méis. Contudo, a grande variabilidade da composição entre as épocas do ano dificulta a criação de um modelo único para identificação das adulterações, sobretudo quando o adulterante é naturalmente encontrado no mel.

No entanto, resultados satisfatórios foram obtidos quando o adulterante é água, provavelmente devido à baixa variabilidade deste constituinte em diferentes méis.

Apesar de algumas limitações, foi possível observar que a técnica FT-NIR pode ser utilizada junto com ferramentas quimiométricas para classificar méis de diferentes regiões brasileiras.

Capítulo 7

Conclusões

7. CONCLUSÕES

O método de preparo de amostra que se mostrou mais adequado às determinações propostas foi a digestão assistida por radiação micro-ondas com cavidade. Neste método foi utilizado ácido nítrico diluído, onde a concentração inicial do ácido era 2 mol L^{-1} e a potência utilizada era de 1000 W.

Na sequência foram determinados 11 elementos em 60 méis por ICP-MS, porém não foi possível separar estes dados quimiometricamente utilizando PCA, pois houve uma grande variação nos elementos de uma mesma classe, o que impossibilitou a separação.

Quando a técnica FT-NIR foi utilizada, foi possível perceber que esta é sensível a possíveis adulterações em méis, contudo, a variabilidade da composição entre as épocas do ano dificulta a criação de um modelo único para identificação das adulterações, sobretudo quando o adulterante é naturalmente encontrado no mel, como é o caso da glicose. No entanto, resultados satisfatórios foram obtidos quando o adulterante é água, provavelmente devido à baixa variabilidade deste constituinte em diferentes méis.

Apesar de algumas limitações, foi possível observar que a técnica NIR aliada a ferramentas quimiométricas pode ser utilizada para classificar méis de diferentes regiões brasileiras.

Capítulo 8

Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVES, R. M. O. CARVALHO, C. A. L. SOUZA, B. A. SODRÉ, G. S. MARCHINI, L. C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* smith (HYMENOPTERA: APIDAE). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 25: 644-650, 2005.
2. MADEJCZYK, M. BARALKIEWICZ, D. Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES. **Analytica chimica acta**, 617: 11–17, 2008.
3. CAROLI, S. FORTE, G. IAMICELI, A.L. GALOPPI, B. Determination of essential and potentially toxic trace elements in honey by inductively coupled plasma-based techniques. **Talanta**, 50: 327–336, 1999.
4. CORBELLA, E. COZZOLINO, D. Classification of the floral origin of Uruguayan honeys by chemical and physical characteristics combined with chemometrics. **LWT** 39: 534–539, 2006.
5. LACHMAN, J.; KOLIHOVÁ, D.; MIHOLOVÁ, D.; KOSATA, J.; TITERA, D.; KULT K. “Analysis of minority honey components: possible use for the evaluation of honey quality”. **Food chemistry**, 101: 973-979, 2007.
6. FERNÁNDEZ-TORRES, R. PÉREZ-BERNAL, J. L. BELLO-LÓPEZ, M. A. CALLEJÓN-MOCHÓN, M. JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, J. C. GUIRAÚM-PÉREZ, A. Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. **Talanta** 65: 686–691, 2005.
7. www.abemel.com.br/estatisticas.htm, acessado em 10/12/2011.
8. RASHED, M. N. EL-HATY, M. T. A. MOHAMED, S. M. Bee honey as environmental indicator for pollution with heavy metals. **Toxicological and Environmental Chemistry**, 91 (3): 389–403, 2009.
9. PAES, L. C. “Determinação de cobre, manganês e cádmio em mel por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite”. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de química. Campinas, 2007.

10. HOUK, R.S. Mass spectrometry of inductively coupled plasmas. **Anal. Chem.**,58(A): 97-105, 1986.
11. BRERETON, R. G. Applied chemometrics for scientists. 1^a. ed. Cichester, John Wiley, p.379, 2007.
12. FERREIRA, M. M. C; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: Calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, 22(5): 724-731, 1999.
13. BUAININ, A. M.; BATALHA, M. O. Cadeias Produtivas de Flores e Mel. **Série Agronegócios**, 9: 85-140, 2007.
14. POHL, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. **Trends in Analytical Chemistry**, 28: 117-128, 2009.
15. <http://extranet.agricultura.gov.br>, acessado em 05/10/2010.
16. PACKER, A. P. GINE, M. F. Analysis of undigested honey samples by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry with direct injection nebulization ID-ICP-MS. **Spectrochimica Acta**, 56(B): 69-75, 2001.
17. TONG, S. S. C.; MORSE, R. A. BACHE, C. A. LISK, D. J. Elemental analysis of honey as an indicator of pollution. **Arch. Environ. Health.**, 30: 329-332, 1975.
18. CONTI, M. E.; BOTRÉ, F. Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metals contamination. **Environ. Monit. Assess**, 69: 267-282, 2001.
19. CRANE, E. Bees, honey, and pollen as indicators of metal in the environment. **Bee World**, 65(1): 47-49, 1984.
20. KRUG, F. J. Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre Preparo de Amostras Orgânicas e Inorgânicas para Análise Elementar. Editado por Francisco José Krug, Fealq, Piracicaba, 2008.

21. SANNA, G. PILO, M. I.; PIU, P. C.; TAPARRO, A.; SEEBER, R. Determination of heavy metals in honey by anodic stripping voltammetry at microelectrodes. **Anal. Chim. Acta**, 415: 165-173, 2000.
22. FODOR, P.; MOLNAR, E. Honey as an environmental indicator: effect of sample preparation on trace element determination by ICP-AES. **Mikrochim. Acta**, 112: 113-118, 1993.
23. TUZEN, M.; SILICI, S.; MENDIL, D.; SOYLAK, M.; Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. **Food Chem.**, 103: 325-330, 2005.
24. HERRERO, C.; PEÑA, R. Pattern recognition analysis applied to the classification of honeys from two geographical origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 41 (4): 560-564, 1993.
25. 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), 168-176, 2006.
26. IOANNIDORE, M. D.; ZACHARIADIS, G. A.; ANTHEMIDIS, A. N.; STRATIS, J. A. Direct determination of toxic trace metals in honey and sugar using inductively couple plasma atomic emission spectrometry. **Talanta**, 65: 92-97, 2005.
27. YARSAN, E.; KARACAL, F.; IBRAHIM, I. G.; DIKMEN, B. Contents of some metals in honeys from different regions in Turkey. **Bull Environ. Contam. Toxicol**, 79: 255-258, 2007.
28. KUMP, P.; NECEMER, M.; SNAJDER, J. Determination of trace elements in bee honey, pollen and tissue by total reflection and radioisotope X-ray fluorescence. **Spectrochim. Acta Part B** 51: 499-507 1996.
29. BRAZIEWICZ, J.; FIJAL, I.; CZYZEWSKI, T.; JASKÓLA, M.; KORMAM, A.; BANAS, D.; KUBALA-KUKUS, A.; MAJEWSKA, U.;

- ZEMLO, L. PIXE and XRF analysis of honey samples. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, 187(B): 231-237, 2002.
30. 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: 487, 2001.
31. MUNOZ, E.; PALMERO, S. Determination of heavy metals in honey by potentiometric stripping analysis and using a continuous flow methodology. **Food Chem.**, 94: 478-483, 2006.
32. CAROLI, S.; FORTE, G.; ALESSANDRELLI, M.; CRESTI, R.; SPAGNOLI, M. D'ILIO, S.; PAUWELS, J.; KRAMER, G. N. A pilot study for the production of a certified reference material for trace elements in honey. **Microchemical Journal**, 67: 227-233, 2000.
33. JARVIS, K. E.; GRAY, A. L.; HOUK, R. S. Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Blackie and Son, New York, 1992.
34. HOUK, R. S.; FASSEL, V. A.; FLESCH, G. D.; SVEC, H. J.; GRAY, A. L.; TAYLOR, C. E. Inductively coupled argon plasmas as ion sources for mass spectrometric determination of trace elements. **Anal. Chem.**, 52: 2283-2289, 1980.
35. HOUK, R.S. Inductively coupled plasma-mass spectrometry and the European discovery of America. **J. Chem. Educ.**, 77: 598-602, 2000.
36. <http://www.spectroscopyonline.com>, acessado em 05/10/2010.
37. ROSINI, F.; MATOS, W. O.; SANTOS, M. C.; NÓBREGA, J. A. Resolução CONAMA no. 357 e técnicas espectroanalíticas: meios adequados aos fins?. **Analytica**, 22: 74-83, 2006.
38. ICP-MS 820-MS – CRI. Application Note 28. Varianinc
39. KRUSHEVSKA, A.; WAHEED, S.; NÓBREGA, J. A.; AMARISIRIWARDENA, D. BARNES, R. M. Reducing polyatomic interferences in the ICP-MS determination of chromium and vanadium in biofluids and tissues. **Appl. Spectrosc.**, 52: 205-211, 1998.

40. BANDURA, D. R.; BARANOV, V. I.; TANNER, S. D. Reaction chemistry and collisional processes in multipole devices for resolving isobaric interferences in ICP-MS. **Fresenius J. Anal. Chem.**, 370: 454-470, 2001.
41. Special Issue, New Dynamic Reaction Cell Technology. **At. Spectrosc.**, 20: 45-77, 1999.
42. KOPPENAAL, D. W.; EIDEN, G. C.; eds., Special Issue, Collision and Reaction Cell Techniques in Atomic Mass Spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 19: 561-651, 2004.
43. OLESIK, J. W.; JONES, D. R. Strategies to develop methods using ion-molecule reactions in a quadrupole reaction cell to overcome spectral overlaps in inductively coupled plasma mass spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, 21: 141-159, 2006.
44. PEREIRA, C. D.; GARCIA, E. E.; SILVA, F. V.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Behaviour of arsenic and selenium in na ICP-QMS with collision and reaction interface. **J. Anal. At. Spectrom.**, 25: 1763-1768, 2010.
45. XING, L.; BEAUCHEM, D. Chromium speciation at trace level in potable water using hyphenated ion exchange chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry with collision/reaction interface. **J. Anal. At. Spectrom.**, 25: 1046-1055, 2010.
46. FRAZZOLI, C.; D'ILIO, S.; BOCCA, B. Determination of Cd and Pb in honey by SF-ICP-MS: validation figures and uncertainty of results. **Analytical Letters**, 40: 1992-2004, 2007.
47. LOGRADO, L. P.; LOGRADO, A. L.; BOTELHO, E. D. O mel em detalhes. **Perícia Federal**, 27 (2): 8-9, 2010.
48. CANO, C. B.; ZAMBON, C. Q. Mel: fraudes e condições sanitárias. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, 52:1-4, 1992.
49. ROSSI, N. F.; MARTINELLI, L. A.; LACERDA, T. H. M.; CAMARGO, P. B.; VICTÓRIA, R. L. Análise da adulteração de méis por açúcares

- comerciais utilizando-se a composição isotópica de carbono. **Ciência e tecnologia de alimentos**, 19, 1999.
50. KELLY, J. F. D.; DOWNEY, G.; FOURATIER, V. Initial study of honey adulteration by sugar solutions using midinfrared (MIR) spectroscopy and chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(1): 33-39, 2004.
51. SKOOG, DOUGLAS A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, TIMOTHY A. Capítulo XVII - Applications of infrared spectrometry. In Principles of Instrumental Analysis. Harcourt Brace & Company, 5ª. Ed., Philadelphia, 1998.
52. RUOFF, K.; LUGINBUHL, W.; BOGDANOV, S.; BOSSET, J. O.; ESTERMANN, B.; ZIOLKO, T.; AMADO, R. Authentication of the botanical origin of honey by near-infrared spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, 6867-6872, 2006.
53. LATORRE, M. J.; PEÑA, R.; PITA, C.; BOTANA, A.; GARCÍA, S.; HERRERO, C. Chemometric classification of honeys according to their type II metal content data. **Food Chemistry**, 66, 263-268, 1999.
54. MADEJCZYK, M. BARALKIEWICZ, D. Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES. **Analytica chimica acta**, 617: 11-17, 2008.
55. PISANI, A.; PROTANO, G.; RICCOBONO, F. Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). **Food Chemistry**, 107: 1553-1560, 2008.
56. HERNÁNDEZ, O. M.; FRAGA, J. M. G.; JIMÉNEZ, A. I.; JIMÉNEZ, F.; ARIAS, J. J. Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. **Food Chemistry**, 93: 449-458, 2005.
57. HOPKE, P. K. The evolution of chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, 500: 365-377, 2003.

58. GELADI, P. Chemometrics in spectroscopy. Part 1. Classical chemometrics. **Spectrochimica Acta Part B**, 58: 767-782, 2003.
59. GELADI, P.; SETHSON, B.; NYSTROM, J.; LILLHONGA, T.; LESTANDER, T.; BERGUER, J. Chemometrics in spectroscopy. Part 2. Examples. **Spectrochimica Acta Part B**, 59: 1347-1357, 2004.
60. LÓPEZ, B.; LATORRE, M. J.; FERNÁNDEZ, M. I.; GARCÍA, M. A.; GARCÍA, S.; HERRERO, C. Chemometric classification of honeys according to their type based on quality control data. **Food Chemistry**, 55: 281-287, 1996.
61. GELADI, P. & GRAHN, H. Multivariate Image Analysis. 1a. ed. New York, John Wiley, p. 330, 1996.
62. SHARAF, M. A.; ILLMAN, D. L. & KOWALSKI, B. R. Chemometrics. 1a. ed. New York, Wiley, p. 332, 1986.
63. GOUVEIA, S. T.; SILVA, F. V.; COSTA, L. M.; NOGUEIRA, A. R. A. & NÓBREGA, J. A. "Determination of residual carbon by inductively-coupled plasma optical emission spectrometry with axial and radial view configuration". **Anal. Chim. Acta**, 445: 269-275, 2001.
64. MOREIRA, E. G. Preparo e caracterização de um material de referência de mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758). Tese de doutorado, IPEN, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, 2010.
65. DERRINGER G, SUICH R, J. Simultaneous optimization of several response variables. **Qual. Technol.** 12: 214–219, 1980.
66. BIANCHI, S. R. Avaliação de estratégias analíticas para reduzir interferências em ICP-MS e ICP OES. Tese de doutorado, UFSCar, 2011.
67. CHUDZINKA, M.; DEBSKA, A.; DANUTA, B. Method validation for determination of 13 elements in honey samples by ICP-MS. **Accred. Qual. Assur.**, 16: 1-9, 2011.

68. THOMSEN, V.; ROBERTS, G.; BURGUESS, K. “The concept of background equivalent concentration in spectroscopy”. **Spectrosc.**, 15 (1): 33, 2000.
69. TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, 23 (8): 535-552, 2004.
70. http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=310, acessado em 13/01/2012.
71. http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/pdf/GMC_RES_1999-089.pdf, acessado em 13/01/2012.

APÊNDICE 1

Tabela 1. Teores médios e desvios padrão para Se, Mg, Al, P, Ca e Mn ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras de méis.

Amostras	$^{77}\text{Se}^+$	$^{26}\text{Mg}^+$	$^{27}\text{Al}^+$	$^{31}\text{P}^+$	$^{43}\text{Ca}^+$	$^{55}\text{Mn}^+$
1	79,9 ± 8,15	42345 ± 3729	941 ± 311	124589 ± 14574	75572 ± 15196	1053 ± 16,1
2	71,5 ± 10,7	20158 ± 357	608 ± 87,1	114850 ± 12647	61219 ± 7670	431 ± 7,77
3	73,8 ± 24,2	38736 ± 1043	1567 ± 836	156882 ± 36398	146984 ± 3180	537 ± 23,2
4	98,1 ± 60,6	32814 ± 12052	1616 ± 965	159671 ± 50085	129762 ± 48614	236 ± 97,6
5	50,8 ± 10,2	67847 ± 732	1354 ± 137	151052 ± 13489	128320 ± 2830	2175 ± 47,0
6	52,6 ± 9,12	48774 ± 487	882 ± 905	220575 ± 20268	60692 ± 5548	542 ± 11,7
7	109 ± 10,4	26055 ± 1244	1774 ± 89,2	101657 ± 10431	53482 ± 2665	443 ± 7,93
8	85,0 ± 28,3	54012 ± 729	1449 ± 707	117204 ± 17863	113271 ± 11865	429 ± 33,6
9	56,5 ± 23,5	17423 ± 429	1474 ± 269	116920 ± 7170	32480 ± 687	636 ± 30,5
10	36,8 ± 3,72	21056 ± 200	1174 ± 1218	251635 ± 23366	79890 ± 2137	473 ± 63,9
11	38,4 ± 7,53	28266 ± 742	545 ± 141	99184 ± 6645	48506 ± 5450	1668 ± 7,07
12	44,4 ± 2,85	71414 ± 699	1264 ± 137	160119 ± 12512	124449 ± 61,7	1259 ± 19,0
13	49,6 ± 18,5	46171 ± 1387	1150 ± 77,7	120356 ± 15384	85947 ± 6480	1880 ± 62,4

14	<LOQ	162475 ± 52715	1433 ± 945	306316 ± 164734	205422 ± 67517	6622 ± 456
15	<LOQ	13137 ± 321	195 ± 83,5	30166 ± 4743	43033 ± 1723	205 ± 7,19
16	<LOQ	33309 ± 719	2194 ± 130	88878 ± 15293	64415 ± 3027	2023 ± 25,8
17	<LOQ	34234 ± 651	542 ± 83,4	64141 ± 5325	78090 ± 6278	1047 ± 18,1
18	<LOQ	67589 ± 3162	701 ± 115	67856 ± 15328	133448 ± 9296	4452 ± 142
19	<LOQ	25972 ± 263	1356 ± 440	55186 ± 5293	59789 ± 1694	1206 ± 29,6
20	<LOQ	20263 ± 259	376 ± 45,8	59631 ± 6906	42955 ± 1812	996 ± 8,76
21	<LOQ	11771 ± 309	870 ± 86,6	28612 ± 1469	26810 ± 2646	792 ± 34,2
22	<LOQ	41379 ± 716	359 ± 58,3	83305 ± 5271	107727 ± 1935	675 ± 1,67
23	<LOQ	249585 ± 6006	2331 ± 1036	223463 ± 20968	310649 ± 8349	9106 ± 36,0
24	<LOQ	6728 ± 259	215 ± 85,6	43749 ± 10665	13876 ± 507	199 ± 8,41
25	<LOQ	13368 ± 543	1232 ± 818	85449 ± 6885	32489 ± 926	1624 ± 37,3
26	<LOQ	21600 ± 210	549 ± 315	75807 ± 7525	51720 ± 858	876 ± 3,16
27	<LOQ	295755 ± 12976	1714 ± 193	172451 ± 23999	288757 ± 6966	9319 ± 552
28	16,6 ± 7,78	18279 ± 355	2284 ± 819	105816 ± 49644	51016 ± 3037	1741 ± 36,6
29	24,8 ± 15,9	100422 ± 90354	1244 ± 335	69696 ± 7058	131568 ± 12911	7886 ± 758
30	34,1 ± 17,1	165360 ± 10352	1127 ± 443	74322 ± 8672	221473 ± 14652	12672 ± 8057
31	32,4 ± 9,33	105349 ± 347	562 ± 121	74111 ± 9240	210672 ± 3122	10745 ± 179

32	41,7 ± 7,88	30394 ± 868	320 ± 96,4	78054 ± 8767	78657 ± 5076	667 ± 6,01
33	25,7 ± 1,51	25883 ± 758	279 ± 92,1	100683 ± 4038	37274 ± 436	839 ± 6,62
34	20,2 ± 6,17	22542 ± 1182	175 ± 15,2	55778 ± 1550	65106 ± 2054	2326 ± 112
35	18,0 ± 10,9	24669 ± 652	479 ± 71,8	85971 ± 12241	48742 ± 1124	3043 ± 67,9
36	24,5 ± 6,47	32243 ± 1047	2673 ± 13,8	69672 ± 4271	70568 ± 3812	2226 ± 45,6
37	19,2 ± 15,3	35376 ± 1514	8004 ± 387	16221 ± 2772	36848 ± 3333	6581 ± 81,8
38	2,82 ± 1,31	19094 ± 531	8078 ± 990	1592 ± 871	57997 ± 3992	849 ± 26,3
39	<LOQ	10183 ± 500	15752 ± 795	16130 ± 6514	22520 ± 1216	573 ± 12,2
40	20,1 ± 7,13	54165 ± 6143	14888 ± 1160	233410 ± 30752	54699 ± 6482	759 ± 41,8
41	4,97 ± 2,71	8641 ± 410	5772 ± 613	115071 ± 16532	22596 ± 1933	1150 ± 74,0
42	5,90 ± 5,40	39627 ± 207	7660 ± 510	40835 ± 11770	107777 ± 3618	3969 ± 133
43	11,0 ± 1,63	31235 ± 1980	6685 ± 1168	17582 ± 3081	92299 ± 6930	1327 ± 142
44	13,3 ± 6,02	35822 ± 1312	7765 ± 799	25420 ± 2579	81463 ± 6169	3451 ± 234
45	10,1 ± 8,44	20198 ± 366	8413 ± 467	2356 ± 1170	52853 ± 692	1229 ± 101
46	<LOQ	12766 ± 1190	8281 ± 558	20762 ± 4340	42658 ± 1318	2239 ± 12,4
47	7,29 ± 1,08	29227 ± 111	9031 ± 719	24646 ± 2693	86109 ± 1973	1535 ± 8,81
48	1,60 ± 1,11	41684 ± 859	7969 ± 715	4088 ± 952	97113 ± 2296	847 ± 23,6
49	12,1 ± 1,21	15561 ± 474	8033 ± 1112	1528 ± 129	74323 ± 4722	299 ± 4,54

50	$1,09 \pm 0,768$	32965 ± 570	7953 ± 243	26004 ± 5765	65528 ± 3401	$2427 \pm 60,7$
51	$10,4 \pm 1,18$	15119 ± 252	8003 ± 590	11379 ± 7838	50399 ± 1501	$1248 \pm 12,1$
52	$6,11 \pm 1,04$	10586 ± 112	7062 ± 430	38562 ± 1780	76707 ± 5023	$653 \pm 27,4$
53	$11,0 \pm 8,30$	17898 ± 253	8462 ± 939	11456 ± 3004	105676 ± 4248	$1970 \pm 16,3$
54	$4,35 \pm 0,690$	16697 ± 418	7969 ± 751	17614 ± 1944	35115 ± 2900	$1083 \pm 42,2$
55	$5,35 \pm 1,55$	27113 ± 1211	8685 ± 372	12798 ± 1432	91383 ± 6121	$167 \pm 16,8$
56	$7,64 \pm 10,8$	90140 ± 10291	6850 ± 543	34775 ± 6321	105384 ± 28320	2853 ± 753
57	$21,1 \pm 6,86$	155958 ± 11176	7586 ± 624	69571 ± 7057	127039 ± 35982	3468 ± 1032
58	$4,89 \pm 0,757$	41707 ± 4633	6730 ± 963	23310 ± 2266	67938 ± 8145	2054 ± 153
59	$1,90 \pm 0,625$	113502 ± 5156	8137 ± 767	16326 ± 1276	105281 ± 2085	4359 ± 240
60	$5,89 \pm 0,631$	9838 ± 392	8076 ± 573	31960 ± 11473	35830 ± 1791	$1862 \pm 82,6$

Tabela 2. Teores médios e desvios padrão para Fe, Cu, Zn, Ba e Pb ($\mu\text{g kg}^{-1}$) em amostras de méis.

Amostras	$^{56}\text{Fe}^+$	$^{65}\text{Cu}^+$	$^{68}\text{Zn}^+$	$^{138}\text{Ba}^+$	$^{206}\text{Pb}^+$	$^{207}\text{Pb}^+$
1	1353 \pm 269	2977 \pm 76,0	1174 \pm 126	142 \pm 4,14	<LOQ	<LOQ
2	1527 \pm 438	203 \pm 27,1	1708 \pm 349	124 \pm 62,7	<LOQ	<LOQ
3	1323 \pm 108	293 \pm 10,5	1985 \pm 276	394 \pm 45,9	<LOQ	<LOQ
4	1955 \pm 1226	385 \pm 104	2365 \pm 782	19,7 \pm 7,14	6,11 \pm 1,93	<LOQ
5	1180 \pm 85,4	269 \pm 26,6	2123 \pm 92,4	755 \pm 38,3	<LOQ	<LOQ
6	785 \pm 445	3533 \pm 53,2	1048 \pm 102	28,8 \pm 17,14	7,79 \pm 3,73	<LOQ
7	694 \pm 66,0	141 \pm 44,9	654 \pm 244	13,1 \pm 3,67	<LOQ	<LOQ
8	1555 \pm 507	593 \pm 115	563 \pm 155	89,9 \pm 14,3	<LOQ	<LOQ
9	801 \pm 76,9	442 \pm 30,4	1347 \pm 33,6	10,2 \pm 3,65	<LOQ	<LOQ
10	12744 \pm 2107	131 \pm 21,9	778 \pm 253	85,0 \pm 22,9	<LOQ	<LOQ
11	954 \pm 29,6	384 \pm 4,49	981 \pm 121	415 \pm 46,0	<LOQ	<LOQ
12	2186 \pm 158,3	319 \pm 1,90	2198 \pm 304	273 \pm 17,8	<LOQ	<LOQ
13	971 \pm 65,7	237 \pm 6,20	1445 \pm 149	157 \pm 3,18	<LOQ	<LOQ
14	3623 \pm 527	1086 \pm 358	3725 \pm 1174	537 \pm 71,1	<LOQ	<LOQ
15	7885 \pm 262	<LOQ	231 \pm 185	50,6 \pm 37,3	<LOQ	<LOQ
16	1421 \pm 107	115 \pm 11,3	2420 \pm 368	3,99 \pm 16,3	<LOQ	<LOQ

17	4873 ± 106	68,8 ± 8,33	877 ± 167	213 ± 75,8	<LOQ	<LOQ
18	672 ± 110	104 ± 11,0	978 ± 115	826 ± 21,8	<LOQ	<LOQ
19	1176 ± 292	156 ± 74,3	919 ± 67,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ
20	919 ± 312	52,6 ± 7,16	659 ± 54,0	136 ± 44,2	<LOQ	<LOQ
21	<LOQ	2302 ± 378	1373 ± 166	<LOQ	<LOQ	<LOQ
22	1386 ± 157	192 ± 40,3	1579 ± 94,0	56,2 ± 7,66	<LOQ	<LOQ
23	2067 ± 543	170 ± 4,11	1077 ± 83,5	2538 ± 132	<LOQ	<LOQ
24	<LOQ	245 ± 28,5	764 ± 17,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ
25	2063 ± 126	153 ± 3,47	2071 ± 77,6	<LOQ	<LOQ	<LOQ
26	427 ± 58,5	59,2 ± 11,8	1463 ± 44,6	152 ± 8,87	<LOQ	<LOQ
27	8631 ± 603	623 ± 35,4	2244 ± 241	2105 ± 19,2	<LOQ	<LOQ
28	4560 ± 326	149 ± 18,7	1132 ± 67,4	<LOQ	<LOQ	<LOQ
29	1218 ± 183	118 ± 65,0	697 ± 63,3	274 ± 114	<LOQ	<LOQ
30	1183 ± 366	185 ± 72,2	864 ± 124	292 ± 130	<LOQ	<LOQ
31	425 ± 104	31,6 ± 6,54	8087 ± 1123	910 ± 73,7	<LOQ	<LOQ
32	194 ± 106	330 ± 169	556 ± 211	<LOQ	<LOQ	<LOQ
33	73,9 ± 12,4	338 ± 11,0	611 ± 32,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ
34	407 ± 82,4	93,6 ± 19,0	1238 ± 61,8	937 ± 69,6	<LOQ	<LOQ

35	467 ± 96,5	135 ± 79,7	1548 ± 21,2	163 ± 57,8	<LOQ	<LOQ
36	748 ± 359	103 ± 11,7	1223 ± 101	<LOQ	<LOQ	<LOQ
37	1039 ± 112	229 ± 19,1	2233 ± 68,0	115 ± 19,3	<LOQ	<LOQ
38	2542 ± 196	237 ± 23,1	916 ± 169	<LOQ	<LOQ	<LOQ
39	173 ± 10,9	115 ± 74,9	688 ± 350	<LOQ	<LOQ	<LOQ
40	1325 ± 152	147 ± 29,1	1400 ± 69,2	277 ± 57,2	<LOQ	<LOQ
41	234 ± 969	52,7 ± 7,15	805 ± 57,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ
42	2499 ± 125	130 ± 17,1	1620 ± 11,1	1256 ± 542	<LOQ	<LOQ
43	2390 ± 583	296 ± 60,0	1749 ± 571	<LOQ	<LOQ	<LOQ
44	2354 ± 464	635 ± 49,3	2504 ± 935	<LOQ	<LOQ	<LOQ
45	4918 ± 718	188 ± 32,7	1070 ± 211	86,4 ± 33,3	<LOQ	<LOQ
46	979 ± 196	165 ± 21,1	709 ± 173	233 ± 19,6	<LOQ	<LOQ
47	3121 ± 282	186 ± 27,2	706 ± 102	31,3 ± 5,22	<LOQ	<LOQ
48	2152 ± 319	84,6 ± 20,2	499 ± 168	252 ± 18,0	<LOQ	<LOQ
49	2278 ± 193	105 ± 6,47	2171 ± 140	<LOQ	<LOQ	<LOQ
50	2660 ± 62,7	203 ± 202	1124 ± 180	<LOQ	<LOQ	<LOQ
51	1390 ± 28,0	67,0 ± 4,30	1326 ± 211	20,1 ± 24,9	<LOQ	<LOQ
52	5728 ± 364	16,0 ± 1,18	344 ± 37,9	<LOQ	<LOQ	<LOQ

53	1480 ± 131	88,3 ± 38,5	3353 ± 171	<LOQ	28,9 ± 11,0	37,8 ± 10,9
54	965 ± 149	332 ± 137	813 ± 139	<LOQ	<LOQ	<LOQ
55	1422 ± 188	218 ± 24,7	2353 ± 187	<LOQ	<LOQ	<LOQ
56	1583 ± 104	950 ± 138	1846 ± 541	239 ± 56,1	<LOQ	<LOQ
57	2510 ± 135	1892 ± 157	2359 ± 706	302 ± 101	<LOQ	<LOQ
58	588 ± 70,3	367 ± 46,0	1982 ± 264	<LOQ	0,830 ± 0,447	7,68 ± 6,01
59	3197 ± 270	810 ± 43,1	2927 ± 167	73,5 ± 9,66	<LOQ	<LOQ
60	838 ± 54,6	193 ± 10,2	1391 ± 52,0	<LOQ	39,8 ± 10,3	57,4 ± 10,2
