

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE – UNICENTRO

GISLAINE PUCHOLOBEK

PERFIL ELEMENTAR DE AMOSTRAS DE MEL DE ABELHA SEM FERRÃO

GUARAPUAVA
2020

GISLAINE PUCHOLOBEK

PERFIL ELEMENTAR DE AMOSTRAS DE MEL DE ABELHA SEM FERRÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, setor de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof. Dr^a Sueli Pércio Quináia
Co-orientadora: Dr^a Camila Kulek de Andrade

GUARAPUAVA
2020

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

P977p Pucholobek, Gislaine
Perfil elementar de amostras de mel de abelha sem ferrão / Gislaine Pucholobek. -- Guarapuava, 2020.
xvi, 77 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.

Orientadora: Sueli Pércio Quináia
Coorientadora: Camila Kulek de Andrade
Banca examinadora: Maria Lurdes Felsner, Eliane Sloboda Rigobello

Bibliografia

1. Química. 2. Metais. 3. Mel de Abelhas nativas. 4. F AAS. 5. Amostragem em suspensão. 6 Validação de métodos. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

| CDD 540

GISLAINE PUCHOLOBEK

PERFIL ELEMENTAR DE AMOSTRAS DE MEL DE ABELHA SEM FERRÃO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovado em 20 de fevereiro de 2020.



Prof.^a. Dr.^a. Eliane Sloboda Rigobello - UTFPR



Prof.^a. Dr.^a. Maria Lurdes Felsner - UNICENTRO



Dr.^a. Camila Kulek de Andrade - Co-orientadora



Prof.^a. Dr.^a. Sueli Pércio Quináia - Orientadora

GUARAPUAVA-PR

2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos que estiveram comigo ao longo dessa caminhada. Primeiramente a Deus por não me deixar sozinha, mesmo quando pensei que estava;

As minhas orientadoras Prof^a Dr^a Sueli Pércio Quináia e a Dr^a Camila Kulek de Andrade, por todos os ensinamentos, pela experiência em ser orientada por grandes profissionais como vocês, pela colaboração e paciência comigo para que este trabalho fosse concluído;

Pela colaboração ao longo do desenvolvimento e conclusão deste trabalho por parte dos membros da banca examinadora, Prof^a Dr^a Andressa Galli, Prof^a Dr^a Maria Lurdes Felsner, Prof^a Dr^a Yohandra Reyes Torres e em especial a Prof^a Dr^a Eliane Sloboda Rigobello, por ceder as amostras além de sua contribuição;

A minha família, que sempre será meu porto seguro, meus pais Eli de Oliveira Pucholobek e Wilson Pucholobek, minha irmã Gisélle Pucholobek Horodenski, meu cunhado Mateus Horodenski e minhas amadas sobrinhas Maria Isabel Pucholobek Horodenski, Maria Elisa Pucholobek Horodenski e Maria Cecília Pucholobek Horodenski;

Ao meu companheiro Roberto Marcondes Baptista Netto, por sempre me apoiar, me motivar a ser uma pessoa cada dia melhor e por me apresentar pessoas maravilhosas que me apoiaram imensamente, as quais estarão para sempre em meu coração;

As amigas que conquistei nesse período, Patrícia Cucchi, Kellyn Nebesnik, Carine Vieira e demais alunos da turma do Mestrado de 2018; além daqueles que sempre estiveram e estarão comigo, dentro do meu coração, Taís Fernanda de Souza, Manoel Henrique Estércio Plácido, Ana Paula Gelinski, Jéssica Paes Berardi e Roberta Cristina Veloso Possebon;

Aos colegas do laboratório de pesquisa LABGATI;

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UNICENTRO;

A CAPES pela bolsa concedida;

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta etapa e contribuíram para a realização deste trabalho.

“A (árdua) tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
Arthur Schopenhauer

RESUMO

O mel de Abelhas Sem Ferrão (ASF), espécie nativa do Brasil, é um produto utilizado com diferentes finalidades devido à sua composição. Vale destacar a presença de espécies metálicas, as quais podem apresentar efeito nutritivo ou tóxico, dependendo da quantidade ingerida ou do metal presente, além da possibilidade de ser empregado como bio-indicador ambiental. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método rápido para determinação dos metais Fe, Mn, Mg e Ca em mel de ASF por F AAS. O desempenho do método analítico proposto foi avaliado comparando três procedimentos de amostragem em suspensão, com a digestão assistida por micro-ondas. Para todos os procedimentos utilizou-se 1,0 g de mel. O método A, foi realizado empregando HNO_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$); o método B, HNO_3 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$) e H_2O_2 (3% m/v); e o método C, apenas água ultrapura. As determinações de Fe, Mn, Ca e Mg foram realizadas empregando a Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS). Neste estudo, as maiores taxas de extração dos metais, foram observadas para os métodos A e B, com porcentagens superiores a 80% para todos os metais avaliados, enquanto que o método C apresentou extração adequada apenas para Mg. O método B foi escolhido, devido as maiores taxas de extração obtidas para todos os metais através dos ensaios realizados. Após a escolha do método mais adequado, foi realizada uma otimização univariada, avaliando a massa de mel de 0,5 a 2,0 g, a concentração de HNO_3 de 0,1 a $0,9 \text{ mol L}^{-1}$, a concentração de H_2O_2 de 1 a 9% m/v e o tempo de agitação ultrassônica de 5 a 20 minutos. As condições ótimas definidas para os metais foram: 1,0 g de mel, HNO_3 ($1,4 \text{ mol L}^{-1}$), H_2O_2 (1,0%, m/v) e 5 minutos de agitação ultrassônica para Fe, Mn e Mg; e 2,5 g de mel, HNO_3 ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$), H_2O_2 (3,0%, m/v) e 10 minutos de agitação ultrassônica para o Ca. A validação da condição otimizada, foi realizada avaliando-se os limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão e exatidão. Durante a validação do método analítico proposto, a curva analítica de padrão externo apresentou linearidade adequada na determinação dos metais Fe, Mn, Mg e Ca. Os limites de detecção e quantificação obtidos estiveram entre $0,2 - 4,3 \mu\text{g g}^{-1}$, sendo considerados baixos e adequados, de acordo com a técnica e a metodologia utilizada. A precisão do método apresentou valores de Desvio Padrão Relativo (DPR) abaixo de 10% para medidas intra e inter dias, e valores Horrat entre 0,5 (Fe) – 1,2 (Ca), sendo que ambos estiveram dentro dos critérios de aceitabilidade recomendados por órgãos regulamentadores. Para a exatidão, comparando o método proposto com a digestão por via seca, foram encontrados valores entre 86,5% (Ca) e 96,8% (Mg), os quais estão dentro da faixa de aceitabilidade para este parâmetro. Após otimização e validação, foi realizada a aplicação do método analítico para a quantificação de 88 amostras de mel advindas de diferentes regiões do Brasil. Foi possível quantificar Fe em 88,6% das amostras nas quais as concentrações variaram de ND a $123,9 \pm 1,5 \mu\text{g g}^{-1}$. Em relação a Mn, foi possível quantificá-lo em 95,5% das amostras, variando sua concentração de ND a $41,9 \pm 4,7 \mu\text{g g}^{-1}$. Para Mg e Ca, os quais são os minerais mais abundantes no mel, foi possível quantificá-los na maioria das amostras, suas concentrações variaram entre $1,6 \pm 0,3$ a $351,5 \pm 9,6 \mu\text{g g}^{-1}$ e $<\text{LD} \rightarrow 0,04 \pm 0,01$ a $363,8 \pm 6,4 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. A ordem de concentração média nas amostras foi de $\text{Ca} > \text{Mg} > \text{Mn} > \text{Fe}$. Os teores obtidos no presente trabalho são semelhantes aos teores encontrados na literatura para as espécies avaliadas. O método analítico proposto mostrou-se como um recurso eficiente na quantificação de Fe, Mn, Mg

e Ca em mel, quando comparado a métodos tradicionais de digestão de amostras utilizando F AAS, pois apresentou vantagens na minimização de alguns fatores indesejados, como a redução de tempo e volume de reagentes além de mostrar-se adequado, uma vez que os resultados obtidos na validação deste método estão dentro dos critérios de aceitabilidade de órgãos regulamentadores nacionais e internacionais. A quantificação dos metais avaliados em um número significativo de amostras pode fornecer informações relevantes sobre as regiões de cultivo do mel e as espécies das ASF. Através da análise de componentes principais verificou-se que o mel das ASF analisados no presente estudo, possuem maiores teores dos metais, avaliados, do que o mel da espécie *Apis mellifera* oriundas do Brasil e de outros países, bem como o mel de ASF de outros estados brasileiros.

Palavras-chave: Metais, Mel de Abelhas nativas, F AAS, Amostragem em suspensão, Validação de métodos.

ABSTRACT

The stingless bees (SB) honey, a species native to Brazil, is a product used for different purposes due to its composition. It is worth mentioning the presence of metallic species, which can have a nutritional or toxic effect, depending on the amount ingested or the metal present, in addition to the possibility of being used as an environmental bio-indicator. The objective of this work was to develop a fast method for determining the metals Fe, Mn, Mg and Ca in SB honey by F AAS. The performance of the proposed analytical method was evaluated by comparing three slurry sampling procedures with microwave assisted digestion. For all procedures, 1.0 g of honey was used. Method A was performed using HNO₃ (0.1 mol L⁻¹); method B, HNO₃ (0.2 mol L⁻¹) and H₂O₂ (3%, w/v); and method C, only ultrapure water. Determinations of Fe, Mn, Ca and Mg were performed using Flame Atomic Absorption Spectrometry (F AAS). In this study, the highest metal extraction rates were observed for methods A and B, with percentages greater than 80% for all metals evaluated, while method C showed adequate extraction only for Mg. Method B was chosen, due to the higher extraction rates obtained for all metals through the tests performed. After choosing the most appropriate method, univariate optimization was performed, evaluating the honey mass from 0.5 to 2.0 g, the HNO₃ concentration from 0.1 to 0.9 mol L⁻¹, the concentration of H₂O₂ from 1 to 9% (w/v) and the ultrasonic stirring time of 5 to 20 minutes. The optimum conditions defined for the metals were: 1.0 g of honey, HNO₃ (1.4 mol L⁻¹), H₂O₂ (1.0%, w/v) and 5 minutes of ultrasonic stirring for Fe, Mn and Mg; and 2.5 g of honey, HNO₃ (0.2 mol L⁻¹), H₂O₂ (3.0%, w/v) and 10 minutes of ultrasonic agitation for Ca. The validation of the optimized condition was performed by evaluating the detection limits and quantification, linearity, precision and accuracy. During the validation of the proposed analytical method, the external standard analytical curve showed adequate linearity in the determination of the metals Fe, Mn, Mg and Ca. The limits of detection and quantification obtained were between 0.2 - 4.3 µg g⁻¹, being considered low and adequate, according to the technique and methodology used. The precision of the method showed Relative Standard Deviation (RSD) values below 10% for intra- and inter-day measurements, and Horrat values between 0.5 (Fe) - 1.2 (Ca), both of which were within the criteria of acceptability recommended by regulatory bodies. For accuracy, comparing the proposed method with dry digestion, values between 86.5% (Ca) and 96.8% (Mg) were found, which are within the acceptability range for this parameter. After optimization and validation, the analytical method was applied to quantify 88 honey samples from different regions of Brazil. It was possible to quantify Fe in 88.6% of the samples in which the concentrations varied from ND to 123.9 ± 1.5 µg g⁻¹. It was possible to quantify Mn in 95.5% of the samples, varying its concentration of ND to 41.9 ± 4.7 µg g⁻¹. For Mg and Ca, which are the most abundant minerals in honey, it was possible to quantify them in most samples, their concentrations ranged from 1.6 ± 0.3 to 351.5 ± 9.6 µg g⁻¹ and < LD → 0.04 ± 0.01 to 363.8 ± 6.4 µg g⁻¹, respectively. The

order of concentration in the samples was $Ca > Mg > Mn > Fe$. The levels obtained in the present work are similar to the levels found in the literature for the species evaluated. The proposed analytical method proved to be an efficient resource in the quantification of Fe, Mn, Mg and Ca in honey, when compared to traditional sample digestion methods using F AAS, as it presented advantages in minimizing some unwanted factors, such as the reduction time and volume of reagents, in addition to proving to be adequate, since the results obtained in the validation of this method are within the acceptability criteria of national and international regulatory bodies. The quantification of the metals evaluated in a significant number of samples can provide relevant information about the regions where honey is grown and the species of SB. Through the analysis of main components it was verified that the honey of the SB analyzed in the present study, have higher contents of metals, evaluated, than the honey of the species *Apis mellifera* from Brazil and other countries, as well as the honey of SB from other Brazilian states.

Keywords: Metals, Native Bee Honey, F AAS, Suspended sampling, Validation of methods.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CLASSIFICAÇÃO RESUMIDA DOS TIPOS DE SOLOS PREDOMINANTES NAS REGIÕES DE ESTUDO NO ESTADO DO PARANÁ.....	27
FIGURA 2 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO (A, B E C), COM O MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS.....	35
FIGURA 3 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO (A, B E C) DE AMOSTRAS DE MEL ENRIQUECIDAS COM ÍONS METÁLICOS, EM RELAÇÃO AO MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS....	37
FIGURA 4 – AVALIAÇÃO DAS PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS EM MEL, PARA OS MÉTODOS DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO (A, B E C), UTILIZANDO ENSAIOS DE ADIÇÃO E RECUPERAÇÃO.....	39
FIGURA 5 – ESTUDO UNIVARIADO DA MASSA DE MEL PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Cu, Zn, Mn, Mg e Ca.....	41
FIGURA 6 – ESTUDO UNIVARIADO DA CONCENTRAÇÃO DE HNO ₃ PARA A EXTRAÇÃO DE Fe, Zn, Mn e Mg.....	43
FIGURA 7 – ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE HNO ₃ PARA DETERMINAÇÃO DE Fe EM MEL.....	44
FIGURA 8 – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE HNO ₃ NA DETERMINAÇÃO DE Mn E Mg.....	45
FIGURA 9 – ESTUDO UNIVARIADO DA PORCENTAGEM DE H ₂ O ₂ PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Zn, Mn, Mg E Ca EM MEL.....	46
FIGURA 10 – ESTUDO UNIVARIADO DO TEMPO DE ULTRASSOM PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Zn, Mn, Mg E Ca EM MEL.....	47
FIGURA 11 – CURVAS ANALÍTICAS COM PE (●), ME (■) E AP (◆) OBTIDAS NA DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn, Mg E Ca.....	49
FIGURA 12 – CURVAS ANALÍTICAS COM PE (●), ME (■) E AP (◆) OBTIDAS NA DETERMINAÇÃO DE Zn.....	50

FIGURA 13 – GRÁFICO DE PESOS (a) E GRÁFICO DE ESCORES (b) PARA AS COMPONENTES PRINCIPAIS 1 E 2 OBTIDAS COM A ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS DE MEL.....	63
FIGURA 14 – GRÁFICO DE PESOS (a) E GRÁFICO DE ESCORES (b) PARA AS COMPONENTES PRINCIPAIS 1 E 2 OBTIDAS COM A ANÁLISE MULTIVARIADA DOS TEORES DE Fe, Mn, Mg E Ca.....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – CONDIÇÕES DE OTIMIZAÇÃO DO F AAS PARA DETERMINAÇÃO DOS METAIS EM MEL DE ABELHA SEM FERRÃO.....	23
TABELA 2 – RELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DE ASF E A REGIÃO DE COLETA (continua).....	23
TABELA 2 – RELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DE ASF E A REGIÃO DE COLETA (continuação).....	24
TABELA 2 – RELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DE ASF E A REGIÃO DE COLETA (conclusão).....	25
TABELA 3 – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO PARA MEL DE ABELHA SEM FERRÃO.....	29
TABELA 4 – CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA O ESTUDO UNIVARIADO NA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM MEL DE ABELHA SEM FERRÃO.....	30
TABELA 5 – CONDIÇÕES DE PREPARO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA Fe, Zn, Mn, Mg E Ca.....	31
TABELA 6 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA NA DETERMINAÇÃO DE Fe E Mg POR F AAS EM AMOSTRAS DE MEL DE ASF E APLICAÇÃO DO TESTE TUKEY DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS.....	35
TABELA 7 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA NA DETERMINAÇÃO DE Fe, Zn, Cu E Mn POR F AAS EM AMOSTRAS DE MEL DE ASF ENRIQUECIDAS E APLICAÇÃO DO TESTE <i>TUKEY</i> DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS.....	37
TABELA 8 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA NA DETERMINAÇÃO DE Fe, Zn, Cu E Mn POR F AAS EM AMOSTRAS DE MEL DE ASF ENRIQUECIDAS E APLICAÇÃO DO TESTE <i>TUKEY</i> DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS.....	39

TABELA 9 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO ESTUDO UNIVARIADO DA RELAÇÃO MASSA/VOLUME DE MEL PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Cu, Zn, Mn, Mg e Ca E APLICAÇÃO DO TESTE <i>TUKEY</i> DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS.....	42
TABELA 10 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO ESTUDO UNIVARIADO DA CONCENTRAÇÃO DE HNO ₃ PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Zn, Mn, Mg e Ca E APLICAÇÃO DO TESTE <i>TUKEY</i> DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS...43	
TABELA 11 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO ESTUDO UNIVARIADO DA CONCENTRAÇÃO DE H ₂ O ₂ PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Zn, Mn, Mg e Ca E APLICAÇÃO DO TESTE <i>TUKEY</i> DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS.. 47	
TABELA 12 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO ESTUDO UNIVARIADO DO TEMPO DE AGITAÇÃO ULTRASSÔNICA PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Zn, Mn, Mg e Ca E APLICAÇÃO DO TESTE <i>TUKEY</i> DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS.....	48
TABELA 13 – AVALIAÇÃO DOS COEFICIENTES LINEARES E ANGULARES NAS EQUAÇÕES DA RETA PARA OS METAIS QUANTIFICADOS EM MEL.....	51
TABELA 14 – PARÂMETROS DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA Fe, Zn, Mn, Mg E Ca.....	52
TABELA 15 – DADOS DE LINEARIDADE PARA Fe, Zn, Mn, Mg E Ca.....	53
TABELA 16 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO OBTIDOS PARA Fe, Mn, Mg E Ca, EMPREGANDO A TÉCNICA DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO E F AAS.....	54
TABELA 17 – VALORES REFERENTES AO ESTUDO DE PRECISÃO (REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA) E VALOR HORRAT UTILIZANDO AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO	56
TABELA 18 – VALORES DE RECUPERAÇÃO (%) PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn, Mg E Ca EM MEL DE ASF.....	57

TABELA 19 – CONCENTRAÇÃO TOTAL DOS METAIS Fe, Mn, Mg E Ca EM MEL DE ASF EMPREGANDO A TÉCNICA DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO (continua).....	57
TABELA 19 – CONCENTRAÇÃO TOTAL DOS METAIS Fe, Mn, Mg E Ca EM MEL DE ASF EMPREGANDO A TÉCNICA DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO (continuação).....	58
TABELA 19 – CONCENTRAÇÃO TOTAL DOS METAIS Fe, Mn, Mg E Ca EM MEL DE ASF EMPREGANDO A TÉCNICA DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO (continuação).....	59
TABELA 19 – CONCENTRAÇÃO TOTAL DOS METAIS Fe, Mn, Mg E Ca EM MEL DE ASF EMPREGANDO A TÉCNICA DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO (conclusão).....	60
TABELA 20 – TEORES DE Fe, Mn, Mg e Ca PARA DIFERENTES ESPÉCIES DE ASF.....	60
TABELA 21 – ESTIMATIVA DE INGESTÃO DE Fe, Mn, Mg E Ca ATRAVÉS DO CONSUMO DIÁRIO DE MEL DE ASF.....	65
TABELA 22 – PORCENTAGENS DE CONTRIBUIÇÃO DIÁRIA DOS METAIS Fe, Mn, Mg E Ca.....	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAS	Espectrometria de Absorção Atômica, do inglês <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>
ACP	Análise de Componentes Principais, do inglês <i>Principal Components Analysis</i>
AES	Espectrometria de Emissão Atômica, do inglês <i>Atomic Emission Spectrometry</i>
AP	Curva analítica de adição de padrão
ASF	Abelhas sem ferrão
ANOVA	Análise de variância
C	Fração de massa decimal
C. A. C.	<i>Codex Alimentarius Commission</i>
CP	Componente Principal
DPR	Desvio Padrão Relativo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica em Forno de Grafite, do inglês <i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>
ICP-MS	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Mass Emission Spectrometry</i>
ICP-OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
IDR	Ingestão Diária Recomendada
IHC	Comissão Internacional do Mel, do inglês <i>International Honey Commission</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
ME	Curva analítica em meio similar ao meio extrator
MRC	Material de Referência Certificado
ND	Não detectado
PE	Curva analítica com padrão externo

PRSDr	Desvio padrão predito que é dado pela equação de Horwitz
r	Coeficiente de Correlação
R ²	Coeficiente de determinação
REC	Recuperação analítica
RSDri	Desvio padrão relativo para análises em dias diferentes
SB	<i>Stingless Bees</i>
TXRF	Espectrometria de Fluorescência de raios X por reflexão total, do inglês <i>Micro X-ray fluorescence spectrometry</i>

SUMÁRIO

1	Introdução e justificativa	5
2	Referencial Teórico.....	9
2.1	Mel de abelha sem ferrão: breve histórico e contexto atual	9
2.2	Abelhas sem ferrão e suas características.....	10
2.3	Composição do mel e seu emprego como bioindicador ambiental .	11
2.4	Determinação de Metais em Mel.....	14
2.5	Procedimentos para Tratamento de Amostras de Mel	15
	2.5.1 Amostragem em Suspensão.....	17
3	Objetivos.....	21
3.1	Objetivos Gerais.....	21
3.2	Objetivos Específicos	21
4	Material e Métodos	22
4.1	Reagentes e Equipamentos	22
4.2	Amostras de mel	23
4.3	Procedimentos analíticos para o preparo de amostras de mel de abelha sem ferrão	28
	4.3.1 Procedimento de Digestão por via Úmida	28
	4.3.2 Procedimento de Digestão por via Seca.....	28
	4.3.3 Procedimento de Amostragem em Suspensão.....	29
4.4	Otimização Univariada dos métodos analíticos empregados para determinação de metais em mel de abelha sem ferrão	29
4.5	Validação do método analítico proposto	30
	4.5.1 Curvas Analíticas e Linearidade.....	30
	4.5.2 Limites de Detecção e Quantificação.....	31
	4.5.3 Precisão	32
	4.5.4 Exatidão.....	32
5	Resultados e Discussão	34

5.1 Desenvolvimento e otimização de métodos analíticos para determinação de metais em mel de ASF.....	34
5.2 Otimização do método analítico para determinação de metais em mel de ASF através de um estudo univariado.....	40
5.3 Validação do método analítico proposto para determinação de metais em mel de ASF	49
5.3.1 Linearidade.....	49
5.3.2 Limites de detecção e quantificação.....	54
5.3.3 Precisão.....	55
5.3.4 Exatidão.....	56
5.4 Determinação da Concentração Total de Metais em de Mel de ASF	57
5.5 Análise Estatística das Concentrações de Metais em Mel de ASF empregando Análise dos Componentes Principais (ACP).....	62
5.6 Grau de Ingestão Humana de Fe, Mn, Mg e Ca em Função do Consumo de mel de ASF.....	65
6 Considerações Finais	67

1 Introdução e justificativa

O conhecimento acerca da utilização do mel como alimento ou com finalidades medicinais, permeia a humanidade desde muito tempo e de diversas formas, devido ao seu alto valor nutricional, sendo uma rica fonte de açúcar e por apresentar propriedades terapêuticas (ESCOBAR; XAVIER, 2013; RAO et al., 2016). Dentre as diversas propriedades medicinais já conhecidas, tais como auxílio em cicatrizações, doenças intestinais, dentre outras, vale ressaltar suas atividades antibacteriana e antioxidante (TUKSITHAA et al., 2018).

De acordo com a *Codex Alimentarius Commission* – C. A. C. (2001) (comissão de orientações e recomendações relativas a produção e segurança alimentar) o mel é caracterizado e definido, de modo geral, como um “fluido viscoso, aromático e doce, produzido por abelhas a partir do néctar das flores, de secreções de partes vivas das plantas ou até mesmo de excreções de insetos sugadores que entram em contato com essas partes.” A partir daí as abelhas modificam e articulam esses substratos com substâncias próprias para posterior armazenamento e maturação nos favos das colmeias (CARVALHO et al., 2005; NORDIN et al., 2018).

O crescente interesse na utilização do mel com distintas finalidades se deve principalmente à sua composição. A composição química e algumas características como cor, aroma, sabor, dentre outras, podem variar de acordo com a origem do néctar da espécie vegetal, condições climáticas, condições de armazenamento, origem botânica, a espécie da abelha, dentre outros fatores (CHUTTONG et al., 2016).

A criação da espécie *Apis mellifera* é difundida em todo o mundo, e em termos de produtividade é a mais utilizada e a mais conhecida. No entanto, essa não é a única espécie de abelha produtora de mel. As abelhas nativas, ou sem ferrão, vem ganhando destaque no cenário produtor de mel. Cada vez mais têm surgido um interesse maior pelo mel produzido pelas Abelhas Sem Ferrão (ASF) devido as características intrínsecas deste produto (ÁVILA et al., 2019).

Porém a produção deste tipo de mel é relativamente menor. Enquanto a *Apis mellifera* tem uma produção de 20,0 kg de mel por colmeia, as ASF produzem entre 1,0 e 5,0 kg de mel por ano, dependendo da espécie, o que pode ser um fator limitante para sua comercialização bem como para a caracterização deste produto. Porém, em

contrapartida, os valores atribuídos ao mel das ASF são significativamente maiores que o mel da *Apis mellifera*, devido ao fato da composição do mel das ASF possuir características próprias e que o diferem do mel comumente consumido (CHUTTONG et al., 2016; ÁVILA et al., 2018). Conseqüentemente, a sua criação vem adquirindo grande relevância no mercado tradicional deste tipo de produto.

Além da produção de mel das ASF ser um fator limitante para que este produto seja melhor difundido, os estudos sobre esse produto ainda são escassos e os parâmetros utilizados para estabelecer padrões de qualidade baseiam-se apenas nas características do mel da *Apis mellifera* (BOGDANOV, 2009; KARABAGIAS, et al., 2014; VERZERA et al., 2014).

Dentre os parâmetros utilizados pela Legislação Brasileira (BRASIL, 2000) a qual se baseia nos parâmetros da Comissão Internacional do Mel (*International Honey Commission – IHC*) (BOGDANOV, 2009), para a avaliação da qualidade do mel, o teor de cinzas é o parâmetro que se refere ao teor total de minerais presentes no mesmo. De acordo com a legislação vigente, o máximo permitido de cinzas é de 0,6% para mel de flores, e de 1,0% para o mel de melato (BRASIL, 2000). A presença e a quantidade destes pode variar devido a inúmeros fatores, inclusive espécie das abelhas.

O mel enquanto alimento rico em nutrientes (KARABAGIAS et al., 2014) possui uma grande variedade de elementos químicos em sua composição, dentre eles alguns considerados como essenciais para o organismo. Por exemplo, macronutrientes como o Ca, Na e K, são fundamentais para a construção e manutenção dos ossos, funcionalidade dos nervos e músculos, para o equilíbrio osmótico entre as células e o fluido intersticial (NEVES, et al., 2009).

Já foram identificados no mel, cerca de 54 elementos químicos, e a classificação desses elementos pode ser dividida em três categorias: elementos principais ou macroelementos, microelementos e os elementos traços (MOHAMMED et al., 2017). Ainda que a quantidade de metais presentes no mel seja relativamente baixa (cerca de 0,1 a 0,2% de sua composição), elementos como K, Na, Ca e Mg, estão classificados entre os macroelementos, devido ao fato de serem encontrados majoritariamente (HERNANDEZ et al., 2005; NEVES, et al., 2009; MOHAMMED et al., 2017). Já elementos como Fe, Cu e Zn, são encontrados em quantidades menores,

além da possível presença de metais tóxicos (Pb, Cd, Cr, etc) (DE ANDRADE et al., 2014b).

A ocorrência destes elementos no mel pode estar relacionada às condições geográficas e botânicas da região ou de ações antropogênicas. As abelhas percorrem grandes áreas espaciais, entrando em contato com diferentes superfícies, e conseqüentemente, se houver possíveis contaminantes, as abelhas podem transportá-los aumentando o seu teor no mel, acentuando assim sua capacidade como potencial indicador ambiental (POHL et al., 2009; BATISTA et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2018; ZHOU et al., 2018).

A quantificação de metais no mel é de grande relevância, uma vez que a presença destes está relacionada à absorção da planta, do solo e do ambiente onde ocorre a coleta do néctar pelas abelhas, acarretando também na mudança de coloração do mel (POHL et al., 2009). Dentre as técnicas mais empregadas na determinação dessas espécies inorgânicas em mel, que normalmente encontram-se em baixas concentrações, estão as técnicas espectrométricas baseadas em absorção ou emissão atômica (POHL et al., 2009; BILUCA et al., 2017; ZHOU et al., 2018).

Atualmente, técnicas de emissão atômica vêm sendo empregadas com mais frequência na quantificação de metais em méis de ASF. Biluca et al. (2017) e Lemos et al. (2018) empregaram as técnicas ICP – MS (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) e ICP – OES (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*), respectivamente, na quantificação de metais em méis de ASF. Essas técnicas possuem alta sensibilidade, porém com custos de análise elevados devido ao fato de que vários componentes têm vida útil limitada e precisam ser substituídos, além do valor e utilização do gás argônio serem elevados quando comparados às técnicas de AAS (do inglês, *Atomic absorption spectroscopy*) (TYLER, 2001).

A técnica de F AAS é comumente empregada na determinação de metais em matrizes alimentares (POHL, 2017). Isso se deve principalmente ao fato de que esta caracteriza-se como uma técnica robusta, relativamente barata quando comparada a outras técnicas e alguns métodos analíticos correspondentes estão bem estabelecidos e validados (FERNÁNDEZ; LOBO; PEREIRO, 2019).

Para que sejam empregadas tais técnicas na quantificação de metais em amostras como o mel, é necessário que inicialmente a amostra passe por uma etapa

de preparo para que os analitos de interesse estejam disponíveis para quantificação. Nesse contexto, a amostragem em suspensão se apresenta como uma alternativa com potencial para a simplificação desta etapa, pois articula vantagens da amostragem líquida e sólida, evitando alguns problemas relacionados à amostragem direta de sólidos (MAGALHÃES, ARRUDA, 1998; PENG et al., 2015).

A amostragem em suspensão consiste basicamente em uma suspensão de partículas insolúveis em solução ácida ou em outros meios, a fim de possibilitar a homogeneização da amostra e a liberação de oligoelementos (SARDDANS, MONTES, PEÑUELAS, 2010). Dentre as vantagens que a técnica proporciona, estão a minimização da perda de analitos voláteis e contaminação da amostra, diminuição de custos e de consumo de reagentes tóxicos e corrosivos, uso de padrões aquosos e/ou métodos de adição de analito para calibração, aplicabilidade em amostras orgânicas e inorgânicas, dentre outras (BOGDANOV et al., 2007).

Nessa perspectiva e diante da escassez de estudos sobre as características e composição do mel das ASF, faz-se necessário o desenvolvimento e aplicação de técnicas que contribuam para o conhecimento deste produto, uma vez que têm grandes efeitos benéficos para o organismo, como já citados anteriormente nesta seção (RAO et al., 2016; TUKSITHAA et al., 2018). Ele também apresenta funções importantes para o meio ambiente, como por exemplo, sua utilização como bioindicador ambiental da região de produção (NASCIMENTO et al., 2018; ZHOU et al., 2018;) e na contribuição para o aperfeiçoamento de parâmetros que estabeleçam padrões de qualidade que atendam às características específicas deste produto.

2 Referencial Teórico

2.1 Mel de abelha sem ferrão: breve histórico e contexto atual

O mel, um dos alimentos mais antigos consumidos pelo homem, foi utilizado como uma das primeiras fontes de açúcar em diversas culturas ao redor do mundo, uma vez que o açúcar da cana-de-açúcar ainda não tinha seu uso muito difundido. Estima-se que o registro mais antigo de atividade apícola seja por volta de 2400 a.C., em regiões de baixo-relevo no Egito, onde também foram encontradas evidências da utilização do mel em receitas datadas de aproximadamente 2000 a.C. (CILLIERS, RETIEF, 2008; FALLAS et al., 2018).

Quando se trata do mel das ASF, também conhecidas como abelhas nativas, os registros mais antigos da sua utilização permeiam os períodos pré-hispânicos, época em que esse produto foi de grande importância no desenvolvimento de comunidades indígenas americanas (CAMARGO, POSEY, 1990).

A cultura indígena brasileira, também esteve intimamente ligada ao cultivo das ASF. Há relatos de que os índios Kaiapó possuíam vasto conhecimento sobre as ASF, inclusive quais flores viriam a produzir um néctar de melhor qualidade, que conseqüentemente diferenciavam o sabor e consistência do mel (MEDINA, GONZALEZ, 1995). O desenvolvimento das práticas de manejo do mel das ASF conhecidas assim devido ao seu ferrão ser atrofiado, também chamadas de meliponíneos, é denominada de meliponicultura, e atribuída aos povos Maia e Nahoá (SOUZA, 2010).

No Brasil, as ASF são espécies nativas e a utilização do seu mel bem como de outros subprodutos (a cera por exemplo), era utilizado na alimentação dos índios e na confecção de velas pelos jesuítas (BALLIVAN et al., 2008). Nota-se a grande diversidade e utilidade dessas espécies nativas, nas palavras do seguinte relato do Padre Anchieta, um dos primeiros viajantes a chegar no Brasil:

Encontram-se quase vinte espécies diversas de abelhas, das quais umas fabricam o mel nos troncos das árvores, outras em cortiços construídos entre os ramos, outras debaixo da terra, donde sucede que haja grande abundância de cera. Usamos do mel para curar feridas, que saram facilmente pela proteção divina. A cera é usada unicamente na fabricação de velas (BALLIVAN et al., 2008, p. 16).

Ainda que sejam relatos antigos, a utilização do mel de ASF está em constante expansão atualmente, devido ao fato deste produto apresentar características distintas como sabor, textura, aroma, fluidez dentre outras, tornando-se atrativo para seus consumidores e agregando valor ao produto (CHUTTONG et al., 2016).

Além de ser um alimento muito utilizado devido à ser rico em açúcar, estudos recentes evidenciam que a utilização do mel com finalidades terapêuticas possui destaque. Fallas (2018) reporta o emprego do mel de ASF, destacando a eficácia e relevância da utilização do mel com finalidades medicinais, como um potencial princípio ativo cicatrizante (FALLAS et al., 2018).

A meliponicultura têm se mostrado, nos últimos anos, como uma atividade com grande potencial econômico devido à peculiaridade que o mel, enquanto produto de comercialização, apresenta (VENTURIERI et al., 2012). Os valores atribuídos a ele podem ser até cinco vezes maiores do que o valor do mel da *Apis mellifera*, dependendo da espécie podem custar até R\$ 100,00/kg (SHADAN et al., 2018).

Nesse contexto, cada vez mais vem sendo atribuído ao mel das ASF uma demanda expressiva no mercado, agregando valor significativo ao produto, sendo esta uma vertente econômica relevante dentro da agricultura de pequenos produtores (NETO et al., 2018).

2.2 Abelhas sem ferrão e suas características

As ASF geralmente são encontradas em regiões de clima tropical e em algumas regiões de clima temperado subtropical. Ao redor do mundo, segundo Chuttong (2016), existem mais de 500 espécies descritas em 32 gêneros, com cerca de 100 novas espécies a serem caracterizadas (CHUTTONG et al., 2016; MICHENER et al., 2007). São agentes polinizadores muito eficientes de plantas nativas, responsáveis por cerca de 40 a 90% da polinização das árvores, outro fator ambiental muito importante para a preservação de tais espécies. No Brasil, são encontradas mais de 300 espécies de ASF, sendo estas distribuídas em 27 gêneros (MAGALHÃES, ARRUDA, 1998; PENG et al., 2015).

As ASF são basicamente divididas em duas tribos: a meliponini e a trigonini. A primeira compreende apenas o gênero *Melipona* que são encontrados nos Neotrópicos incluindo diversas espécies, como Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata* Lepeletier, 1936) e a Manduri (*Melipona marginata* Lepeletier, 1836). A segunda tribo,

Trigonini com ocorrência nos trópicos, distribuí-se em vários gêneros como das espécies Jataí (*Tetragonisca angustula* Latreille, 1811), Jataí acreana (*Tetragonisca weyrauchi* Schwarz, 1943), Borá (*Tetragonisca clavipes* Fabricius, 1804), Tubuna (*Scaptotrigona depilis* Moure, 1950) e a Mandaguari (*Scaptotrigona postica* Latreille, 1804), dentre outros gêneros (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Ainda existem alguns equívocos em relação aos nomes populares e espécies/subespécies das ASF, a exemplo disso temos a *Melipona quadrifasciata anthidioides* e a *Melipona quadrifasciata quadrifasciata*. Ambas do gênero *Melipona* diferenciam-se as subespécies em que a primeira possui ocorrência em regiões mais quentes e a segunda em regiões mais frias, de grande altitude (NOGUEIRA-NETO, 1997; WALDSCHMIDT et al., 2002).

A espécie Mandaçaia pode produzir cerca de 1,0 a 2,0 kg de mel por colmeia ao ano, e possui hábito generalista, mas com grande número de visitas nas espécies *Myrtaceae*, *Fabaceae* e *Asteraceae*. Seus ninhos, na natureza, são construídos com uma mistura de barro e resinas de plantas (SAMPAIO et al., 2013; OSTROVSKI, 2019).

A espécie *Tetragonisca angustula*, também conhecida como Jataí, é uma abelha de pequeno porte e uma das espécies de ASF de maior ocorrência no Brasil, presente em grande parte dos estados (ANACLETO et al., 2009). Dentre as espécies recorrentes na região Sul do Brasil está a subespécie Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata quadrifasciata*) geralmente encontrada em regiões mais frias, abrangendo a região Sul dos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (KERR, 1948; *apud* TEIXEIRA, 2018).

Como citado acima, existe uma vasta diversidade de espécies de ASF, conseqüentemente também há a variação de preferências florais dessas espécies, variabilidade das regiões de ocorrência, bem como solo e clima dessas regiões, além da distinção de hábitos/comportamentos das abelhas. Nesse sentido, tais variáveis contribuem substancialmente na diferenciação das características do mel das ASF e do mel da espécie *Apis mellifera*.

2.3 Composição do mel e seu emprego como bioindicador ambiental

Uma vez que apresenta características diferenciadas, o mel das ASF, mesmo apresentando uma composição em que possui majoritariamente água e açúcares,

também é composto em menores quantidades, de outros componentes importantes (ANTONESCU, MATTESCU, 2001). Dentre estes componentes estão os metais, macro e micronutrientes, os quais são importantes para o organismo, pois possuem um papel relevante nos sistemas biológicos, em reações fisiológicas normais, indução do metabolismo geral e sistema circulatório, dentre outras funções (SOETAN, OLAIYA, OYEWOLE, 2010).

O Fe por exemplo, é um micronutriente essencial em funções no organismo humano como o transporte de oxigênio, oxidação celular, crescimento e dentre outras de grande relevância. Alguns metais traço como Cu e Zn também são essenciais para o organismo, os quais atuam como cofatores de enzimas responsáveis por inúmeras atividades metabólicas, atuando nas respostas imunes do organismo e auxiliando na maturação dos tecidos e células linfoides (MACÊDO et al., 2010).

Outro elemento traço que também possui funções importantes para o organismo é o Mn, o qual é essencial no desenvolvimento de tecidos, esqueletos, no processo de reprodução, além de atuar como antioxidante, dentre outras funções (ZHANG et al., 2016). No entanto, acima de certas concentrações, tais metais podem apresentar certa toxicidade (GU et al., 2017).

Em contrapartida, mesmo que em baixas concentrações, a presença de alguns metais no organismo pode apresentar riscos devido a sua toxicidade. Por exemplo, metais como Pb, Cd, Cr, dentre outros, não apresentam funções essenciais para o organismo e são elementos persistentes no meio ambiente, podendo sofrer processo de bioacumulação em diversas espécies (TEMPLETON et al., 2000; AFONSO et al., 2017).

Além de alguns metais apresentarem funções importantes para o organismo humano, a presença deles e de metais não essenciais no mel também podem ter uma importante contribuição em relação ao meio ambiente. Durante o processo de coleta do néctar, as abelhas entram em contato com diversos espaços (POHL et al., 2009; IOANNIDOU et al., 2005). Estima-se que por dia, cerca de 10 a 25 mil abelhas façam uma média de 10 viagens em um raio de aproximadamente 7 km² (PERUGINI et al., 2011). Para algumas espécies de ASF estudos estimam que as distâncias percorridas sejam distintas, por exemplo 500 metros para a espécie jataí, 540 metros para mirim, 840 metros para irapuá e 2.500 metros para mandaçaia (NOGUEIRA-NETO, 1997; OSTROVSKI, 2019).

Devido ao fato de entrarem em contato com diferentes superfícies e compartimentos ambientais (solo, vegetação, ar, água) (POHL et al., 2009), e em uma ampla abrangência, as abelhas podem transportar partículas presentes no ambiente, as quais podem acumular no mel produzido pelas mesmas. Assim, isso faz com que o mel, outros subprodutos e até mesmo as abelhas, tornem-se eficientes bioindicadores de impacto ambiental (BOGDANOV et al., 2007; PERUGINI et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2018; ZHOU et al., 2018; AL-ALAM et al., 2019). Desde 1970, as abelhas mostram-se como bioindicadores eficientes para o acompanhamento da presença de metais traço oriundos de diferentes fontes, tanto em áreas rurais quanto em áreas urbanas (POHL et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2017; NASCIMENTO et al., 2018).

Nascimento et al., (2018), realizaram a quantificação dos metais Cd ($0,001 \pm 0,003$), Cu (de $0,29 \pm 0,16$ a $0,67 \pm 0,39$), Pb ($0,0007 \pm 0,002$), Co (de $0,0006 \pm 0,0014$ a $0,0069 \pm 0,0078$), Cr (de $0,28 \pm 0,36$ a $0,55 \pm 0,50$), Fe (de $1,21 \pm 0,85$ a $3,6 \pm 0,8$), Mn ($0,24 \pm 0,08$ a $1,20 \pm 0,49$), Mo (de $0,006 \pm 0,012$ a $0,28 \pm 0,18$), Ni (de $0,014 \pm 0,008$ a $0,018 \pm 0,006$) e Zn (de $0,4 \pm 0,2$ a $0,9 \pm 0,5$) em 58 amostras de mel da espécie de abelha nativa *Melipona scutellaris* a níveis de $\mu\text{g g}^{-1}$, oriundas da região de Salvador – BA e identificaram que a concentração de metais no mel está associada à origem floral, práticas agrícolas e características do solo, além de fatores ambientais, como poluição, que variam de acordo com a localização geográfica (NASCIMENTO et al., 2018).

A detecção dos metais analisados pelos autores indica que o mel de *M. scutellaris* é uma ferramenta útil para avaliar a presença de contaminantes ambientais e, portanto, pode ser considerado um bom indicador de contaminação ambiental e ser usado para monitorar um determinado local, a fim de evitar problemas causados pela liberação de metais no meio ambiente (NASCIMENTO et al., 2018).

De Andrade et al (2014b), avaliaram a relação da origem geográfica e as concentrações de Pb (200 ± 76), Cd ($4,1 \pm 4$) e Cr (88 ± 14) em amostras de mel da espécie *Apis mellifera* a níveis de ng g^{-1} produzidas no estado do Paraná (Brasil). Algumas amostras de mel apresentaram níveis de Cd e Pb maiores que a média geral obtida para a mesma região do estado, sugerindo contaminação no processo de produção do mel (DE ANDRADE et al., 2014b).

A diferença nos teores de metais no mel também pode ser atribuída a fatores biológicos, químicos e físicos, sendo que estes podem estar relacionados com a presença de parasitas, existência de contaminações industriais ou pesticidas, fornecendo assim informações importantes sobre a região de produção do mel (RISSATO et al., 2006).

2.4 Determinação de Metais em Mel

Considerando a presença de espécies metálicas em mel, diversas técnicas analíticas vêm sendo empregadas para a determinação de espécies inorgânicas em mel. (LEMOS et al., 2018) Dentre as mais empregadas, é possível citar: a espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês *Flame Atomic Absorption Spectrometry* (F AAS) (NAYIK; NANDA, 2016), a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry* (GF AAS) (DE ANDRADE, 2014), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* (ICP-OES) (KARABAGIAS et al., 2017), a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês *Inductively coupled plasma mass spectrometry* (ICP-MS) (MULLER et al., 2017), a espectrometria de fluorescência de raios X por reflexão total, do inglês *Micro X-ray fluorescence spectrometry* (TXRF) (RIBEIRO et al., 2014).

Especificamente para o mel de ASF, a maioria dos trabalhos encontrados utilizam técnicas de emissão atômica (ICP-OES, ICP-MS) na determinação de metais. Oliveira, et al. (2017) reportam um estudo realizado para a determinação de metais em mel e pólen de abelhas nativas brasileiras. Os autores realizaram a quantificação de 21 elementos nestes produtos apícolas, através da técnica de ICP-MS, apresentando interferência de matriz orgânica do mel e do pólen para alguns elementos, porém quantificando elementos à níveis traço e ultra-traço.

Não obstante, dentre as técnicas espectrométricas de absorção/emissão atômica, a espectrometria de absorção atômica, do inglês *Atomic Absorption Spectrometry* (AAS), é bastante utilizada (EPIFÂNIO, 2012), neste caso, destacando-se as técnicas de F AAS e GF AAS (AMORIM et al., 2008).

A técnica de AAS em si, consiste na absorção da radiação por átomos. A amostra é volatilizada (atomização da amostra) e os átomos no estado gasoso absorvem

energia radiante de comprimento de onda específico. A quantidade de átomos no estado gasoso é proporcional à energia absorvida (EPIFÂNIO, 2012).

A atomização da amostra é o que caracteriza cada técnica de AAS. A técnica de F AAS é frequentemente utilizada para a quantificação de metais no mel em maiores quantidades, os macros ou microelementos. (POHL et al., 2017) A atomização é obtida utilizando uma chama, através da combustão de um gás combustível (acetileno, hidrogênio ou propano) com um gás oxidante (ar, óxido nitroso ou oxigênio). A mistura de gases mais utilizada para determinação de metais é a de acetileno/ar (KRUG; NÓBREGA; OLIVEIRA, 2004).

A técnica de F AAS, uma das mais utilizadas dentre as técnicas de AAS, possui vantagens pela simplicidade no manuseio/operação, seletividade e por ser relativamente barata quando comparada a outras, por exemplo ICP-MS e ICP-OES, uma vez que o consumo do gás argônio eleva o custo de ambas (BROWN; MILTON, 2005; FERREIRA et al., 2018).

No entanto, ainda que essas técnicas sejam eficientes para a quantificação de metais em mel, a determinação de elementos em alimentos ricos em açúcar é um desafio analítico, pois há a presença de diversos interferentes de matriz, tornando-se necessário o emprego de procedimentos para o tratamento das amostras para que os analitos de interesse tornem-se disponíveis para a quantificação.

2.5 Procedimentos para Tratamento de Amostras de Mel

O preparo da amostra é umas das primeiras e principais etapas em uma análise química, a qual deve priorizar a simplicidade, a rapidez, a utilização de pequenos volumes de ácidos, possibilitar a dissolução de grandes quantidades de amostras e proporcionar resultados precisos (ARRUDA, SANTELLI, 1997). Os procedimentos utilizados para o preparo da amostra, seja ela biológica, ambiental ou alimentar, são diversos, dentre os quais, destacam-se a digestão por via úmida e por via seca (MENDES, BACCAN, CADORE, 2006).

Quando se utiliza a digestão por via úmida, a amostra é submetida a ação de um ácido ou mistura de ácidos e outros reagentes oxidantes (como peróxido de hidrogênio, por exemplo), afim de produzir uma solução, para que a matriz orgânica seja destruída e o analito de interesse torne-se disponível, possibilitando sua quantificação (POHL et al., 2017).

Os ácidos mais utilizados são o ácido clorídrico, o ácido nítrico, o ácido fluorídrico e o ácido perclórico (HOSSNER, 1996). O processo de digestão por via úmida consiste basicamente no aquecimento da amostra com algum dos ácidos citados ou a mistura destes a temperaturas brandas para que não haja perdas significativas da solução e do analito.

Com a finalidade de minimizar algumas condições que afetam a eficiência da digestão por via úmida, o emprego da radiação micro-ondas proporciona a redução da quantidade de reagentes, temperatura e tempo (WELZ, SPERLING, 1999; NÓBREGA et al., 2001). O processo que ocorre quando se utiliza a digestão assistida por micro-ondas consiste na absorção e conversão da radiação eletromagnética em energia térmica, acarretando o aquecimento do meio reacional. Essa técnica de digestão vem sendo amplamente utilizada para digestão de amostras de mel para a análise de elementos por AAS (FLORES, ESCUREDO, SEIJO, 2016; KEK et al., 2016).

No procedimento de digestão por via seca, a amostra é inicialmente carbonizada e aquecida em mufla, à altas temperaturas que variam de 100 °C a 600 °C, e posteriormente as cinzas resultantes são dissolvidas em um ácido apropriado e avolumadas com água purificada (MENDES, BACCAN, CADORE, 2006). Um fator que deve ser levado em consideração quando se utiliza tal procedimento para digestão é a temperatura, pois dependendo do analito de interesse podem ocorrer perdas deste, por volatilização (POHL, SERGIEL, STECKA, 2009).

De acordo com Pohl et al. (2017) a maioria dos trabalhos relatados na literatura, utilizam com frequência a digestão assistida por micro-ondas, inclusive para o tratamento de amostras de mel, para posterior determinação de metais através das técnicas de espectrometria de absorção atômica.

Flores et al. (2016) realizaram a determinação de oito metais (K, Ca, Fe, Mg, Na, P, Zn e Cu) por AAS utilizando a digestão assistida por micro-ondas, em amostras de mel unifloral advindo de regiões do noroeste da Espanha, produzidos por abelhas melíferas. Já Kek et al. (2016) avaliaram a presença de 12 metais em amostras de mel produzidos por abelhas melíferas e ASF, utilizando também a digestão assistida por micro-ondas, utilizando as técnicas de AAS e ICP-MS para determinação de tais metais.

Apesar de se mostrarem, em sua maioria, eficientes, os procedimentos ditos convencionais para tratamento de amostra, estão sujeitos a fatores que atribuem erros na quantificação de analitos (SILVA, 2006). Estes, por sua vez, podem ocorrer devido à exposição prolongada na manipulação da amostra durante seu preparo bem como, custos e tempo elevados, perdas de analito, contaminação de amostra, dentre outros interferentes (SILVA, 2006; DE ANDRADE et al., 2014).

Devido a isso, vêm sendo desenvolvidas estratégias analíticas alternativas que visam minimizar tais fatores. A análise direta de sólidos em GF AAS por exemplo, minimiza um tempo elevado na preparação de amostras, e evita o uso de reagentes corrosivos, etapas que afetam significativamente o preparo de amostras de matrizes complexas, reduzindo assim o risco de contaminação e a perda de analitos e, uma vez que não há necessidade de diluição, apresenta maior sensibilidade (LEMAIRE et al., 2013; PENG et al., 2015).

Porém, esse tipo de inserção de amostras apresenta algumas desvantagens, quando comparada à análise da solução digerida. Neste contexto, pode-se citar a precisão inferior, calibração complexa e correção de fundo dificultada levando a um risco elevado de interferências espectrais devido a quantidades significativas de matriz dentro do atomizador, dentre outras dificuldades (WELZ et al., 2007).

Outra estratégia analítica que se apresenta como uma potencial alternativa para a simplificação da etapa de tratamento de amostras é a amostragem em suspensão, que articula vantagens da amostragem líquida e sólida, evitando alguns problemas relacionados à amostragem direta de sólido (MAGALHÃES, ARRUDA, 1998; PENG et al., 2015).

2.5.1 Amostragem em Suspensão

A amostragem em suspensão foi proposta por Brady et al. em 1974 combinando as vantagens da amostragem sólida e líquida, na determinação de Zn e Pb em folhas e sedimentos marinhos (BRADY et al., 1974 *apud* ALVES et al., 2001). Esse procedimento consiste basicamente em uma suspensão de partículas insolúveis em solução ácida ou em outros meios, a fim de possibilitar a homogeneização da amostra e a liberação de oligoelementos (SARDANS; MONTES; PEÑULAS, 2010).

Deve-se ressaltar que para que a amostragem em suspensão seja eficiente é necessário levar em consideração a influência do tamanho da partícula, a

concentração de analitos na amostra, homogeneidade da suspensão, utilização de baixas concentrações de reagentes que aumentem a decomposição de resíduos carbonáceos no interior do atomizador, além da estabilização da emulsão (LIMA et al., 2000; TRINDADE et al., 2019).

O tamanho da partícula pode influenciar na estabilidade e homogeneidade da suspensão, conseqüentemente influenciando na eficiência do transporte da amostra e atomização do analito, inclusive em técnicas como a F AAS, que possui sistema de nebulização para introdução da amostra. O tamanho adequado depende de fatores como homogeneidade, densidade e composição da amostra, bem como da técnica analítica empregada (FERREIRA, et al., 2010).

A escolha dos reagentes utilizados, também denominados diluentes na amostragem em suspensão, também é um fator relevante quando se utiliza tal procedimento no preparo de amostras. Soluções ácidas diluídas, concentradas ou combinadas com outros ácidos (AMORIM, et al., 2017) e com peróxido de hidrogênio (FERREIRA, et al., 2010) constituem os reagentes mais utilizados no preparo das suspensões, sendo o ácido nítrico o mais explorado dentre todos, uma vez que além da solubilização auxilia na extração do analito de interesse. Amorim et al. (2017) reportaram 13 trabalhos da literatura que utilizavam a amostragem em suspensão no preparo de diversas matrizes alimentares em meio ácido, sendo que 9 desses utilizavam o ácido nítrico.

Outro fator relevante é a razão entre os dois fatores citados acima, a relação massa/volume de amostra e reagentes utilizados, a qual deve ser composta de acordo com a homogeneidade e teor de analitos na amostra. Deve-se ponderar as concentrações utilizadas no preparo de suspensões para que estas não apresentem interferentes, como por exemplo em suspensões diluídas, quando a amostra apresenta altas concentrações do analito, a diluição é adequada até um determinado limite, uma vez que perdas na precisão podem ocorrer devido ao menor número de partículas presentes na suspensão quando as mesmas estão muito diluídas (FERREIRA, et al., 2010).

O inverso também deve ser levado em consideração para determinação da razão massa/volume, visto que em suspensões concentradas, que são preparadas com intuito de se obter menores limites de detecção e quantificação quando a amostra apresenta baixo teor do analito, podem acarretar em interferentes como efeitos de

matriz, dificuldades na estabilidade da suspensão e redução da precisão, inclusive para matrizes de alta densidade (FERREIRA et al., 2010; TRINDADE et al., 2019).

A homogeneização e estabilização da suspensão, que compreendem a distribuição homogênea das partículas no meio líquido para garantir a representatividade da amostra, caracteriza-se como um dos fatores mais críticos na técnica de amostragem em suspensão, uma vez que afetam diretamente a precisão e a exatidão do método. A homogeneização/estabilização de uma suspensão pode ser alcançada por meio de agitação e/ou adição de agentes estabilizantes (MAGALHÃES; ARRUDA, 1998; TRINDADE et al., 2019).

A obtenção da homogeneização de suspensões pode ser utilizando-se desde processos simples como a agitação manual, até processos com conceitos mais complexos como a agitação ultrassônica. Basicamente, a razão pela qual empregase a agitação ultrassônica em procedimentos de extração, parte do princípio de se empregar uma energia externa que aumente a ação química de um solvente sobre o soluto (KRUG, 2006).

O uso da agitação ultrassônica para homogeneização/estabilização de suspensões apresenta vantagens em virtude da sua eficiência na diminuição do tamanho das partículas, na quebra de aglomerados e na extração das espécies de interesse para a fase líquida da suspensão (MAGALHÃES; ARRUDA, 1998; FERREIRA et al., 2010).

No tratamento de amostras, a faixa de frequência das ondas ultrassônicas está comumente entre 20 e 100 kHz. Nesta faixa, onde tem-se baixa frequência e alta potência, acarreta-se a formação de pequenas bolhas de cavitação em decorrência da onda atravessando um meio líquido (KRUG, 2006).

A cavitação acústica envolve a formação, crescimento e colapso de microbolhas de gás, ao passar ondas ultrassônicas com pressões oscilantes através de um meio líquido o que pode levar a formação de uma variedade de espécies no meio, pela combinação dos radicais livres formados pela energia oriunda da implosão, conseqüentemente auxiliando na estabilização e/ou homogeneização das suspensões (KRUG, 2006; LUQUE DE CASTRO et al., 2011).

Dentre as vantagens que a técnica de amostragem em suspensão proporciona, estão a minimização da perda de analitos voláteis e contaminação da amostra, redução de custos e de consumo de reagentes tóxicos e/ou corrosivos, uso de

padrões aquosos ou métodos de adição de analito para calibração, aplicabilidade em amostras orgânicas e inorgânicas, dentre outras vantagens (MAGALHÃES; ARRUDA, 1998; ALVES et al., 2001; TRINDADE et al., 2019).

Para méis de ASF, a maioria dos trabalhos relatados na literatura utilizam como técnica para preparo de amostra, a digestão assistida por micro-ondas (LEMOS et al., 2018; KEK et al., 2016) ou a análise de teores de cinzas, em que geralmente utiliza-se o preparo da amostra por via seca (CHUTTONG et al., 2016; FLUENMAYOR et al., 2012). No entanto, ainda são poucos os estudos utilizando a amostragem em suspensão durante a etapa de preparo de amostras de mel de ASF com o auxílio da técnica de F AAS.

Nessa perspectiva, diversos estudos surgem em busca da determinação do conteúdo inorgânico do mel, pois além de fornecerem informações importantes sobre sua composição, há também a necessidade de se obter subsídios para a complementação de parâmetros que regulamentam a qualidade do mel das ASF. Isso é necessário, uma vez que, a Legislação Brasileira que regulamenta a padronização do mel para fins de comercialização só atende às características do mel da espécie *Apis mellifera*, não contemplando o mel das abelhas nativas do país (ASF), além de ser baseada em padrões internacionais, não considerando as particularidades do mel produzido no território nacional.

3 Objetivos

3.1 Objetivos Gerais

Desenvolver, validar e aplicar métodos analíticos para a determinação rápida de metais em amostras nacionais de mel de ASF, com o emprego da espectrometria de absorção atômica com chama.

3.2 Objetivos Específicos

i) Otimizar e validar metodologias analíticas para a determinação de Fe, Mn, Mg e Ca em amostras de mel de ASF, utilizando a amostragem em suspensão aliada a espectrometria de absorção atômica com chama;

ii) Aplicar as metodologias desenvolvidas em diversas amostras nacionais de mel de ASF provenientes de diferentes regiões;

iii) Avaliar o perfil do mel das ASF em relação à presença de teores de íons metálicos, empregando ferramentas estatísticas, a fim de estabelecer sua identidade e contribuir para o estabelecimento de padrões de qualidade e segurança alimentar.

4 Material e Métodos

4.1 Reagentes e Equipamentos

Para a realização dos procedimentos propostos foram utilizados reagentes de grau analítico, água ultrapura obtida através do sistema Milli-Q fornecido pela Millipore Corporation® e soluções padrão de 1000 mg L⁻¹ (Biotec®) dos íons metálicos Fe, Cu, Zn, Mn, Mg e Ca.

Em todo procedimento, foram adotadas técnicas limpas, visando minimizar possíveis contaminações de soluções e amostras. (CAMPOS; BENDO; VIEL, 2002; DE ANDRADE et al., 2014) Brevemente, os materiais e vidrarias utilizados foram lavados em água corrente e detergente neutro, e posteriormente foram mantidos em banho de HNO₃ 5% (65%, v/v) por um período de 24 horas. Após a retirada do banho ácido, todos os materiais foram enxaguados por cinco vezes com água ultrapura, e colocados em bandejas devidamente descontaminadas, para a secagem, sendo em seguida armazenados em sacos plásticos. No decorrer de todas as análises e ensaios, as bancadas foram previamente limpas com álcool 70% (v/v) e em seguida solução de EDTA 0,1 mol L⁻¹, sempre utilizando luvas de procedimento, sem talco.

Os equipamentos comumente utilizados durante o estudo, foram: uma balança analítica (Shimadzu®, modelo AUW220D), micropipetas (Labmate® – HTL) com diferentes capacidades, banho ultrassônico (Elma® P 30H), mufla (Spencer®) e digestor de micro-ondas (Anton Paar®).

A quantificação dos elementos Fe, Mn, Mg e Ca foi realizada com o auxílio de um espectrômetro de absorção atômica com chama – F AAS (Varian®, modelo AA 220). Para a quantificação dos metais Fe, Mn e Mg, a chama empregada foi do tipo oxidante, sendo composta de ar/acetileno (Tabela 1), com fluxo do ar de 10,0 L min⁻¹ e do acetileno de 2,00 L min⁻¹. Para Ca, a chama era redutora, composta por óxido nitroso/acetileno (Tabela 1), na qual o fluxo de óxido nitroso foi de 10,0 L min⁻¹ e de acetileno de 6,35 L min⁻¹. As medidas foram realizadas em triplicata, considerando a integração do sinal de absorbância, com tempo total de 6 segundos de análise. Foram utilizadas lâmpadas de cátodo oco (Varian®, Photron®, Agilent® e Luxan®) para os elementos estudados, empregando-se as condições operacionais bem como as razões de ar/acetileno e de óxido nitroso/acetileno recomendadas pelo fabricante do equipamento, conforme consta na Tabela 1.

TABELA 1 – CONDIÇÕES DE OTIMIZAÇÃO DO F AAS PARA DETERMINAÇÃO DOS METAIS EM MEL DE ABELHA SEM FERRÃO.

Equipamento	Metal	Chama	I (mA)	λ (nm)
F AAS	Zn	Ar/Acetileno	5,0	213,9
	Fe	Ar/Acetileno	5,0	248,3
	Mn	Ar/Acetileno	15,0	279,5
	Mg	Ar/Acetileno	4,0	285,2
	Ca	Óxido nitroso/Acetileno	10	422,7

FONTE: A AUTORA (2020)

4.2 Amostras de mel

Na etapa de otimização do procedimento analítico para a determinação de metais em mel de ASF, foram utilizadas amostras de mel da espécie Jataí (*Tetragonisca angustula*) oriundas do município de Nova Tebas – PR, localizada a uma latitude 24°26'16" sul e a uma longitude 51°56'42" oeste, estando a uma altitude de 650 m, em relação ao nível do mar.

As amostras foram coletadas em diferentes épocas ao longo do ano de 2018, o que pode ocasionar a distinção da floração, e conseqüentemente alteração da composição do néctar coletado pelas abelhas. Em uma primeira etapa, em que foram avaliados e comparados diferentes procedimentos analíticos para quantificação dos metais por F AAS, as amostras de mel foram coletadas nos meses de Março e Setembro de 2018. Durante a etapa de estudo univariado, a amostra de mel utilizada foi coletada no mês de Novembro de 2018.

As amostras avaliadas na etapa de aplicação da metodologia desenvolvida, foram coletadas em regiões distintas as quais estão descritas na Tabela 2.

TABELA 2 – RELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DE ASF E A REGIÃO DE COLETA DOS MÉIS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DO PERFIL MINERAL.

(continua)

Amostra	Espécie	Cidade – Estado	Solo predominante
1.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Ariquemes – RO	Argissolo vermelho
2.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Ariquemes – RO	Argissolo vermelho
3.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Ariquemes – RO	Argissolo vermelho
4.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Ariquemes – RO	Argissolo vermelho
5.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Cacoal – RO	Argissolo vermelho
6.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Cacoal – RO	Argissolo vermelho
7.	<i>Tetragonisca weyrauchi</i>	Ariquemes – RO	Argissolo vermelho
8.	<i>Tetragonisca weyrauchi</i>	Ariquemes – RO	Argissolo vermelho
9.	<i>Tetragonisca weyrauchi</i>	Ariquemes – RO	Argissolo vermelho
10.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Marialva – PR	Latossolo
11.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Marialva – PR	Latossolo
12.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jussara – PR	Latossolo
13.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Mal. Cândido Rondon – PR	Latossolo
14.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Guaraqueçaba – PR	Cambissolo
15.	<i>Melipona quadri. quadrifasciata</i>	Guaraqueçaba – PR	Cambissolo
16.	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Guaraqueçaba – PR	Cambissolo

TABELA 2 – RELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DE ASF E A REGIÃO DE COLETA DOS MÉIS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DO PERFIL MINERAL.

(continuação)

Amostra	Espécie	Cidade – Estado	Solo predominante
17.	Melipona quadri. quadrifasciata	São José dos Pinhais – PR	Cambissolo/Latossolo
18.	Tetragonisca angustula	Floresta – PR	Latossolo/Nitossolo
19.	Tetragonisca angustula	Tuneiras do Oeste – PR	Argissolo
20.	Tetragonisca angustula	Ponta Grossa – PR	Cambissolo/Latossolo
21.	Tetragonisca angustula	Perobal – PR	Argissolo/Latossolo
22.	Tetragonisca angustula	Pérola – PR	Argissolo/Latossolo
23.	Tetragonisca angustula	Pérola – PR	Argissolo/Latossolo
24.	Tetragonisca angustula	Cambará – PR	Latossolo/Nitossolo
25.	Scaptotrigona bipunctata	Cambará – PR	Latossolo/Nitossolo
26.	Tetragonisca angustula	Mandirituba – PR	Argissolo
27.	Scaptotrigona bipunctata	Mandirituba – PR	Argissolo
28.	Tetragonisca angustula	Mandirituba – PR	Argissolo
29.	Melipona quadrifasciata	Mandirituba – PR	Argissolo
30.	Melipona quadrifasciata	Mandirituba – PR	Argissolo
31.	Scaptotrigona bipunctata	Mandirituba – PR	Argissolo
32.	Tetragonisca angustula	Ortigueira – PR	Neossolo
33.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
34.	Tetragonisca angustula	Nova Tebas – PR	Neossolo
35.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
36.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
37.	Scaptotrigona bipunctata ²	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
38.	Scaptotrigona bipunctata ³	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
39.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
40.	Scaptotrigona bipunctata ²	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
41.	Scaptotrigona bipunctata ³	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
42.	Scaptotrigona postica	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
43.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
44.	Scaptotrigona bipunctata ²	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
45.	Scaptotrigona bipunctata ³	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
46.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
47.	Scaptotrigona bipunctata ²	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
48.	Scaptotrigona bipunctata ³	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
49.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
50.	Scaptotrigona bipunctata ²	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
51.	Scaptotrigona bipunctata ³	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
52.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
53.	Scaptotrigona bipunctata ²	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
54.	Scaptotrigona bipunctata ³	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
55.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
56.	Scaptotrigona bipunctata ²	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
57.	Scaptotrigona bipunctata ³	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
58.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
59.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
60.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
61.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
62.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
63.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
64.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
65.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
66.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
67.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
68.	Scaptotrigona bipunctata	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
69.	Scaptotrigona bipunctata ²	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
70.	Scaptotrigona bipunctata ³	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo

TABELA 2 – RELAÇÃO ENTRE ESPÉCIES DE ASF E A REGIÃO DE COLETA DOS MÉIS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO DO PERFIL MINERAL.

			(conclusão)
71.	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
72.	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> ²	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
73.	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> ³	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
74.	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
75.	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> ²	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
76.	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> ³	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
77.	<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
78.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Maringá – PR	Latossolo/Nitossolo
79.	<i>Tetragonisca angustula</i>	São Lourenço – PR	Latossolo/Argissolo
80.	<i>Tetragonisca angustula</i>	São Lourenço – PR	Latossolo/Argissolo
81.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Foz do Iguaçú – PR	Latossolo/Nitossolo
82.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Santa Helena – PR	Latossolo/Nitossolo
83.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Guaraqueçaba – PR	Cambissolo
84.	<i>Melipona marginata</i>	Guaraqueçaba – PR	Cambissolo
85.	<i>Tetragona clavipes</i>	Guaraqueçaba – PR	Cambissolo
86.	<i>Melipona quadrifasciata</i>	João Dourado – BA	Cambissolo
87.	<i>Tetragona clavipes</i>	Seara – SC	Neossolo litólico
88.	<i>Tetragonisca angustula</i>	Nova Tebas – PR	Neossolo

LEGENDA: 2^a coleta²; 3^a coleta³

FONTE: A AUTORA (2020)

Da amostra 35 a amostra 77, o período de coleta foi realizado entre os meses de Dezembro de 2016 e Novembro de 2017. As demais amostras foram coletadas em diferentes períodos entre fevereiro de 2014 a dezembro de 2014, uma vez que, devido ao fato de as ASF produzirem mel em quantidades reduzidas, fez-se necessário a coleta em mais de uma vez para que fosse obtido quantidade suficiente para análise.

As regiões de coleta oriundas do Estado do Paraná possuem vegetação típica da mata atlântica, com abundância de recursos florais, sendo o clima caracterizado como subtropical temperado, possuindo grande variedade de tipos de solos (Figura 1), havendo a predominância de determinados tipos de solo, como pode ser observado na Tabela 2.

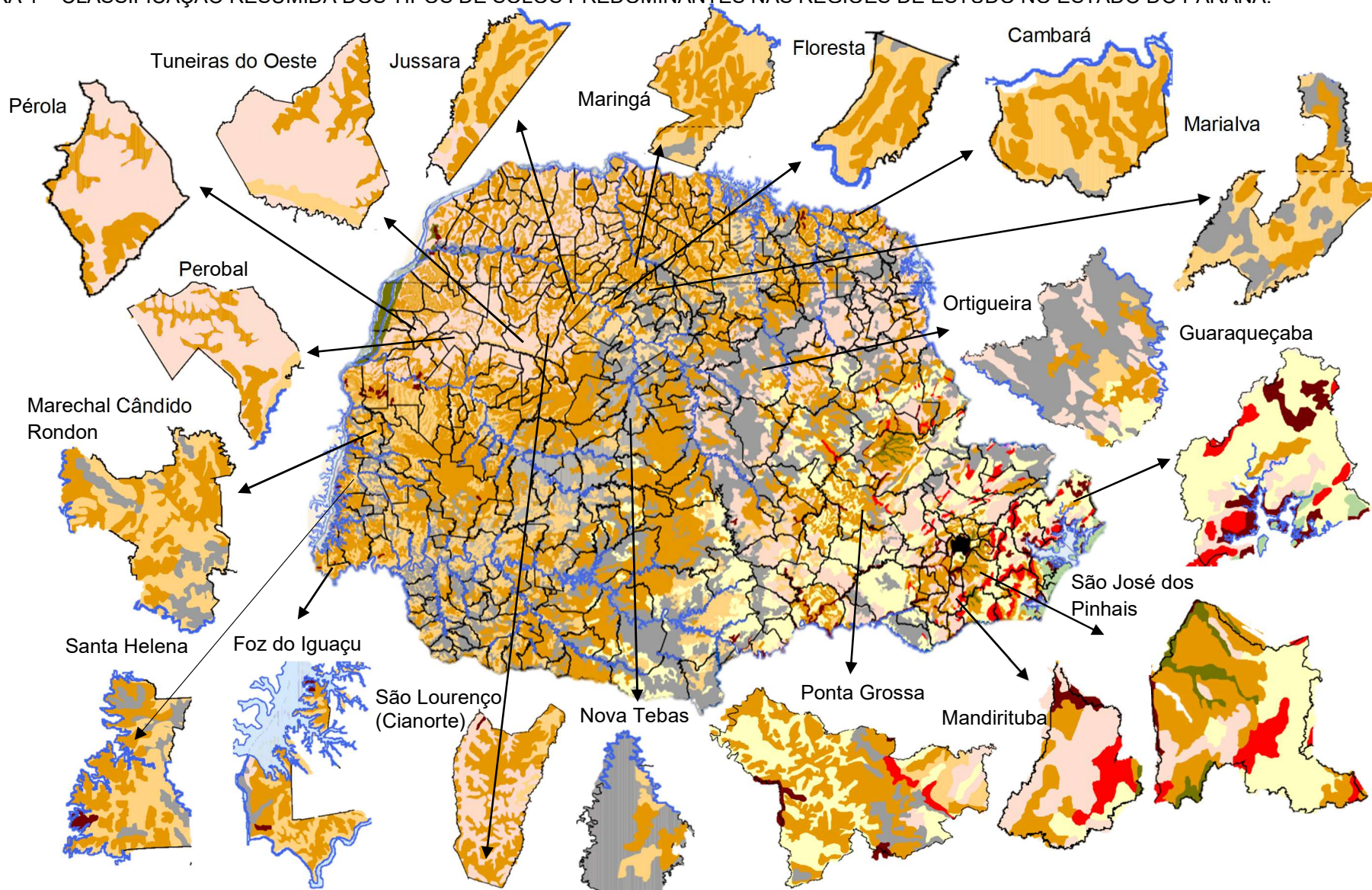
Nas regiões de coleta do Estado de Rondônia, Ariquemes (localizado a uma latitude de 09°54'48" ao Sul e a uma longitude de 63°02'27" a Oeste) e Cacoal (localizado a uma latitude de 11°26'19" ao Sul e a uma longitude de 61°26'50" a Oeste), a predominância de solos é de Argissolos Vermelhos (ALDAMY, 2010), como consta na Tabela 2.

A vegetação predominante no município de Ariquemes é do tipo floresta fluvial amazônica, possuindo área de cerrado a oeste do estado, que devido à exploração de minérios vem sendo desmatada. O clima de Ariquemes é classificado como equatorial, com médias anuais de temperatura acima de 26°C. A região do município de Cacoal possui clima e vegetação semelhantes (IBGE, 2017).

Já nas regiões de coleta oriundas do Estado de Santa Catarina, Seara (localizada a uma latitude 27°08'58" Sul e a uma longitude 52°18'38" Oeste) e João Dourado, município do Estado da Bahia (localizado a uma latitude de 11°21'00" Sul e uma longitude de 41°39'50" Oeste), os tipos de solos predominantes nessas respectivas regiões são, Neossolo Litólico (SANTA CATARINA, 1991) e Cambissolo (INEMA, 2014) (Tabela 2).

O município de Seara possui clima subtropical úmido e vegetação caracterizada como floresta ombrófila mista (SILVA JM; SILVA EJE, 2014). Já a região de João Dourado, município do estado da Bahia, possui clima tropical semiárido e vegetação adaptada ao clima caracterizada como xerófita (BAHIA, 1976).

FIGURA 1 – CLASSIFICAÇÃO RESUMIDA DOS TIPOS DE SOLOS PREDOMINANTES NAS REGIÕES DE ESTUDO NO ESTADO DO PARANÁ.



LEGENDA: ■ Afloramento de Rocha; ■ Argissolo; ■ Cambissolo; ■ Espodossolo; ■ Gleissolo; ■ Latossolo; ■ Neossolo; ■ Nitossolo; ■ Organossolo
 FONTE: Adaptado de ITC (2008)

4.3 Procedimentos analíticos para o preparo de amostras de mel de abelha sem ferrão

Em relação ao preparo de amostra de mel, foram avaliados diferentes procedimentos a fim de verificar a eficiência dos mesmos em relação aos procedimentos de amostragem em suspensões relatadas na literatura. A digestão da amostra de mel de ASF foi realizada por via úmida e por via seca a fins de comparação com os métodos utilizando a amostragem em suspensão.

4.3.1 Procedimento de Digestão por via Úmida

O procedimento de digestão por via úmida, foi realizada em meio ácido com auxílio de um digestor de micro-ondas (Anton Paar®). Inicialmente foram avaliadas amostras de mel da espécie Jataí, *in natura* e amostras enriquecidas com 1,0 mg L⁻¹ dos padrões metálicos (Biotec®) de Fe, Zn e Mn, ambas em triplicatas, as alíquotas utilizadas no procedimento são referentes a amostra 34. Neste estudo, foram utilizadas massas de 1,0 g de mel, com posterior adição de 4,0 mL de HNO₃ (Carlo Erba®, 65%, v/v), 1,0 mL de H₂O₂ (Biotec®, 35%, m/v) e 1,0 mL de H₂O purificada às amostras.

Tais condições foram estabelecidas conforme a recomendação do fabricante e adaptação baseada nas condições utilizadas por Moniruzzaman et al., (2014), uma vez que havia similaridade no equipamento utilizado por estes autores com o equipamento empregado neste trabalho (MONIRUZZAMAN et al., 2014). As soluções de mel foram então transferidas para frascos de teflon, e levadas para digestão utilizando uma rampa de aquecimento de 0 °C à 150 °C por 50 minutos com potência de 1200 W. Por fim, a solução resultante foi avolumada à 25 mL utilizando água ultrapura.

4.3.2 Procedimento de Digestão por via Seca

Para a realização da digestão por via seca, foi utilizada a metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz – IAL (2008), na qual foi carbonizado 1,0 g de mel em cápsulas de porcelana com auxílio de um Bico de Bunsen, com posterior calcinação em forno mufla a 450 °C por 4 horas. As cinzas resultantes foram dissolvidas em 1,0 mL de HNO₃ (Carlo Erba®, 65%, v/v) e avolumadas para 10 mL com água ultrapura (TIGLEA et al., 2008).

Foram avaliadas em triplicatas amostras de mel da espécie Jataí, *in natura* e enriquecidas com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ dos padrões metálicos (Biotec®) de Fe, Mn, Mg e Ca a fim de realizar a validação dos métodos analíticos desenvolvidos, as alíquotas utilizadas nesta etapa do estudo são referentes a amostra 88.

4.3.3 Procedimento de Amostragem em Suspensão

Para os métodos utilizando a amostragem em suspensão, foram avaliados alguns procedimentos já relatados na literatura para mel de abelha *Apis mellifera*. Os procedimentos utilizados nesta etapa foram baseados em trabalhos prévios desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (De Andrade et al., (2014)) e da literatura (Pohl e Sergiel (2012)). Para cada condição avaliada, as amostras foram aferidas para um volume de 10 mL com água ultrapura. A descrição dos procedimentos que foram utilizados para amostragem em suspensão, constam na Tabela 3.

TABELA 3 – AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO PARA MEL DE ABELHA SEM FERRÃO

Método	Condições de preparo de amostra
A	1,0 g de mel + HNO_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) + agitação ultrassônica (10 min)
B	1,0 g de mel + HNO_3 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) + H_2O_2 (3%, m/v) + agitação ultrassônica (10 min)
C	1,0 g de mel + H_2O ultra-pura + agitação ultrassônica (10 min)

FONTE: A AUTORA (2020)

Foi empregado um banho ultrassônico com frequência de 37 kHz, potência de 100%, da marca Elma® nos três procedimentos avaliados, priorizando a posição dos tubos centralmente, evitando outras posições dentro do banho, uma vez que através de estudos prévios do grupo de pesquisa (BAHIA, 2019) foram observadas reduções na eficiência do banho ultrassônico.

Os resultados observados para os metais avaliados, em cada procedimento, foram utilizados para a escolha dos métodos que foram em seguida otimizados para posterior quantificação dos metais em amostras de mel de ASF.

4.4 Otimização Univariada dos métodos analíticos empregados para determinação de metais em mel de abelha sem ferrão

Para a otimização dos procedimentos analíticos escolhidos, foi empregado um estudo univariado, avaliando os seguintes fatores: massa de mel, concentração de reagentes e tempo de agitação ultrassônica, conforme disposto na Tabela 4.

TABELA 4 – CONDIÇÕES ESTABELECIDAS PARA O ESTUDO UNIVARIADO NA DETERMINAÇÃO DE METAIS EM MEL DE ABELHA SEM FERRÃO

Fator	Condições avaliadas			
Massa (g)	1,0	1,5	2,0	2,5
HNO₃ (mol L⁻¹)	0,2	0,6	0,4	0,8
H₂O₂ (% m/v)	1,0	3,0	6,0	9,0
Tempo (min.)	5	10	15	20

FONTES: A AUTORA (2020)

Inicialmente, foi fixada a concentração de 0,2 mol L⁻¹ de HNO₃ (Carlo Erba®, 65%, v/v), 3,0% (m/v) de H₂O₂ (Biotec®, 30%, m/v) e tempo de agitação ultrassônica de 10 minutos, para que houvesse a variação do primeiro fator, no caso a massa de mel. Após fixada a massa de mel mais adequada para cada metal, foram variadas e avaliadas a concentração de HNO₃, a porcentagem de H₂O₂ e o tempo de agitação ultrassônica de forma univariada, respectivamente.

Os dados do estudo de otimização dos métodos analíticos foram avaliados pela aplicação de ANOVA de um fator e teste *Tukey* no nível de 95% de confiança, toda a análise estatística foi realizada com o auxílio do software Minitab 18.

Em seguida, após a otimização dos procedimentos utilizando a amostragem em suspensão, foi realizada a validação dos métodos desenvolvidos, sendo avaliados alguns parâmetros importantes: linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão. Esses estudos foram realizados para todos os metais avaliados.

4.5 Validação do método analítico proposto

A validação do método analítico que foi desenvolvido para a determinação direta de metais em mel de ASF foi realizada através da análise de diversos parâmetros como linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão do procedimento, utilizando ferramentas estatísticas (IHC, 2005; AOAC, 2012; INMETRO, 2016).

4.5.1 Curvas Analíticas e Linearidade

Para avaliação da linearidade dos métodos, foram construídas três curvas analíticas para Fe, Zn, Mn, Mg e Ca com padrões metálicos dos respectivos metais, os quais foram adicionados em meio aquoso (curva analítica com padrão externo – PE), em meio similar ao meio extrator (método de simulação de meio extrator – ME) e em suspensão de mel (método de adição de padrão – AP), a fim de verificar se o meio extrator ou a matriz de mel poderia interferir na quantificação dos metais de

interesse (IHC, 2005). O procedimento realizado para construção de cada curva consta na Tabela 5.

TABELA 5 – CONDIÇÕES DE PREPARO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA Fe, Zn, Mn, Mg E Ca

Metais	Padrão externo – PE	Meio extrator – ME	Adição de padrão – AP
Fe	Padrão metálico na faixa de 0,1 a 1,2 mg L ⁻¹	Padrão metálico na faixa de 0,1 a 1,2 mg L ⁻¹ + HNO ₃ (0,2 mol L ⁻¹) + H ₂ O ₂ (1%, m/v) + 5 min de agitação ultrassônica	Padrão metálico na faixa de 0,1 a 1,2 mg L ⁻¹ + 1,0 g de mel + HNO ₃ (0,2 mol L ⁻¹) + H ₂ O ₂ (1%, m/v) + 5 min de agitação ultrassônica
Zn			
Mn			
Mg	Padrão metálico na faixa de 0,2 a 0,8 mg L ⁻¹	Padrão metálico na faixa de 0,2 a 0,8 mg L ⁻¹ + HNO ₃ (0,01 mol L ⁻¹) + H ₂ O ₂ (0,09%, m/v) + 5 min de agitação ultrassônica	Padrão metálico na faixa de 0,1 a 1,2 mg L ⁻¹ + 0,01 g de mel + HNO ₃ (0,01 mol L ⁻¹) + H ₂ O ₂ (0,09%, m/v) + 5 min de agitação ultrassônica
Ca	Padrão metálico na faixa de 0,4 a 2,0 mg L ⁻¹	Padrão metálico na faixa de 0,4 a 2,0 mg L ⁻¹ + HNO ₃ (0,01 mol L ⁻¹) + H ₂ O ₂ (0,09%, m/v) + 10 min de agitação ultrassônica	Padrão metálico na faixa de 0,4 a 2,0 mg L ⁻¹ + 0,01 g de mel + HNO ₃ (0,01 mol L ⁻¹) + H ₂ O ₂ (0,09%, m/v) + 10 min de agitação ultrassônica

NOTA: O volume final para as curvas de ME e AP foi de 10 mL e para a curva de PE 25 mL

FONTES: A AUTORA (2020)

Devido ao fato dos metais Mg e Ca estarem presentes majoritariamente no mel, foi necessário reduzir as proporções de massa e volume dos reagentes para que fosse possível a construção da curva analítica de AP para os respectivos metais. Diante disso, os volumes dos reagentes utilizados nas curvas de ME também foram reduzidos para ambos.

Os dados obtidos nas curvas analíticas em meio aquoso, meio similar ao meio extrator e de adição padrão, foram empregados na análise de regressão linear e de um teste de falta de ajuste, fazendo uso do software Minitab 16. Os dados de linearidade para as curvas analíticas foram avaliados pelos parâmetros *F* de regressão, *F* de falta de ajuste e análise do coeficiente de determinação (*R*²).

4.5.2 Limites de Detecção e Quantificação

Após a análise das curvas analíticas e estudos de linearidade, foram realizadas as determinações dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos métodos propostos para determinação dos metais Fe, Mn, Mg e Ca (INMETRO, 2016).

Para os cálculos de LD e LQ foi realizada a estimativa do desvio padrão (*s*) da leitura de 10 medidas consecutivas do controle analítico composto por H₂O₂, HNO₃, e agitação ultrassônica de acordo com o método analítico empregado na determinação dos respectivos metais avaliados bem como pela inclinação da curva analítica (*b*) para cada um destes.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados através das Equações 1 e 2, respectivamente (INMETRO, 2016).

$$LD = \frac{3,3s}{b} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{10s}{b} \quad (2)$$

4.5.3 Precisão

A fim de verificar a confiabilidade dos métodos desenvolvidos, também foi avaliado a precisão destes na quantificação dos metais Fe, Mn, Mg e Ca, através dos testes de repetitividade, precisão intermediária e valor Horrat. (AOAC, 2012) As suspensões de mel foram preparadas no mesmo dia (repetitividade) e em dias diferentes (precisão intermediária) e analisadas por F AAS, tais parâmetros foram avaliados para todos os metais estudados.

Os resultados de precisão foram expressos pela estimativa de desvio padrão relativo (DPR), os quais são obtidos pela Equação 3, onde s representa a estimativa de desvio padrão das replicatas e \bar{x} é a média das replicatas realizadas (AOAC, 2012; INMETRO, 2016).

$$DPR\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (3)$$

Além do cálculo de precisão intermediária e repetitividade através da equação anterior, também foi calculado o valor de Horrat através da Equação 4, onde RSD_{ri} é o desvio padrão relativo para análises em dias diferentes e $PRSD_r$, é o desvio padrão predito que é dado pela equação de Horwitz (5), onde C é expresso como uma fração de massa decimal (AOAC, 2012).

$$Horrat = \frac{RSD_{ri}}{PRSD_r} \quad (4)$$

$$PRSD_r\% = 2C^{-0,15} \quad (5)$$

4.5.4 Exatidão

A exatidão dos métodos propostos para determinação dos metais Fe, Mn, Mg e Ca, também foi avaliada. Devido à ausência de um material de referência certificado (MRC), a exatidão dos métodos desenvolvidos neste trabalho, foi avaliada por meio da comparação com o método de digestão por via seca - tradicionalmente utilizado para determinação de minerais e conteúdos inorgânicos em alimentos como o mel, descrito no item 4.3.2 na seção de otimização do método.

As suspensões foram preparadas de acordo com a condição estabelecida a partir da otimização do método para cada metal. Para Mn, Mg e Fe foi solubilizado 1,0 g de

mel de ASF em 1,4 mol L⁻¹ de HNO₃ (Carlo Erba[®], 65%, v/v), 1,0% (m/v) de H₂O₂ (Biotec[®], 30%, m/v) e avolumado para 10 mL com H₂O ultrapura, em seguida utilizado 5 minutos de agitação ultrassônica. Para Ca, as suspensões foram preparadas utilizando 2,5 g de massa de mel de ASF, 0,2 mol L⁻¹ de HNO₃ (Carlo Erba[®], 65%, v/v), 3,0% (m/v) de H₂O₂ (Biotec[®], 30%, m/v) e avolumadas para 10 mL, em seguida foi utilizado 10 minutos de agitação ultrassônica.

Os valores de recuperação analítica (REC) para a análise da exatidão dos métodos desenvolvidos, foram obtidos através da relação entre o valor observado (suspensões de mel) e o valor esperado (digestão por via seca), através da Equação 6: (INMETRO, 2016)

$$REC\% = \frac{\text{valor observado}}{\text{valor esperado}} \times 100 \quad (6)$$

Durante a etapa de validação dos métodos analíticos desenvolvidos para a quantificação dos metais Fe, Mn, Mg e Ca, as alíquotas utilizadas para a avaliação de todos os parâmetros são referentes a amostra 88.

Em seguida, após definido, otimizado e validado os procedimentos analíticos mais adequados para a determinação das espécies de interesse em mel de ASF, foram determinadas as concentrações de espécies metálicas em amostras oriundas de diferentes regiões do Brasil.

5 Resultados e Discussão

5.1 Desenvolvimento e otimização de métodos analíticos para determinação de metais em mel de ASF

Na etapa de otimização do procedimento escolhido para a determinação de metais em mel de ASF, foram avaliados alguns métodos já relatados na literatura para a espécie *Apis mellifera* (POHL et al., 2012; DE ANDRADE et al., 2014), devido à escassez de estudos para o mel de ASF até a data desta etapa do estudo.

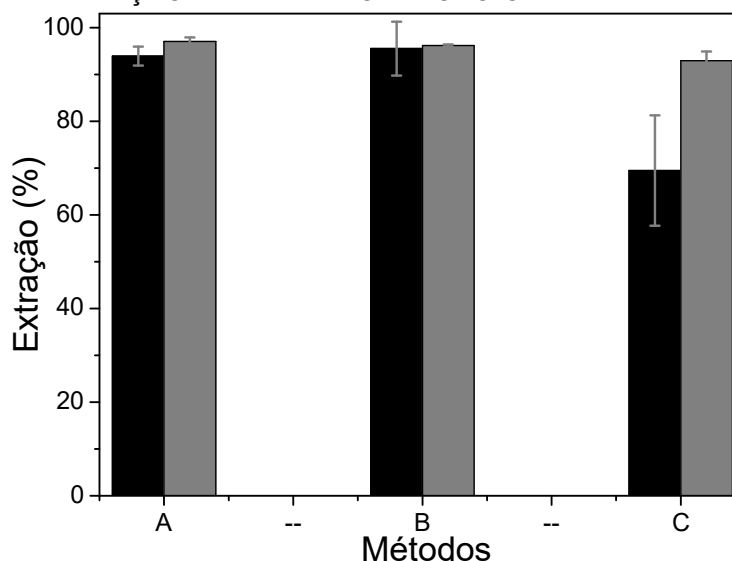
Dentre os métodos relatados na literatura sobre o preparo de amostra e posterior determinação de metais especificamente para o mel das ASF, pode-se citar a incineração das amostras em forno mufla e posterior solubilização das cinzas obtidas em meio ácido (ÁVILA et al., 2019; SOUZA et al., 2006), digestão nitro-perclórica (NASCIMENTO et al., 2018), solubilização de amostras de mel em HNO₃ (BILUCA et al., 2017) e o método gravimétrico (descrito pela legislação brasileira para o mel *Apis mellifera* com base no *Codex Alimentarius* – 2001) (VALE et al., 2018).

Em relação aos métodos citados acima, todos possuem elevado tempo de preparo e/ou utilização de grandes volumes de reagentes. Nesse sentido, nota-se a necessidade e a relevância de desenvolver métodos que otimizem tais condições a fim de minimizar possíveis interferentes na determinação de metais em mel de ASF.

Os resultados de concentração dos metais estudados no presente trabalho e obtidos nesta etapa, foram comparados com o método mais usual para determinação de metais nesse tipo de amostra, a digestão por via úmida assistida por micro-ondas.

Para os metais Fe e Mg foi possível realizar a comparação entre os métodos de amostragem em suspensão e o método de referência (digestão assistida por micro-ondas) sem realizar o enriquecimento das amostras, o que indica que as amostras *in natura* utilizadas durante essa etapa da otimização possuíam quantidades majoritárias de ambos metais. As porcentagens de extração obtidas a partir deste ensaio, são apresentadas na Figura 2 e seus respectivos valores dispostos na Tabela 6.

FIGURA 2 - COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO (A, B E C), COM O MÉTODO DE EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS.



LEGENDA: ■ Fe, ■ Mg. A = HNO₃ (0,1 mol L⁻¹) + Agitação ultrassônica; B = HNO₃ (0,1 mol L⁻¹) + H₂O₂ (3%, m/v) + Agitação ultrassônica (10 min.); C = (H₂O ultrapura) + Agitação ultrassônica (10 min.).
 FONTE: A AUTORA (2020)

Avaliando as taxas de extração para Mg, dispostas na Figura 2 e seus respectivos valores na Tabela 6, que variaram entre 93 – 97%, nota-se que nos três métodos avaliados há eficiência na extração deste metal, inclusive em meio aquoso, o que demonstra a facilidade em extrair esse elemento desse tipo de matriz, mesmo sendo complexa.

Para Fe, utilizando-se os métodos A e B, as taxas de extração variaram entre 94 – 95,5% (Tabela 6) enquanto que para o método C a extração não foi eficiente, uma vez que a taxa de extração obtida foi inferior a 80%.

TABELA 6 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA NA DETERMINAÇÃO DE Fe E Mg POR F AAS EM AMOSTRAS DE MEL DE ASF E APLICAÇÃO DO TESTE *TUKEY* DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS.

Métodos	Metais (%) e teste <i>Tukey</i>	
	Fe	Mg
A = HNO ₃ (0,1 mol L ⁻¹) + Agitação ultrassônica (10 min.)	94 ± 2 ^a	97 ± 1 ^a
B = HNO ₃ (0,1 mol L ⁻¹) + H ₂ O ₂ (3%, m/v) + Agitação ultrassônica (10 min.)	95,5 ± 5,8 ^a	96,2 ± 0,2 ^a
C = H ₂ O (ultrapura) + Agitação ultrassônica (10 min.)	69,5 ± 11,8 ^a	93 ± 2 ^a

LEGENDA: Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ^a

FONTE: A AUTORA (2020)

Com a realização de uma Análise de Variância (ANOVA) e um teste de comparação múltipla de média (teste *Tukey*) no nível de 95% de confiança descrito na Tabela 6, nota-se que para ambos os metais Fe e Mg, os três métodos foram estatisticamente semelhantes. No entanto, tal semelhança pode ser atribuída aos desvios padrão para os respectivos métodos, visto que para o método C, na

determinação de Fe, houve grande variabilidade entre as replicatas ocasionando um desvio padrão elevado, conseqüentemente tornando-se semelhante aos demais apesar de apresentar baixa taxa de extração para o analito determinado em relação as taxas obtidas para o mesmo através dos demais métodos.

O comportamento dos metais Fe e Mg diante de tal estudo pode ser explicado pelo fracionamento destes no mel. Em estudo realizado por Pohl e Prusisz (2006), eles identificaram que na fração dissolvida do mel, Mg e Ca estavam predominantemente presentes na forma das espécies catiônicas; a contribuição da fração catiônica para o Ca foi de 96 a 100% de sua concentração total na amostra, enquanto que para o Mg foi de 97 a 100%. Uma vez que esses metais estavam presentes na fração mais biodisponível, pode-se atribuir a isso a facilidade em extrair Mg, além de uma possível prospecção de como seria a extração do metal Ca no mesmo tipo de ensaio, uma vez que o comportamento de ambos metais foram semelhantes no estudo de fracionamento (POHL; PRUSISZ, 2006; POHL; SERGIEL; STECKA, 2009).

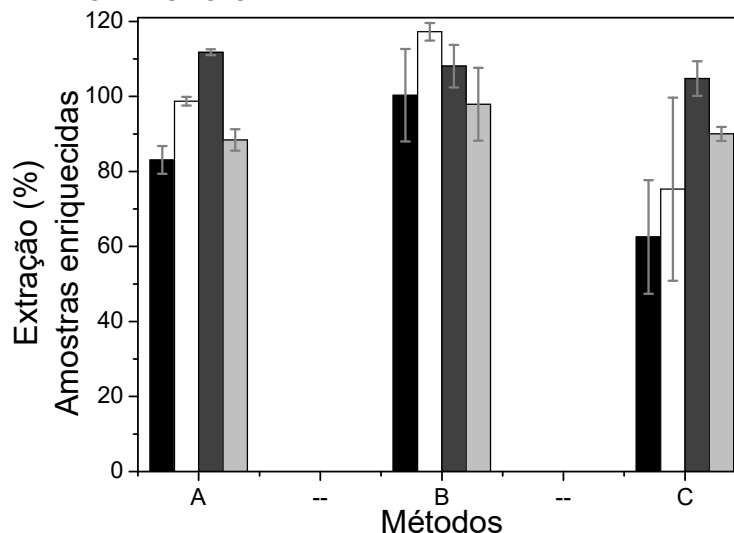
Em um estudo subsequente, realizado pelos mesmos autores, Pohl e Prusisz (2007) fizeram o fracionamento dos metais Fe e Zn em mel, sendo que verificou-se para o Fe, que a quantidade da fração catiônica, em relação a quantidade total do metal, variou de 23 a 40%; a mesma classe dos agrupamentos de metal para o Zn foi maior e variou de 73 a 100%. Para o Fe, a fração aniônica variou de 31 a 40%, enquanto que a fração residual foi de 29 a 45%. Para Zn, a contribuição das respectivas frações foram de 2 a 10% e de 5 a 20%, em relação a quantidade total do metal (POHL; PRUSISZ, 2007).

Uma vez que para Fe as frações, catiônica, aniônica e residual estiveram próximas, sugere-se que a biodisponibilidade de Fe seja atribuída as frações catiônicas e aniônicas, visto que na fração residual o metal pode estar ligado principalmente a ácidos fenólicos e outros compostos polifenólicos e/ou polissacarídeos, presumindo-se que estes compostos orgânicos presentes no mel inibam substancialmente a capacidade de absorção de Fe, conseqüentemente justificando-se a menor taxa de extração em meio aquoso, como observado na Figura 2 (POHL; PRUSISZ, 2007; POHL; SERGIEL; STECKA, 2009).

As taxas de extração apresentadas na Figura 3, foram avaliadas em amostras de mel enriquecidas com Fe, Zn, Cu e Mn. O metal Mg não foi incluído em tal ensaio

devido ao fato deste analito estar naturalmente presente, em amostras como o mel, em concentrações elevadas.

FIGURA 3 – COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO (A, B E C) DE AMOSTRAS DE MEL ENRIQUECIDAS COM ÍONS METÁLICOS, EM RELAÇÃO AO MÉTODO DE DIGESTÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS.



LEGENDA: ■ Fe, □ Zn, ■ Cu, ■ Mn. A = HNO₃ (0,1 mol L⁻¹) + Agitação ultrassônica; B = HNO₃ (0,1 mol L⁻¹) + H₂O₂ (3%, m/v) + Agitação ultrassônica (10 min.); C = (H₂O, ultrapura) + Agitação ultrassônica (10 min.).

FONTE: A AUTORA (2020)

Com base nas taxas de extração obtidas a partir dos métodos avaliados com as amostras de mel enriquecidas, nota-se na Tabela 7 que estas variaram entre 62,5% (Fe) a 117,2% (Zn). Como no estudo anterior, o método C apresentou as menores taxas de extração, as quais foram inferiores a 80% para os metais Fe e Zn, demonstrando complexidade em extrair esses metais apenas em meio aquoso, o que pode estar relacionado com a forma como esses metais estão ligados a esse tipo de matriz.

TABELA 7 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA NA DETERMINAÇÃO DE Fe, Zn, Cu E Mn POR F AAS EM AMOSTRAS DE MEL DE ASF ENRIQUECIDAS E APLICAÇÃO DO TESTE *TUKEY* DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS.

Métodos	Metais (µg g ⁻¹) e teste <i>Tukey</i>			
	Fe	Zn	Cu	Mn
A	83,1 ± 3,7 ^a	98,7 ± 1,2 ^a	111,5 ± 0,4 ^a	88,4 ± 2,9 ^a
B	100 ± 12 ^a	117,2 ± 2,4 ^a	108,1 ± 5,7 ^a	97,9 ± 9,7 ^a
C	62,5 ± 15,1 ^a	75,3 ± 24,4 ^a	104,8 ± 4,6 ^a	90 ± 2 ^a

LEGENDA: Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ^a A = HNO₃ (0,1 mol L⁻¹) + Agitação ultrassônica; B = HNO₃ (0,1 mol L⁻¹) + H₂O₂ (3%, m/v) + Agitação ultrassônica (10 min.); C = (H₂O ultrapura) + Agitação ultrassônica (10 min.)

FONTE: A AUTORA (2020)

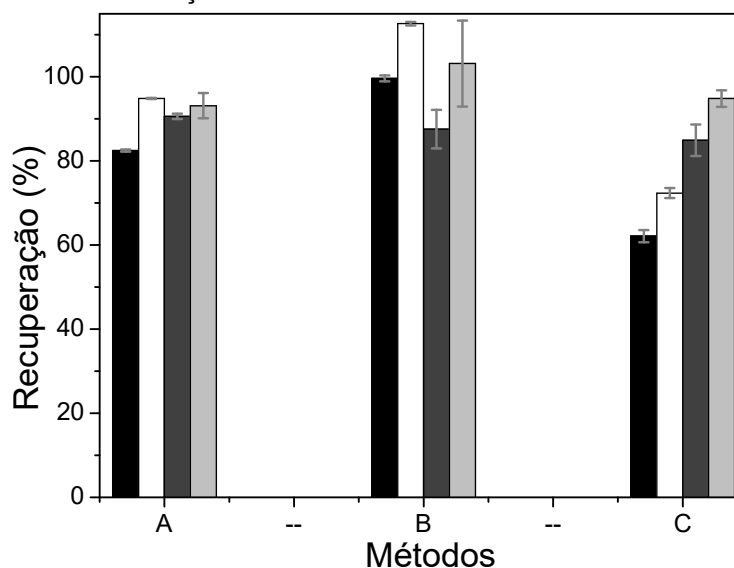
De acordo com o estudo de fracionamento dos metais Fe e Zn realizado por Pohl e Prusisz (2007), citados anteriormente, apesar de, no presente estudo, ambos metais apresentarem baixas taxas de extração no método C, nota-se que para Zn essa taxa é superior a do Fe, o que pode estar relacionado a maior contribuição da fração catiônica e menor contribuição de espécies residuais para este metal. (POHL; PRUSISZ, 2007). A possibilidade de haver a presença de cátions livres, hidroxicações e um grupo de complexos metálicos lábeis, potencializa a biodisponibilidade do metal devido à facilidade na migração através das membranas celulares; sugere-se que em decorrência disso obtém-se maiores taxas de extração para Zn (POHL; PRUSISZ, 2007). No entanto, nota-se a potencialização da extração de ambos metais na presença de reagentes oxidantes (métodos A e B).

Analisando os resultados desse estudo (Figura 3), pode-se observar que as maiores taxas de extração foram obtidas através do método B, o qual consiste na utilização de HNO_3 e H_2O_2 , seguido do método A, onde a extração foi apenas em meio ácido, e por último o método C, o qual foi utilizado apenas meio aquoso. Apesar de ambos os testes apresentarem estatisticamente semelhança, como pode ser observado pelo teste de *Tukey* na Tabela 7, pode-se atribuir isso aos elevados desvios padrão obtidos para as réplicas do método C, como também pode ser observado no teste anterior.

Sugere-se que a eficiência no desempenho obtido pelo método B em relação aos demais métodos avaliados, pode ser devido à mistura entre um ácido com alto poder oxidante (HNO_3), auxiliado por um outro agente oxidante (H_2O_2), o que torna o meio mais eficaz na destruição da matriz orgânica da amostra, facilitando assim a extração e a disponibilidade das espécies metálicas, além de impedir a formação dos resíduos carbonáceos (GARCIA et al., 2003; AJTONY, 2007).

Estudos de adição e recuperação também foram empregados para avaliar o desempenho dos métodos de amostragem em suspensão empregados na determinação dos metais Fe, Zn, Cu e Mn em amostras de mel de ASF. A Figura 4 apresenta os resultados de recuperação para os respectivos metais, bem como os valores dos mesmos dispostos na Tabela 8.

FIGURA 4 – AVALIAÇÃO DAS PORCENTAGENS DE RECUPERAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS EM MEL, PARA OS MÉTODOS DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO (A, B E C), UTILIZANDO ENSAIOS DE ADIÇÃO E RECUPERAÇÃO.



LEGENDA: ■ Fe, □ Zn, ■ Cu, ■ Mn. A = HNO₃ (0,1 mol L⁻¹) + Agitação ultrassônica; B = HNO₃ (0,1 mol L⁻¹) + H₂O₂ (3%, m/v) + Agitação ultrassônica (10 min.); C = (H₂O ultrapura) + Agitação ultrassônica (10 min.)

FONTE: A AUTORA (2020)

Como pode ser observado na Tabela 8, as taxas de recuperação neste estudo variaram de 62,1% (Fe) a 112,7% (Zn). Os resultados apresentados na Figura 4, corroboraram resultados obtidos nos estudos anteriores. Os métodos A e B forneceram taxas de recuperação acima de 80%, limite de aceitabilidade para avaliar a eficiência do método, variando entre 82,5 – 112,7%, para todos os metais avaliados. No método C foram obtidas taxas de extração inferiores a 80% para os metais Fe e Zn (Tabela 8).

Os três métodos A, B e C, foram significativamente diferentes na determinação dos metais Fe e Zn, de acordo com o teste *Tukey* (Tabela 8), sendo que através do método B foram obtidas as maiores taxas de extração para a maioria dos metais avaliados.

TABELA 8 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DE DIFERENTES MÉTODOS DE PREPARO DE AMOSTRA NA DETERMINAÇÃO DE Fe, Zn, Cu E Mn POR F AAS EM AMOSTRAS DE MEL DE ASF ENRIQUECIDAS E APLICAÇÃO DO TESTE *TUKEY* DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS.

Métodos	Metais (µg g ⁻¹) e teste <i>Tukey</i>			
	Fe	Zn	Cu	Mn
A	82,5 ± 0,3 ^b	94,9 ± 0,1 ^b	90,6 ± 0,6 ^a	93 ± 3 ^a
B	99,6 ± 0,7 ^a	112,7 ± 0,4 ^a	87,6 ± 4,6 ^a	103,2 ± 10,2 ^a
C	62,1 ± 1,5 ^c	72,3 ± 1,2 ^c	84,9 ± 3,8 ^a	95 ± 2 ^a

LEGENDA: Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ^{a b c} A = HNO₃ (0,1 mol L⁻¹) + Agitação ultrassônica; B = HNO₃ (0,1 mol L⁻¹) + H₂O₂ (3%, m/v) + Agitação ultrassônica (10 min.); C = (H₂O ultrapura) + Agitação ultrassônica (10 min.)

FONTE: A AUTORA (2020)

Dentre os três métodos avaliados, o método C, no qual a liberação dos metais foi realizada em meio aquoso, mostrou-se menos eficiente para o preparo das suspensões de mel e posterior determinação dos metais por F AAS, pois foram obtidas taxas de recuperação e extração inferiores a 80% para alguns metais e desvios padrão mais elevados quando comparados aos desvios obtidos nos demais métodos, em todos os estudos realizados para a avaliação de desempenho dos métodos.

Os métodos A e B apresentaram taxas de extração e recuperação satisfatórias, variando entre 80 – 110%. Porém, através do método B, em que foi utilizado HNO_3 (0,1 mol L^{-1}) e H_2O_2 (3%, m/v), obteve-se taxas de extração superiores em relação ao método A, no qual utilizava-se apenas HNO_3 (0,1 mol L^{-1}). Sendo assim, o método escolhido para determinação dos metais Fe, Zn, Cu, Mn e Mg, foi o método B composto por HNO_3 (0,1 mol L^{-1}) e H_2O_2 (3%, m/v) em meio aquoso.

Durante essa etapa de otimização dos procedimentos analíticos não foi possível incluir o metal Ca, devido a imprevistos relacionados ao equipamento necessário para a quantificação deste metal. No entanto, o método também foi empregado posteriormente nas etapas de otimização e quantificação, considerando a importância nutricional do mesmo.

5.2 Otimização do método analítico para determinação de metais em mel de ASF através de um estudo univariado

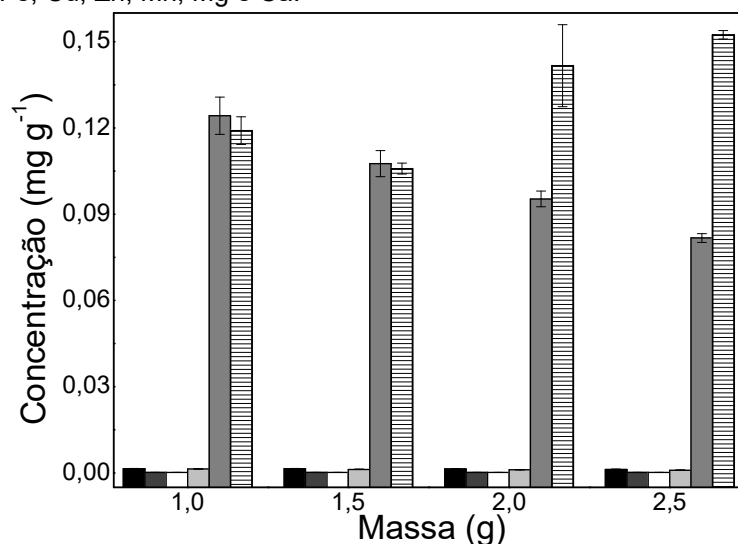
Após a escolha do método de extração mais adequado, foi realizado um estudo univariado para cada metal a fim de realizar a otimização do método escolhido, variando fatores como massa de mel, concentração de HNO_3 e H_2O_2 , além do tempo de agitação no banho de ultrassom.

Análises multivariadas também foram testadas durante a etapa de otimização do método a fim de avaliar a influência de cada um dos fatores, no entanto os efeitos obtidos não tiveram grandes variâncias, ficando dentro dos desvios de cada fator, não possibilitando conclusões satisfatórias a partir deste tipo de análise. Sendo assim, a análise univariada foi o tipo de análise mais adequada para dar continuidade aos estudos.

O primeiro fator avaliado para os metais estudados foi a massa de mel, a qual foi variada de 1,0 g a 2,5 g, baseando-se em testes preliminares realizados em laboratório e trabalhos reportados na literatura para amostras de mel (POHL, et al., 2017). A

Figura 5 apresenta as concentrações obtidas para os metais Fe, Cu, Zn, Mn, Mg e Ca no estudo da relação de massa de mel e volume dos reagentes utilizados, bem como seus respectivos valores apresentados na Tabela 9.

FIGURA 5 – ESTUDO UNIVARIADO DA RELAÇÃO MASSA/VOLUME DE MEL PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Cu, Zn, Mn, Mg e Ca.



LEGENDA: ■ Fe, ■ Cu, □ Zn, ■ Mn, ■ Mg, ≡ Ca
FONTE: A AUTORA (2020)

Como pode ser observado na Figura 5, para os metais Fe, Cu e Zn, ao aumentar a massa de mel não houve grandes variações nas concentrações dos respectivos metais, porém para Fe e Zn as concentrações não foram semelhantes estatisticamente, utilizando-se massas maiores (Tabela 9).

Para os metais Mn e Mg, de acordo o teste *Tukey* o qual consta na Tabela 9, utilizando-se massas distintas todas as concentrações obtidas foram significativamente diferentes, sendo que para a maioria dos metais massas menores, entre 1,0 – 1,5 g, resultaram na obtenção de maiores concentrações. Apenas para Ca o inverso foi observado, visto que as concentrações obtidas empregando 2,0 – 2,5 g de mel foram estatisticamente semelhantes e maiores quando comparadas com as demais massas avaliadas.

Sendo assim, para determinação de Fe, Zn, Cu, Mn e Mg optou-se por fixar a massa de 1,0 g de mel, diferindo apenas para Ca, em que se optou por fixar a massa de 2,5 g de mel para dar continuidade ao estudo univariado.

TABELA 9 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO ESTUDO UNIVARIADO DA RELAÇÃO MASSA/VOLUME DE MEL PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Cu, Zn, Mn, Mg e Ca E APLICAÇÃO DO TESTE *TUKEY* DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS.

Massa (g)	Metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) e Teste <i>Tukey</i>					
	Fe	Cu	Zn	Mn	Mg	Ca
1,0	1,4 \pm 0,1 ^a	0,20 \pm 0,03 ^a	0,21 \pm 0,02 ^a	1,38 \pm 0,06 ^a	124,2 \pm 6,5 ^a	119 \pm 5 ^b
1,5	1,46 \pm 0,09 ^a	0,22 \pm 0,01 ^a	0,21 \pm 0,01 ^a	1,25 \pm 0,04 ^b	107,6 \pm 4,5 ^b	106 \pm 2 ^b
2,0	1,40 \pm 0,06 ^{ab}	0,21 \pm 0,01 ^a	0,18 \pm 0,01 ^{ab}	1,10 \pm 0,03 ^c	95,3 \pm 2,7 ^c	141,7 \pm 14,3 ^a
2,5	1,23 \pm 0,03 ^b	0,19 \pm 0,01 ^a	0,15 \pm 0,01 ^b	0,96 \pm 0,02 ^d	81,8 \pm 1,5 ^d	152,6 \pm 1,5 ^a

LEGENDA: Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ^{a b c d}

FONTE: A AUTORA (2020)

Sugere-se que com a utilização de uma massa menor a superfície de contato entre a amostra e o meio extrator seja maior, facilitando a extração completa do metal. Além disso, massas superiores de mel podem reduzir a eficiência da taxa de aspiração e da nebulização das soluções de mel, como relatado por Pohl e Sergiel (2011), visto que a tensão superficial e a viscosidade entre a amostra e a solução de padrão externo, são diferentes.

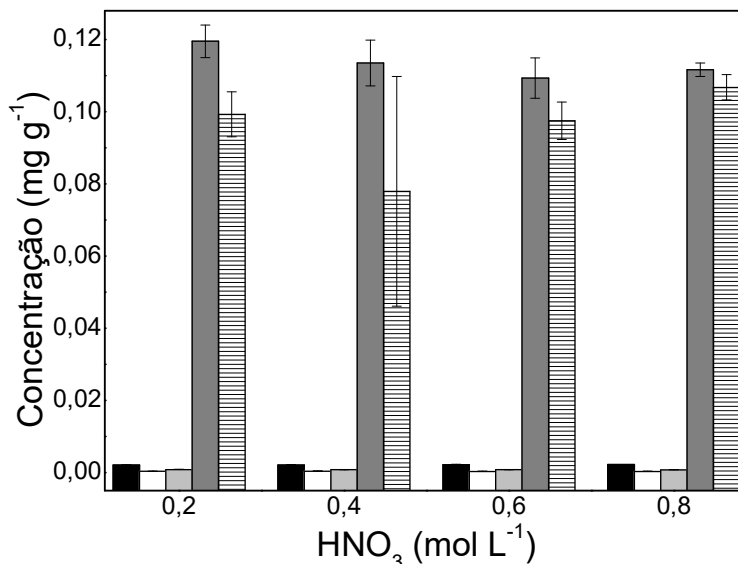
O mesmo não foi observado no comportamento de Ca realizando a mesma variação de massa (Figura 5). Sugere-se que isso seja atribuído a geometria do queimador utilizado na quantificação de Ca, o qual é relativamente menor que o queimador utilizado na quantificação dos demais metais. De acordo com os princípios da Lei de Beer-Lambert quanto maior o comprimento do meio através do qual a luz passa (caminho óptico) mais centros absorventes estarão no caminho (SKOOG, et al., 2006). A partir desta afirmação, presume-se que devido ao menor caminho óptico na determinação de Ca, faz-se necessário maior massa de mel para que assim obtenha-se mais centros absorventes do respectivo analito.

Ao longo do desenvolvimento do estudo univariado na otimização do método, o metal Cu, presente em baixas quantidades em matrizes como o mel, não foi determinado em quantidade suficiente em amostras subsequentes para ser detectado através da técnica de F AAS. Portanto, optou-se por não realizar a quantificação deste metal. Estudos futuros podem ser desenvolvidos empregando a técnica GF AAS para quantificação deste metal em mel de ASF. Sendo assim, foi dada continuidade ao estudo univariado para os demais metais, com exceção do metal Cu.

Após a otimização e escolha da massa de mel mais adequada, foi avaliada a concentração de HNO₃, a qual foi variada de 0,2 a 0,8 mol L⁻¹ para os metais Fe, Zn, Mn e Mg. Essa faixa também foi estabelecida baseando-se em testes preliminares realizados em laboratório e em trabalhos reportados na literatura, os quais utilizavam

concentrações próximas, como avaliado por Pohl e Sergiel (2010) 0,10; 0,28 e 0,7 mol L⁻¹. Os resultados estão apresentados na Figura 6.

FIGURA 6 – ESTUDO UNIVARIADO DA CONCENTRAÇÃO DE HNO₃ PARA A EXTRAÇÃO DE Fe, Zn, Mn, Mg E Ca.



LEGENDA: ■ Fe, □ Zn, ■ Mn, ■ Mg, ≡ Ca
 FONTE: A AUTORA (2019)

Como pode ser observado na Figura 6 e na Tabela 10, para os metais Fe, Zn, Mn, Mg e Ca não houve diferenças significativas nas concentrações obtidas variando a concentração de HNO₃, visto que todas elas foram semelhantes estatisticamente. Tendo isso em vista, a concentração de 0,2 mol L⁻¹ de HNO₃ mostrou-se a mais adequada para este método, uma vez que além da semelhança estatística, consiste em menor consumo do respectivo reagente.

TABELA 10 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO ESTUDO UNIVARIADO DA CONCENTRAÇÃO DE HNO₃ PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Zn, Mn, Mg e Ca E APLICAÇÃO DO TESTE TUKEY DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS.

HNO ₃ (mol L ⁻¹)	Metais (µg g ⁻¹) e Teste Tukey				
	Fe	Zn	Mn	Mg	Ca
0,2	2,10 ± 0,08 ^a	0,37 ± 0,01 ^{ab}	0,85 ± 0,03 ^a	119,6 ± 4,5 ^a	99,3 ± 6,2 ^a
0,4	2,1 ± 0,1 ^a	0,41 ± 0,01 ^a	0,82 ± 0,03 ^a	113,5 ± 6,3 ^a	78 ± 32 ^a
0,6	2,2 ± 0,1 ^a	0,32 ± 0,04 ^b	0,79 ± 0,03 ^a	109,3 ± 5,6 ^a	97,5 ± 5,2 ^a
0,8	2,23 ± 0,04 ^a	0,34 ± 0,03 ^b	0,76 ± 0,04 ^a	111,6 ± 1,9 ^a	106,8 ± 3,5 ^a

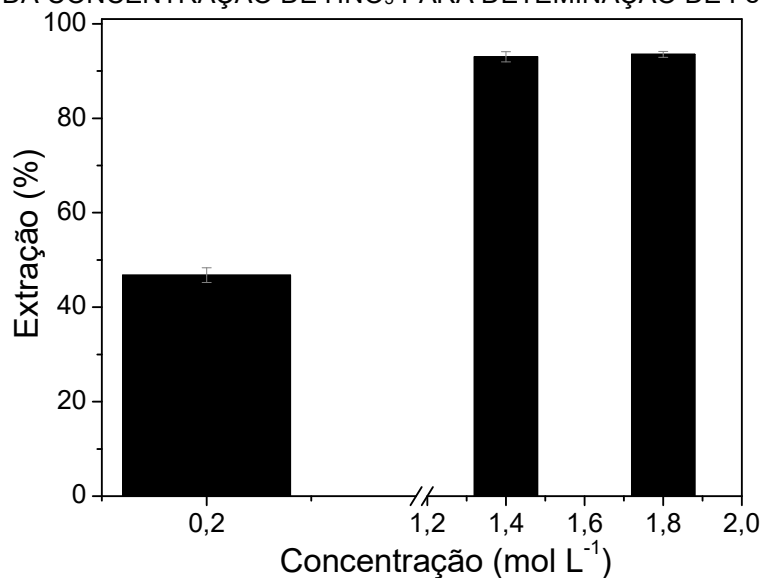
LEGENDA: Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ^{a b}
 FONTE: A AUTORA (2020)

Ao longo dos estudos, ao comparar as concentrações de Fe obtidas na suspensão de mel com aquelas obtidas por digestão por via seca, as taxas de extração foram inferiores a 80%, indicando que o Fe não estava sendo completamente extraído do

mel, o que pode estar relacionado a como o metal está ligado a compostos presentes no mel, como citado anteriormente no item 5.1.

Sendo assim, foram realizados estudos para este metal, variando a concentração de HNO_3 em uma faixa maior (1,4 e 1,8 mol L^{-1}). A Figura 7 apresenta os resultados obtidos no estudo de variação da concentração de HNO_3 em suspensão de mel e posterior determinação de Fe por F AAS.

FIGURA 7 – ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO DE HNO_3 PARA DETERMINAÇÃO DE Fe EM MEL.



LEGENDA: ■ Fe
FONTE: A AUTORA (2020)

Como pode ser observado na Figura 7, em que são apresentadas as taxas de extração fixando-se as concentrações de HNO_3 de 0,2 mol L^{-1} (condição estabelecida para os demais metais), 1,4 mol L^{-1} e 1,8 mol L^{-1} e comparando-as com as concentrações obtidas através da digestão por via seca, método tradicionalmente utilizado na digestão de mel, a extração de Fe foi mais eficiente utilizando-se concentrações maiores de ácido. Sugere-se que isso seja atribuído a possibilidade de o Fe estar ligado a macromoléculas como ácidos fenólicos e outros compostos fenólicos presentes nos méis, o que provavelmente torna o metal menos disponível. (POHL, SERGIEL, 2010)

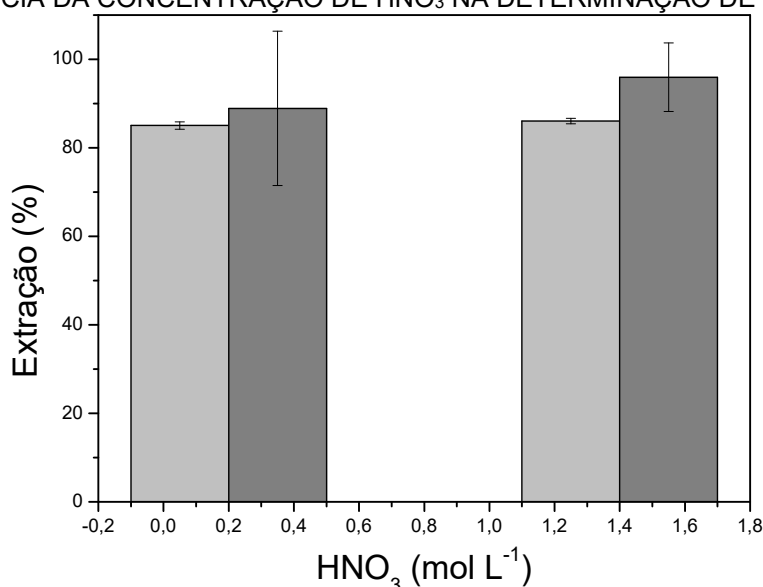
Uma vez que as taxas de extração para as concentrações de 1,4 mol L^{-1} e 1,8 mol L^{-1} de HNO_3 foram próximas (Figura 7), optou-se por utilizar a concentração que utiliza a menor concentração do respectivo reagente, ou seja 1,4 mol L^{-1} de HNO_3 . O emprego de tal condição foi corroborado pelos valores de um teste-*t* para comparação de duas médias experimentais, o qual indicou que não existe diferença significativa

entre as concentrações obtidas utilizando-se 1,4 e 1,8 mol L⁻¹ de HNO₃, visto que o valor de $t_{\text{calculado}} = -1,18$ foi inferior ao valor de $t_{\text{crítico}} = 2,78$ e o valor de $p = 0,31$ foi superior a 0,05, concluindo que a utilização de ambas concentrações de HNO₃ resultam em taxas de extração de Fe estatisticamente iguais.

Visando o desenvolvimento de um procedimento analítico eficiente para quantificação dos metais avaliados neste trabalho foi realizado um teste utilizando a mesma condição de Fe (1,4 mol L⁻¹ de HNO₃) para os metais Mn e Mg, a fim de avaliar se seria possível empregar a mesma condição para os três metais o que auxiliaria a reduzir a utilização de reagentes, redução de massa das amostras de mel avaliadas e aumento da frequência analítica do procedimento.

Através do teste- t para comparação de duas médias experimentais foi verificado se havia diferenças significativas utilizando as concentrações de 0,2 mol L⁻¹ e 1,4 mol L⁻¹ de HNO₃ na quantificação de Mn e Mg. Como pode ser observado na Figura 8, em que é apresentado as taxas de extração para os respectivos metais e concentrações de HNO₃.

FIGURA 8 – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE HNO₃ NA DETERMINAÇÃO DE Mn E Mg.



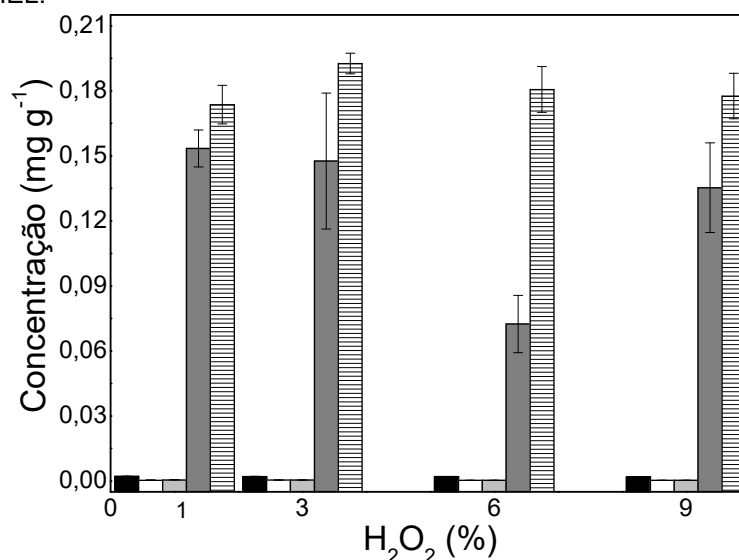
LEGENDA: ■ Mn, ■ Mg
FONTE: A AUTORA (2020)

Para Mn considerando-se os valores obtidos para $t_{\text{calculado}} = 1,44$ e $p = 0,223$, com valor de $t_{\text{crítico}} = 2,78$, assume-se que não existem diferenças significativas na utilização das concentrações de HNO₃ analisadas. Para Mg os valores obtidos foram $t_{\text{calculado}} = 0,52$ e $p = 0,653$ e uma vez que $t_{\text{crítico}} = 4,303$, pode-se considerar que na

quantificação de Mg também não existem diferenças significativas na utilização das concentrações de HNO₃ avaliadas, no nível de 95% de confiança.

Após a definição das condições ótimas para os fatores massa de mel e concentração de HNO₃, foi avaliada a concentração de H₂O₂, a qual foi variada de 1 a 9%. Como para os fatores anteriores, a faixa de concentração de H₂O₂ foi baseada em testes prévios em laboratório e em alguns trabalhos reportados na literatura que avaliam a proporção de H₂O₂ utilizada em relação a outros agentes oxidantes (POHL, 2009; POHL et al., 2017). Os resultados são apresentados na Figura 9.

FIGURA 9 – ESTUDO UNIVARIADO DA PORCENTAGEM DE H₂O₂ PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Zn, Mn, Mg E Ca EM MEL.



LEGENDA: ■ Fe, □ Zn, ■ Mn, ■ Mg, ≡ Ca
FONTE: A AUTORA (2020)

Como pode ser observado na Figura 9, não foram obtidas grandes variações nas concentrações de Fe, Zn e Mn, utilizando diferentes concentrações de H₂O₂. Porém, para Mg a porcentagem de H₂O₂ mais adequada foi de 1% (m/v), uma vez que com essa condição foi obtida maior concentração do respectivo metal, isso pode ser observado na Tabela 11, em que se observa maiores concentrações para a maioria dos metais, inclusive Mg, ao utilizar H₂O₂ a 1% (m/v).

Para Ca, apesar de haver estatisticamente semelhança entre as concentrações obtidas ao variar as porcentagens de H₂O₂, utilizando-se H₂O₂ a 3% (m/v) obteve-se maior concentração deste metal, como pode ser observado na Figura 9. Portanto, optou-se por utilizar a concentração de 1% (m/v) de H₂O₂ na quantificação dos metais Fe, Zn, Mn e Mg e de 3% (m/v) para determinação de Ca.

TABELA 11 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO ESTUDO UNIVARIADO DA CONCENTRAÇÃO DE H₂O₂ PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Zn, Mn, Mg e Ca E APLICAÇÃO DO TESTE TUKEY DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS.

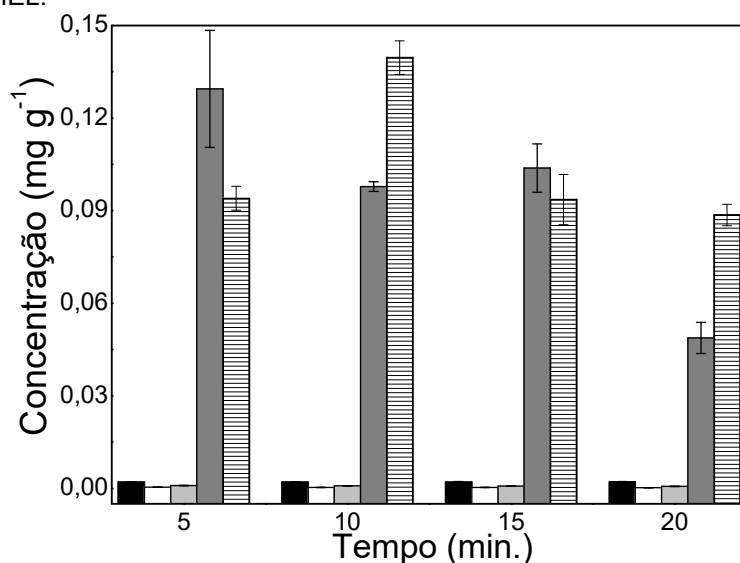
H ₂ O ₂ (%)	Metais (µg g ⁻¹) e teste Tukey				
	Fe	Zn	Mn	Mg	Ca
1	2,14 ± 0,05 ^a	0,36 ± 0,02 ^{ab}	0,47 ± 0,06 ^a	153,4 ± 8,5 ^a	173,7 ± 8,9 ^a
3	2,1 ± 0,1 ^a	0,41 ± 0,01 ^a	0,38 ± 0,08 ^{ab}	147,6 ± 31,3 ^a	192,6 ± 4,8 ^a
6	2,00 ± 0,07 ^a	0,33 ± 0,03 ^b	0,31 ± 0,05 ^b	72,4 ± 13,2 ^a	180,7 ± 10,5 ^a
9	1,91 ± 0,09 ^a	0,33 ± 0,04 ^b	0,29 ± 0,03 ^b	135,3 ± 20,7 ^a	177,6 ± 10,5 ^a

LEGENDA: Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ^{a b}

FONTE: A Autora (2020)

O último fator avaliado durante o estudo univariado foi o tempo de agitação ultrassônica com a variação de 5 a 20 minutos, o qual foi baseado em testes prévios e adaptado de diferentes métodos de extração de metais em mel reportados na literatura (DE ANDRADE et al., 2014; ALTUNAY et al., 2019). Os resultados das concentrações dos metais determinados em relação a variação de tal fator, são apresentados na Figura 10 e na Tabela 12.

FIGURA 10 – ESTUDO UNIVARIADO DO TEMPO DE ULTRASSOM PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Zn, Mn, Mg E Ca EM MEL.



LEGENDA: ■ Fe, □ Zn, ■ Mn, ■ Mg, ≡ Ca

FONTE: A AUTORA (2020)

Para Fe, como pode ser observado na Tabela 12, não houve variações significativas nas concentrações obtidas conforme o aumento de tempo utilizado na agitação ultrassônica. Já para Zn e Mn, a eficiência na extração foi reduzida ao empregar a mesma variação de tempo. Na determinação de Mg, obteve-se concentrações estatisticamente diferentes em três dos quatro intervalos de tempo avaliados; apenas entre 5 e 10 minutos houve semelhança estatística, sendo que a

maior concentração de Mg foi obtida utilizando-se 5 minutos de agitação ultrassônica. Diante disso foi fixado este tempo na determinação de Fe, Zn, Mn e Mg.

Avaliando as concentrações obtidas para Ca, a maioria foi semelhante estatisticamente com exceção da concentração obtida utilizando-se 10 minutos de agitação ultrassônica, sendo esta superior as demais. Portanto, fixou-se o tempo de 10 minutos de agitação ultrassônica na determinação de Ca.

TABELA 12 – RESULTADOS OBTIDOS ATRAVÉS DO ESTUDO UNIVARIADO DO TEMPO DE AGITAÇÃO ULTRASSÔNICA PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Zn, Mn, Mg e Ca E APLICAÇÃO DO TESTE *TUKEY* DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA DE MÉDIAS.

Tempo (min.)	Metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) e teste <i>Tukey</i>				
	Fe	Zn	Mn	Mg	Ca
5	2,01 \pm 0,06 ^a	0,39 \pm 0,03 ^a	0,91 \pm 0,06 ^a	130 \pm 19 ^a	94 \pm 4 ^b
10	2,08 \pm 0,08 ^a	0,31 \pm 0,02 ^{ab}	0,81 \pm 0,03 ^{ab}	97,8 \pm 1,5 ^{ab}	139,6 \pm 5,4 ^a
15	2,1 \pm 0,1 ^a	0,29 \pm 0,06 ^{ab}	0,72 \pm 0,05 ^b	103,8 \pm 7,8 ^b	93,6 \pm 8,1 ^b
20	2,15 \pm 0,09 ^a	0,22 \pm 0,02 ^b	0,68 \pm 0,08 ^b	48,8 \pm 5,0 ^c	88,6 \pm 3,5 ^b

LEGENDA: Médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ^{a b c}
 FONTE: A AUTORA (2020)

Considerando que Ca se diferenciou dos demais metais diante da variação de tempo de agitação ultrassônica, sugere-se que um tempo menor pode ser insuficiente para liberação do metal na solução, lembrando que foi utilizada uma massa maior de mel para a quantificação do respectivo metal e tempos superiores de agitação ultrassônica podem facilitar a formação de óxidos de Ca, que dificultam a determinação do metal por F AAS. (NEVES et al., 2009)

A partir do estudo univariado foram estabelecidas as condições ótimas do método utilizado para a determinação dos metais Fe, Zn, Mn e Mg em mel de ASF, as quais foram 1,0 g de mel, 1,4 mol L⁻¹ de HNO₃, 1,0% (m/v) de H₂O₂ e 5 minutos em agitação ultrassônica. Para Ca, as condições ótimas estabelecidas foram de 2,5 g de mel, 0,2 mol L⁻¹ de HNO₃, 3,0% (m/v) de H₂O₂ e 10 minutos em agitação ultrassônica.

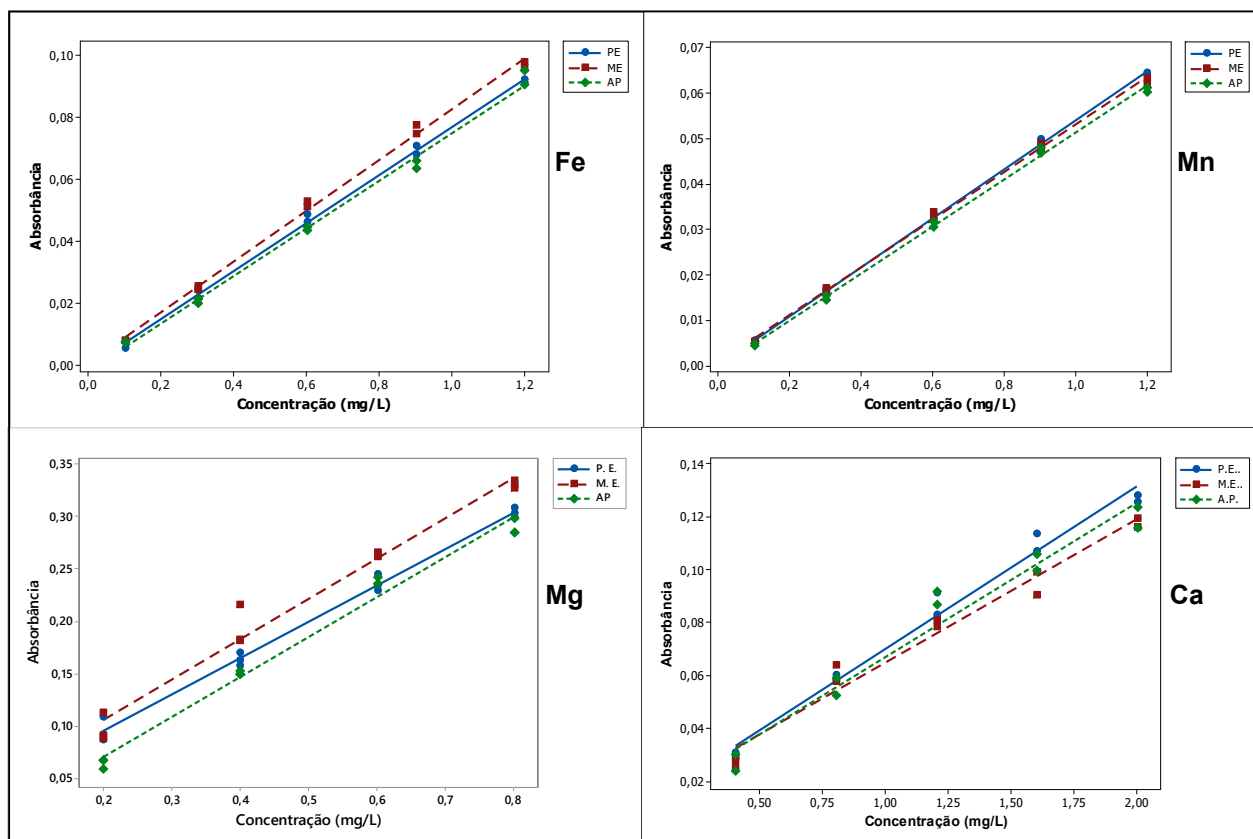
Diante disso, o estudo univariado, no qual o objetivo era o desenvolvimento de um método analítico adequado para a determinação de metais em mel de ASF, apresentou resultados satisfatórios, uma vez que as condições estabelecidas caracterizam um método rápido e que utiliza pequenos volumes de reagentes durante a etapa de preparo desse tipo de matriz quando comparado a métodos tradicionais de digestão pra esse tipo de amostra. Após a otimização, foi realizada a validação dos métodos propostos, avaliando parâmetros como linearidade, LD, LQ, precisão e exatidão.

5.3 Validação do método analítico proposto para determinação de metais em mel de ASF

5.3.1 Linearidade

Para avaliação da linearidade do método desenvolvido para cada metal avaliado em mel, foram construídas curvas analíticas conforme os procedimentos descritos na Tabela 5 no item 4.5.1 na seção de material e métodos, com padrões metálicos de Fe, Zn, Mn, Mg e Ca, os quais foram adicionados em meio aquoso (curva analítica de padrão externo – PE), em meio similar ao meio extrator (método de simulação de meio extrator – ME) e em suspensão de mel (método de adição de padrão – AP), a fim de verificar se a matriz de mel poderia interferir na quantificação dos metais de interesse. A Figura 11 apresenta as curvas analíticas construídas para Fe, Mn, Mg e Ca.

FIGURA 11 – CURVAS ANALÍTICAS DE PE (●), ME (■) E AP (◆) OBTIDAS PARA A DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn, Mg E Ca.



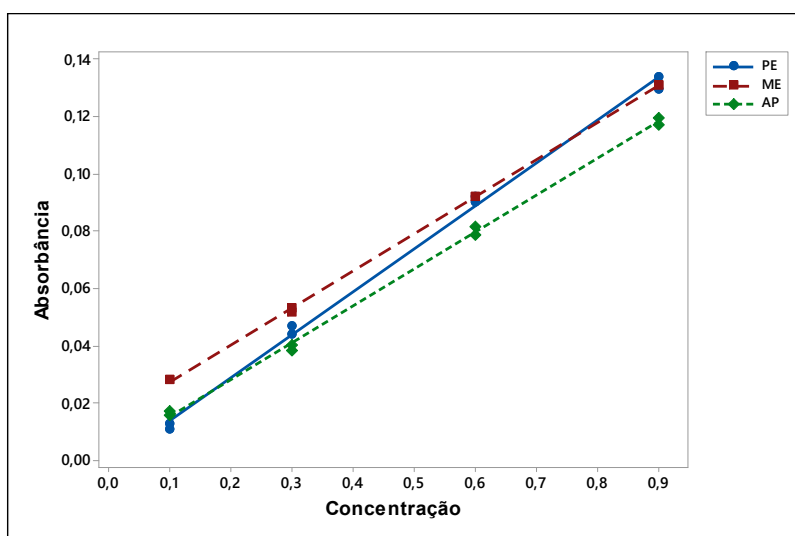
FONTE: A AUTORA (2020)

Como pode ser observado na Figura 11, para os três meios em que foram construídas as curvas analíticas, não houve efeito de matriz significativo para os metais Fe, Mn, Mg e Ca, ou seja, independente do meio utilizado não existem

diferenças entre as inclinações das três curvas avaliadas. Sendo assim, notou-se que é possível determinar os metais nas suspensões de mel utilizando curva com padrão externo ou em meio extrator.

No entanto, para o metal Zn a inclinação da curva de PE diferiu significativamente da inclinação das curvas de ME e AP, indicando que é necessário utilizar a curva com simulação do meio extrator para a quantificação deste metal, uma vez que a inclinação neste meio é semelhante à inclinação de AP, como pode ser observado na Figura 12.

FIGURA 12 – CURVAS ANALÍTICAS COM PE (●), ME (■) E AP (◆) OBTIDAS NA DETERMINAÇÃO DE Zn.



FONTE: A AUTORA (2020)

Para verificar a significância estatística dos coeficientes lineares e angulares das equações de cada curva analítica, foram avaliados os valores de t e p , os quais estão dispostos na Tabela 13.

TABELA 13 – AVALIAÇÃO DOS COEFICIENTES LINEARES E ANGULARES NAS EQUAÇÕES DA RETA PARA OS METAIS QUANTIFICADOS EM MEL.

Calibração	Equação da reta	Avaliação da Equação da Retas			
		Coeficiente Linear		Coeficiente Angular	
		t_{obs}	p	t_{obs}	p
Fe (0,1 – 1,2)	PE A = -0,000373 + 0,0774 x [Fe]	-0,41	0,689	63,34	0,000
	ME A = 0,00089 + 0,0818 x [Fe]	0,75	0,473	50,94	0,000
	AP A = - 0,00180 + 0,0769 x [Fe]	-1,29	0,232	40,70	0,000
Zn (0,1 – 1,2)	PE A = - 0,00157 + 0,150 x [Zn]	-0,83	0,436	44,90	0,000
	ME A = 0,0143 + 0,129 x [Zn]	28,37	0,000	144,69	0,000
	AP A = 0,00203 + 0,129 x [Zn]	1,76	0,129	62,73	0,000
Mn (0,1 – 1,2)	PE A = 0,000339 + 0,0538 x [Mn]	0,91	0,391	106,08	0,000
	ME A = 0,000847 + 0,0523 x [Mn]	1,42	0,194	64,44	0,000
	AP A = - 0,000300 + 0,0516 x [Mn]	-0,50	0,631	63,16	0,000
Mg (0,2 – 0,8)	PE A = 0,0252 + 0,348 x [Mg]	4,88	0,001	36,85	0,000
	ME A = 0,0282 + 0,385 x [Mg]	2,91	0,016	21,69	0,000
	AP A = -0,0080 + 0,387 x [Mg]	-0,76	0,475	20,14	0,000
Ca (0,4 – 2,0)	PE A = 0,00901 + 0,0613 x [Ca]	2,40	0,043	21,63	0,000
	ME A = 0,0107 + 0,0542 x [Ca]	2,42	0,042	16,20	0,000
	AP A = 0,00892 + 0,0582 x [Ca]	1,60	0,148	13,88	0,000

Notas: As unidades das concentrações das curvas de calibração são dadas em mg L⁻¹. (PE: Padrão Externo; ME: Simulação de Meio Extrator; AP: Adição de Padrão). Fe, Mn e Ca: $t_{crítico(8;0,05)} = 2,306$. Zn: $t_{crítico(6;0,05)} = 2,447$. Mg: $t_{crítico(10;0,05)} = 2,228$ para PE e ME, $t_{crítico(4;0,05)} = 2,776$ para AP
 FONTE: A AUTORA (2020)

Como pode ser observado na Tabela 13, para o coeficiente angular, os valores de t_{obs} foram superiores aos valores de $t_{crítico}$ para todos os metais, indicando que este é significativo na equação da reta, fato corroborado pelos valores de p os quais foram inferiores a 0,05. Já para o coeficiente linear, houveram diferenças entre os metais.

Para os metais Fe e Mn os valores de t_{obs} referentes ao coeficiente linear foram inferiores aos valores de $t_{crítico}$, enquanto que os valores de p foram superiores a 0,05, indicando que o coeficiente linear não é significativo na equação da reta, dispensando sua representação nesta. Dessa forma, para Fe e Mn, a equação da reta pode ser representada por $y = bx$.

Para Mg e Ca o coeficiente linear foi significativo nas curvas de PE e ME, enquanto que para Zn apenas na curva de ME, onde os valores t_{obs} para esses metais foram superiores aos valores de $t_{crítico}$ e os valores de p foram inferiores a 0,05. Na curva de AP, para Ca e Mg, o coeficiente linear não foi significativo, bem como nas curvas de PE e AP para Zn, também sendo dispensada a sua representação nas equações da reta.

A partir dos dados obtidos nas curvas analíticas com PE, ME e AP, foram calculados os coeficientes de regressão linear e de determinação (R^2) e a avaliação

de modelos de regressão linear e falta de ajuste no nível de 95% de confiança, dados que são representados nas Tabelas 14 e 15.

TABELA 14 – PARÂMETROS DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA Fe, Zn, Mn, Mg E Ca.

Calibração	Parâmetros de Regressão			R ²
	Equação da reta ¹	Intervalos de confiança da inclinação das curvas analíticas (IC)		
Fe (0,1 – 1,2)	PE	A = 0,0774(±0,001) x [Fe]	(0,07458 – 0,08022)	99,8
	ME	A = 0,0818(±0,002) x [Fe]	(0,07809 – 0,08550)	99,7
	AP	A = 0,0769(±0,002) x [Fe]	(0,07254 – 0,08126)	99,5
Zn (0,1 – 1,2)	PE	A = 0,150(±0,003) x [Zn]	(0,14180 – 0,15819)	99,7
	ME	A = 0,0143(±0,0005) + 0,129(±0,0009) x [Zn]	(0,12681 – 0,13119)	100
	AP	A = 0,129(±0,002) x [Zn]	(0,12397 – 0,13403)	99,8
Mn (0,1 – 1,2)	PE	A = 0,0538(±0,0005) x [Mn]	(0,05263 – 0,05497)	99,9
	ME	A = 0,0523(±0,0008) x [Mn]	(0,05043 – 0,05417)	99,8
	AP	A = 0,0516(±0,0008) x [Mn]	(0,04972 – 0,05348)	99,8
Mg (0,2 – 0,8)	PE	A = 0,0252(±0,005) + 0,348(±0,009) x [Mg]	(0,32697 – 0,36902)	99,2
	ME	A = 0,0282(±0,010) + 0,385(±0,017) x [Mg]	(0,34547 – 0,42452)	97,7
	AP	A = 0,387(±0,019) x [Mg]	(0,34004 – 0,43396)	98,3
Ca (0,4 – 2,0)	PE	A = 0,00901(±0,004) + 0,0613(±0,003) x [Ca]	(0,05476 – 0,06783)	98,1
	ME	A = 0,0107(±0,004) + 0,0542(±0,003) x [Ca]	(0,04648 – 0,06192)	96,7
	AP	A = 0,0582(±0,004) x [Ca]	(0,04853 – 0,06787)	95,5

Notas: As unidades de concentração das curvas de calibração são dadas por mg L⁻¹. (PE: Padrão Externo; ME: Simulação de Meio Extrator; *ME: Simulação de Meio Extrator; AP: Adição de Padrão)

¹Valores em parênteses correspondem aos intervalos de confiança dos coeficientes linear e angular

FONTE: A AUTORA (2020)

Como pode ser observado na Tabela 14, onde são apresentados os parâmetros de regressão, as inclinações entre as curvas de PE, ME e AP, são similares e não diferem estatisticamente entre si. Para R², os valores variaram de 95,5 a 100,0, ou seja, os coeficientes de correlação (r) variaram de 0,98 a 1,00, corroborando a relação linear entre o sinal de absorbância e as concentrações dos metais.

Analisando os intervalos de confiança da inclinação (IC) referentes a cada curva analítica, é possível observar que para todos os metais os IC de AP foram semelhantes aos IC de ME e PE, o que indica que tanto a curva de ME, quanto a curva de PE poderiam ser utilizadas nas quantificações de Fe, Mn, Mg e Ca em suspensão de mel, o que é vantajoso pois reduz os custos de análise além de aumentar a frequência analítica.

Considerando que para Zn, não seria possível o uso da curva PE, devido as diferenças de inclinação entre as curvas (PE, ME e AP), seria necessário adotar a curva de ME para todos os metais, incluindo Zn. Porém, não foi possível dar continuidade nas quantificações, com precisão, para este metal em amostras subsequentes, o que pode ser atribuído às amostras serem colhidas em épocas diferentes durante as etapas de otimização/validação e também em como este metal está ligado a amostras como o mel.

Sendo assim, optou-se por utilizar a curva de PE para a quantificação dos metais Fe, Mn, Mg e Ca devido ao fato de que os IC da inclinação para este tipo de padronização foram similares quando comparados aos IC das curvas de AP para os respectivos metais.

Uma vez que a condição otimizada de Fe foi concluída utilizando uma concentração maior de HNO₃ do que para os demais metais, foi realizada a comparação entre as curvas de PE e ME utilizando a concentração de HNO₃ de 0,2 mol L⁻¹ e 1,4 mol L⁻¹, a fim de verificar se os coeficientes lineares de ambas as curvas diferiam significativamente.

As inclinações das curvas analíticas obtidas para Fe foram similares, uma vez que a razão entre seus respectivos coeficientes angulares foi próxima a 1,0, além de apresentarem similaridade entre seus intervalos de confiança, sendo assim foi possível a utilização da curva analítica de PE para quantificação de Fe, mesmo sendo utilizado uma concentração maior de ácido para extração desse metal.

Além da avaliação de parâmetros de regressão também foram analisados valores de F de regressão e F de falta de ajuste em um nível de 95% de confiança, dados que estão apresentados na Tabela 15. Os valores de F_{obs} variaram de 192,55 (Ca) a 11252,40 (Mn), e todos foram superiores aos valores de $F_{crítico}$, indicando que a regressão linear é significativa para todas as curvas analíticas.

TABELA 15 – DADOS DE LINEARIDADE PARA Fe, Mn, Mg E Ca.

Calibração		Avaliação da Linearidade			
		Regressão		Falta de ajuste	
		F_{reg}	p	F_{faj}	p
Fe (0,1 – 1,2)	PE	4011,52	0,00	0,76	0,565
	ME	2595,39	0,00	5,01	0,058
	AP	1656,27	0,00	3,27	0,117
Mn (0,1 – 1,2)	PE	11252,40	0,00	1,94	0,241
	ME	4151,92	0,00	4,64	0,066
	AP	3989,26	0,00	3,50	0,105
Mg (0,2 – 0,8)	PE	1357,81	0,00	0,14	0,869
	ME	470,41	0,00	2,40	0,153
	AP	405,73	0,00	9,98	0,028
Ca (0,4 – 2,0)	PE	467,76	0,00	3,38	0,112
	ME	262,38	0,00	5,23	0,053
	AP	192,55	0,00	5,27	0,052

NOTAS: As unidades de concentração das curvas de calibração são dadas por mg L⁻¹. (PE: Padrão Externo; ME: Simulação de Meio Extrator; AP: Adição de Padrão). F_{reg} = F de regressão; F_{faj} = F de falta de ajuste; p = valor de p

FONTE: A AUTORA (2020)

Para avaliar a falta de ajuste dos modelos lineares, foram analisados valores de F_{faj} os quais variaram de 0,76 (Fe) a 9,98 (Mg), em que todos apresentaram-se abaixo

dos valores de $F_{crítico}$ e com valores de p acima de 0,05, exceto para a curva de AP para o metal Mg ($F_{aj} = 9,98 > F_{crítico} = 6,94$ e $p = 0,028 < 0,05$). Isso pode ser explicado devido à matriz ser naturalmente rica em relação a este elemento, dificultando assim a construção deste tipo de curva analítica.

Esses resultados indicam que existe uma elevada significância estatística da curva ajustada. As curvas em meio aquoso, suspensão de mel e simulação de meio extrator apresentaram linearidade adequada e ficaram dentro dos intervalos de confiança das inclinações estudados. Portanto, as curvas analíticas de PE utilizadas para a determinação de Fe, Mn, Mg e Ca foram lineares, sem falta de ajuste e podem ser adotadas na quantificação destes metais em mel de ASF.

5.3.2 Limites de detecção e quantificação

Devido aos teores dos metais encontrados no mel das ASF e a complexidade da matriz em relação a quantificação destes, é necessário saber qual a concentração do analito que pode ser detectada ou quantificada através do método proposto. Sendo assim, foram determinados os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) do método desenvolvido e otimizado para quantificação de Fe, Mn, Mg e Ca em mel de ASF através da técnica de F AAS.

De acordo com Skoog (2006) o limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor concentração do analito que pode ser distinguida em certo nível de confiança, o qual depende da magnitude do sinal analítico e o tamanho das flutuações estatísticas no sinal do controle, também chamado de branco. Já o limite de quantificação (LQ) é definido como a menor quantidade de analito que pode ser quantificado na amostra com precisão e exatidão aceitáveis (SKOOG, 2006).

A determinação de LD e LQ neste trabalho foi determinado através das Equações 1 e 2 descritas anteriormente no item 4.5.2. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 16.

TABELA 16 – LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO OBTIDOS PARA Fe, Mn, Mg E Ca, EMPREGANDO A TÉCNICA DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO E F AAS.

Elemento	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g g}^{-1}$) – Literatura	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$) – Literatura
Fe	0,2	0,05*	0,7	0,20*
Mn	0,2	0,01*	0,6	0,05*
Mg	0,2	0,02*	0,6	0,10*
Ca	4,3	0,10*	13	0,33*

*BILUCA, et al. (2017); **LEMONS, et al. (2018)

FONTE: A AUTORA (2020)

Como pode ser observado na Tabela 16, os valores de LD para Fe, Mn e Mg foram de $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ enquanto que para Ca foi obtido um LD de $4,3 \mu\text{g g}^{-1}$. Em relação aos valores de LQ, foram obtidos $0,6 \mu\text{g g}^{-1}$ para Mn e Mg, $0,7 \mu\text{g g}^{-1}$ para Fe e $13 \mu\text{g g}^{-1}$ para Ca. Tais valores, quando comparados com a literatura, podem ser relativamente elevados.

No entanto, Biluca et al. (2017) ao analisar amostras de mel de ASF provenientes do estado de Santa Catarina, utilizaram um espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP - MS) para a quantificação de Fe, Mn e Mg, técnica que possui vantagens na sensibilidade para obtenção de limites de detecção e quantificação menores, porém com um custo mais elevado quando comparado com a técnica de F AAS.

Para Ca, os valores LD e o LQ obtidos por Biluca et al. (2017) também foram inferiores aos apresentados neste trabalho. No entanto, deve-se reiterar que neste trabalho foi utilizada a técnica de F AAS, a qual é menos sensível que as técnicas de emissão com plasma. Pode-se também sugerir que o fato de, no presente trabalho, ser utilizada uma mistura de HNO_3 e H_2O_2 , tenha elevado os valores do controle analítico, elevando assim os limites de detecção e quantificação.

Lemos et al. (2018) realizaram a análise de méis de quatro espécies de abelhas, dentre essas, espécies de ASF, utilizando a técnica de espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP - OES). Comparando os valores de LD e LQ deste estudo, com os valores obtidos por Lemos et al. (2018) para os metais Fe, Mn, Mg e Ca, apenas para Fe e Mg os valores foram próximos. No entanto, considerando que a técnica de ICP é mais sensível, ainda assim os valores de LD e LQ obtidos por F AAS, são considerados aceitáveis.

Portanto, de modo geral pode-se considerar que os métodos desenvolvidos apresentam sensibilidade adequada, considerando as misturas extratoras utilizadas nos métodos e a técnica de determinação dos metais avaliados que foi empregada.

5.3.3 Precisão

A fim de verificar a confiabilidade do método desenvolvido também foi avaliada a precisão do método, através dos testes de repetitividade, precisão intermediária e valor Horrat (AOAC, 2012). As suspensões de mel foram preparadas no mesmo dia

(repetitividade) e em dias diferentes (precisão intermediária), sendo analisadas por F AAS.

Neste trabalho, os resultados de precisão são expressos pela estimativa de desvio padrão ou coeficiente de variação (CV), também chamado de estimativa de desvio padrão relativo (DPR), os quais são obtidos pela equação 3, descrita anteriormente em Materiais e Métodos no item 4.5.3.

Além das estimativas da precisão intermediária e repetitividade calculadas pela equação 3, são apresentados os valores de Horrat obtidos através da equação 4 (item 3.5.3), os quais estão dispostos na Tabela 17.

TABELA 17 – VALORES REFERENTES AO ESTUDO DE PRECISÃO (REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA) E VALOR HORRAT UTILIZANDO AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO.

Elemento	(%DPR)		Horrat
	Repetitividade	Precisão Intermediária	
Fe	1,4	6,9	0,5
Mn	4,8	9,8	0,6
Mg	3,4	9,6	1,2
Ca	0,1	9,0	1,2

FONTE: A AUTORA (2020)

Os valores de DPR para repetitividade variaram de 0,1 a 4,8% enquanto que para precisão intermediária esses valores estiveram entre 6,9 a 9,8%, os quais são considerados aceitáveis e adequados, pois de acordo com a recomendação dos órgãos normativos Inmetro (2016) e AOAC (2012), os critérios de aceitação limitam-se a 11% para esses parâmetros.

Ainda de acordo com a AOAC (2012), valores Horrat que variam de 0,3 – 1,3 estão dentro dos critérios de aceitabilidade para esse parâmetro demonstrando a adequabilidade da precisão intermediária. Como pode ser observado na Tabela 17, todos os metais avaliados neste trabalho estiveram dentro desta faixa. Os valores referentes a repetitividade, precisão intermediária e Horrat obtidos neste estudo são aceitáveis e sugerem que o método desenvolvido possui precisão adequada.

5.3.4 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio da taxa de recuperação analítica, comparando a amostragem em suspensão a um método tradicional de digestão de amostra (via seca). Os valores obtidos foram encontrados através da Equação 6 descrita no item 4.5.4 na sessão de Materiais e Métodos. Para o método ser

considerado exato, esperava-se que as taxas de recuperação dos metais na matriz, fossem próximas a 100%. Os percentuais de extração obtidos no presente trabalho para os metais Fe, Mn, Mg e Ca estão dispostos na Tabela 18.

TABELA 18 – VALORES DE RECUPERAÇÃO (%) PARA DETERMINAÇÃO DE Fe, Mn, Mg E Ca EM MEL DE ASF.

Metais	Recuperação (%)
Fe	95,6
Mn	90,5
Mg	96,8
Ca	86,5

FONTE: A AUTORA (2020)

As taxas de recuperação obtidas para exatidão neste trabalho variaram entre 86,5 – 96,8% para os metais avaliados, indicando que o método proposto apresenta exatidão adequada, uma vez que de acordo com a recomendação de órgãos normativos a faixa de aceitabilidade deste parâmetro é de 80 a 110% (INMETRO, 2016).

Após a validação do procedimento analítico, foram quantificados os metais Fe, Mn, Mg e Ca em amostras de mel de ASF oriundas, em sua maioria, da região noroeste do estado do Paraná.

5.4 Determinação da Concentração Total de Metais em de Mel de ASF

Foram determinados os metais Fe, Mn, Mg e Ca em amostras de mel de diferentes espécies de ASF, oriundas de diferentes regiões do Brasil, sendo a maioria do Estado do Paraná. Foi utilizado a técnica de amostragem em suspensão, previamente otimizada e validada, para favorecer a disponibilidade dos metais para posterior quantificação. As cores de cada amostra e os teores metálicos obtidos nas mesmas são apresentadas na Tabela 19.

TABELA 19 – CONCENTRAÇÃO TOTAL DOS METAIS Fe, Mn, Mg E Ca EM MEL DE ASF EMPREGANDO A TÉCNICA DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO.

(continua)







Amostra	Fe $\mu\text{g g}^{-1}$	Mn $\mu\text{g g}^{-1}$	Mg $\mu\text{g g}^{-1}$	Ca $\mu\text{g g}^{-1}$
 1	5,77±0,60	1,60±0,10	51,94±5,92	101,01±11,84
 2	4,62±0,01	1,36±0,03	40,83±0,83	99,71±6,71
 3	1,23±0,11	0,72±0,06	33,96±0,45	68,78±7,64
 4	1,37±0,14	1,06±0,04	46,21±1,73	73,81±7,97
 5	<LQ→0,55±0,07	ND	8,10±1,83	26,66±2,41
 6	<LQ→0,52±0,06	<LQ→0,04±0,02	10,63±0,94	28,43±3,21

TABELA 19 – CONCENTRAÇÃO TOTAL DOS METAIS Fe, Mn, Mg E Ca EM MEL DE ASF EMPREGANDO A TÉCNICA DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO.

(continuação)





















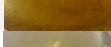





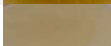

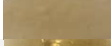








	7	2,23±0,21	<LQ→0,52±0,02	47,88±2,97	80,22±0,60
	8	1,85±0,11	1,68±0,07	26,96±0,15	57,10±4,64
	9	2,58±0,22	2,26±0,05	31,35±1,27	64,17±3,77
	10	0,70±0,06	<LQ→0,19±0,00	36,30±1,13	76,84±11,85
	11	2,14±0,35	0,66±0,03	109,55±2,93	71,44±3,18
	12	2,37±0,26	0,88±0,04	65,07±3,74	53,51±4,38
	13	0,87±0,06	0,72±0,01	60,52±0,15	101,71±0,76
	14	2,53±0,01	0,90±0,01	18,28±0,52	37,84±1,40
	15	3,05±0,13	0,94±0,03	19,71±2,13	38,93±2,90
	16	<LQ→0,61±0,01	<LQ→0,21±0,01	157,69±11,88	190,99±8,36
	17	4,31±0,22	0,86±0,02	110,30±9,59	37,52±0,57
	18	2,23±0,13	0,90±0,07	63,61±3,80	72,91±4,39
	19	<LQ→0,53±0,04	1,17±0,07	25,17±2,76	43,65±2,88
	20	0,83±0,01	2,66±0,07	49,34±6,73	30,58±2,99
	21	12,53±0,63	6,68±0,24	98,11±8,11	160,11±4,19
	22	ND	2,26±0,12	32,27±2,42	<LQ→5,83±0,11
	23	5,33±0,06	3,57±0,16	159,08±11,28	90,20±4,07
	24	5,94±0,73	2,13±0,19	76,73±4,64	92,35±2,68
	25	3,85±0,05	1,56±0,06	41,31±0,94	46,35±1,70
	26	ND	<LQ→0,56±0,13	7,92±0,14	<LQ→0,04±0,01
	27	<LQ→0,16±0,03	3,41±0,19	80,89±4,70	73,66±1,23
	28	<LQ→0,14±0,04	2,99±0,20	83,23±4,74	75,34±3,04
	29	ND	1,40±0,06	7,58±0,39	<LQ→0,35±0,04
	30	ND	2,38±0,19	7,97±0,84	<LQ→5,49±0,28
	31	<LQ→0,03±0,03	3,49±0,17	72,70±0,49	71,59±3,71
	32	ND	<LQ→0,19±0,12	14,71±1,87	13,04±0,39
	33	3,79±0,10	11,17±0,25	153,94±19,30	89,75±6,43
	34	1,93±0,07	<LQ→0,31±0,07	127,08±8,20	69,92±5,38
	35	1,63±0,19	4,78±0,18	77,10±0,79	54,73±5,59
	36	3,17±0,10	12,40±0,05	136,03±22,92	254,85±6,93
	37	0,75±0,06	3,22±0,04	82,03±2,32	68,00±3,39
	38	2,17±0,03	20,91±0,28	300,25±59,73	256,21±26,14
	39	2,77±0,06	22,21±0,21	247,99±27,11	264,56±6,99
	40	1,49±0,09	6,68±0,07	150,93±14,82	111,42±10,57
	41	<LQ→0,23±0,03	ND	44,30±5,94	32,09±3,33
	42	<LQ→0,40±0,04	0,92±0,07	53,74±5,02	46,47±6,08
	43	<LQ→0,39±0,04	ND	83,47±7,50	31,04±4,91








TABELA 19 – CONCENTRAÇÃO TOTAL DOS METAIS Fe, Mn, Mg E Ca EM MEL DE ASF EMPREGANDO A TÉCNICA DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO.

(continuação)

44	1,24±0,02	0,95±0,01	113,12±10,10	94,30±4,17
45	2,48±0,15	17,42±0,49	351,48±9,58	220,66±9,18
46	<LQ→0,13±0,01	4,40±0,04	54,48±3,24	59,75±4,87
47	3,12±0,31	24,27±2,76	220,55±12,60	284,43±12,76
48	1,95±0,22	17,58±0,23	186,16±17,57	176,10±15,03
49	<LQ→0,15±0,11	2,08±0,01	41,12±2,99	39,28±3,08
50	ND	1,95±0,02	38,28±1,87	36,64±1,98
51	ND	1,42±0,05	36,87±2,17	30,46±2,20
52	<LQ→0,14±0,00	1,18±0,03	48,04±2,16	24,37±0,88
53	1,40±0,02	4,28±0,03	63,91±7,00	82,34±4,89
54	2,56±0,16	22,17±0,30	208,82±10,74	363,77±6,41
55	<LQ→0,23±0,03	0,81±0,06	43,14±3,19	45,57±2,75
56	2,25±0,09	16,48±0,18	173,31±16,86	321,49±21,92
57	1,90±0,12	12,65±0,26	152,21±15,79	207,56±4,02
58	1,34±0,06	1,27±0,02	25,87±1,04	27,87±2,73
59	<LQ→0,30±0,02	1,42±0,03	46,48±2,86	36,33±2,37
60	1,32±0,12	2,25±0,01	43,91±1,21	54,98±2,10
61	1,47±0,12	13,96±0,38	156,50±17,56	125,20±3,12
62	<LQ→0,21±0,02	2,71±0,10	52,82±7,28	41,95±0,22
63	<LQ→0,57±0,07	5,55±0,06	81,23±6,23	73,85±5,19
64	1,18±0,05	16,67±0,18	142,52±9,45	165,44±18,84
65	65,65±2,54	3,11±0,03	54,11±2,65	41,37±2,81
66	90,73±1,97	20,57±0,20	156,03±12,68	175,14±12,04
67	123,92±1,49	18,61±0,48	256,07±0,93	174,96±0,37
68	2,20±0,25	41,92±4,67	248,14±6,43	276,03±35,49
69	0,83±0,09	6,52±0,16	66,33±10,79	83,43±5,80
70	1,11±0,03	35,70±0,20	200,41±6,51	211,45±22,24
71	1,80±0,12	33,08±3,33	194,50±18,32	211,16±8,66
72	<LQ→0,56±0,08	4,54±0,17	74,42±2,41	69,00±0,14
73	<LQ→0,65±0,09	27,68±1,51	199,05±14,01	208,09±9,29
74	1,10±0,07	3,97±0,11	60,53±7,47	52,55±1,84
75	1,61±0,04	41,06±1,74	202,52±1,83	224,05±20,42
76	<LQ→0,08±0,02	19,93±1,42	143,29±11,29	143,67±13,37
77	ND	3,99±0,11	60,38±4,10	53,34±5,35
78	ND	35,98±0,89	75,48±7,13	61,80±5,15
79	ND	15,11±1,17	37,00±2,50	39,25±1,50
80	2,85±0,15	1,20±0,02	75,92±4,46	73,30±3,34
81	0,84±0,07	<LQ→0,36±0,03	54,59±6,30	42,14±2,79

TABELA 19 – CONCENTRAÇÃO TOTAL DOS METAIS Fe, Mn, Mg E Ca EM MEL DE ASF EMPREGANDO A TÉCNICA DE AMOSTRAGEM EM SUSPENSÃO.

(conclusão)

	82	2,49±0,01	3,13±0,03	153,99±21,10	109,59±4,47
	83	1,25±0,04	0,89±0,10	48,31±4,99	25,92±1,55
	84	1,01±0,01	<LQ→0,40±0,02	27,65±2,18	18,38±0,51
	85	1,24±0,06	0,66±0,06	83,45±3,81	34,39±1,77
	86	<LQ→0,17±0,02	ND	1,60±0,25	<LQ→3,89±0,08
	87	1,25±0,03	1,30±0,04	187,47±1,49	137,04±4,06
	88	2,10±0,01	1,39±0,05	117,31±9,88	76,43±5,90
TOTAL		5,32±0,18	7,44±0,30	93,32±6,83	94,19±6,19

LEGENDA: LQ: Limite de Quantificação
 FONTE: A AUTORA (2020)

Como pode ser observado na Tabela 19, foi possível quantificar Fe em 88,6% das amostras nas quais as concentrações variaram de ND a $123,92 \pm 1,49 \mu\text{g g}^{-1}$. Em relação a Mn, foi possível quantificá-lo em 95,5% das amostras, variando sua concentração de ND a $41,92 \pm 4,67 \mu\text{g g}^{-1}$.

Para os metais Mg e Ca, os quais são os minerais mais abundantes no mel, foi possível quantificar Mg em todas as amostras e Ca em 93,2% destas, suas concentrações variaram entre $1,60 \pm 0,25$ a $351,48 \pm 9,58 \mu\text{g g}^{-1}$ e $<LD\rightarrow 0,04 \pm 0,01$ a $363,77 \pm 6,41 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. A ordem de concentração dos metais avaliados na maioria das amostras foi de $\text{Ca} > \text{Mg} > \text{Mn} > \text{Fe}$.

Como pode ser observado na Tabela 20, a qual se refere a teores de metais encontrados na literatura, para amostras de mel de diferentes espécies de abelhas, oriundas de diferentes regiões, os teores de metais obtidos no presente trabalho foram semelhantes aos teores obtidos por Ávila et al., (2019) e Biluca et al., (2018), para diversas espécies de ASF.

TABELA 20 – TEORES DE Fe, Mn, Mg e Ca PARA DIFERENTES ESPÉCIES DE ASF E A ESPÉCIE APIS MELLIFERA.

Espécie	Referência	Região	Metais ($\mu\text{g g}^{-1}$)			
			Fe	Mn	Mg	Ca
<i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Ávila et al., (2019)	Brasil	4,80 – 14, 20	6,70 – 22,40	87,80 – 210,80	172,80 – 429,40
	Biluca et al., (2018)	Brasil	2,04	4,13	63,94	134,91
	Neste trabalho	Brasil	0,03 – 123,92	0,21 – 41,06	25,87 – 351,48	24,37 – 363,77
<i>Melipona quadrifasciata</i>	Ávila et al., (2019)	Brasil	1,70 – 15,60	5,50 – 30,00	38,00 – 160, 20	136,40 – 132,30
	Biluca et al., (2018)	Brasil	0,41 – 0,66	0,52 – 1,38	25,94 – 62,44	110,90 – 122, 80
	Neste trabalho	Brasil	0,17 – 4,31	0,86 – 2,38	1,60 – 110,30	0,35 – 38,93
<i>Melipona marginata</i>	Ávila et al., (2019)	Brasil	2,00 – 91,10	9,70 – 105,60	53,70 – 866,50	121,20 – 1550,80
	Biluca et al., (2018)	Brasil	0,82 – 5,78	2,06 – 3,28	29,56 – 57,73	116,08 – 133,92
	Neste trabalho	Brasil	1,01	0,40	27,65	18,38
<i>Tetragonisca angustula</i>	Biluca et al., (2018)	Brasil	4,14	2,98	95,8	123,29
	Neste trabalho	Brasil	0,14 – 12,53	0,04 – 35,98	7,92 – 159,08	0,04 – 160,11
<i>Tetragonisca clavipes</i>	Biluca et al., (2018)	Brasil	2,56	1,54	88,06	136,37
	Neste trabalho	Brasil	1,24 – 1,25	0,66 – 1,30	83,45 – 187,47	34,39 – 137,04
ASF (teores totais)	Ávila et al., (2019)	Brasil	1,30 – 91,10	5,50 – 105,60	38,00 – 866,50	121,2 – 1550,80
	Biluca et al., (2018)	Brasil	0,33 – 6,22	0,52 – 5,69	25,94 – 231,02	88,67 – 136,37
	Neste trabalho	Brasil	0,03 – 123,92	0,04 – 41,92	1,60 – 351,48	0,04 – 363,77
<i>Apis mellifera</i>	Boussaid et al., (2018)	Tunísia	0,83 – 3,54	–	37,32 – 78,12	113,85 – 221,07
	Oliveira et al., (2019)	Brasil	0,72 – 47,0	0,17 – 4,62	2,82 – 96,0	28,4 – 216,0
	Altun et al., (2017)	Turquia	<0,001 – 7,3	<0.001 – 0,27	–	<0,001 – 4,5

NOTA: ASF (teores totais): consiste na faixa dos teores totais dos respectivos metais em mel de ASF, sem especificação de espécies.

FONTE: A AUTORA (2020)

Os teores de metais obtidos para espécie *Scaptotrigona bipunctata* neste trabalho foram superiores para a maioria dos metais quantificados no mel desta espécie pelos demais autores, bem como os teores obtidos para o mel das ASF, de maneira geral, conforme consta na Tabela 20. Vale ressaltar que o número de amostras não foi ponderado nesta observação.

Comparando os teores obtidos para o mel das ASF com o mel da espécie *Apis mellifera* o mesmo pode ser observado. Para todos os metais as concentrações foram superiores tanto em amostras oriundas do Brasil quanto para amostras oriundas da Tunísia e Turquia.

Sugere-se que isso pode ser relacionado as especificidades de cada região de coleta, uma vez que é possível fazer a relação entre o conteúdo elementar do mel e sua região de produção. Kreitals e Watling (2014) citam que as “assinaturas químicas” que são resultantes de influências climatológicas, geoquímicas e antropogênicas “são incorporadas na geologia, solos, água e vegetação da região; percorrendo a cadeia alimentar até organismos de nível superior” podendo ocorrer uma variação expressiva entre diferentes regiões (KREITALS, WATLING, 2014; SHADAN et al., 2018).

Devido à quantidade significativa de amostras avaliadas, uma análise quimiométrica mais aprofundada apresenta-se como uma ferramenta adequada, a fim de verificar a relação entre as amostras e as concentrações obtidas dos metais avaliados.

5.5 Análise Estatística das Concentrações de Metais em Mel de ASF empregando Análise dos Componentes Principais (ACP)

A análise de componentes principais (ACP) consiste em uma ferramenta quimiométrica que baseia-se em um projeto de dados multidimensionais que são dispostos em diferentes coordenadas de um gráfico, dependendo da variância e da correlação mínima entre esses dados. É possível transformar os dados experimentais em gráficos de escores, em coordenada 2D ou 3D, em que os grupos de valores formados podem ser utilizados na classificação e/ou separação de amostras com dados similares (WEI et al., 2010).

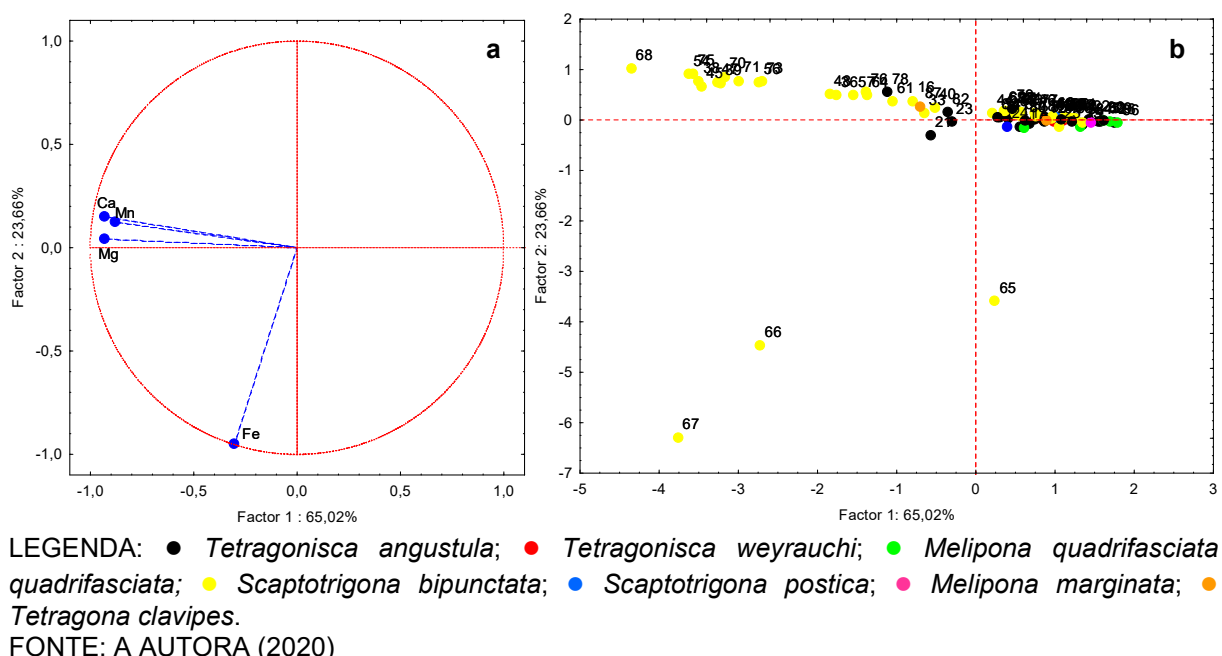
O método de ACP visa a análise exploratória de dados, diminuindo a dimensionalidade de um conjunto de dados, mas preservando a variabilidade destes (JOLLIFE, CADIMA, 2016). Sendo assim, os fatores principais (CPs) identificados

procuram melhor explicar a variabilidade que possa existir na matriz de dados (PELLERANO et al., 2012).

Neste trabalho, os parâmetros utilizados para a análise de componentes principais foram os teores Fe, Mn, Mg e Ca. A partir disso foi construído uma matriz de dados de dimensão que corresponde aos quatro parâmetros e seus respectivos valores obtidos para 88 amostras de mel de ASF. Os dados originais foram auto escalonados e utilizados para gerar o modelo de regressão multivariada.

A Figura 13 apresenta os gráficos de pesos e de escores para as duas primeiras componentes principais.

FIGURA 13 – GRÁFICO DE PESOS (a) E GRÁFICO DE ESCORES (b) PARA AS COMPONENTES PRINCIPAIS 1 E 2 OBTIDAS COM A ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS DE MEL.



Com a ACP foi possível obter uma explicação de 88,7% da variabilidade dos dados, sendo que a primeira componente (CP1) foi responsável por explicar 65% da relação existente entre as variáveis e a segunda componente (CP2) 23,7%. Levando em consideração as características inerentes a cada amostra, essa explicação pode ser considerada adequada.

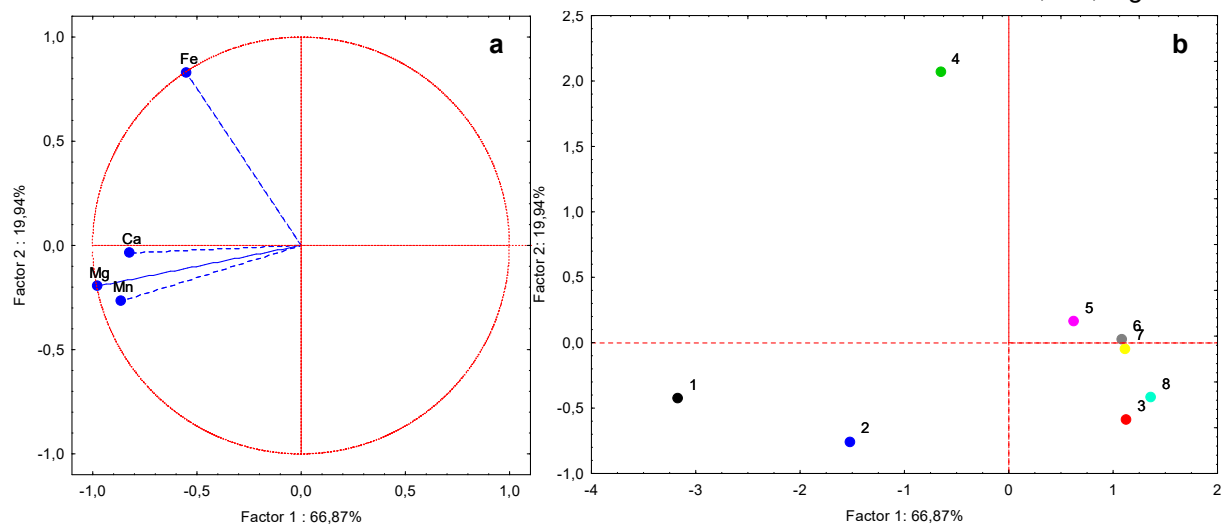
Observando-se a figura 13-b, pela CP1, a qual foi responsável por maior parte da explicação dos dados na ACP, nota-se que em relação ao eixo positivo de X não houve separação definida das amostras em relação as espécies avaliadas. Já ao analisar o eixo negativo de X nota-se que houve maior separação das amostras com

predominância da espécie *Scaptotrigona bipunctata*, sendo que estas apresentaram maiores teores dos metais Mn, Mg e Ca.

Em relação ao eixo negativo de Y, destacam-se as amostras 65-67 por seus teores de Fe. Sugere-se que isso pode ser atribuído ao fato de que na região de coleta dessas amostras (Tabela 2) a predominância de solo é do tipo Latossolo Vermelho Distroférico, o qual possui altos teores de Fe nos horizontes subsuperficiais, consequentemente, podendo ocorrer maior absorção deste metal pelas plantas nas quais o néctar foi coletado pelas ASF.

A seguir, é apresentada a ACP utilizando como parâmetros teores dos metais Fe, Mn, Mg e Ca e como variáveis diferentes regiões do Brasil e de outros países, a fim de realizar uma comparação com os teores dos respectivos metais entre diferentes espécies de abelhas (ASF e *Apis mellifera*) bem como entre as regiões de coleta das amostras. A Figura 14 apresenta os gráficos de pesos e de escores para as duas primeiras componentes principais.

FIGURA 14 – GRÁFICO DE PESOS (a) E GRÁFICO DE ESCORES (b) PARA AS COMPONENTES PRINCIPAIS 1 E 2 OBTIDAS COM A ANÁLISE MULTIVARIADA DOS TEORES DE Fe, Mn, Mg E Ca.



LEGENDA: ● Brasil (Este Trabalho – ASF); ● Brasil (Biluca et al., 2018 – ASF); ● Brasil (Ávila et al., 2019 – ASF); ● Brasil (Oliveira et al., 2019 – *Apis mellifera*); ● Egito (Karabagias et al., 2018 – *Apis mellifera*); ● Grécia (Karabagias et al., 2018 – *Apis mellifera*); ● Marrocos (Karabagias et al., 2018 – *Apis mellifera*); ● Espanha (Karabagias et al., 2018 – *Apis mellifera*)
FONTE: A AUTORA (2020)

Foi possível obter, com a ACP, 86,8% de explicação da variabilidade dos dados, sendo que a CP1 foi responsável em explicar 66,9% da relação existente entre as variáveis e a CP2 por 19,9%. Considerando as características das amostras, a explicação obtida pode ser considerada adequada.

Avaliando a Figura 14-b, nota-se que houve distribuição definida entre os dados. Em relação ao eixo negativo de X, pela CP1, as amostras provenientes das regiões 1 e 2, as quais correspondem aos teores encontrados em amostras de mel de ASF oriundas do Brasil, apresentaram os maiores teores dos metais avaliados.

Dentre as referências utilizadas e os dados obtidos neste trabalho, observa-se que as amostras de mel brasileiras possuem maiores teores de Fe, Mn, Mg e Ca, destacando-se as amostras de mel de ASF utilizadas no presente trabalho e por Biluca et al., 2018. Isso pode ser atribuído pelo tipo de solo da região de cultivo do mel, visto que no Brasil há uma grande diversidade de solos e a maioria desses são ricos em minerais.

5.6 Grau de Ingestão Humana de Fe, Mn, Mg e Ca em Função do Consumo de mel de ASF

Tendo em vista que o consumo do mel de ASF está cada vez maior, torna-se pertinente a realização de cálculos correlacionando a quantidade ingerida de mel e dos metais avaliados neste trabalho. Considerando a ingestão diária de 1 a 2 colheres de sopa (aproximadamente 25 g) de mel, foram calculados os teores de ingestão de metais para adultos. A Tabela 21 apresenta uma estimativa dessa ingestão tendo em vista as concentrações mínima, máxima e média de cada metal obtido a partir das 88 amostras avaliadas, que constam na Tabela 19.

TABELA 21 – ESTIMATIVA DE INGESTÃO DE Fe, Mn, Mg E Ca ATRAVÉS DO CONSUMO DIÁRIO DE MEL DE ASF.

Metal	Concentrações (µg)			
	Mínima	Máxima	Média	ANVISA (IDR)
Fe	0,7	3098,0	133,0	1,4 x 10 ⁴
Mn	1,0	1048,0	186,0	2,3 x 10 ³
Mg	40,0	8787,0	2333,0	2,6 x 10 ⁵
Ca	1,0	9094,2	2354,7	1,0 x 10 ⁶

FONTE: A AUTORA (2020)

Com base na Tabela 21, nota-se que a ingestão média diária dos metais avaliados seguiu a ordem Ca>Mg>Mn>Fe. Apenas entre as concentrações mínima e máxima, entre os metais Ca – Mg e Fe – Mn, que essas ordens se inverteram.

A Tabela 22, apresenta as porcentagens de contribuição para cada metal levando em consideração os valores de ingestão diárias recomendadas pela Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005, dispostos na Tabela 21 (BRASIL, 2005).

TABELA 22 – PORCENTAGENS DE CONTRIBUIÇÃO DIÁRIA DOS METAIS Fe, Mn, Mg E Ca.

Metal	Contribuição diária (%)		
	Mínima	Máxima	Média
Fe	0,0050	22,13	0,95
Mn	0,0400	45,56	8,09
Mg	0,0150	3,38	0,91
Ca	0,0001	9,09	0,24

FONTE: A AUTORA (2020)

Considerando a contribuição diária de cada metal a partir da concentração média destes, mediante o consumo de 25,0 g de mel, nota-se que a maior contribuição é advinda do metal Mn, seguida dos metais Fe, Mg e Ca.

Díaz et al., (2019) determinaram o teor de 20 metais em méis provenientes das Ilhas Canárias e avaliaram a ingestão diária bem como a porcentagem de contribuição nutricional para Fe, Mn, Mg e Ca na dieta humana (DÍAZ et al., 2019). Os valores obtidos no presente trabalho foram todos superiores aos valores obtidos pelos autores, evidenciando a contribuição nutricional do mel de ASF oriundos do Brasil.

Vale ressaltar que os dados de ingestão diária obtidos são teóricos. A ingestão efetiva pelo organismo pode ser alterada visto que a interação dos metais com o sistema digestório pode modificar a absorção dos mesmos. Diante disso, faz-se necessário estudos subsequentes de bioacessibilidade e biodisponibilidade uma vez que estes forneceriam a estimativa real deste grau de ingestão.

6 Considerações Finais

Os métodos analíticos desenvolvidos para as determinações de Fe, Mn, Mg e Ca em mel de ASF mostrou-se adequado, uma vez que os resultados obtidos na validação deste método estão dentro dos critérios de aceitabilidade de órgãos regulamentadores nacionais e internacionais.

Já para a extração de Zn nesse tipo de matriz, serão necessários estudos mais aprofundados, o que implica em uma maior disponibilidade de tempo para a realização dos mesmos, e para que a extração deste metal seja realizada de forma eficiente.

A amostragem em suspensão mostrou-se um recurso eficiente quando comparada a métodos tradicionais de digestão de amostras para quantificação de metais utilizando a técnica de F AAS, apresentando vantagens como redução de reagentes e otimização do tempo durante a etapa de preparo de amostras complexas como o mel, conseqüentemente, minimizando custos das análises.

A quantificação dos metais Fe, Mn, Mg e Ca em um número relevante de amostras e de diferentes regiões, forneceu informações importantes sobre o mel de ASF. Algumas amostras destacaram-se em relação aos teores de Fe, sendo possível correlacionar tal fato com o tipo de solo predominante na região. Através das ACPs verificou-se que os méis das ASF analisados no presente estudo, sendo a grande maioria advinda do estado do Paraná, possuem maiores teores dos metais avaliados do que o mel da espécie *Apis mellifera* oriundas do Brasil e de outros países, bem como o mel de ASF de outros estados brasileiros.

Cálculos teóricos demonstraram também que o mel de ASF fornece contribuições significativas de metais para a dieta humana, o que pode vir a contribuir para a regulamentação, comercialização, fiscalização e caracterização de méis de ASF, uma vez que este produto possui características distintas do mel da espécie *Apis mellifera* comumente comercializado.

7 REFERÊNCIAS

- AFONSO, A. et al. Determination of toxic metals, trace and essentials, and macronutrients in *Sarpa salpa* and *Chelon labrosus*: risk assessment for the consumers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 11, p.10557-10569, 2017.
- AJTONY, Z. et al. Study on the simultaneous determination of some essential and toxic trace elements in honey by multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 71, p. 683–690, 2007.
- ALTUN, S. K. et al. Analyses of Mineral Content and Heavy Metal of Honey Samples from South and East Region of Turkey by Using ICP-MS. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2017, p. 1-6, 2017.
- ALVES, F. L. et al. Use of slurry sampling in the determination of Cu and Zn in Antarctic limpets and Ni in river sediment by flame atomic absorption spectrometry. **Química Nova**, v. 24, p. 756–760, 2001.
- AL-ALAM, J. et al. The use of vegetation, bees, and snails as important tools for the biomonitoring of atmospheric pollution—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, 2019, doi:10.1007/s11356-019-04388-8.
- AMILCAR, A. Geodiversidade do estado de Rondônia / Organização Amilcar Adamy. – Porto Velho: **CPRM**, 2010.
- AMORIM, F. A., et al. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares. **Química Nova**, v. 31, n.7, São Paulo, 2008.
- AMORIM, F. A. C. et al. Multivariate optimization of simple procedure for determination of Fe and Mg in cassava starch employing slurry sampling and F AAS. **Food Chemistry**, v. 227, p. 41-47, 2017.
- ANACLETO, D. C. A. et al. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula latreille*, 1811). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, p.535-541, 2009.
- ANTONESCU, C.; MATTESCU, C. Environmental pollution and its effects on honey quality. **Romanian Biotechnological Letters**. v. 6, n. 5, p. 371-379. 2001.
- AOAC. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 19.ed. Gaithersburg, Maryland, 2012.
- ARRUDA, M. A. Z.; SANTELLI, R. E. Mecanização no Preparo de Amostras por Microondas: O Estado da Arte. **Química Nova**, v. 20, n.6, 1997.
- ÁVILA, S. et al. Influence of stingless bee genus (*Scaptotrigona* and *Melipona*) on the mineral content, physicochemical and microbiological properties of honey. **J. Food Sci. Technol.** v. 56, p. 42-47, 2019.

ÁVILA, S. et al. Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 81, p. 37, 2018.

ALTUNAY, N.; ELIK, A.; GÜRKAN, R. Monitoring of some trace metals in honeys by flame atomic absorption spectrometry after ultrasound assisted-dispersive liquid liquid microextraction using natural deep eutectic solvent. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 49-59, 2019.

BALLIVAN, J. M.P. P.; et al. **Abelhas Nativas sem Ferrão - M̃ g Pẽ**. São Leopoldo: Oikos, 2008, p. 128.

BAHIA, F. A. **Extração assistida por ultrassom aplicada a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn em chia (*Salvia hispanica L.*) por espectrometria de absorção atômica**. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, 2019.

BAHIA. Secretaria do Planejamento, Ciência e Tecnologia – **Atlas do estado da Bahia**, Salvador, Artes Gráficas, 1976.

BATISTA, B. L. et al. Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and stimation of geographic origin with data mining techniques. **Food Research International**, v. 49, p. 209-215, 2012.

BILUCA, F. C. et al. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 89–97, 2017.

BILUCA, F. C. et al. Phenolic compounds, antioxidant capacity and bioaccessibility of minerals of stingless bee honey (Meliponinae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 63, p. 89–97, 2017.

BOGDANOV, S. **Harmonized methods of the international honey commission**. Bern: International Honey Commission, 2009. 63 p. Disponível em: <<http://www.ihcplatform.net/ihcmethods2009.pdf>>. Acesso em: 30 de Agosto de 2018.

BOGDANOV, S. Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, v. 46, n. 4, p. 269–275, 2007.

BOUSSAID, A. et al. Physicochemical and bioactive properties of six honey samples from various floral origins from Tunisia. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 265–274, 2018.

BRASIL. Mapa de Solos Resumido do Estado do Paraná. **ITC**, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 11, De 20 de Outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. Brasília, 2000.

BRASIL. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária de 23 de Setembro de 2005. p. 3, 2005.

BROWN, R. J. C.; MILTON, M. J. T. Analytical techniques for trace element analysis: an overview. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 266-274, 2005.

CAMARGO, J. M. F.; POSEY, D. A. O Conhecimento dos Kayapó Sobre As Abelhas Sociais Sem Ferrão (*Meliponinae, Apidae, Hymenoptera*). **Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi**. Zoologia, v, 6, n. 1, p. 17-42, 1990.

CAMPOS, M. L. A. M.; BENDO, A.; VIEL F. C. Métodos de baixo custo para purificação de reagents e controle de contaminação para determinação de metais traços em águas naturais. **Química Nova**, v. 25, p. 808-813, 2002.

CARVALHO, C. A. L. D. et al. **Mel de ASF**: contribuição para a caracterização físico-química. Série Meliponicultura, nº 4. Cruz das Almas, BA: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA, 2005. 32p.

CHUTTONG, B. et al. Effects of long term storage on stingless bee (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) honey. **Journal of Apicultural Research**, v. 54 p. 441–451 jun. 2016.

CHUTTONG, B. et al. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). **Food Chemistry**, v. 192, p. 149-155, 2016.

CHUTTONG, B. et al. (2016b). Physicochemical profiles of stingless bee (apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). *Food Chemistry*, 192, 149–155.

CILLIERS, I.; RETIEF, F. P. Bees, Honey and Health in Antiquity. **Akroterion**, v. 53, p. 7-19, 2008.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (**C.A.C.**): Standard For Honey - CODEX STAN 12-1981 v. 3, Supl 2, p. 1-8 2001.

DE ANDRADE, C. K. et al. Direct determination of Cd, Pb and Cr in honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v.146, p.166–173, 2014.

DE ANDRADE, C. K. et al. Relationship between geographical origin and contents of Pb, Cd, and Cr in honey samples from the state of Paraná (Brazil) with chemometric approach. **Environment Science and Pollution Research**, v. 21, p. 12372-12381, 2014b.

DOQ-CGCRE-008. INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Documento de caráter orientativo. Revisão 05, Agosto de 2016. p. 20.

EPIFÂNIO, A. F. R. P. **Determinação de metais pesados em mel nacional por espectrometria de absorção atômica**. 75 f. p. 20-36. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar). Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2012.

ESCOBAR, A. N. S.; XAVIER, F. B. Propriedades fitoterápicas do mel de abelhas. **Revista UNINGÁ**, Maringá, n.37, p. 159-172 jul./set. 2013.

FALLAS, L. G. Z. **Characterization of Bioactive Constituents from Honey Produced by Costa Rican Stingless Bees**. 114 f. Tese (Biologia Química e Programa de Descoberta de Medicamentos) – Departamento de Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências, Universidade de Utrecht Utrecht, Holanda, 2018.

FERNÁNDEZ, B.; LOBO, L.; PEREIRO, R. Atomic Absorption Spectrometry | Fundamentals, Instrumentation and Capabilities. **Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering - Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)**, p. 137 – 143, 2019.

FLORES, S. R.; ESCUREDO, O.; SEIJO, M. C. Characterization and antioxidant capacity of sweet chestnut honey produced in North-West Spain. **Journal of Apicultural Science**, v. 60, n.1, p. 19–30, 2016

FUENMAYOR, C.A. et al. Miel de angelita: Nutritional composition and physicochemical properties of *Tetragonisca angustula* honey. **Interciencia**, v. 37, p.142–147, 2012.

GARCIA, J. C. R. et al.; Martin, S. G.; Crecente, R. M. P. Comparison of palladium-magnesium nitrate and ammonium dihydrogenphosphate modifiers for cadmium determination in honey samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 61, p. 509–517, 2003.

GU, Y. G. et al. Heavy metals in fish tissues/stomach contents in four marine wild commercially valuable fish species from the western continental shelf of South China Sea. **Marine Pollution Bulletin**, v.114, n. 2, p. 1125-1129, 2017.

HERNANDEZ, O. M. et al. Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. **Food Chemistry**, v. 03, p. 449. 2005.

HOSSNER, L. R. Dissolution for total elemental analysis. Dissolution for total elemental analysis. Methods of Soil Analysis. Part 3. **Chemical Methods. Soil Science Society of America/American Society of Agronomy**, n. 5, p. 49-64, Madison, 1996.

IOANNIDOU, M. D. et al. Direct determination of toxic trace metals in honey and sugars using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Talanta**. v. 65, p. 92. 2005.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Biblioteca Digital: Monografias municipais, 2017. Disponível em:

<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=72974>

Acesso em: 10/01/2020.

INEMA – INSTITUTO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS (Bahia). **Regiões De Planejamento E Gestão Das Águas - Rpga e Solos Estado Da Bahia**, 2014. Escala 1:1.250.000.

KARABAGIAS, I. K. et al. Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 146, p. 548-557, mar. 2014.

KARABAGIAS, I.K. et al. Characterization and geographical discrimination of comercial Citrus spp. honeys produced in different Mediterranean countries based on minerals, volatile compounds and physicochemical parameters, using chemometrics. **Food Chemistry**, v. 5, n. 217, p. 445-455, 2017.

KEK, S. P. et al. Classification of Honey from Its Bee Origin via Chemical Profiles and Mineral Content. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 1, p. 19–30, 2016.

KERR, W. E. Estudos sobre o gênero Melipona. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 5, p. 181–276, 1948.

KREITALS, N.; WATLING, R.; Multi-element analysis using inductively coupled plasma mass spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy for provenancing of animals at the continental scale. **Forensic Sci Int**, v. 244, p. 116–21, 2014.

KRUG, F. G.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. V. **Espectrometria de Absorção Atômica – Parte 1. Fundamentos e atomização com chama**. São Paulo, 2004. Universidade de São Paulo.

KRUG, G. G. **Métodos de Preparo de Amostras Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Santa Maria – UFSM, 2006.

LEMAIRE, R. et al. Determination of Lead in Lipstick by Direct Solid Sampling High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry: Comparison of two Digestion Methods. **Analytical Letters**, v. 46, p. 2265–2278, 2013.

LEMOS, M. S. Evaluation of the physicochemical parameters and inorganic constituents of honeys from the Amazon region. **Journal of Apicultural Research**, v. 57, p.135-144, 2018.

LIMA, C. et al. Comparison of ultrasound-assisted extraction, slurry sampling and microwave-assisted digestion for cadmium, copper and lead determination in biological and sediment samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 15, n.8, p. 995–1000, 2000.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F.; PERALBO-MOLINA, A. The role of ultrasound in analytical derivatizations - A review. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 1189-1195, 2011.

MACÊDO, E. M. C. et al. Effects of copper, zinc and magnesium deficiency on the immune system of severely malnourished children. **Revista Paulista de Pediatria**, v.28, n.3, p.329-36, 2010.

MAGALHÃES, C. E. C.; ARRUDA, M. A Z. Amostragem de Suspensões: Emprego da Técnica na Análise Direta de Amostras. **Química Nova**, v. 21, p. 459-466, 1998.

MEDINA, C. M.; GONZALEZ, A. J. B. **IX Seminario Americano de Apicultura**, p. 46-50. México, 1995.

MENDES, T. M. F. F., BACCAN, N. S., CADORE, S. Sample treatment procedures for the determination of mineral constituents in honey by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 168-176, 2006.

MICHENER, C. D. **The bees of the World**. 2ª Ed. Baltimore, Johns Hopkins University Press, p. 953, 2007.

MOHAMMED, F. et al Element content of Yemeni honeys as a long-time marker to ascertain honey botanical origin and quality. **LWT - Food Science and Technology**, v. 88, p. 43-46, 2017.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Determination of Mineral, Trace Element, and Pesticide Levels in Honey Samples Originating from Different Regions of Malaysia Compared to Manuka Honey. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–10, 2014.

MULLER, E.I., et al. Determination of Br, Cl and I in honey using ICP based techniques following microwave-assisted wet digestion with alkaline H₂O₂ in a single reaction chamber. **Analytical Methods**, v.9, p. 649, 2017.

NASCIMENTO, A. S. et al. Honey from Stingless Bee as Indicator of Contamination with Metals. **Sociobiology**, v. 65, p. 727-736, 2018.

NASCIMENTO, N. O. et al. Pollen storage by stingless bees as an environmental marker for metal contamination: spatial and temporal distribution of metal elements. **Sociobiology**, v. 65, n.2, p. 259-270, 2018.

NAYIK, G. A.; NANDA, V. A chemometric approach to evaluate the phenolic compounds, antioxidant activity and mineral content of different unifloral honey types from Kashmir, India. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 504–513, 2016.

NETO, C. A. L. F. et al. Pontos críticos de agroecossistemas melíponas no Semiárido norte-rio-grandense do Brasil. **Sociedade e Natureza**, Uberlândia, MG, v.30, n.1, p.110-131, 2018.

NEVES, E. R. C. F. et al. F AAS determination of metal nutrients in fish feed after ultrasound extraction. **Food Chemistry**, v. 113, n. 2, p. 679–683, 2009.

NÓBREGA, A. R. et al. **Digestão de Amostras Assistida por Microondas**. In: Curso em Análise Química. Plasmas em química analítica e preparo de amostras, 2001, São Carlos: UFSCar, 2001. p.106-149.

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão. São Paulo, Brasil, 1997.

NORDIN, A. et al. Physicochemical properties of stingless bee honey from around the globe: A comprehensive review. **Journal of Food Composition and Analysis**, (2018) <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.06.002>

OLIVEIRA, F. A. et al. Evaluation of matrix effect on the determination of rare earth elements and As, Bi, Cd, Pb, Se and In in honey and pollen of native Brazilian bees (*Tetragonisca angustula* – Jataí) by Q-ICP-MS. **Talanta**, v. 162, n. 1, p. 488-494, 2017.

OLIVEIRA, S. S. et al. Determination of essential and potentially toxic elements and their estimation of bioaccessibility in honeys. **Microchemical Journal**, v. 151, p. 104-221, 2019.

OSTROVSKI, K. R. **Desenvolvimento, produção e qualidade do mel de abelha mandçaia MQQ em ambientes urbano e rural**. 130 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

PENG, Y. et al. Heat-assisted slurry sampling GF AAS method for determination of lead in food standard reference materials. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 42, p. 78-83, 2015.

PERUGINI, M. et al. Heavy Metal (Hg, Cr, Cd and Pb) contamination in urban áreas and wildlife reserves: honeybees as bio indicators. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 140, n. 2, p. 170-176, 2011.

POHL, P.; PRUSISZ, B. Fractionation of calcium and magnesium in honeys, juices and tea infusions by ion exchange and flame atomic spectrometry. **Talanta**, v. 69, p. 1227–1233, 2006.

POHL, P.; PRUSISZ, B. Fractionation of calcium, iron, magnesium and zinc in bee honeys by means of tandem column ion exchange and flame atomic absorption spectrometry. **Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy**, v. 52, p. 207–214, 2007.

POHL, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 28, p. 117. 2009.

POHL, P.; SERGIEL, I.; STECKA, H. Determination and Fractionation of Metals in Honey. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 39, n.4, p. 276–288, 2009b.

POHL, P.; SERGIEL, I. Direct determination of the total concentrations of copper, iron and manganese and their fractionation forms in freshly ripened honeys by means of flame atomic absorption spectrometry. **Microchim Acta**, v. 168, p. 9–15, 2010.

POHL, P.; SERGIEL, I. Direct Determination of the Total Concentrations of Magnesium, Calcium, Manganese, and Iron in Addition to their Chemical and Physical Fractions in Dark Honeys. **Analytical Letters**, v. 44, p. 2265–2279, 2011.

POHL, P.; SERGIEL, I. Direct Analysis of Dark Honeys for Total Content of Copper and Its Fractionation Forms. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 113–118, 2012.

POHL, P. et al. Recent achievements in element analysis of bee honeys by atomic and mass spectrometry methods. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 93, p. 67-77 ago., 2017.

RAO, P. V. et al. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.26, n.5, p. 657-664, out. 2016.

RIBEIRO, R. O. et al. Determination of Trace Elements in Honey from Different Regions in Rio de Janeiro State (Brazil) by Total Reflection X-Ray Fluorescence. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, 2014.

RISSATO, S. R, et al. Método multirresíduo para monitoramento de contaminação ambiental de pesticidas na região de Bauru (SP) usando mel como bio-indicador. **Quím. Nova**, v.29 n.5, São Paulo, Set./Out. 2006.

SARDANS, J.; MONTES, F.; PEÑUELAS, J. Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 2, p. 97-112, 2010.

SAMPAIO, R. B. et al. Avaliação de alimentadores para abelha mandacari (Melipona quadrifasciata anthidioides). **Archivos de zootecnia**, v. 62, n. 240, p. 619-622, 2013.

SANTA CATARINA. Secretaria de Estado de Coordenação Geral e Planejamento. Subsecretaria de Estudos Geográficos e Estatísticos. **Atlas Escolar de Santa Catarina**. Rio de Janeiro: Aerofoto Cruzeiro, 1991. 96 p.

SHADAN, A. F. et al. Provenance Establishment of Stingless Bee Honey Using Multi-element Analysis in Combination with Chemometrics Techniques. **Journal of Forensic Sciences**, v. 63, n. 1, p. 80–85, 2018.

SILVA, E. G. P. **Determinação de metais em amostras de chocolate em pó utilizando amostragem de suspensão e detecção por espectrometria de absorção atômica em chama multielementar seqüencial**. 121 f. Dissertação

(mestrado em Química) – Setor de Pós Graduação em Química Aplicada, Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, 2006.

SILVA, J. M.; SILVA, E. J. E. Contribuição para o Conhecimento da Fauna de Arctiinae (Lepidoptera: Erebidae) no Estado de Santa Catarina, Brasil.

EtomoBrasilis, v. 7, n. 3, p. 222-226, 2014.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução 8^a Ed. Norteamericana. São Paulo; Thomson, 2006.

SOETAN, K.O.; OLAIYA, C.O.; Oyewole, O. E. The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants - A review. **African Journal Of Food Science**, v.4, p. 200- 222, mai. 2010.

SOUZA, B. de A. Caracterização dos méis de meliponíneos no Brasil: situação atual e perspectivas. In: **Congresso Iberolatinoamericano de Apicultura**, 2010, Natal.

SOUZA, B. A. et al. Composition Of Stingless Bee Honey: Setting Quality Standards. **Interciencia**, 2006, v. 31, p. 867.

TEIXEIRA, K. O. **Distribuição potencial das subespécies de Melipona quadrifasciata Lepeletier, 1836, no Brasil em relação às mudanças climáticas**. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais), Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Criciúma, 2018.

TEMPLETON, D. M. et al. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendations 2000). **IUPAC, Pure and Applied Chemistry**, v. 72, p. 1453-1470, 2000.

TIGLEA, P; PASCUET, NEUS, S. S.; ZENEON, O. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IV Ed.; 1^a Ed Digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. Cap. XXIII.

TRINDADE, A. C. et al. Development of a Method Based on Slurry Sampling for Determining Ca, Fe, and Zn in Coffee Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry. **Food Analytical Methods**, 2019, doi:10.1007/s12161-019-01578-5

TUKSITHAA, L. et al. Antioxidant and antibacterial capacity of stingless bee honey from Borneo (Sarawak). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Taiwan, v. 21 p. 563–570 mar. 2018.

TYLER, G. ICP-OES, ICP-MS and AAS Techniques Compared. **ICP Optical Emission Spectroscopy**, v. 3, p. 1-11, 2001.

VALE, M. A. D. et al. Honey quality of Melipona sp. bees in Acre, Brazil. **Acta Agronômica**, v. 67, p. 201, 2018.

VENTURIERI, G. C. et al. **Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras**. In: IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. et al. (eds). Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais. EDUSP, São Paulo, 2012

VERZERA, A. et al. Chiral volatile compounds for the determinations of orange honey authenticity. **Food Control**, v. 39, p. 237-243, 2014

WALDSCHMIDT, A. M. et al. Genetic analysis of *Melipona quadrifasciata* LEP. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. **Brazilian journal of biology**, v. 62, p. 923–928, 2002.

WELZ, B. et al. Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 2085–2095, 2007.

WELZ, B., SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3 ed. Alemanha: Wiley – VCH, 1999, p. 27-46, 170-202, 451-463.

ZHANG, H. et al. Dietary manganese requirement of juvenile large yellow croaker *Larimichthys crocea* (Richardson, 1846). **Aquaculture**. v. 450, p.74–79, 2016.

ZHOU, X. et al. Identifying sources of environmental contamination in European honey bees (*Apis mellifera*) using trace elements and lead isotopic compositions. **Environmental Science & Technology**, v. 52, p. 991–1001, 2018.