

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA A DETERMINAÇÃO DIRETA DE Pb, Cd E Cr EM AMOSTRAS DE
MEL UTILIZANDO ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA
COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA EM FORNO DE GRAFITE**

GUARAPUAVA

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA A DETERMINAÇÃO DIRETA DE Pb, Cd E Cr EM AMOSTRAS DE
MEL UTILIZANDO ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA
COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA EM FORNO DE GRAFITE**

Dissertação de Mestrado

Camila Kulek de Andrade

GUARAPUAVA - PR

2013

CAMILA KULEK DE ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA A DETERMINAÇÃO DIRETA DE Pb, Cd E Cr EM AMOSTRAS DE
MEL UTILIZANDO ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA
COM ATOMIZAÇÃO ELETROTÉRMICA EM FORNO DE GRAFITE**

Dissertação apresentada sob orientação da Profa.
Dra. Sueli Pércio Quináia e co-orientação da Dra.
Vanessa Egéa dos Anjos, como parte dos requisitos
para obtenção do Título de Mestre em Química,
Programa de Pós Graduação em Química Aplicada,
Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Pércio Quináia

Co-orientadora: Dra. Vanessa Egéa dos Anjos

GUARAPUAVA-PR

2013

AGRADECIMENTOS

Á Deus;

Á minha família, meus pais Juarez e Maria, minha irmã Jucimara, pelo carinho, apoio e compreensão em todos os momentos, e por não me deixarem desistir no primeiro obstáculo;

Ás minhas orientadoras Profª. Dra. Sueli Pércio Quináia e Dra. Vanessa Egéa dos Anjos pela amizade, paciência, ensinamentos e dedicação em todos os momentos do trabalho;

Á Profª. Dra. Maria Lurdes Felsner pela amizade e ensinamentos e pela grande contribuição ao trabalho;

Á Profª. Dra. Danielle Caroline Schnitzler pela valorosa contribuição ao trabalho;

Á Profª. Dra. Yohandra Reyes Torres;

Aos meus amigos que estiveram sempre ao meu lado, me apoiando e dando força nos momentos mais difíceis, especialmente: Elisiane Berton, Andréia Boeno, Marieli Ferreira, Marcelo Russo, Osmar Junior, Elene Virmond e um agradecimento muito especial á Angélica Furlanetto Soares, pela amizade e pelo apoio técnico quando foi necessário;

Ás amigas que conquistei durante este período e com quem aprendi muito;

Aos amigos (alunos e professores) do LABGATI e CRONAT pelo apoio incondicional;

Aos colegas e amigos da turma de mestrado de 2011 pelo companheirismo;

Á Fundação Araucária pela bolsa concedida;

Á UNICENTRO;

Á coordenação e secretaria do programa de Pós-Graduação em Química da UNICENTRO;

Enfim, á todos que de algum modo fizeram parte desta caminhada.

RESUMO

Na produção do mel, as abelhas *Apis mellifera* percorrem imensas áreas e entram em contato com vários compartimentos ambientais. Nesse processo, elas podem acumular contaminantes, especialmente espécies metálicas, e o mel pode atuar como um indicador da qualidade ambiental, refletindo essas concentrações encontradas no meio ambiente. A quantificação de metais em mel ainda é considerada um desafio analítico, devido à complexidade da matriz. Muitos métodos analíticos desenvolvidos envolvem uma etapa de pré-tratamento da amostra antes da quantificação dos metais, podendo causar contaminação da amostra ou perda do analito. Neste estudo foram estabelecidas bases analíticas para a determinação direta de espécies metálicas em amostras de mel empregando a espectrometria de absorção atômica. Um protocolo analítico foi desenvolvido e implantado para a determinação de Pb, Cd e Cr em amostras de mel de forma direta, ou seja, sem etapa de pré-tratamento, empregando a Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite. Para tal, suspensões aquosas de mel foram preparadas e inseridas diretamente no forno de grafite. A adição de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio nas suspensões aquosas de mel possibilitaram a eliminação da matriz orgânica da amostra durante a etapa de pirólise do programa de aquecimento do GF AAS. Os programas de aquecimentos do forno de grafite foram otimizados para cada elemento. A necessidade do uso de modificadores químicos, tais como Paládio, dihidrogenofosfato de amônio e nitrato de magnésio foi avaliada. Na determinação de cádmio foi necessário empregar o modificador universal (Pd-Mg) a fim de evitar perdas do elemento durante as etapas de aquecimento do forno de grafite. As características analíticas dos métodos foram avaliados através dos testes de calibração, avaliação da sensibilidade, da precisão e exatidão. Curvas analíticas em meio aquoso foram empregadas nas determinações de Pb e Cr, e em meio de frutose nas quantificações de Cd em amostras de mel. Os limites de quantificação foram baixos com valores de 2,0; 5,4 e 9,4 ng g⁻¹ para Cd, Pb e Cr, respectivamente. As estimativas de desvio padrão relativo foram inferiores a 10% nos testes de repetibilidade e precisão intermediária. As recuperações obtidas nos testes de exatidão foram adequadas e variaram entre 90% e 105% para os três elementos. Assim, após a validação dos métodos desenvolvidos realizou-se a aplicação da metodologia analítica em 52 amostras de mel provenientes de diferentes regiões do Estado do Paraná. Os teores de Pb, Cd e Cr variaram entre > 2,0 ng g⁻¹ até 413 ng g⁻¹ e estão concordantes com a literatura. De modo geral, nota-se que a concentração dos elementos seguiu a seguinte ordem: Pb > Cr > Cd, com as concentrações de Pb na faixa entre 86-413 ng g⁻¹; para Cr 46-132 ng g⁻¹ e 2,0-16,3 ng g⁻¹ para Cd, respectivamente. Uma ferramenta quimiométrica foi aplicada para avaliar os dados gerados para amostras de mel do Estado do Paraná. Através da Análise de Componentes Principais (PCA) observa-se que as amostras de mel obtidas na região Centro-Sul e Sudeste apresentam teores similares de Pb e Cd, sendo que o teor mais elevado de Pb foi obtido na amostra de Candói (3) e de Cd na amostra de Rio Piquiri (4). Isso pode estar relacionado com o fato destas localidades terem sua economia baseada na agricultura. A presença destes metais em agrotóxicos e fertilizantes e também na atmosfera, devido a partículas suspensas provenientes da emissão de fumaça de veículos, faz com que seus teores aumentem nessas regiões. Já as amostras das regiões Oeste, Sudoeste, Noroeste e Metropolitana apresentaram teores similares de Cr. Portanto, com a PCA, foi possível notar que as amostras de mel do Paraná se classificaram de acordo com sua região geográfica e teores dos elementos traço. Com base em cálculos de ingestão diária de mel, observou-se que os méis paranaenses também apresentaram segurança alimentar em relação ao teor de Pb, Cd e Cr ingeridos na alimentação humana através do consumo deste produto.

Palavras-chave: Análise direta, amostragem em suspensão, cádmio, chumbo, cromo, GF AAS, mel.

ABSTRACT

In the honey production, *Apis mellifera* honeybees roam vast areas and it come into contact with various environmental compartments. In this process, they can accumulate contaminants, especially metal species, and honey can act as an indicator of environmental quality, reflecting the concentrations found in the environment. The quantification of metals in honey is still considered an analytical challenge due to the complexity of the matrix. Many analytical methods developed involve a step of pretreatment of the sample prior to quantification of the metals that may cause sample contamination or loss of analyte. In this study were established analytical basis for the direct determination of metal species in the honey samples using atomic absorption spectrometry. An analytical protocol was developed and implemented for the determination of Pb, Cd and Cr in honey samples directly, i.e., without pretreatment step, using the Atomic Absorption Spectrometry with Electrothermal Atomization in Graphite Furnace. For this purpose, aqueous suspensions of honey were prepared and inserted directly into the graphite furnace. Addition of nitric acid and hydrogen peroxide in aqueous suspensions of honey possible the elimination of the organic matrix of the sample during the pyrolysis step of heating program of GF AAS. The programs of the heating graphite furnace were optimized for each element. The need to use chemical modifiers such as palladium, ammonium dihydrogenphosphate and magnesium nitrate was evaluated. In the determination of cadmium was necessary to employ the universal modifier (Pd-Mg) in order to avoid losses of the element through the steps of heating the graphite furnace. The analytical characteristics of the methods were evaluated through calibration tests, evaluation of sensitivity, precision and accuracy. Aqueous analytical curves were used for determinations of Pb and Cr, and in middle of fructose in the quantification of Cd in honey samples. The quantification limits were low with values of 2.0, 5.4 and 9.4 ng g⁻¹ for Cd, Pb and Cr, respectively. Estimates of relative standard deviation was below 10% in tests of repeatability and intermediate precision. The recoveries obtained in the accuracy tests were adequate and ranged between 90% and 105% for the three elements. So, after validation of the developed methods was performed applying the analytical methodology in 52 honey samples from different regions of the State of Paraná. The levels of Pb, Cd and Cr ranged from > 2.0 ng g⁻¹ to 413 ng g⁻¹ and are consistent with the literature. In general, it is noted that the concentration of elements followed the order: Pb > Cr > Cd, Pb with concentrations in the range of 86-413 ng g⁻¹, and for Cr 46-132 ng g⁻¹ and 2.0-16.3 ng g⁻¹ to Cd, respectively. A chemometric tool was applied to evaluate data generated for honey samples of Paraná. Through Principal Component Analysis (PCA) was observed that the honey samples obtained in the Center-South and Southeast regions have similar contents of Pb and Cd, and the higher content of Pb was obtained in the sample from Candói (3) and Cd in the sample from Rio Piquiri (4). This may be related to the fact that these places have their economy based on agriculture. The presence of these metals in pesticides and fertilizers and also in the atmosphere, because the particulate matter from the smoke emission vehicle, causes his levels are higher in these regions. The samples of the regions West, Southwest, Northwest and Metropolitan had similar contents of Cr. Therefore, with the PCA, it was possible to note that the honey samples from Paraná are qualified according to their geographical region and levels of trace elements. Based on calculations of daily ingestion of honey, it was observed that the honeys from Paraná also present food safety in relation to the content of Pb, Cd and Cr in foods ingested by consumption of this product.

Keywords: Direct analysis, slurry sampling, cadmium, lead, chromium, GF AAS, honey.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	x
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1. Mel como Bioindicador de Contaminação Ambiental.....	18
3.2. Metais Traço em Mel.....	20
3.2.1. Cádmio.....	21
3.2.2. Chumbo.....	22
3.2.3. Cromo.....	24
3.3. Métodos Analíticos Empregados na Determinação de Metais Traço em Mel.....	25
3.3.1. Princípios básicos da espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GF AAS).....	27
3.3.2. Determinação de metais em amostras de alimentos empregando GF AAS.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Reagentes.....	34
4.2. Equipamentos.....	34
4.3. Técnicas Limpas.....	35
4.4. Implantação do Procedimento Analítico para Determinação Direta de Cd, Cr e Pb em Amostras de Mel Empregando GF AAS e Amostragem em Suspensão.....	36
4.4.1. Estudo da forma de preparo de suspensões de mel.....	36
4.4.2. Desenvolvimento e otimização do procedimento analítico empregado na determinação direta de metais em mel empregando GF AAS.....	37
4.4.2.1. Chumbo.....	38
4.4.2.2. Cádmio.....	39
4.4.2.3. Cromo.....	40

4.5. Avaliação do Procedimento Analítico Desenvolvido para Determinação Direta de Cd, Pb e Cr em Amostras de Mel Empregando GF AAS e Amostragem em Suspensão.....	42
4.6. Aplicação do Protocolo Analítico em Amostras de Mel do Estado do Paraná, Brasil.....	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1. Estudo da Forma de Preparo das Suspensões de Mel.....	48
5.2. Desenvolvimento e Otimização do Procedimento Analítico Empregado na Determinação Direta de Pb, Cd, e Cr em Amostras de Mel Empregando GF AAS.....	50
5.2.1. Chumbo.....	51
5.2.2. Cádmio.....	56
5.2.3. Cromo	60
5.2.4. Condição otimizada.....	66
5.3. Avaliação das Características Analíticas dos Métodos Desenvolvidos para a Determinação Direta de Pb, Cr e Cd em Amostras de Mel empregando GF AAS e Amostragem em Suspensão.....	67
5.3.1. Avaliação da forma de calibração, linearidade e sensibilidade dos métodos desenvolvidos.....	67
5.3.1.1. Chumbo.....	67
5.3.1.2. Cromo.....	70
5.3.1.3. Cádmio.....	73
5.3.2. Avaliação dos limites de detecção, quantificação e massa característica.....	76
5.3.3. Avaliação da precisão dos métodos desenvolvidos.....	79
5.3.4. Avaliação da exatidão dos métodos desenvolvidos.....	81
5.4. Aplicação do Protocolo Analítico em Amostra de Mel do Paraná, Brasil.....	82
5.5. Análise Estatística dos Teores de Pb, Cd e Cr em Amostras de Mel do Estado do Paraná empregando Análise dos Componentes Principais (PCA).....	89
5.6. Grau de Ingestão Humana de Pb, Cd e Cr em função do consumo do Mel Paranaense.....	98
6. CONCLUSÕES.....	101
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Foto ilustrativa referente ao procedimento de técnicas limpas adotado durante todo o desenvolvimento do trabalho.....	36
Figura 2. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado na otimização de determinação direta de Pb por GF AAS.....	39
Figura 3. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado na otimização de determinação direta de Cd por GF AAS.....	40
Figura 4. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado na otimização de determinação direta de Cr por GF AAS.....	41
Figura 5. Figura ilustrativa do local de estudo, Estado do Paraná localizado na Região Sul do Brasil.....	44
Figura 6. Mapa do Estado do Paraná que indica a localização das amostras de mel utilizadas no trabalho e número de amostras por município.....	47
Figura 7. Foto que ilustra o estudo realizado para otimizar a forma de preparo de suspensões de mel.....	49
Figura 8. Otimização da temperatura de pirólise usada na determinação direta de Pb em mel empregando GF AAS e amostragem em suspensão e estudo da influência de modificadores de matriz.....	51
Figura 9. Otimização da temperatura de atomização usada na determinação direta de Pb em mel empregando GF AAS e amostragem em suspensão.	54
Figura 10. Perfis de atomização para Pb na análise de suspensões de mel sem modificador químico por GF AAS, empregando diferentes programas de aquecimento do forno de grafite.....	55
Figura 11. Otimização da temperatura de pirólise usada na determinação direta de Cd em mel empregando GF AAS e amostragem em suspensão e estudo da influência de modificadores de matriz.....	57
Figura 12. Otimização da temperatura de atomização usada na determinação direta de Cd em mel empregando GF AAS e amostragem em suspensão.....	58
Figura 13. Perfis de atomização para Cd na análise de suspensões de mel com modificador químico Pd-Mg por GF AAS, empregando diferentes programas de aquecimento do forno de grafite.....	59
Figura 14: Otimização da temperatura de pirólise usada na determinação direta de Cr em mel empregando GF AAS e amostragem em suspensão e estudo da influência de modificador de matriz.....	62

Figura 15. Otimização da temperatura de atomização usada na determinação direta de Cr em mel empregando GF AAS e amostragem em suspensão.....	64
Figura 16. Perfis de atomização para Cr na análise de suspensões de mel sem modificador químico por GF AAS, empregando diferentes programas de aquecimento do forno de grafite.....	65
Figura 17. Curvas analíticas obtidas na determinação de Chumbo por GF AAS.....	68
Figura 18. Curvas analíticas obtidas na determinação de Cromo por GF AAS.....	71
Figura 19. Curvas analíticas obtidas na determinação de Cádmio por GF AAS.....	73
Figura 20. Curvas analíticas obtidas na determinação de Cádmio por GF AAS empregando diferentes formas de calibração.....	74
Figura 21. Resultados obtidos na quantificação de chumbo em amostras de mel do Estado do Paraná.....	84
Figura 22. Resultados obtidos na quantificação de cromo em amostras de mel do Estado do Paraná.....	86
Figura 23. Resultados obtidos na quantificação de cádmio em amostras de mel do Estado do Paraná.....	87
Figura 24. Relação entre as concentrações médias de Pb, Cr e Cd determinadas em amostras de mel em função da origem geográfica representada pelas Mesorregiões do Estado do Paraná, Brasil.....	88
Figura 25. Principais fatores de correlação entre as amostras de mel e suas variáveis.....	90
Figura 26. Gráfico de escores para as componentes principais 1 e 2 obtidas com a análise multivariada dos dados para méis do Paraná.....	91
Figura 27. Gráfico de pesos para PC1 e PC2 obtido através da análise multivariada dos dados.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Programa de aquecimento estudado na determinação de Pb em suspensões de mel por GF AAS.....	38
Tabela 2. Programa de aquecimento estudado na determinação de Cd em suspensões de mel por GF AAS.....	40
Tabela 3. Programa de aquecimento estudado na determinação de Cr em suspensões de mel por GF AAS.....	41
Tabela 4. Informações sobre as amostras de mel coletadas em diferentes regiões do Estado do Paraná, Brasil e empregadas na determinação direta de Pb, Cd e Cr por GF AAS.....	46
Tabela 5. Resultados obtidos na determinação direta de Cr por GF AAS em suspensões de mel enriquecidas com cromo e contendo diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.....	61
Tabela 6. Programas de aquecimento do forno de grafite otimizados para a determinação direta de Pb, Cd e Cr em amostras de mel empregando GF AAS e amostragem em suspensão.....	66
Tabela 7. Parâmetros de calibração obtidos na quantificação de Pb por GF AAS empregando amostragem em suspensão de mel.....	68
Tabela 8. Avaliação estatística da linearidade das curvas analíticas obtidas na quantificação de Pb por GF AAS e amostragem em suspensão.....	69
Tabela 9. Parâmetros de calibração obtidos na quantificação de Cr por GF AAS empregando amostragem em suspensão de mel.....	71
Tabela 10. Avaliação estatística da linearidade das curvas analíticas obtidas na quantificação de Cr por GF AAS e amostragem em suspensão.....	72
Tabela 11. Parâmetros de calibração obtidos na quantificação de Cd por GF AAS empregando calibração externa em meio de frutose e calibração por adição de padrão.....	75
Tabela 12. Avaliação estatística da linearidade das curvas analíticas obtidas na quantificação de Cd por GF AAS e amostragem em suspensão.....	76
Tabela 13. Limites de detecção e quantificação e massa característica (m_0) obtidos para Pb, Cr e Cd, empregando GF AAS e amostragem em suspensão.....	77
Tabela 14. Avaliação da precisão do método para determinação direta de Pb, Cd e Cr em mel.....	80

Tabela 15. Resultados de recuperação por adição de padrão para Pb, Cd e Cr em mel.....	82
Tabela 16. Teor de Pb, Cd e Cr encontrado nas 52 amostras de mel de diferentes regiões do Estado do Paraná.....	83
Tabela 17. Escores das variáveis Cr, Pb, Cd, meso e microrregião dos PC1 e PC2 das amostras de mel.....	90
Tabela 18. Estimativa da ingestão humana de Pb, Cd e Cr através do consumo frequente de mel.....	99
Tabela 19. Estimativa da ingestão humana de Pb, Cd e Cr ($\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corpóreo) para um adulto que consome mel do Estado do Paraná.....	99

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Absorção Atômica
ANOVA	Análise de variância
BG	Background
Cd	Cádmio
CERCOPA	Central Regional de Comercialização do Centro-Oeste do Paraná
Cr	Cromo
CV	Coefficiente de Variação
g	Gramas (unidade de medida)
GF AAS	Espectrometria de absorção atômica em Forno de Grafite, do inglês Graphite furnace atomic absorption spectrometry
HNO ₃	Ácido nítrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
ICP MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês Inductively coupled plasma mass spectrometry
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês Inductively coupled plasma optical emission spectrometry
ID	Identificação
kg	Quilograma (unidade de medida)
L	Litro (unidade de medida)
LQ	Limite de Quantificação

LD	Limite de Detecção
m_0	Massa característica
μL	Microlitro (unidade de medida)
μg	Micrograma (unidade de medida)
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	Nitrato de Magnésio
ng	Nanograma (unidade de medida)
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	Dihidrogenofosfato de amônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Chumbo
PCA	Análise de Componentes Principais, do inglês Principal Components Analysis
Pd	Paládio
pg	Picograma (unidade de medida)
PVC	Policloreto de Vinila
r	Coefficiente de correlação
R^2	Coefficiente de determinação
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês Relative Standard Deviation
$T_{\text{pirólise}}$	Temperatura de Pirólise
$T_{\text{atomização}}$	Temperatura de Atomização

1. INTRODUÇÃO

O mel é definido como uma substância doce, viscosa e aromática que é produzida por abelhas melíferas (*Apis mellifera*) do néctar de diferentes plantas (flores), de secreções de partes vivas de plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas (VIÑAS *et al.*, 1997; CAROLI *et al.*, 1999; GOLOB *et al.*, 2005; POHL *et al.*, 2010; BATISTA *et al.*, 2012). Sua matriz é bastante complexa, constituída principalmente de carboidratos diversos e outras substâncias minoritárias, dentre as quais estão os íons metálicos K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc. e, ocasionalmente, metais em nível traço tais como Pb^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Cd^{2+} , entre outros (HERNANDEZ *et al.*, 2005; LACHMAN *et al.*, 2007; POHL, 2009).

O mel pode apresentar uma variação na sua composição, principalmente no conteúdo de elementos químicos, pois é dependente de inúmeros fatores tais como origem botânica, geográfica, condições climáticas e atividades antrópicas. Na presença de algum tipo de contaminação no ambiente, as abelhas, que percorrem grandes áreas para coleta de pólen, podem transportar o contaminante que acaba se acumulando no mel, lhe fornecendo uma característica importante de indicador biológico de contaminação ambiental (ANKLAN, 1998; IOANNIDOU *et al.*, 2005; POHL, 2009; BILANDZIC *et al.*, 2011; LAMBERT *et al.*, 2012).

O Brasil apresenta características especiais quanto à flora e o clima que favorecem a atividade apícola. A cada ano, a exportação desse produto aumenta, e o país tem despontado como um dos principais exportadores mundiais. O interesse pelo mel se deve às suas características nutricionais, coloração e sabor, fazendo com que este produto seja cada vez mais utilizado como substituto do açúcar em inúmeros produtos alimentícios manufaturados. Além disso, apresenta um importante papel na medicina por apresentar propriedades antioxidantes, antibactericidas, antifúngicas, entre outras (LACHMAN *et al.*, 2007).

Esse crescente interesse pelo mel brasileiro faz necessário o desenvolvimento de métodos de análise do produto que possam conceber sua certificação de qualidade, visando principalmente evitar problemas com adulteração de mel por adição de medicamentos, espécies metálicas, etc., e que comprovem a sua função de indicador biológico de contaminação ambiental. Contudo, sabe-se que a determinação de constituintes inorgânicos em alimentos ricos em açúcar, como o mel, ainda é um desafio analítico, devido aos

problemas de interferência da matriz apresentados em diversas técnicas analíticas instrumentais como, por exemplo, a espectrometria de absorção e emissão atômica.

A Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de Grafite (do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometer* – GF AAS) é muito utilizada na análise de amostras de interesse ambiental e biológico, devido a sua capacidade de determinar concentrações traço ou ultra traço de espécies metálicas. Além da capacidade de analisar amostras líquidas e suspensões, possui características vantajosas que podem ser citadas: utilização de pequenos volumes de amostra (μL), elevada sensibilidade, baixos valores de limites de detecção e quantificação, seletividade, etc (AGILENT TECHNOLOGIES, 2010).

Normalmente, na determinação de metais em mel por GF AAS é indicado que a amostra passe por procedimentos de pré-tratamento que incluem métodos de digestão ou extração dos analitos, a fim de destruir a matriz orgânica e extrair os elementos metálicos para soluções mais simples, previamente à análise (MENDES *et al.*, 2006; POHL, 2009; PELLERANO *et al.*, 2012). Porém, ao passar por algum tratamento, a análise pode ser comprometida. Isso ocorre devido à adição de diferentes reagentes, e aquecimento das amostras de mel a elevadas temperaturas o que pode causar contaminação ou perda do metal de interesse por volatilização. Além disso, esses tratamentos geralmente demandam muito tempo de preparo, necessitam do uso de elevados volumes de reagentes de alto grau de pureza; muitas vezes são empregados reagentes tóxicos e perigosos (VIÑAS *et al.*; 1997, MAGALHÃES *et al.*, 1998; POHL, 2009).

Nos últimos anos, em análise de espécies metálicas em amostras biológicas, geológicas, alimentos, além de outras matrizes, estão sendo desenvolvidos métodos diretos, ou seja, a amostra não precisa passar por um pré-tratamento (digestão, extração, etc), antes de ser analisada. Uma das alternativas que vem sendo utilizada na determinação direta de metais por GF AAS é a amostragem de suspensões, que são preparadas com amostras sólidas ou semi-sólidas finamente divididas em meio líquido. Essa abordagem apresenta vantagens, pois minimiza problemas das radiações de fundo, possibilita o uso de padrões aquosos na calibração, minimiza problemas de contaminação ou perda do analito (MAGALHÃES *et al.*, 1998; ALVES *et al.*, 2001; DOBROWOLSKI *et al.*, 2012).

Dessa forma, o desenvolvimento de métodos analíticos para análise de amostras de mel, é uma área de relevância que ainda necessita de esforços a fim de facilitar e minimizar custos relacionados aos métodos de análise empregados. Além disso, devido ao grande e

crecente consumo de mel brasileiro, faz-se necessária uma atenção maior com esse produto, no que se refere à avaliação da sua qualidade, conhecimento das suas características nutricionais em virtude das diferentes regiões apícolas, assim como, o seu uso como bioindicador ambiental.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais do presente trabalho consistiram em desenvolver uma metodologia analítica voltada à determinação direta de chumbo, cádmio e cromo empregando a Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite e Amostragem em Suspensão. Foi proposto o estabelecimento de procedimentos simples ou sem nenhum pré-tratamento da amostra antes da sua introdução no atomizador eletrotérmico.

Os objetivos específicos foram:

- (i) Otimizar as condições de preparo de suspensões de amostras de mel;
- (ii) Avaliar o programa de aquecimento do forno de grafite empregado na determinação direta de Pb, Cr e Cd em mel;
- (iii) Estudar a influência de modificadores químicos nas determinações;
- (iv) Validar os métodos desenvolvidos e otimizados, através da avaliação das formas de calibração, testes de exatidão e precisão, limites de quantificação e detecção;
- (v) Aplicar a metodologia analítica desenvolvida na quantificação de Pb, Cd e Cr em amostras de mel, provenientes de diversas regiões do Estado do Paraná, Brasil;
- (vi) Avaliar o perfil mineral do mel produzido no Estado do Paraná através dos teores dos elementos traço Pb, Cd e Cr afim de estabelecer sua identidade em função da sua origem geográfica, e avaliação das condições de segurança alimentar.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A apicultura no Brasil teve início em 1839 com colméias da espécie de abelha preta européia, trazida pelos jesuítas de Portugal e Espanha. Depois, essa espécie passou a ser denominada como *Apis mellifera mellifera*, vulgarmente “abelha européia” ou “abelha do reino” (DE PAULA, 2008). No começo da introdução de colônias de abelhas no Brasil, não se buscava fins lucrativos, era apenas uma distração para os povos que criavam a cultura.

Em 1951 a apicultura começava a ser implantada como uma atividade econômica no Brasil. A partir de 1956, novas espécies de colméias foram trazidas, com destaque para as abelhas africanizadas, que tinham grande capacidade de adaptação ao clima tropical (DE PAULA, 2008). Desde 1970, após um extensivo período de adaptação às novas espécies de abelhas, a produção do mel foi crescendo gradativamente, até o país ganhar destaque no cenário mundial do mel.

O Brasil apresenta características especiais quanto à flora e o clima que favorecem a atividade apícola. A cada ano, a exportação desse produto aumenta, e o país tem despontado como um dos principais exportadores mundiais. Segundo dados do IBGE, em 2009 o Brasil ocupava o 9º lugar dentre os dez maiores produtores de mel do mundo sendo estes, China, Turquia, Argentina, Ucrânia, Estados Unidos, Índia, Rússia, Etiópia e Canadá (SEBRAE, 2011). Em 2011, o Brasil chegou a exportar 20,6 mil toneladas de mel, um aumento de 17,8%, se comparado com 2010. Os principais fatores que alavancaram a exportação do produto foram o aumento da florada, a melhoria das técnicas de produção e o aumento do consumo de mel (SEBRAE, 2012). Em 2012, devido ao grande período de estiagem a produção e exportação de mel brasileiro tiveram uma queda significativa, se comparado ao mesmo período do ano anterior. Em agosto de 2012, foram exportados aproximadamente 1,4 mil toneladas de mel, enquanto em agosto de 2011 a exportação de mel chegou a 2 mil toneladas (SEBRAE, 2012). Mesmo assim, a tendência é que a produção e exportação voltem a crescer com a melhora das condições climáticas.

Os principais destinos do mel brasileiro são os Estados Unidos, a Alemanha, o Canadá, o Reino Unido, a Bélgica e a Argentina. O mel produzido no Brasil apresenta grandes vantagens em relação a outros países, pois é um produto orgânico, silvestre e isento de substâncias tóxicas, o que faz crescer o seu mercado internacional (SEBRAE, 2012).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável por estabelecer e fiscalizar o cumprimento dos requisitos mínimos de qualidade do mel no Brasil (SEBRAE, 2009). Esses regulamentos são feitos com base aos estabelecidos em nível internacional, a fim de equiparar, em qualidade, o mel brasileiro ao mel de outros países e assim, favorecer a exportação do produto. O MAPA atua nesse sentido exigindo dos apicultores e dos estabelecimentos que processam mel, programas de garantia da qualidade como as Boas Práticas de Fabricação (BPF), a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e a participação no Programa Nacional de Controle de Resíduos para o mel (PNCR) (SEBRAE, 2009). A qualidade do mel brasileiro é avaliada de acordo com a realização de algumas análises de rotinas que são divididas em três grupos: análises indicadoras de maturidade, pureza e deterioração. Estas análises devem apresentar resultados em conformidade com a legislação para que assim o mel possa ser comercializado (SEBRAE, 2009).

Em relação ao Estado do Paraná, segundos dados do IBGE de 2009, o Estado ocupava o 2º lugar dentre todos os maiores Estados produtores de mel do Brasil, sendo que o principal estado produtor de mel era o Rio Grande do Sul (SEBRAE, 2011). Atualmente, o Estado ainda segue nessa mesma colocação, se destacando como um dos maiores produtores brasileiros de mel (SEAB, 2012).

O Estado do Paraná nunca teve grande destaque no que se refere à exportação do mel. Contudo, segundo dados referentes à exportação brasileira em agosto de 2012, o Estado alcançou o terceiro lugar na exportação de mel em relação ao cenário nacional, ultrapassando a exportação de outros estados brasileiros com histórico de elevado número de exportações de mel tais como Santa Catarina, Minas Gerais e Ceará. Além disso, o mel paranaense apresentou o segundo melhor preço pago por quilo de mel exportado (SEBRAE, 2012).

O grande interesse comercial pelo produto é devido as suas propriedades nutricionais e medicinais. O mel possui enzimas, aminoácidos, carboidratos, etc., que conferem ao produto um valor nutricional muito importante, e por ser um adoçante natural, está sendo amplamente utilizado como substituto do açúcar. Além disso, suas propriedades terapêuticas (antimicrobiana, antibacteriana, cicatrizante, diurética, digestiva, etc.) vem ganhando destaque nas pesquisas, comprovando os benefícios do consumo frequente do mel (EMBRAPA, 2012).

No entanto, a composição do mel, que garante inúmeras propriedades ao produto, depende da região onde o mesmo é produzido (EMBRAPA, 2012). Com a crescente

industrialização das regiões, inclusive produtoras de mel, o conhecimento do nível de exposição deste produto a diversos fatores como clima, atividade industrial, possibilidade de contaminação por agroquímicos, metais, entre outros, é de grande valia para melhor avaliar a qualidade do mel para consumo humano.

3.1. Mel como Bioindicador de Contaminação Ambiental

O conteúdo predominante do mel é uma mistura complexa de carboidratos, incluindo a frutose (25-45%), glicose (25-37%), maltose (2-12%), sacarose (0,5-3%), além de traços de outros açúcares, enzimas, aminoácidos, pigmentos, pólen, cera, minerais, entre outros (IOANNIDOU *et al.*, 2005; POHL *et al.*, 2010; BILANDZIC *et al.*, 2011; CHUA *et al.*, 2012). A contribuição de minerais no mel é relativamente baixa, normalmente de 0,1 a 0,2% (AKLAN, 1998; POHL, 2009; BILANDZIC *et al.*, 2011). Os elementos majoritários são o K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} . Elementos tais como o Pb^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} são encontrados em méis em concentrações traço, inferiores a $1,0 \mu g g^{-1}$ (HERNANDEZ *et al.*, 2005; LACHMAN *et al.*, 2007; POHL, 2009). A cor do mel pode ter relação com a sua concentração de minerais. Anklan (1998) relata que a concentração de metais pode variar de 0,04% em méis claros à 0,2% em méis escuros, dependendo do local onde o néctar foi coletado para produção do mel.

A diferença na composição dos méis, especialmente, no conteúdo de elementos químicos majoritários e minoritários, bem como nas suas características físico-químicas gerais, sabor, cor, pH, umidade, entre outros, podem estar relacionadas com alguns fatores. Entre estes estão o tipo de flora em que as abelhas coletaram o pólen (origem botânica); o tipo de solo; as características do local de produção (origem geológica e geográfica); as condições climáticas da região de produção e as condições antrópicas relacionadas à poluição atmosférica, pela emissão de partículas pelas indústrias, veículos etc.; contaminação de solos e água por agroquímicos; escoamento de efluentes urbanos; entre outros (DOS ANJOS, 2006; POHL, 2009; BILANDZIC *et al.*, 2011; PELLERANO *et al.* 2012). O tipo de processamento e armazenamento do produto comercial também influencia nas características físico-químicas dos méis (DOS SANTOS *et al.*, 2008). Se os locais utilizados pelos apicultores e pela cooperativa de beneficiamento do mel para o armazenamento e processamento do produto não apresentarem condições higiênicas adequadas, isso pode afetar o sabor, o cheiro, etc., e

também contribuir para a alteração da concentração de elementos químicos no mel, caso esses elementos estejam disponíveis nesse ambiente.

No que se refere à influência antrópica nos teores de espécies metálicas no mel, é conhecido que as concentrações dos metais refletem as quantidades dos elementos presentes na região que as abelhas entram em contato, sendo que elas podem cobrir áreas maiores que 7 km² (IOANNIDOU *et al.*, 2005; PISANI *et al.*, 2008; POHL, 2009; BILANDZIC *et al.*, 2011). Se o ambiente apresenta alguma contaminação, as abelhas ao entrarem em contato com esse ambiente (água, solo, plantas, ar), podem transportar o contaminante e influenciar as características físico-químicas do produto final. Na produção de mel, as abelhas podem transferir os mais variados tipos de contaminantes (resíduos de pesticidas, espécies metálicas, etc.), fazendo com que estes se acumulem no produto, alterando sua condição e composição natural (GARCÍA *et al.*, 2006). Assim, o mel sendo resultado de um processo de bioacumulação, pode ser usado para fornecer informações relacionadas ao ambiente em que as abelhas vivem, fazendo com que seja reconhecido como um indicador biológico de contaminação ambiental (ANKLAN, 1998; IOANNIDOU *et al.*, 2005; POHL, 2009; BILANDZIC *et al.*, 2011).

Na literatura podem ser encontrados estudos relativos à determinação de diferentes contaminantes em mel.

Wang *et al.* (2010) estudaram a presença de resíduos de pesticidas organoclorados em méis de diferentes regiões geográficas. Para isso, os autores adquiriram 38 amostras de diferentes lugares do mundo que foram analisadas por cromatografia gasosa. Alguns pesticidas estudados não foram detectados em amostras de mel, sendo que a concentração máxima encontrada foi de 8,70 ng g⁻¹. Os autores compararam as razões entre as maiores e menores concentrações dos pesticidas encontrados em mel, e verificaram que havia uma uniformidade dessas razões para amostras provenientes de países em desenvolvimento e uma grande variação para méis provenientes de países desenvolvidos.

Lambert *et al.* (2012) estudaram as abelhas, o mel e o pólen da cidade de Pays de la Loire (França), como marcadores de contaminação ambiental por chumbo. As matrizes foram coletadas em diferentes locais, urbanizados e rurais. Os autores realizaram um procedimento de tratamento das amostras de mel que envolveu várias etapas a fim de eliminar a matriz orgânica das amostras antes da determinação de chumbo por GF AAS. No tratamento, as amostras (abelhas e pólen) foram secas em estufa (etapa de pré-secagem não foi realizada

para mel), com posterior adição de ácido sulfúrico (50%) e nova etapa de secagem em mufla utilizando uma rampa de aquecimento com temperatura e tempo total de secagem de 750 °C e 9,5 horas, respectivamente. Posteriormente as amostras foram tratadas com ácido nítrico e água ultrapura, resultando em soluções com volumes finais de 10 mL (abelha e pólen) e 5 mL (mel). As amostras diluídas foram injetadas em forno de grafite e Pb foi determinado. Os teores obtidos para Pb ficaram nas faixas de 0,001 a 1,869 $\mu\text{g g}^{-1}$ em abelhas, 0,004 a 0,798 $\mu\text{g g}^{-1}$ em pólen e 0,004 a 0,378 $\mu\text{g g}^{-1}$ em mel. Os autores verificaram que o mel foi a matriz menos contaminada, e que não foi possível obter uma relação com o teor de Pb encontrado nessa matriz com o nível de contaminação apresentado pelas abelhas e o pólen. Porém, comparando essas duas últimas matrizes, os teores de Pb foram similares entre as amostras avaliadas. Conseguiu-se concluir também que o período e a região de coleta das amostras influencia no teor de Pb. Matrizes coletadas em períodos mais secos e regiões mais urbanizadas tendem a ter concentração de Pb mais elevada.

Portanto, o conhecimento em relação à presença de contaminantes em mel, principalmente dos teores de elementos traço em diferentes amostras de mel, pode fornecer informações relevantes em termos da qualidade do produto, da caracterização geográfica dos méis, assim como estimar o nível de contaminação ambiental da região (FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2005; CBA, 2011; VANHANEN *et al.*, 2011; BATISTA *et al.*, 2012; ALDAGARCILOPE *et al.*, 2012; PELLERANO *et al.*, 2012).

3.2. Metais Traço em Mel

Os metais tem uma grande importância para o planeta. Metais como Mn, Cu, Co, Zn e Se, se em baixas concentrações, são considerados micronutrientes essenciais. Porém, Pb, Cd, Hg, entre outros, não apresentam nenhuma função essencial aos organismos vivos sendo considerados tóxicos mesmo em baixas concentrações (TEMPLETON *et al.*, 2000). Elementos como o cromo, dependendo do seu estado de oxidação, podem ser considerados essenciais ou tóxicos aos organismos vivos. Por exemplo, a espécie Cr^{3+} é considerada essencial agindo no metabolismo da glicose e do colesterol e na ação da insulina em processos de degradação do açúcar no sangue (QUINÁIA e NÓBREGA, 1999; 2000; DOBROWOLSKI *et al.*, 2012). Porém, em outros estados de oxidação, a exemplo do Cr^{6+} , este elemento é tóxico, carcinogênico e mutagênico para as espécies vivas (NACKE, 2011).

Os alimentos são responsáveis por fornecer grande parte dos nutrientes necessários à manutenção da vida. No entanto, eles estão sujeitos a contaminação por elementos químicos tóxicos que são prejudiciais a saúde. Elementos como Pb, Cd, Cr (VI), As, Hg, entre outros podem ser encontrados na atmosfera, em processos industriais, nos fertilizantes, adubos, pesticidas, etc., e acabam sendo absorvidos pelas plantas, que servem de alimento para animais e seres humanos, criando uma rede de ingestão destes metais tóxicos (VENEZUELA, 2001; NACKE, 2011).

O mel, assim como qualquer alimento está sujeito a contaminação e acumulação de metais não essenciais em organismos vivos, e como citado, isso lhe garante uma característica importante de bioindicador de contaminação ambiental. Dentre os metais traço que podem acumular-se no mel se destacam três: Cádmio (Cd), Chumbo (Pb) e Cromo (Cr). Sabe-se que Pb e Cd não apresentam função importante no organismo, podendo ser fatal dependendo da quantidade ingerida. Cr, como já citado, dependendo de sua forma iônica, pode ser um nutriente essencial ou prejudicial aos seres vivos. Além disso, são elementos que estão disponíveis no meio ambiente e podem ser encontrados em inúmeros alimentos de origem animal e vegetal. Portanto, é importante conhecer as fontes e os riscos desses elementos para a saúde.

3.2.1. Cádmio

Na natureza, geralmente o cádmio é encontrado nos solos devido ao tipo de rocha de origem (VENEZUELA, 2001). Uma grande quantidade do cádmio que se deposita no solo provém de fertilizantes fosfatados, lixo urbano ou industrial e lodo de esgoto, sendo facilmente absorvido por plantas, onde é introduzido na cadeia alimentar (NACKE, 2011). A mobilidade de Cd no solo vai depender de vários fatores, como pH e teor de matéria orgânica. Ele pode se ligar fortemente com matéria orgânica, sendo assim imobilizado no solo e absorvido por vegetais (OLIVEIRA, 2009; SILVEIRA, 2012).

O uso de cádmio na indústria é feito devido ao seu baixo ponto de fusão, onde é utilizado na fabricação de ligas metálicas que possuem baixo coeficiente de fricção e alta resistência à fadiga. É utilizado na galvanoplastia, construção de baterias, atua como estabilizador na indústria de plásticos polivinílicos e é utilizado como pigmento amarelo em tintas e vidros (OLIVEIRA, 2009; SILVEIRA, 2012). Há também presença de Cd em produtos derivados do tabaco (WAALKES, 2003)

O cádmio é um elemento tóxico ao organismo, e a ingestão de alimentos ou água com altos teores deste metal pode causar irritação no trato gástrico, causando vômitos e diarreia. A longo prazo, e em concentrações menores, a ingestão de Cd pode causar danos nos rins e fragilizar a estrutura dos ossos (WAALKES, 2003; OLIVEIRA, 2009). O cádmio ainda pode causar câncer de próstata, de pulmão e testículos. Á nível celular, esse elemento afeta a proliferação e diferenciação das células podendo causar a destruição celular (NACKE, 2011).

Devido às inúmeras fontes de Cd que o tornam disponíveis no meio ambiente, sua presença em alimentos pode acontecer. Por exemplo, as abelhas podem transportar esse metal juntamente com outros contaminantes, e acabar transferindo-o para o mel. Na literatura, a maioria dos estudos de quantificação de Cd em mel relata concentrações na ordem de ng g^{-1} . Em méis da Espanha o teor de Cd encontrado abrange uma faixa de 4,3 – 5,4 ng g^{-1} (GARCÍA *et al.*, 2003; VIÑAS *et al.*, 1997). Em méis da Croácia, o valor máximo de Cd pode chegar á uma concentração 5 a 6 vezes maior (24 ng g^{-1}) do que no mel espanhol (BILANDZIC *et al.*, 2011). Em relação ao mel brasileiro, podem ser encontrados teores de Cd em uma faixa de <0,02-1,1 ng g^{-1} (BATISTA *et al.*, 2012).

3.2.2. Chumbo

As principais fontes naturais de Pb são as erupções vulcânicas, o intemperismo geoquímico e névoas aquáticas. A queima de combustível como a gasolina, em termos mundiais, é uma das mais importantes fontes de emissão antropogênica de chumbo, além das liberações industriais oriundas de fundições, fábricas de baterias e indústrias químicas, as quais contribuem para contaminação do solo pelo metal (SOUZA, 2004; GARCÍA *et al.*, 2005a; OLIVEIRA, 2009). O ambiente aquático também pode sofrer contaminação por Pb sendo que suas principais causas estão relacionadas com a poluição atmosférica, que aumenta o teor deste metal na água da chuva; presença de Pb na água de escoamento urbano (doméstico e industrial), nos efluentes da agricultura com o uso frequente de agrotóxicos e fertilizantes, entre outros (VENEZUELA, 2001).

O chumbo possui vasta utilização comercial. Os óxidos de chumbo podem ser usados na fabricação de vidros e cristais, na produção de vernizes e esmaltes e na vitrificação (SILVEIRA, 2012). Os esmaltes e tintas produzidos com óxidos de Pb são bastante utilizados nas construções, na produção de cerâmicas, entre outros (OLIVEIRA, 2006; GONÇALVES, 2008).

A absorção de chumbo pelo ser humano pode ocorrer por via respiratória, oral ou cutânea e depende de alguns fatores como o estado físico e químico do metal, e da idade e das condições físicas do indivíduo. Os principais meios de absorção do Pb são a ingestão e inalação. Já absorvido, o metal chega a tecidos diversos, como fígado, rins, pulmões, cérebro, baço, coração e músculos, através do sangue (OLIVEIRA, 2009; NACKE, 2011). Com o passar do tempo, o chumbo desloca-se e é acumulado nos ossos e dentes, podendo permanecer nessas estruturas por um longo tempo. No organismo o chumbo pode inibir ou substituir a ação do cálcio e interagir com proteínas, além de outros mecanismos de intoxicação (MOREIRA e MOREIRA, 2004; SCHIFER *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2009).

Os efeitos adversos de intoxicação por Pb vão desde a dificuldades no aprendizado e desenvolvimento comportamental até a morte. A intoxicação por Pb em crianças é mais perigosa e freqüente. As crianças estão mais suscetíveis aos efeitos da intoxicação pelo metal do que os adultos, já que a capacidade de absorção pelo organismo das mesmas é maior (SCHIFER *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2009). Isso pode trazer conseqüências ao longo da vida devido a danos neurológicos como a diminuição da aprendizagem (saturnismo). Além disso, o excesso de Pb pode causar efeitos renais, cardiovasculares, hepáticos, neuromusculares, entre outros (MOREIRA e MOREIRA, 2004; SCHIFER *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2009).

Porém elementos essenciais como zinco, ferro, selênio e algumas vitaminas interferem nos efeitos tóxicos do chumbo, e estudos demonstram que crianças com baixa ingestão diária desses nutrientes apresentaram um aumento da concentração de chumbo no sangue (SCHIFER *et al.*, 2005; OLIVEIRA, 2009).

Devido a elevada disponibilidade de Pb na atmosfera, solo, água etc., os alimentos estão muito suscetíveis a presença deste metal. Frutas, vegetais, carnes, frutos do mar e bebidas podem conter chumbo devido à contaminação de água e solos onde plantas e animais são criados (TAVARES, 2010). O mel, assim como qualquer alimento, também é suscetível a contaminação por Pb pelo processo de bioacumulação, já citado. Em méis espanhóis são relatados teores máximos de Pb na faixa entre 75-270 ng g⁻¹ (GARCÍA *et al.*, 2005a; VIÑAS *et al.*, 1997). Em méis da Turquia, encontram-se teores máximos de Pb que ficam cerca de 55 a 200 vezes maiores do que em méis espanhóis (14960 ng g⁻¹ de Pb em mel) (YÜCEL e SULTANOĞLU, 2012). Em méis do Brasil, pode-se encontrar teores de Pb entre 1,2 e 31,4 ng g⁻¹ (BATISTA *et al.*, 2012).

3.2.3. Cromo

O cromo é um elemento químico encontrado em todas as rochas da crosta terrestre, estando assim muito presente no solo, na água e nos materiais biológicos. Os compostos de cromo, principalmente nas formas Cr^{3+} e Cr^{6+} , são usados para atividades de galvanização, manufatura de tintas e pigmentos, curtimento de couros e como preservativos de madeira (MAUÁ, 2004).

Esse elemento pode ser considerado bioativo, pois a presença de Cr^{3+} na dieta de seres vivos está relacionada com o metabolismo de glicose, lipídeos e proteínas (QUINÁIA e NÓBREGA, 1999; 2000; BALDAN, 2004; MAUÁ, 2004; NACKE, 2011; DOBROWOLSKI *et al.*, 2012). Contudo, a espécie Cr^{6+} é considerada agente tóxico devido ao seu alto potencial de oxidação, causadora de vários e graves problemas respiratórios e dermatites em geral, além de ser um agente carcinogênico (KOTAS e STASICKA, 2000; NACKE, 2011; DOBROWOLSKI *et al.*, 2012).

No solo, a matéria orgânica tende a estimular a redução do Cr^{6+} para Cr^{3+} , que possui ocorrência natural. No entanto, o Cr^{6+} apresenta grande mobilidade no solo, sendo prontamente solúvel e tóxico para plantas, animais e humanos (KOTAS e STASICKA, 2000; NACKE, 2011).

Os compostos de cromo, principalmente na forma hexavalente (Cr^{6+}) produzem vários danos a saúde: dermatite alérgica, ulcerações na pele, perfuração do septo nasal, lesões bronco-pulmonares, renais, gastrointestinais, podendo causar câncer (KOTAS e STASICKA, 2000; MAUÁ, 2004; NACKE, 2011).

Em alimentos pode existir a presença de cromo devido a sua disponibilidade nos ambientes. O teor normal de Cr em plantas medicinais e vegetais é de 0,05 a 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ (DOBROWOLSKI *et al.*, 2012). Em mel, estudos realizados relatam teores de Cr entre 5,75 e 26,4 ng g^{-1} , isso para amostras da Espanha (GARCÍA *et al.*, 2005b). Na Eslovênia, porém, é possível encontrar, em média, 3550 ng g^{-1} de Cr em mel (GOLOB *et al.*, 2005), valor aproximadamente 135 vezes maior do que no mel espanhol. Nos méis brasileiros, a concentração de Cr encontrada varia entre 0,03 e 11,5 ng g^{-1} (BATISTA *et al.*, 2012).

Todos os relatos em relação ao risco oferecido por metais traço, em especial Pb e Cd e Cr, demonstram a importância em se conhecer e desenvolver mais métodos analíticos para determinação destes metais em alimentos, especialmente no mel, a fim de obter dados em

relação a sua segurança alimentar, e também, poder estimar níveis de contaminação em regiões produtoras, através do seu uso como bioindicador de contaminação ambiental.

3.3. Métodos Analíticos Empregados na Determinação de Metais Traço em Mel

Na literatura são relatados inúmeros estudos relativos à determinação da concentração de constituintes inorgânicos do mel de diversos países (LATORRE *et al.*, 2000; HERNANDEZ *et al.*, 2005). Porém, poucos dados relativos ao teor de metais, principalmente em nível traço, encontram-se disponíveis para os méis brasileiros (PAMPLONA, 1989; DOS SANTOS *et al.*, 2008).

Normalmente a determinação de espécies metálicas presentes em baixas concentrações no mel é realizada por técnicas espectrométricas de análise baseadas em absorção ou emissão atômica (POHL, 2009; BATISTA *et al.*, 2012; YÜCEL e SULTANOĞLU, 2012). Contudo, outras técnicas também são utilizadas, tais como Espectroscopia de Fluorescência por Raio-X com Reflexão Total, do inglês *Total Reflection X-ray Fluorescence Spectroscopy* (TXRF); Voltametria de Redissolução Anódica, do inglês *Anodic Stripping Voltammetry* (ASV); Análise de Redissolução Potenciométrica, do inglês *Potentiometric Stripping Analysis*; Análise Instrumental por Ativação com Nêutrons, do inglês *Instrumental Neutronic Activation Analysis* (INAA); Cromatografia Iônica, do inglês *Ion Chromatography* etc. (SANNA *et al.*, 2000; GOLOB *et al.*, 2005; MENDES *et al.*, 2006; POHL, 2009; PELLERANO *et al.*, 2012).

Na determinação de metais traço em alimentos, especialmente em mel, destaca-se o emprego da Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite, do inglês *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry* (GF AAS), Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* (ICP OES) e a Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado, do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry* (ICP MS). A utilização destes instrumentos se deve a alta sensibilidade e seletividade, e precisão e exatidão adequadas (POHL, 2009; CHUA *et al.*, 2012; YÜCEL e SULTANOĞLU, 2012).

Contudo, sabe-se que a determinação de metais em alimentos ricos em açúcar, como o mel, ainda é um desafio analítico, devido aos problemas com interferentes de matriz apresentados em diversas técnicas espectrométricas (QUINÁIA e NÓBREGA, 1999; POHL,

2009). Os interferentes de matriz do mel podem estar relacionados com a presença de impurezas e compostos orgânicos, que por sua vez podem levar a dificuldades nas análises, como por exemplo, a obtenção de sinais de fundo mais elevados.

Na literatura, muitos trabalhos que realizam a determinação de metais majoritários e minoritários em mel demonstram a necessidade de fazer uma abertura das amostras para que se possa extrair o analito de interesse e assim, serem realizadas as determinações instrumentais.

Fernández-Torres *et al.* (2005) realizaram a determinação de 11 metais, sendo Zn, P, B, Mn, Mg, Cu, Sr, Ca, Ba, Na e K, em 40 amostras de mel provenientes de diferentes regiões da Espanha. Para minimizar a interferência da matriz do mel, foram realizadas etapas de tratamento das amostras. O mel foi tratado com ácido nítrico concentrado e aquecimento até secagem da solução. O mesmo procedimento foi realizado com uma mistura 2:1 de HNO₃/HClO₄ até completa mineralização. O resíduo foi dissolvido em ácido nítrico concentrado e água tipo milli-Q resultando em soluções com volume de 25 mL. As soluções foram analisadas por ICP OES, sendo que apenas Cu e Ba não puderam ser determinados em algumas amostras de mel. As concentrações obtidas para os metais de interesse ficaram entre 0,133 e 1845 µg g⁻¹.

Chua *et al.* (2012) relataram a determinação dos seguintes elementos: K, Na, Fe, Mg, Al, Cr, Mn, Zn, Rb, Cu, Se, Sr, Ag, Cd, In, Cs, Ba, U, Li, Ni, Be, V, Co, Ga, As, Pb, Ca e Ti em méis da Costa Oeste da Malásia. Para tal, os autores utilizaram ICP OES para a determinação dos elementos mais abundantes, no caso K e Na, e ICP MS para a determinação dos outros 26 elementos. Previamente às determinações, as amostras de mel foram tratadas a fim de destruir a matriz orgânica e minimizar as interferências. Amostras de mel (1 g) foram digeridas com 10 mL de HNO₃ (65%), e aquecimento até próximo a secagem da solução. Posteriormente, adicionou-se água deionizada até volume resultante da solução em 50 mL. Os autores concluíram que foi possível determinar os elementos Al, Cr, Cd, Mn, Zn e Rb em concentrações menores que 7 µg L⁻¹. Porém, Li, Be, V, Co, Ga, As, Pb, Ti e Ca não foram detectados nas amostras de mel, pois seus teores estavam abaixo do limite de detecção que ficou entre 0,266 e 88,198 µg L⁻¹.

Em relação ao mel nacional, em um recente estudo, Batista *et al.* (2012) avaliaram 42 metais, essenciais e tóxicos, em diferentes amostras de mel do Brasil coletadas em 4 das 5 regiões do país, em diferentes estados. Neste estudo, as quantificações foram realizadas

através do ICP MS. As amostras de mel foram diluídas em água do tipo Milli-Q (1:1 m/m) e 400 µL dessa solução de mel foram misturadas com 200 µL de HNO₃ concentrado. As soluções foram homogeneizadas por 20 minutos e tiveram o seu volume completado em 10 mL. Os autores quantificaram 40 elementos. As concentrações dos elementos variam de 0,001 a 486000 ng g⁻¹. Por exemplo, para Cd e Pb as concentrações médias quantificadas no mel brasileiro foram 0,33 e 8,7 ng g⁻¹, respectivamente.

Entre as inúmeras técnicas espectrométricas citadas na literatura, para determinação de espécies metálicas em amostras biológicas e alimentos, especialmente em mel, a GF AAS é uma das mais utilizadas (VIÑAS, *et al.*, 1997; GARCÍA *et al.*, 2003, 2005a, 2005b). Seu extensivo uso está associado a sua capacidade de detecção, conseguindo determinar concentrações em nível de traço e ultra traço. Além disso, vários aspectos vantajosos podem ser encontrados nessa técnica, sendo análise de diferentes tipos de amostras (aquosas, sólidas e suspensão), utilização de pequenos volumes de amostra, seletividade, entre outros (GARCÍA *et al.*, 2003; AGILENT TECHNOLOGIES, 2010).

3.3.1. Princípios básicos da Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite (GF AAS)

O uso do Forno de Grafite para geração de átomos livres em AAS, foi introduzida por Boris L'Vov em 1959 (WELZ e SPERLING, 1999). Mas foi o forno de Massmann, em 1968, que ganhou destaque para comercialização (LAJUNEN e PERÄMÄKI, 2004).

As vantagens no uso de atomizadores eletrotérmicos, como o Forno de Grafite, são inúmeras: utilização de uma fonte de radiação específica para o analito, alta sensibilidade, utilização de pequeno volume de amostra na ordem de microlitros (µL), eliminação da matriz diretamente na etapa da calcinação (pirólise), baixos valores de limites de detecção e quantificação e, além disso, a GF AAS permite que se possa trabalhar com amostras líquidas, sólidas e suspensões (WELZ e SPERLING, 1999; LAJUNEN e PERÄMÄKI, 2004; AGILENT TECHNOLOGIES, 2010).

Geralmente são encontradas diferentes superfícies de atomização utilizadas na determinação de espécies metálicas em atomizadores eletrotérmicos como o Forno de Grafite. As mais citadas em trabalhos na literatura são os tubos de grafite pirolítico e com Plataforma de L'vov.

A atomização da amostra de interesse em superfície de tubo de grafite pirolítico ocorre em um tubo aberto em suas duas extremidades e que contém um orifício central para a introdução da amostra. Geralmente o tubo de grafite tem 5 cm de comprimento e um diâmetro interno um pouco menor que 1 cm, mas as dimensões do tubo variam de um equipamento para outro. O tubo tem um par de contatos elétricos feitos de grafite localizados nas duas extremidades do tubo. Esses contatos são mantidos em um compartimento metálico refrigerado com água. São utilizados dois fluxos de gás inerte. O fluxo externo previne a entrada de ar e a conseqüente incineração do tubo. Já o fluxo interno flui pelas duas extremidades do tubo e sai pelo orifício central. Essa corrente de gás, além de excluir o ar, também serve para carregar para fora os vapores gerados pela matriz da amostra durante os estágios iniciais de aquecimento (SKOOG, 2006).

A introdução da Plataforma de L'vov como superfície de atomização tem o objetivo de melhorar as determinações aquecendo a amostra de forma uniforme, com condições isotérmicas em determinado período de tempo, sem gradientes de temperatura, como é o caso de tubo pirolítico (WELZ e SPERLING, 1999). Ou seja, à medida que a temperatura do forno aumenta, a atomização é atrasada já que a amostra não está mais em contato com as paredes do tubo, e a alteração da temperatura é mínima nessa etapa. Assim, os sinais obtidos são mais reprodutíveis (SKOOG, 2006). Esse tipo de superfície proporciona também que amostras sólidas possam ser analisadas com eficácia, sendo que a amostra pode ser pesada diretamente na plataforma. No entanto, esse tipo de superfície de atomização é mais cara se comparado com a superfície pirolítica.

Além da superfície de atomização adequada, é necessário que o atomizador eletrotérmico com Forno de Grafite tenha um programa de aquecimento da amostra que seja seletivo e busque a minimização dos interferentes de matriz (OLIVEIRA, 2004). O programa de aquecimento do Forno de Grafite, geralmente é constituído das seguintes etapas, as quais são descritas por Welz e Sperling (1999):

- 1) *Secagem*: Nesta etapa o solvente é evaporado da amostra lentamente para evitar perdas, ou que algumas partículas sejam levadas pelo fluxo de gás. Geralmente leva um tempo de 30 a 40 segundos até atingir uma temperatura de 105°C;
- 2) *Calcinação ou pirólise*: Nesta etapa ocorre a remoção da matriz, ou seja, o analito é separado das matrizes que possam vir causar algum tipo de interferência. Aqui se

deve levar em consideração o tipo de matriz e a velocidade de volatilização do analito, para evitar perdas. A temperatura nesta etapa varia de 200 a 1600 °C;

- 3) *Atomização*: Nesta etapa a amostra é aquecida até formar átomos no estado fundamental e na forma de vapor no caminho do feixe de radiação. Geralmente a atomização do analito ocorre dentro de 0,1 segundos, com temperaturas até 3000 °C (SKOOG, 2006);
- 4) *Limpeza*: Nesta etapa, após a atomização, são aplicadas altas temperaturas, para que qualquer resíduo no tubo de grafite seja eliminado.

Dependendo do tipo de matriz e analito a serem analisados, esse programa de aquecimento pode sofrer alterações. Podem ser incluídas novas etapas se necessário e as temperaturas de pirólise e atomização podem ser otimizadas para melhorar as determinações dos analitos de interesse na matriz de estudo.

Em muitos casos, para evitar perdas de analito em alguma das etapas de aquecimento do forno de grafite ou diminuir o efeito de interferentes da matriz, são introduzidos reagentes químicos, chamados de modificadores químicos ou modificadores de matriz (OLIVEIRA, 2004; SOUZA, 2004). Este por sua vez, foi proposto por Ediger em 1975, e tinha como objetivo reduzir ou eliminar a volatilização de interferentes na etapa de vapor (WELZ e SPERLING, 1999). Geralmente são utilizados sais inorgânicos (por exemplo, Pd, Mg(NO₃)₂, NH₄H₂PO₄, entre outros) que são adicionados na amostra para: (i) tornar a matriz e interferentes mais voláteis ou (ii) converter o analito em uma forma menos volátil. Em ambos os casos, o objetivo é diferenciar a volatilidade do analito e da matriz para que eles possam ser separados durante a pirólise (RIBEIRO, 1999; WELZ e SPERLING, 1999; OLIVEIRA, 2004; SOUZA, 2004).

O conhecimento das características apresentadas pela GF AAS torna-se fundamental para que sua aplicação possa ser realizada na determinação de metais em amostras de interesse.

3.3.2 Determinação de metais em amostras de alimentos empregando GF AAS

A determinação de espécies metálicas em alimentos e bebidas vem ganhando destaque nos últimos tempos. Os crescentes casos de contaminação de alimentos por metais, principalmente tóxicos, ganham interesse nas pesquisas e a GF AAS se destaca nas análises destas espécies devido suas várias vantagens já conhecidas. Na literatura podem ser

encontrados trabalhos de determinação de metais em alimentos e bebidas como gelatina, açúcar, leite, vegetais, vinho, entre outros (QUINÁIA e NÓBREGA, 1999; 2000; AJTONY *et al.*, 2008; DOBROWOLSKI *et al.*, 2012). Na literatura, também podem ser encontrados estudos de determinação de metais em mel por GF AAS (GARCÍA *et al.*, 2003; GARCÍA *et al.*, 2005a; 2005b; AJTONY *et al.*, 2007; LAMBERT *et al.*, 2012).

Geralmente, quando se realizam determinações de espécies metálicas em alimentos, principalmente mel, utilizando GF AAS é necessário que a amostra sofra um tratamento, sendo incluídos procedimentos com métodos de digestão via seca e via úmida, que possam extrair o analito para soluções mais simples para que o mesmo possa ser determinado (MENDES *et al.*, 2006; POHL, 2009; PELLERANO *et al.*, 2012). Isso é necessário devido á complexidade da matriz do mel, que possui muitos compostos orgânicos e impurezas, tornando a determinação de metais tóxicos por GF AAS uma tarefa que não é trivial. Esses procedimentos de extração são importantes, pois agem na destruição da matriz orgânica do mel.

A digestão da amostra de mel pode ser realizada por diferentes procedimentos de mineralização, tais como a digestão assistida por microondas, a digestão úmida, a calcinação, entre outras.

Na digestão úmida são empregando ácidos e outros agentes oxidantes como, por exemplo, peróxido de hidrogênio, que tem por finalidade destruir a matriz orgânica da amostra e extrair, de forma eficaz, a espécie metálica de interesse (MENDES *et al.*, 2006; SARDANS *et al.*, 2010). Nesse tipo de procedimento a amostra com adição desses reagentes é aquecida em temperaturas brandas, para evitar perdas da solução e do analito, até total decomposição. Posteriormente, a solução ou resíduo é completada com água até um volume conhecido. As vantagens desse procedimento estão relacionadas com a facilidade de manipulação e com a utilização de curvas analíticas com padrão externo, o que facilita as determinações dos metais de interesse (SARDANS *et al.*, 2010).

A digestão ácida assistida por microondas se baseia no aquecimento da amostra por radiação das microondas. Suas vantagens estão relacionadas com o aumento da velocidade das reações devido às altas temperaturas e pressões que podem ser atingidas nos frascos onde é realizado o procedimento (PAES, 2007).

Na calcinação, a amostra pode ser colocada em muflas empregando rampas de aquecimento que variam entre 100 a 600°C, dependendo do elemento a ser analisado. A

escolha da temperatura de calcinação adequada ao analito de interesse é muito importante para evitar a perda do mesmo por volatilização. Posteriormente, as cinzas obtidas são diluídas em soluções ácidas, podendo conter um ácido ou uma mistura de ácidos (POHL, 2009; SARDANS *et al.*, 2010).

Porém, os procedimentos baseados em digestão e calcinação tem desvantagens como o maior tempo de preparo das amostras, já que a decomposição da amostra pode levar horas; uso de grandes volumes de reagentes, que muitas vezes são de alto grau de pureza, o que aumenta o custo da análise; e emprego de reagentes tóxicos e perigosos. Além disso, o maior tempo de preparo da amostra e as etapas de aquecimento envolvidas nos procedimentos, principalmente relacionadas com a utilização de altas temperaturas, podem ter como consequência a perda do analito por volatilização ou mesmo a contaminação da amostra, o que influencia toda a análise (VIÑAS *et al.*; 1997, MAGALHÃES *et al.*, 1998; POHL, 2009; SARDANS *et al.*, 2010).

Na literatura são encontrados trabalhos que realizam a determinação de espécies metálicas em mel por GF AAS, utilizando procedimentos de extração do analito, a exemplo das digestões.

Bilandzic *et al.* (2011) relatam o uso de GF AAS na determinação de As, Cd, Cu e Pb em amostras de mel de diferentes regiões da Croácia. Neste estudo, 0,5 g de mel foi digerida com 4 mL de HNO₃ (65% v/v) e 2 mL de H₂O₂ (30% v/v) em um forno de microondas com diferentes programações da digestão (potência, tempo de rampa e permanência). Na solução final da digestão adicionou-se água deionizada até volume de 50 mL. O estudo aponta a presença de grande teor de Pb nas amostras de mel das 5 regiões do país (10 a 841 ng g⁻¹).

Nos últimos anos, porém, vêm sendo desenvolvidos métodos de determinação de metais por GF AAS em amostras biológicas, geológicas, alimentos, e outras matrizes, que buscam minimizar a participação humana em todas as etapas do processo analítico. Isso é necessário para evitar que o excesso de manipulação da amostra permita que ocorra algum tipo de contaminação. Estes métodos são conhecidos como métodos de análise direta, e tem por princípio eliminar ao máximo as etapas de pré-tratamento das amostras (digestão, extração, etc), antes de serem analisadas por GF AAS.

Uma das alternativas para minimizar os problemas de preparo de amostra tem sido o uso da técnica de amostragem sólida acoplada a GF AAS. Neste caso, a amostra sólida, ou uma amostra pulverizada com tamanho de partícula controlado, é inserida diretamente no

atomizador eletrotérmico minimizando os problemas durante etapa de tratamento de amostra (WELZ e SPERLING, 1999; LAJUNEN e PERÄMÄKI, 2004). Isso minimiza as possibilidades de contaminação, já que não é adicionado nenhum tipo de reagente e a manipulação da amostra é mínima (SARDANS *et al.*, 2010). Contudo, neste tipo de abordagem é necessário utilizar amostradores específicos para sólidos, de custo um pouco elevado. Normalmente a amostra sólida é pesada diretamente em uma plataforma de grafite pirolítico do tipo canoa, que é inserida lateralmente no interior do tubo de grafite. Esses amostradores podem ser muito simples ou mais sofisticados com o uso de balanças e pinças operadas automaticamente. Esse tipo de amostragem apresenta algumas desvantagens tais como a geração de absorção de fundo devido à absorção molecular e espalhamento de radiação pelas partículas da amostra, a necessidade do uso de padrões sólidos (pouco disponíveis) na calibração e a dificuldade de obter amostras bem homogêneas (MAGALHÃES *et al.*, 1998; WELZ e SPERLING, 1999; DAMIN, 2009).

Outra alternativa que vem sendo utilizada na determinação direta de metais em amostras ambientais e alimentos por GF AAS é a amostragem de suspensões. Suspensões são preparadas com amostras sólidas ou semi-sólidas finamente divididas em meio líquido. As suspensões diferem das soluções aquosas, pois o tamanho da partícula dissolvida é geralmente grande e por esse motivo este tipo de dispersão, sob efeito da luz, torna-se opaca.

A amostragem em suspensão apresenta vantagens, pois reduz o tempo de preparo das amostras, minimiza problemas das radiações de fundo na análise de sólidos, possibilita o uso de padrões aquosos na calibração e minimiza problemas de contaminação ou perda do analito (MAGALHÃES *et al.*, 1998; ALVES *et al.*, 2001; DAMIN, 2009; DOBROWOLSKI *et al.*, 2012).

O principal cuidado quando se opta por trabalhar com amostragem em suspensão é a garantia da representatividade da amostra, principalmente em termos de estabilidade e homogeneidade, pois alguns tipos de amostras apresentam diferentes taxas de sedimentação dos seus analitos (LAJUNEN e PERÄMÄKI, 2004; DAMIN, 2009). Nesse sentido, muitas vezes são utilizados agitadores mecânicos, agitação ultrassônica, misturadores por efeito vortex, uso de agentes estabilizantes tais como Triton X-100, glicerol, emulsão antifoam B, trietanolamina, entre outros, que possam garantir uma distribuição homogênea das partículas na solução.

Esse tipo de abordagem é interessante na análise de metais traço em alimentos, especialmente em mel, pois devido ao baixo risco de contaminação e perda de analito, tem-se uma maior garantia na determinação dos teores de metais de interesse, que geralmente são baixos nesse tipo de matriz. Além disso, a amostragem em suspensão permite com que seja determinada a concentração total do analito (SARDANS *et al.*, 2010).

Poucos trabalhos relatam o desenvolvimento de análises diretas das amostras de mel para determinação de metais traço por GF AAS (VIÑAS, *et al.*, 1997; GARCÍA *et al.*, 2003, 2005a, 2005b). Por exemplo, Viñas *et al.* (1997) relatam um procedimento rápido empregado na determinação direta de Pb, Cd, Zn e Cu em mel utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em tubos de grafite pirolíticos e com plataforma de L'vov como superfícies de atomização. As amostras de mel foram diluídas em meio de HNO₃ (1%) e H₂O₂ (10%), com adição de dihidrogenofosfato de amônio (1 g L⁻¹) como modificador químico, e injeção direta no atomizador eletrotérmico (forno de grafite).

García *et al.* (2003; 2005a), descrevem o desenvolvimento de dois métodos para a determinação direta de Pb e Cd em amostras de mel da Galícia (Espanha) por GFAAS. O mel foi diluído em água (20%) e foram adicionados H₂O₂, HNO₃ e Triton X-100 para minimizar o efeito de matriz, relacionados à viscosidade e impurezas e compostos orgânicos presentes na composição do mel. Em um dos métodos, os autores utilizaram paládio e magnésio como modificadores químicos. O segundo método envolveu o uso do dihidrogenofosfato de amônio como modificador químico.

Em outro estudo, García *et al.* (2005b) realizaram a determinação direta e combinada de cromo, cobre e níquel em méis da Galícia (Espanha), utilizando também H₂O₂, HNO₃ e Triton X-100 para minimizar efeito de matriz. Neste estudo foi utilizado Paládio (Pd) como modificador de matriz e a injeção direta da suspensão no atomizador eletrotérmico.

Nesse contexto, a busca pelo desenvolvimento de protocolos analíticos que facilitem, agilizem e diminuam os custos relacionados às técnicas analíticas são de grande relevância, principalmente na determinação de espécies metálicas em mel, que é um produto de grande interesse nutricional e ambiental (bioindicador de contaminação).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico para análise de metais traço.

Água ultrapura foi empregada em todos os experimentos. A mesma foi obtida através do sistema de purificação TKA-GenPure (Thermo Scientific, Alemanha).

As soluções analíticas dos íons metálicos de chumbo, cádmio e cromo foram preparadas diariamente a partir de diluições de soluções padrão de 1000 mg L⁻¹ (Biotec) até a concentração desejada.

Sais de nitrato de magnésio e dihidrogenofostato de amônio e solução de paládio (Fluka, 970 mg L⁻¹) foram utilizados como modificadores de matriz. Ácido nítrico (Merck, 65% m/v), peróxido de hidrogênio (Biotec, 33% v/v) e Triton X-100 (Aldrich) também foram utilizados.

Dois tipos de modificadores químicos foram preparados através de diluição em solução de mel: (i) Pd-Mg(NO₃)₂; (ii) NH₄H₂PO₄.

4.2. Equipamentos

Os materiais comumente empregados nesta dissertação foram uma balança analítica (Shimadzu, modelo AUW220D) com precisão ± 0,001 g, lavadora ultrassônica (Unique, USC 2800, 40 kHz), chapa de aquecimento (Novatecnica), e micropipetas (Labmate-HTL) com diferentes capacidades.

As determinações de cádmio, cromo e chumbo foram conduzidas com um espectrômetro de absorção atômica (Agilent Varian, AA 240Z), com atomização eletrotérmica em forno de grafite (modelo GTA 120), equipado com corretor Zeeman transversal para correção de fundo, amostrador automático (modelo PSD 120) e sistema de aquisição de dados (SpectraA).

Duas lâmpadas de cátodo-oco multielementar (Varian, Agilent) foram utilizadas para medidas de chumbo, cádmio e cromo. Uma lâmpada operando em comprimento de onda de 228,8 nm com corrente de 4 mA e fenda 0,5 nm para Cd, e operando a 10 mA e comprimento

de onda de 283,3 nm e fenda de 0,5 nm para Pb. Outra lâmpada para cromo foi utilizada operando com corrente de 7 mA, comprimento de onda de 357,9 nm e fenda de 0,2 nm.

Argônio foi usado como gás inerte de arraste num fluxo de 0,3 L min⁻¹ em todos os estágios de aquecimento do forno de grafite, com exceção da etapa de atomização, na qual o arraste era interrompido.

Tubos de grafite recobertos piroliticamente (Varian, Agilent) foram utilizados em todas as determinações empregando espectrometria de absorção atômica em forno de grafite.

As medidas foram realizadas utilizando como sinal analítico a área integrada do pico de absorvância com correção de fundo (background), sendo que cada dado de sinal representou um valor médio de três replicatas.

4.3. Técnicas Limpas

Procedimentos de técnicas limpas foram adotados no presente trabalho para minimizar possíveis contaminações ou adulterações de soluções e amostras (CAMPOS *et al.*, 2002; DOS ANJOS, 2006; DOS ANJOS *et al.*, 2010). A implantação desses procedimentos foi necessária, pois o estudo envolve a determinação de concentrações traço de espécies metálicas em mel.

Todos os materiais utilizados foram previamente lavados com detergente comercial neutro, escova e água corrente. Posteriormente, os materiais foram enxaguados por 5 vezes com água corrente e 3 vezes com água destilada. Em seguida, os materiais foram mantidos em banho de HNO₃ 5% (v/v) em recipiente plástico com tampa, por um tempo mínimo de 24 horas. A próxima etapa consistiu em enxaguar os materiais por 5 vezes com água do tipo ultrapura. Os materiais foram secos em bandejas plásticas previamente descontaminadas. Finalmente, os materiais foram armazenados em sacos plásticos (CAMPOS *et al.*, 2002; DOS ANJOS, 2006).

Durante todo o processo de limpeza e ensaios, os materiais foram manipulados em bandejas e/ou bancadas previamente descontaminadas com solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mol L⁻¹, pH 5. O EDTA age como um complexante das espécies metálicas que podem estar presentes nas bancadas ou bandejas, diminuindo o risco de contaminação de reagentes e das amostras de interesse.

Os materiais descontaminados e amostras foram manuseados com o auxílio de luvas de procedimento sem talco. A Figura 1 ilustra o procedimento de técnicas limpas utilizadas durante o preparo e manipulação de soluções e amostras de mel.



Figura 1. Foto ilustrativa referente ao procedimento de técnicas limpas adotado durante todo o desenvolvimento do trabalho.

4.4. Implantação do Procedimento Analítico para Determinação Direta de Cd, Cr e Pb em Amostras de Mel Empregando GF AAS e Amostragem em Suspensão

Nesta etapa de trabalho, uma amostra de mel (480 g), adquirida na Central Regional de Comercialização do Centro-Oeste do Paraná (CERCOPA) de Guarapuava-PR, foi utilizada em experimentos de implantação dos protocolos analíticos e por isso, considerada modelo. A CERCOPA atua no beneficiamento e comércio de produtos alimentícios, especialmente mel, cera de abelha e chás.

4.4.1. Estudo da forma de preparo de suspensões de mel

A proposta do trabalho foi realizar determinações de Pb, Cr e Cd em amostras de mel empregando GF AAS de forma direta, ou seja, sem qualquer tratamento prévio das amostras. Assim, as amostras de méis foram diluídas em água ultrapura, a fim de obter suspensões de mel homogêneas e estáveis para injeção direta no forno de grafite durante determinação por GF AAS. Contudo, foi necessária em uma etapa preliminar a condução de experimentos que incluíam avaliar diferentes formas de diluição das amostras de mel.

As concentrações das suspensões de mel em meio aquoso foram estudadas na faixa entre 30 a 100 g L⁻¹, de acordo com o que pode ser observado na literatura, em estudos de determinação direta de metais em mel (GARCÍA *et al.*, 2003; GARCÍA *et al.*, 2005a, 2005b). Nessas suspensões foram avaliadas as adições de alguns reagentes tais como HNO₃, H₂O₂ e Triton X-100.

Na otimização do preparo das suspensões de mel, soluções foram preparadas pesando 0,75 a 2,5 g de mel (amostra modelo) e adicionados alguns reagentes como ácido nítrico (0,1 mol L⁻¹), peróxido de hidrogênio (3 - 10% v/v) e Triton X-100 (2% m/v). As soluções foram diluídas com água ultrapura até ajuste do volume em 25 mL. As soluções foram mantidas durante 5-10 minutos em banho ultrassônico para garantir a total solubilização e homogeneidade das amostras. Aspectos como coloração, viscosidade, homogeneidade, estabilidade e facilidade de pipetagem foram avaliados. Esse tipo de avaliação foi feita visualmente, observando as características das suspensões; e com o uso de micropipetas de 20 a 100 µL para avaliar, principalmente, a viscosidade e a facilidade de pipetagem das suspensões de mel.

Para as amostras de mel que se apresentam na forma sólida devido a sua cristalização, as mesmas foram aquecidas em banho aquoso (50 °C) para o preparo da suspensão. As suspensões de mel diluídas foram preparadas diariamente para prevenir a atividade anaeróbica de microorganismos (GARCÍA *et al.*, 2003; GARCÍA *et al.*, 2005a, 2005b).

4.4.2. Desenvolvimento e otimização do procedimento analítico empregado na determinação direta de metais em mel empregando GF AAS

Na implantação do procedimento analítico voltado à determinação direta de metais em amostras de mel foram realizados experimentos de forma univariada para otimizar o programa de aquecimento do forno de grafite, e para avaliar a influência do uso de modificadores químicos nas determinações diretas.

Nestes ensaios foram avaliados parâmetros tais como sinal de fundo (background - BG), formato do pico, altura e área do pico do analito, a fim de obter maior sinal analítico e máxima redução de interferentes de matriz que poderiam causar problemas na análise. Na otimização do programa de aquecimento foram obtidas curvas de pirólise e de atomização e também foi avaliada a ação de modificadores químicos (Pd, NH₄H₂PO₄ e Mg(NO₃)₂).

4.4.2.1. Chumbo

Para a determinação de chumbo em mel por GF AAS e amostragem em suspensão foram preparadas suspensões de mel contendo 70 g L⁻¹ de mel, 0,1 mol L⁻¹ de HNO₃ e 3% de H₂O₂.

Nos estudos de otimização do programa de aquecimento do forno de grafite e uso de modificadores químicos, nas suspensões de mel foram adicionadas 30 µg L⁻¹, ou seja, 429 ng g⁻¹ de Pb em mel. A concentração adicionada foi escolhida por estar dentro da faixa de concentração de Pb normalmente encontrada em amostras de mel. Uma alíquota da suspensão enriquecida com o analito, sem adição de modificador químico, foi utilizada e injetada diretamente no forno de grafite. Em uma segunda alíquota da suspensão de mel foi adicionado até concentração de 1,0 g L⁻¹ do modificador químico, dihidrogenofostato de amônio (NH₄H₂PO₄). Em uma terceira alíquota da suspensão de mel foi adicionado 600 mg L⁻¹ de nitrato de magnésio - Mg(NO₃)₂ e 368,3 mg L⁻¹ de paládio. Vinte microlitros de cada alíquota de suspensão de mel foram injetadas diretamente no forno de grafite e as determinações empregando GF AAS foram realizadas utilizando diferentes programas de aquecimento do forno de grafite, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Programa de aquecimento estudado na determinação de Pb em suspensões de mel por GF AAS.

Étapas	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão de Ar (L min⁻¹)	Leitura do sinal
Secagem 1	85	5	2	0,3	Não
Secagem 2	95	40	1	0,3	Não
Secagem 3	120	10	1	0,3	Não
Pirólise	400 – 800	5	6	0,3	Não
Atomização	2000 – 2200	0,9	4	0	Sim
Limpeza	2000	2	1	0,3	Não

A Figura 2 mostra um fluxograma ilustrando o procedimento utilizado na otimização.

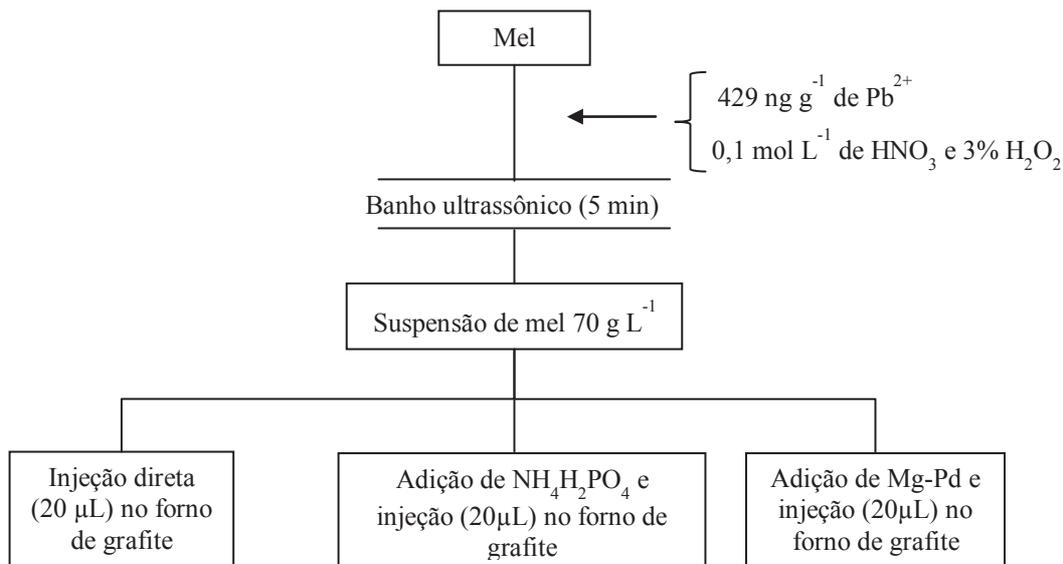


Figura 2. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado na otimização de determinação direta de Pb por GF AAS.

4.4.2.2. Cádmio

Para a determinação de cádmio em mel por GF AAS e amostragem em suspensão foram preparadas suspensões de mel contendo 70 g L^{-1} de mel, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 e 3% de H_2O_2 .

Nos estudos de otimização do programa de aquecimento do forno de grafite e uso de modificadores químicos, nas suspensões de mel foram adicionadas $1,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, ou seja, 14 ng g^{-1} de Cd em mel. A concentração adicionada foi escolhida por estar dentro da faixa de concentração de Cd normalmente encontrada em amostras de mel. Uma alíquota da suspensão enriquecida com o analito foi utilizada e injetada diretamente no forno de grafite. Em uma segunda alíquota da suspensão de mel foi adicionado até concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ do modificador químico, dihidrogenofostato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). Em uma terceira alíquota da suspensão de mel foi adicionado 600 mg L^{-1} de nitrato de magnésio - $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e $368,3 \text{ mg L}^{-1}$ de paládio. Vinte microlitros de cada alíquota de suspensão de mel foram injetadas diretamente no forno de grafite e as determinações empregando GF AAS foram realizadas utilizando diferentes programas de aquecimento do forno de grafite, conforme Tabela 2.

Tabela 2. Programa de aquecimento estudado na determinação de Cd em suspensões de mel por GF AAS.

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão de Ar (L min ⁻¹)	Leitura do sinal
Secagem 1	85	5	2	0,3	Não
Secagem 2	95	40	1	0,3	Não
Secagem 3	120	10	1	0,3	Não
Pirólise	400 – 900	5	13,2	0,3	Não
Atomização	1100 – 1800	0,8	4	0	Sim
Limpeza	1350	2	0	0,3	Não
Limpeza	1600	2	0	0,3	Não

A Figura 3 mostra um fluxograma ilustrando o procedimento utilizado na otimização.

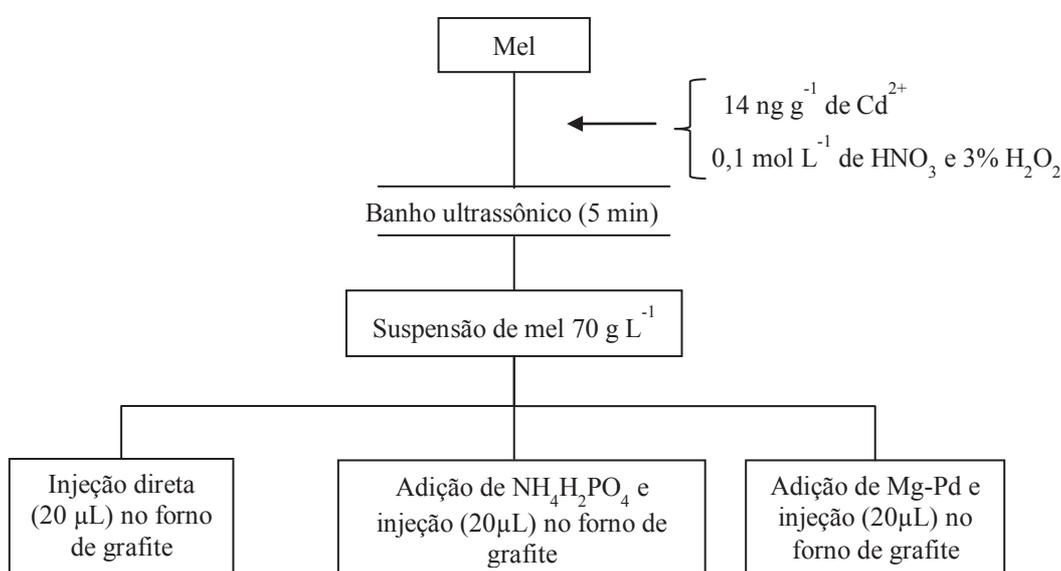


Figura 3. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado na otimização de determinação direta de Cd por GF AAS.

4.4.2.3. Cromo

Para a determinação de cromo em mel por GF AAS e amostragem em suspensão foram preparadas suspensões de mel contendo 70 g L⁻¹ de mel, 0,1 mol L⁻¹ de HNO₃. Estudos preliminares foram realizados analisando suspensões de mel por GF AAS com diferentes teores de H₂O₂, variando de 3% a 9% (m/v).

Nos estudos de otimização do programa de aquecimento do forno de grafite e uso de modificadores químicos, nas suspensões de mel foram adicionadas 8,0 µg L⁻¹, ou seja, 114 ng g⁻¹ de Cr em mel.

Uma alíquota da suspensão enriquecida com o analito foi utilizada e injetada, 20 μL , diretamente no forno de grafite. Uma segunda alíquota da suspensão de mel (20 μL) foi injetada no forno de grafite juntamente com 10 μL de uma solução de paládio (970 mg L^{-1}), empregado como modificador químico. As determinações empregando GF AAS foram realizadas utilizando diferentes programas de aquecimento do forno de grafite, conforme Tabela 3.

Tabela 3. Programa de aquecimento estudado na determinação de Cr em suspensões de mel por GF AAS.

Etapas	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão de Ar (L min^{-1})	Leitura do sinal
Secagem 1	85	5	2	0,3	Não
Secagem 2	95	40	1	0,3	Não
Secagem 3	120	10	1	0,3	Não
Pirólise	1000 – 1900	5	6	0,3	Não
Atomização	2000 – 2600	0,8	4	0	Sim
Limpeza	2200	2	1	0,3	Não

A Figura 4 mostra um fluxograma ilustrando o procedimento utilizado na otimização.

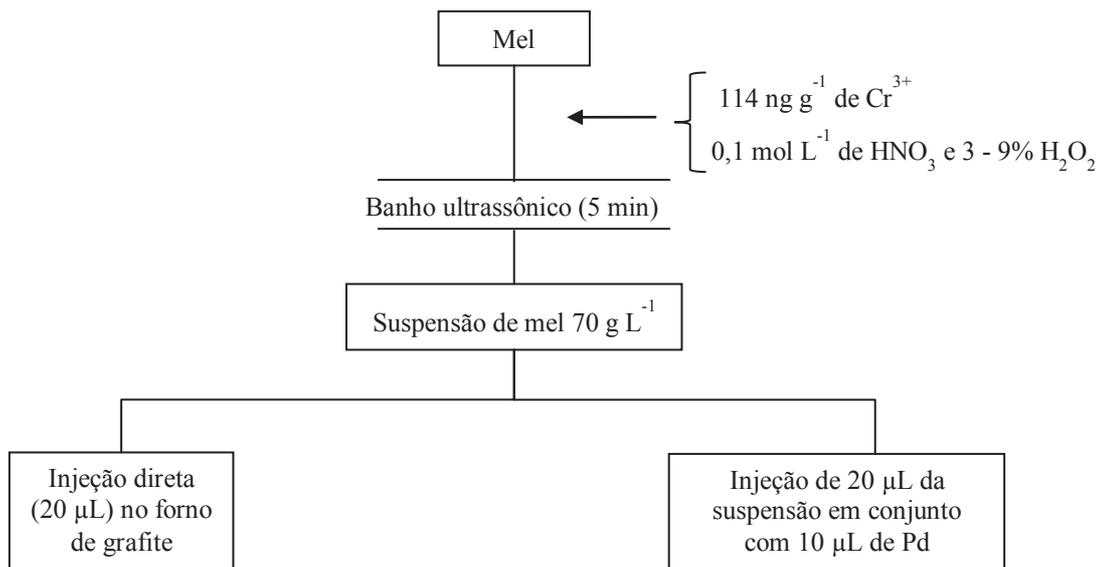


Figura 4. Fluxograma ilustrativo para o procedimento utilizado na otimização de determinação direta de Cr por GF AAS.

4.5. Avaliação do Procedimento Analítico Desenvolvido para Determinação Direta de Cd, Pb e Cr em Amostras de Mel Empregando GF AAS e Amostragem em Suspensão

O desempenho analítico da metodologia desenvolvida para determinação direta de Pb, Cd e Cr em mel por GF AAS foi avaliada e validada através de diversos testes estatísticos que incluíram formas de calibração, linearidade, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), massa característica, exatidão e precisão.

Os dados gerados na validação realizada foram analisados através de inúmeros testes estatísticos como análise de regressão linear simples e *teste t* (*t – Student*) realizados com o uso dos softwares estatísticos Minitab – versão 16.2.2 e Gnumeric – versão 1.10 (Minitab, *Minitab Incorporation, USA, 2010* e Gnumeric, *Freestatistics, 2012*).

A forma de calibração instrumental para a espectrometria de absorção atômica em forno de grafite para os analitos foi avaliada através do uso de soluções padrão de Pb^{2+} , Cr^{3+} e Cd^{2+} em duas faixas de concentração e diferentes meios, tais como solução aquosa, solução com mel (70 g L^{-1}) e solução de frutose (3 e 4 % m/v). Em uma das faixas, as concentrações dos elementos variaram entre 0 e $10\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Na outra faixa, as concentrações variaram entre 10 e $60\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$.

Os dados obtidos nas curvas analíticas obtidas em meio aquoso, e frutose e as curvas de adição de padrão foram empregados no cálculo da regressão linear por mínimos quadrados ordinários e do coeficiente de determinação (R^2) fazendo uso do software Minitab 16.2.2. O ajuste e adequação do modelo linear foram avaliados estatisticamente. Os dados de linearidade para as curvas analíticas e de adição de padrão foram validados pela análise de variância (ANOVA), característica da regressão linear, e procedimento de falta de ajuste no nível de 95% de confiança.

A capacidade de detecção e quantificação dos métodos desenvolvidos foi avaliada através dos cálculos de limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e massa característica (m_o).

LD e LQ foram calculados para os três elementos, através do desvio padrão de dez medidas consecutivas do controle analítico, também chamado de branco analítico e o coeficiente angular da curva analítica de menor concentração para cada metal. O controle analítico consistiu de uma solução aquosa contendo peróxido de hidrogênio e ácido nítrico para Pb e Cr. As concentrações de HNO_3 e H_2O_2 utilizadas foram similares às condições

otimizadas para cada elemento. Para Cd, o controle analítico consistiu de solução aquosa contendo peróxido de hidrogênio, ácido nítrico e modificador de matriz Pd-Mg.

A massa característica que se define por ser a massa do analito (em pg) que produz um sinal de absorvância integrada de 0,0044, ou 1% da absorvância (IUPAC, 1997; L'VOV *et al.*, 1986), também foi calculada para cada metal de interesse.

A precisão dos métodos desenvolvidos foi avaliada em dois níveis sendo estes, o teste de repetibilidade e o teste de precisão intermediária. Para o teste de repetibilidade, suspensões de mel foram preparadas em triplicata e no mesmo dia. As suspensões de mel foram enriquecidas com 14; 86 e 214 ng g⁻¹ para Cd, Cr e Pb, respectivamente. As amostras foram analisadas no mesmo dia de preparo das soluções para obtenção de sinais de absorvância integrada com correção do background em quadruplicata. Os dados gerados foram utilizados no cálculo da estimativa de desvio padrão relativo (% RSD).

No teste de precisão intermediária foram empregadas suspensões de mel enriquecidas com os elementos, preparadas da mesma forma que no teste de repetibilidade. Contudo, o preparo das suspensões e análises por GF AAS foram realizadas em dias diferentes, durante 4 dias consecutivos. A estimativa de desvio padrão relativo (% RSD) também foi calculada. Ainda no teste de precisão intermediária, os dados do desvio padrão relativo foram utilizados no cálculo do valor de Horrat.

A exatidão dos métodos desenvolvidos foi avaliada através de ensaios de recuperação por adição de padrão realizados com dois níveis de fortificação para cada elemento. Para tal, alíquotas da amostra de mel modelo foram enriquecidas com 71 e 214 ng g⁻¹ de Pb²⁺, 86 e 143 ng g⁻¹ de Cr³⁺ e 11 ng g⁻¹ de Cd²⁺, respectivamente. Suspensões de mel foram preparadas e as determinações de Pb, Cr e Cd foram conduzidas por GF AAS, com as condições otimizadas previamente.

As amostras foram preparadas em triplicata para cada concentração do metal adicionada. É importante destacar que antes de enriquecer as amostras com os elementos de interesse, foram realizadas quantificações dos metais, em triplicata, na amostra *in natura*, empregando GF AAS e amostragem em suspensão. Os resultados gerados também foram analisados estatisticamente através da ANOVA e *teste-t* no nível de 95% de confiança.

4.6. Aplicação do Protocolo Analítico em Amostras de Mel do Estado do Paraná, Brasil.

Com o desenvolvimento e validação das metodologias analíticas, os teores de Cr, Pb e Cd foram determinados em amostras de mel brasileiro através da GF AAS e amostragem em suspensão. As quantificações foram realizadas em duplicata para cada elemento e para cada amostra. Portanto, para a determinação de um analito, duas suspensões de mel foram preparadas e analisadas por GF AAS. E para cada suspensão, a análise foi conduzida em triplicata.

A região de estudo desse trabalho foi o Estado do Paraná, localizado na região Sul do Brasil, mostrado na Figura 5. O Paraná ocupa uma área de 199.880 Km² e possui 399 municípios (IPARDES, 2011). O estado é dividido geograficamente em 10 mesorregiões que são: Centro Sul, Sudeste, Centro Ocidental, Centro Oriental, Noroeste, Oeste, Norte Central, Norte Pioneiro, Sudoeste e Metropolitana de Curitiba. As principais atividades econômicas desse estado são a agricultura e pecuária, o extrativismo vegetal, mineração e indústria. A apicultura é uma das atividades em expansão, contudo é realizada ainda por pequenos apicultores.

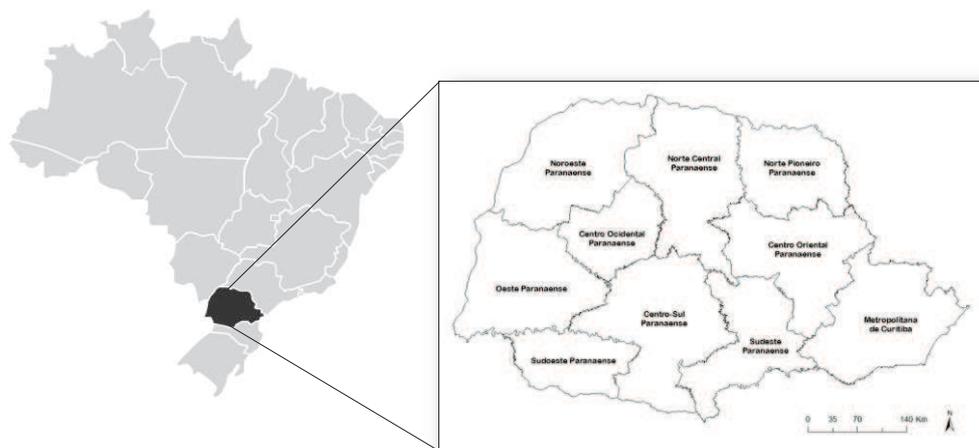


Figura 5. Figura ilustrativa do local de estudo, Estado do Paraná localizado na Região Sul do Brasil. Mapa do Paraná em destaque para a divisão geográfica em mesorregiões (<http://www.pr.gov.br> e www.mapaparacolorirvia.via12.com).

Foram adquiridas 52 amostras de mel de apicultores do Estado do Paraná no período de 2010 e 2011 e utilizadas no trabalho. Das 10 mesorregiões do estado, foram obtidas amostras de mel de 8 sendo estas: Centro Sul, Sudeste, Centro Ocidental, Noroeste, Oeste, Norte Central, Sudoeste, e Metropolitana de Curitiba. As amostras foram identificadas

numericamente e armazenadas no laboratório em frascos plásticos de polietileno com tampas e, sob temperatura ambiente (média de 20 °C). Os frascos utilizados foram previamente descontaminados e sempre mantidos envoltos em filmes plásticos (PVC) para evitar contaminação.

Na Tabela 4 são listadas as amostras e informações de localização, data de coleta, etc.

Tabela 4. Informações sobre as amostras de mel coletadas em diferentes regiões do Estado do Paraná, Brasil e empregadas na determinação direta de Pb, Cd e Cr por GF AAS.

Mesorregião	Microrregião	Município	Coleta		ID*	
			Local	Ano / Mês		
Centro-sul	Guarapuava	Campina do Simão	Rio Piquiri	2011/01	1	
		Campina do Simão		2011/11	46	
		Divisa entre Campina do Simão e Santa Maria do Oeste		2011	2	
		Candói		2011	3	
		Laranjeiras do Sul		2010	4	
		Laranjeiras do Sul		2011/01	26	
		Laranjeiras do Sul		2011/11	44	
		Guarapuava		2011	25	
		Guarapuava		2010	5	
		Guarapuava		2011	49	
		Turvo		Reserva Indígena de Marrecas	2010	8
		Pinhão		Faxinal dos Ribosinos	2010	9
		Pinhão		Faxinal dos Ribosinos	2011	48
		Cantagalo			2011	30
		Marquinho			2011	43
Nova Laranjeiras		2011	45			
Sudeste	Prudentópolis	Prudentópolis	Despraiado-Relógio	2010	6	
		Prudentópolis	Marcondes	2011	15	
		Prudentópolis	Linha Brasília	2011	16	
		Divisa Guamiranga e Prudentópolis		2011/01	10	
		Divisa Guamiranga e Prudentópolis		2011/02	13	
		Divisa Guamiranga e Prudentópolis		2011/03	14	
	União da Vitória	Prudentópolis	Barra Grande	2011	17	
		Prudentópolis	Barra Mansa	2011	18	
		Prudentópolis	Esperança	2011	19	
		Cruz Machado		2010	11	
Oeste	Toledo	Cruz Machado		2011	7	
		Bituruna		2011	34	
		Terra Roxa		2011	22	
		Entre Rios do Oeste		2011	24	
		Santa Helena		2011	27	
	Cascavel	Quatro Pontes		2011	28	
		Mercedes		2011	31	
		Toledo		2011	33	
		Nova Santa Rosa		2011	38	
		Palotina		2011	41	
Foz do Iguaçu	Cascavel		2011	23		
	Guaraniaçu		2011	40		
	Missal		2011	29		
	Céu Azul		2011	32		
Norte Central	Londrina	Foz do Iguaçu		2011	52	
		Rolândia		2011	35	
	Maringá	Londrina		2011	37	
		Maringá		2011	36	
		Ivaiporã		2010	12	
Noroeste	Umuarama	Ivaiporã		2011	47	
		Pérola		2011	21	
Metropolitana	Curitiba	Altônia		2011	39	
		Curitiba		2011	50	
Centro Ocidental	Goioerê	Paranaguá		2011	51	
		Quarto Centenário		2011	20	
Sudoeste	Capanema	Realeza		2011	42	

*ID: identificação

A Figura 6 mostra a localização das amostras nas mesorregiões do Estado do Paraná, bem como nos municípios de origem.

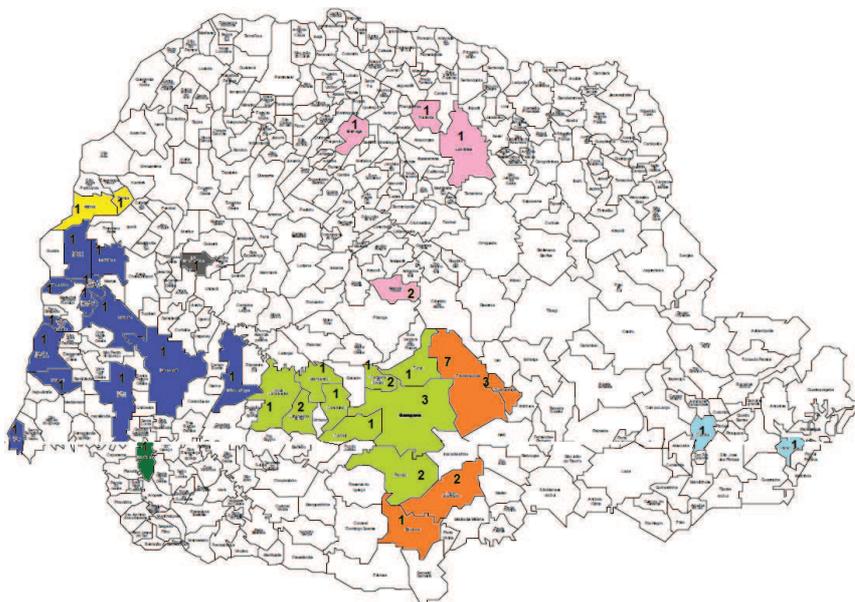


Figura 6. Mapa do Estado do Paraná que indica a localização das amostras de mel utilizadas no trabalho e número de amostras por município (www.mapaparacolorirvia.via12.com). Mesorregiões onde foram obtidas as amostras de mel: ● Sudeste; ● Centro Sul; ● Oeste; ● Norte Central; ● Noroeste; ● Metropolitana; ● Centro Ocidental; ● Sudoeste.

Os dados obtidos para concentração de Pb, Cd e Cr nas amostras de mel foram avaliados com auxílio de ferramentas quimiométricas a fim de melhor relacionar as amostras com os teores de metais encontrados e assim, poder classificar essas amostras, dentro do conjunto total, de acordo com a origem geográfica. Para tal, a Análise de Componentes Principais, do inglês *Principal Components Analysis* (PCA) foi empregada na análise dos dados, sendo que para isto foi utilizado o software Minitab.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo da Forma de Preparo das Suspensões de Mel

O objetivo do trabalho foi estabelecer um procedimento simples, direto, sem a necessidade de qualquer procedimento de pré-tratamento no preparo de amostras de mel para determinação de metais por GF AAS. Assim, optou-se por empregar amostragem em suspensão aliada a GF AAS. A forma de preparo das suspensões de mel deve garantir a representatividade das amostras, ou seja, as suspensões devem ser homogêneas e estáveis. Portanto, neste trabalho, utilizou-se agitação ultrassônica para garantir uma homogeneização das suspensões após o preparo das mesmas. A sonicação envolve a extração das espécies químicas de interesse em diversos tipos de matrizes e amostras, uma vez que o processo de cavitação (geração de microbolhas de gás no interior de uma solução) gera altas temperaturas pela ação mecânica entre partículas sólidas e líquidas, facilitando processos como a dissociação, fusão e lixiviação (MENDES *et al.*, 2006; PAES, 2007). Na determinação de metais por GF AAS aliada à amostragem em suspensão, esse tipo de procedimento vem ganhando destaque por facilitar a homogeneização da suspensão e auxiliar a extração dos metais de interesse do meio sólido para o líquido (PAES, 2007; SARDANS *et al.*, 2010).

Testes preliminares foram conduzidos para encontrar um meio apropriado no preparo de suspensões de mel para introdução direta no forno de grafite. Dois procedimentos foram investigados, (i) amostra de mel (modelo) foi dispersa em solução aquosa contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 e 3-9% de H_2O_2 ; e (ii) amostra modelo foi dispersa em solução aquosa contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 e 3-9% de H_2O_2 e foi adicionado um surfactante não-iônico, Triton X-100.

A injeção direta de suspensões de amostras de interesse no atomizador eletrotérmico é viável para análise por GF AAS devido ao uso de um programa de aquecimento que permite um pré-tratamento térmico da amostra, removendo parte dos concomitantes que podem provocar interferências nas medidas.

O uso de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio tem como finalidade promover a mineralização da amostra, ou seja, a destruição da matriz orgânica, durante a etapa de pirólise do programa de aquecimento do forno de grafite. Assim, o uso desses reagentes contribui na minimização dos efeitos de matriz no momento da análise e, evita a formação de resíduos carbonáceos no atomizador (VIÑAS *et al.*, 1997; QUINÁIA e NÓBREGA, 1999; GARCÍA *et*

al., 2005b). O uso de um surfactante não iônico em suspensões de mel tem como função diminuir a viscosidade da amostra, aumentar a estabilidade das suspensões, favorecendo assim a sua injeção no atomizador (GARCÍA *et al.*, 2003; GARCÍA *et al.*, 2005a; 2005b).

As suspensões foram preparadas com 30 a 100 g L⁻¹ de mel, sob diferentes condições de preparo, conforme já descrito. Nas soluções resultantes após a solubilização e homogeneização foram avaliados aspectos como coloração, viscosidade e facilidade de pipetagem. As suspensões de mel foram testadas com o uso de micropipetas e os volumes utilizados foram 10 e 100 µL, simulando a condição de injeção das suspensões de mel no tubo de grafite pirolítico, através de um capilar. A Figura 7 apresenta as suspensões utilizadas neste estudo de diluição.



Figura 7. Foto que ilustra o estudo realizado para otimizar a forma de preparo de suspensões de mel. Frascos numerados de 1 a 4 para indicar as diferentes concentrações de 30, 50, 70 e 100 g L⁻¹ para as amostras de mel, respectivamente. As soluções continham HNO₃ e H₂O₂ e a solução do frasco 4 continha também Triton X-100.

Em todos os casos, suspensões claras, homogêneas e estáveis foram obtidas. De modo geral, foi observado que suspensões de mel com concentração na faixa de 30 a 70 g L⁻¹, na presença de HNO₃ e H₂O₂ e sem surfactante, apresentavam uma viscosidade adequada para injeção direta no tubo de grafite (10 a 100 µL). Para as suspensões mais concentradas, acima de 70 g L⁻¹ a 100 g L⁻¹ de mel, o uso do Triton X-100 torna-se necessário para minimizar a viscosidade e permitir uma pipetagem correta, e com maior reprodutibilidade.

O uso de soluções mais concentradas de mel na determinação direta de metais por GF AAS apresenta vantagem de aumentar a sensibilidade, porém tem desvantagens tais como a maior chance de ocorrer resíduos carbonáceos no atomizador, a necessidade do uso de mais um reagente que aumenta o risco de contaminação e eleva o custo da análise. Além disso, normalmente é recomendado o uso do surfactante na limpeza do capilar de injeção do amostrador automático do espectrômetro de absorção atômica (GARCÍA *et al.*, 2003; GARCÍA *et al.*, 2005a, 2005b).

Neste trabalho, a condição de preparo das suspensões de mel foi escolhida com base no baixo custo, facilidade de preparo e minimização dos riscos de contaminação e adulteração das amostras. Portanto, suspensões de mel consistiram de soluções aquosas contendo 70 g L^{-1} de mel, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 e 3% de H_2O_2 .

Alguns trabalhos descritos na literatura sobre a determinação direta de metais em amostras de mel por GF AAS descrevem o uso de amostras de mel diluídas ($20\text{-}100 \text{ g L}^{-1}$) em água, HNO_3 , H_2O_2 e Triton X-100. Em todos os trabalhos os autores utilizaram tubos de grafite com plataforma L'vov para aumentar sensibilidade e minimizar o efeito de matriz (GARCÍA *et al.*, 2003; GARCÍA *et al.*, 2005a).

Com a definição do modo de preparo das suspensões de mel, estudos foram conduzidos para a otimização das condições instrumentais aplicadas na determinação de Pb, Cr e Cd em suspensões de mel utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. Além disso, também foi avaliada a influencia de alguns modificadores químicos tais como Pd, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ nas medidas por GF AAS.

5.2. Desenvolvimento e Otimização do Procedimento Analítico Empregado na Determinação Direta de Pb, Cd, e Cr em Amostras de Mel Empregando GF AAS

Para a implantação da metodologia analítica, estudos foram realizados visando otimizar os programas de aquecimento do forno de grafite e avaliar a necessidade do uso de modificadores de matriz.

Na GF AAS é utilizado um programa de aquecimento do forno de grafite que consiste de quatro etapas: secagem, pirólise ou calcinação, atomização e limpeza. As temperaturas utilizadas em cada etapa dependem do analito a ser determinado e também da matriz. Dessa forma, torna-se necessário estabelecer qual temperatura é a mais adequada nas etapas. Tal otimização é importante para obtenção de um procedimento analítico mais sensível, com valores mais elevados de absorbância e sinais de fundo/background (BG) menos intensos.

Neste trabalho, o estudo dos programas de aquecimento empregados na determinação de Cd, Pb e Cr foi realizado individualmente para cada elemento e de modo univariado. Assim, primeiramente a temperatura de atomização foi mantida fixa e variou-se a temperatura de pirólise, obtendo-se curvas de pirólise para cada elemento. Em seguida, fixou-se a temperatura de pirólise, considerada mais adequada, e realizou-se a variação da temperatura de atomização.

A influência de modificadores de matriz no programa de aquecimento do forno de grafite também foi estudada. O modificador de matriz ou também chamado de modificador químico é uma substância ou uma mistura de reagentes que são adicionados à amostra com diferentes funções: (a) reduzir a perda do analito durante a etapa de pirólise, estabilizando-o em altas temperaturas; (b) tornar a matriz mais volátil, aumentando a volatilidade dos concomitantes; (c) aumentar o tempo de vida da superfície de atomização (DOS ANJOS, 2006).

5.2.1. Chumbo

A determinação de chumbo por absorção atômica em forno de grafite geralmente utiliza temperatura de pirólise e atomização de 400 °C e 2100 °C, respectivamente. Além disso, geralmente são utilizados modificadores de matriz H_3PO_4 , $NH_4H_2PO_4$, EDTA, citrato, oxalato e solução de Pd, dado que é um elemento volátil (AGILENT TECHNOLOGIES, 2010). Neste trabalho, foi realizada a otimização do programa de aquecimento do forno de grafite utilizado na determinação direta de chumbo em mel empregando GF AAS. Inicialmente, foi avaliada a temperatura de pirólise ($T_{pirólise}$) que variou entre 400 a 800 °C para a suspensão de mel com temperatura de atomização ($T_{atomização}$) fixa em 2100 °C. A curva de pirólise obtida para chumbo está mostrada na Figura 8.

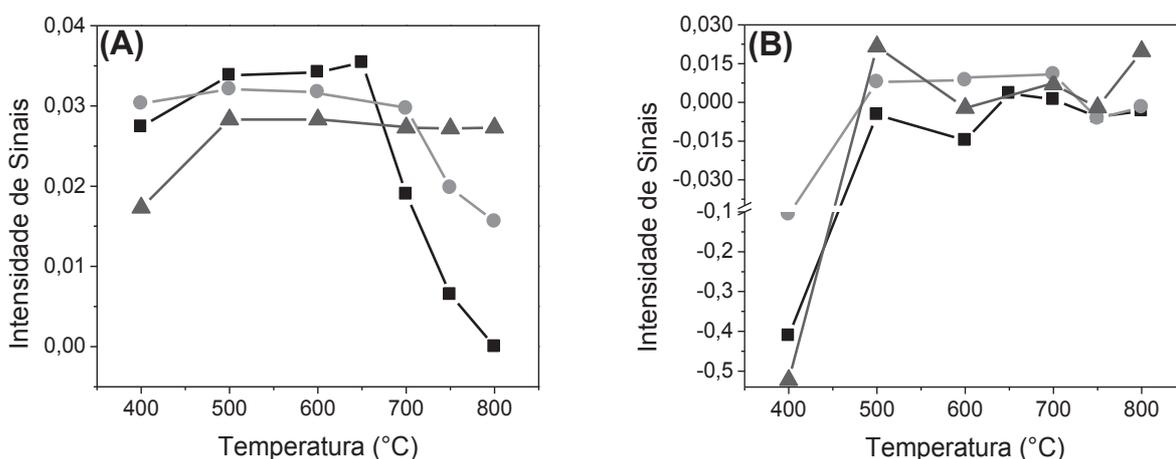


Figura 8. Otimização da temperatura de pirólise usada na determinação direta de Pb em mel empregando GF AAS e amostragem em suspensão e estudo da influência de modificadores de matriz. (A) Sinais de absorbância referentes à área do pico de Pb e; (B) Sinais de fundo, background (BG). Suspensão de mel enriquecida com Pb^{2+} com ausência de modificador químico (■), na presença de $1,0\text{ g L}^{-1}$ de $NH_4H_2PO_4$ (●), e na presença de uma mistura de 600 mg L^{-1} e $368,3\text{ mg L}^{-1}$ de Pd e $Mg(NO_3)_2$, respectivamente (▲). $T_{atomização}$ fixa em 2100 °C.

A Figura 8 mostra a relação da absorvância integrada em função da temperatura de pirólise empregada na determinação de Pb por GF AAS e amostragem em suspensão de mel na presença e ausência de modificadores químicos.

A Figura 8A mostra os sinais de absorvância obtidos para curva de pirólise do Pb para diferentes suspensões de mel. Nota-se um comportamento do Pb diferenciado em função do tipo de suspensão.

Para solução de mel sem modificador químico, os sinais de absorvância (área de pico) foram constantes e de intensidade elevada quando a temperatura de calcinação variou entre 500 e 650 °C. Acima de 650 °C nota-se uma queda do sinal de absorvância para essa amostra, indicando perda de chumbo por volatilidade.

Para as amostras diluídas de mel contendo modificadores de matriz ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e $\text{Pd/Mg}(\text{NO}_3)_2$), observa-se que os sinais de absorvância (Fig. 8A) foram um pouco inferiores à suspensão sem modificador. Para a suspensão de mel com dihidrogenofosfato de amônio as áreas de pico foram constantes para temperatura de pirólise entre 500-700 °C. Acima desta temperatura, o Pb foi totalmente volatilizado. Para a suspensão de mel com a mistura de Pd-Mg utilizada como modificador universal nota-se uma maior estabilidade do sinal de absorvância (com um patamar de temperatura) para a faixa entre 500 e 800°C para $T_{\text{pirólise}}$. Esse comportamento é esperado, pois os modificadores químicos agem na minimização da perda de metais devido a temperaturas elevadas de pirólise (GARCÍA *et al.*, 2005a). Portanto, neste caso, o uso de modificadores possibilita utilizar temperaturas mais elevadas para pirólise sem perda do analito, 700 °C e 800 °C para $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e $\text{Pd/Mg}(\text{NO}_3)_2$, respectivamente. Contudo, o uso de modificadores tem a desvantagem de elevar o custo da análise, pois geralmente estes tem alto custo, além de aumentar a chance de contaminação, devido a adição de mais reagente na amostra.

De modo geral, sinais mais elevados de absorvância foram obtidos com suspensões de mel sem adição de modificador químico. As medidas podem ser realizadas com $T_{\text{pirólise}}$ de 500 – 650°C sem perda do Pb, provavelmente devido a presença de alguns cátions majoritários presentes na amostra do mel, como por exemplo, Mg^{2+} , K^+ , Na^+ que agem como modificadores naturais de matriz, e contribuem na estabilização térmica do elemento mesmo com o uso de temperaturas de pirólise mais elevadas.

Além da avaliação dos sinais de absorbância obtidas nas curvas de pirólise é necessário também observar os sinais de fundo obtidos no estudo da pirólise das suspensões de mel por GF AAS, conforme mostra Figura 8B.

Os sinais de fundo obtidos na determinação de Pb podem ser considerados baixos, apesar da introdução direta de uma matriz bastante complexa como o mel no atomizador eletrotérmico. Sinais de BG podem ser devidos a resíduos carbonáceos/interferentes de matriz presentes no tubo de grafite, que podem absorver ou espalhar a radiação durante as medidas.

Os sinais baixos de BG podem indicar que ocorreu uma eliminação completa da matriz orgânica e ausência de resíduos carbonáceos dentro do atomizador. Portanto, a adição de agentes oxidantes como ácido nítrico e peróxido de hidrogênio na suspensão juntamente com a temperatura adequada de pirólise possibilitou a eliminação completa de concomitantes.

Comparando os sinais de ruído entre a suspensão de mel sem modificador com as suspensões com modificadores, nota-se que a intensidade do BG (Figura 8B), para ambos os modificadores, ficou em média mais elevada. Esse comportamento pode implicar em limites de detecção mais elevados para a determinação do Pb com o uso dos modificadores, uma vez que o limite de detecção depende fortemente do nível e das flutuações do ruído, no caso do BG.

Portanto, a condição escolhida para a determinação direta de Pb por GF AAS foi o uso de suspensão sem modificador com temperatura de pirólise de 650 °C. Essa condição foi escolhida devido a simplicidade, sensibilidade, menor custo, baixo sinal do ruído e por ser uma condição menos drástica de temperatura que minimiza a deterioração do atomizador. Tendo-se encontrado a temperatura de pirólise mais adequada, esta foi fixada e curvas de atomização de Pb foram obtidas, cujos resultados estão apresentados na Figura 9.

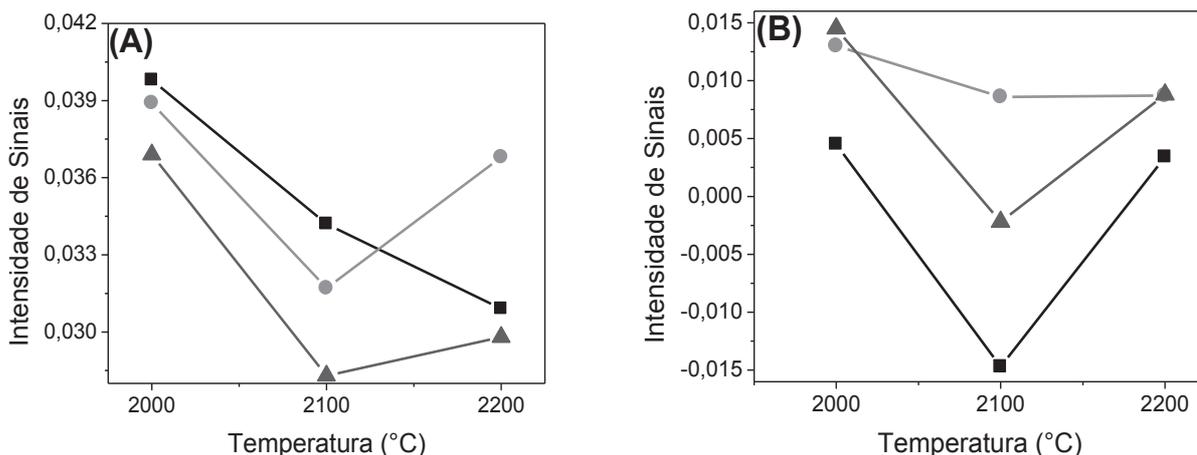


Figura 9. Otimização da temperatura de atomização usada na determinação direta de Pb em mel empregando GF AAS e amostragem em suspensão. (A) Sinais de absorvância referentes à área do pico de Pb e (B) Sinais de fundo, background (BG). Diferentes suspensões de mel enriquecidas com Pb²⁺ foram utilizadas: (i) na ausência de modificador (■); (ii) na presença de NH₄H₂PO₄ (●); e (iii) e na presença de uma mistura de Pd e Mg(NO₃)₂ (▲). T_{pirólise} fixa em 650 °C.

Com relação à otimização da temperatura de atomização para Pb (Figura 9) é possível observar comportamentos similares entre as diferentes suspensões de mel.

Na Figura 9A, que mostra os sinais de área de pico de Pb para a curva de atomização, observa-se sinais elevados em temperatura de 2000°C para as três suspensões de mel. Além disso, nota-se que sinais mais elevados foram obtidos com a suspensão de mel sem adição de modificador químico. Este resultado foi similar ao observado na curva de pirólise. Com relação aos sinais de BG obtidas no estudo da otimização da temperatura de atomização, Figura 9B, observa-se que os sinais foram inferiores ao sinal de absorvância e podem ser considerados adequados. Sinais de BG foram de modo geral inferiores para a suspensão sem modificador químico. Em função dos aspectos descritos, a condição escolhida para ser utilizada como temperatura de atomização nas determinações diretas de Pb por GF AAS em suspensões de mel foi 2000°C, o qual garante uma vida útil mais elevada, por ser a menor temperatura estudada para Pb.

Resumidamente, escolheu-se realizar as quantificações diretas de Pb empregando GF AAS e as suspensões de mel sem a presença de modificadores de matriz e utilizando 650 °C e 2000 °C como temperaturas de pirólise e atomização, respectivamente. Os perfis de atomização obtidos para chumbo empregando GF AAS e amostragem em suspensão para amostras de mel em diferentes condições do programa de aquecimento do forno estão apresentados na Figura 10.

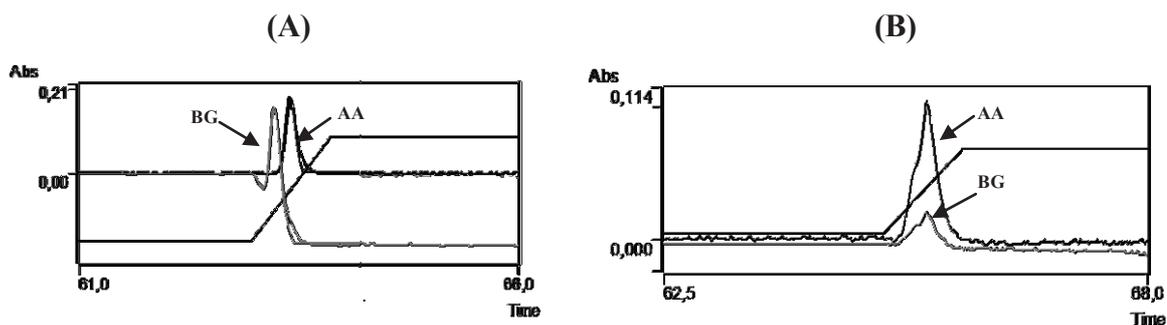


Figura 10. Perfis de atomização para Pb na análise de suspensões de mel sem modificador químico por GF AAS, empregando diferentes programas de aquecimento do forno de grafite. (A) Condição inicial de trabalho com $T_{\text{pirólise}}$ de 400 °C e $T_{\text{atomização}}$ de 2100 °C; (B) Condição otimizada de trabalho com $T_{\text{pirólise}}$ de 650 °C e $T_{\text{atomização}}$ de 2000 °C. Sinais atômicos (AA) e sinais de background (BG) estão representados nas cores em negro e cinza, respectivamente. Nas figuras são apresentadas também as rampas de aquecimento.

Na Figura 10 é possível observar diferenças nos perfis de otimização obtidas para Pb em suspensões de mel em diferentes condições de pirólise e atomização. Na Figura 10A nota-se que o sinal de fundo (BG) é bastante elevado, similar a intensidade de atomização (AA). Além disso, observa-se uma pequena separação temporal entre o sinal de atomização e o BG. Portanto, na condição inicial de trabalho (condição sugerida pelo fabricante) percebe-se que o sinal BG pode interferir na análise da suspensão do mel e a intensidade de absorbância (área de pico integrada e corrigida em relação ao BG) é baixa, indicando a necessidade de otimizar as condições de trabalho a fim de eliminar a matriz orgânica e minimizar o sinal de fundo. A Figura 10B mostra o perfil de atomização do Pb em uma condição otimizada para temperatura de pirólise e atomização. Neste caso, é evidente que a utilização de temperatura mais elevada na pirólise minimizou o sinal de BG, tornando-o pouco significativo, indicando a adequada eliminação da matriz orgânica na etapa de pirólise. Como pode ser também observado na Figura 10 B, a otimização das condições do forno aumentou a sensibilidade analítica, pois intensidades de absorbância puderam ser aumentadas cerca de duas vezes sem perdas do analito.

Portanto, as determinações diretas do Pb em suspensões de mel sem modificador por GF AAS podem ser realizadas sem perda do analito, ausência de sinais de interferência, com maior sensibilidade, menor custo e com maior rapidez devido a facilidade de preparo das suspensões.

Comparando os resultados obtidos nesse trabalho com a literatura notam-se diferenças. As diferenças podem estar relacionadas com as diferentes superfícies de atomização utilizadas e também com as diversidades dos méis que são utilizados. Por exemplo, García *et al.* (2005a)

determinaram Pb de modo direto em amostras de mel da Galícia na Espanha empregando GF AAS e plataforma L'vov como superfície de atomização. Os autores descrevem o uso de amostras de mel diluídas em meio de HNO₃, H₂O₂, Triton X-100 e o uso de modificadores de matriz. As temperaturas de pirólise otimizadas foram 700 °C e 950° C com o uso de NH₄H₂PO₄ e Pd/Mg(NO₃)₂, respectivamente. Para temperatura de atomização, nessas mesmas condições, eles obtiveram 1300 e 1850 °C, para ambos modificadores. Viñas *et al.* (1997) discutiram o procedimento analítico desenvolvido para a determinação direta de Pb, Cd, Zn e Cu em méis comerciais de Murcia, na Espanha, utilizando GF AAS e tubos de grafite pirolítico com plataforma de L'vov. Suspensões de mel foram utilizadas contendo HNO₃, H₂O₂ e NH₄H₂PO₄ (modificador de matriz). Os autores otimizaram o programa de aquecimento do forno de grafite e descrevem como temperaturas ótimas 1200 °C e 1800 °C, para pirólise e atomização, respectivamente. Dessa forma, as condições otimizadas neste trabalho apresentam vantagens em relação aos trabalhos descritos na literatura, pois a utilização de tubo de grafite pirolítico, sem adição de modificadores químicos, minimiza os custos de análise, aumentando a vida útil da superfície de atomização, cujo custo é mais baixo que a plataforma de L'vov.

5.2.2. Cádmió

A determinação de cádmio por absorção atômica em forno de grafite geralmente utiliza temperatura de pirólise e atomização de 250 °C e 1800 °C, respectivamente. Além disso, geralmente são utilizados modificadores de matriz H₃PO₄, NH₄H₂PO₄ e Pd, dado que é um elemento volátil (AGILENT TECHNOLOGIES, 2010). Neste trabalho, foi realizado a otimização do programa de aquecimento do forno de grafite utilizado na determinação direta de cádmio em mel empregando GF AAS. Os testes foram similares aos realizados para o chumbo. A curva de pirólise obtida para cádmio está mostrada na Figura 11.

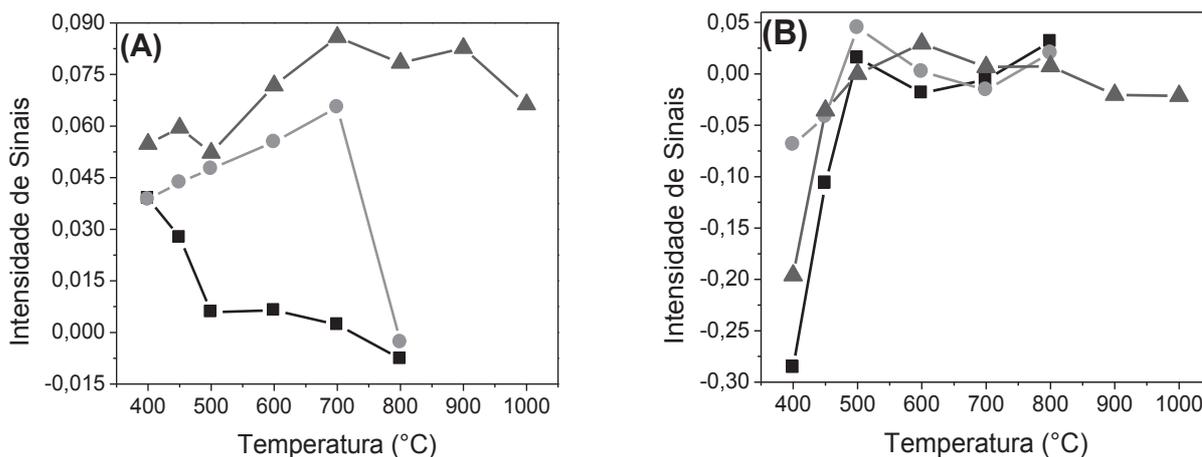


Figura 11. Otimização da temperatura de pirólise usada na determinação direta de Cd em mel empregando GF AAS e amostragem em suspensão e estudo da influência de modificadores de matriz. **(A)** Sinais de absorvância referentes à área do pico de Cd e; **(B)** Sinais de fundo, background (BG). Suspensão de mel enriquecida com Cd²⁺ com ausência de modificador químico (■), na presença de 1,0 g L⁻¹ de NH₄H₂PO₄ (●), e na presença de uma mistura de 600 mg L⁻¹ e 368,3 mg L⁻¹ de Pd e Mg(NO₃)₂, respectivamente (▲). T_{atomização} fixa em 1800 °C.

Na Figura 11 é possível observar um comportamento particular para cada suspensão de mel analisada. Com relação à análise da suspensão de mel sem adição de modificadores químicos, os sinais de absorvância (Figura 11A) indicam que se pode alcançar uma temperatura máxima de pirólise de 450 °C sem perdas de Cd por volatilidade. Acima dessa temperatura o Cd foi totalmente volatilizado para esta suspensão de mel.

Para as suspensões de mel contendo os modificadores de matriz, NH₄H₂PO₄ e Pd/Mg(NO₃)₂, observa-se que os sinais de absorvância (Figura 11A) foram mais elevados se comparado a suspensão sem qualquer modificador. Utilizando NH₄H₂PO₄ como modificador é possível alcançar uma temperatura de pirólise de 700 °C. Com a utilização da mistura de modificadores, Pd-Mg, é possível alcançar um patamar estável de temperaturas entre 700-900 °C sem perda do analito. Esse comportamento é esperado, pois os modificadores químicos agem na minimização da perda de metais por volatilidade. Portanto, neste caso o uso de modificadores, principalmente a mistura de Pd-Mg, possibilita utilizar temperaturas mais elevadas para pirólise sem perda do analito. Em relação as três suspensões analisadas, comparando os resultados de absorvância, nota-se sinais mais elevados com o uso de Pd/Mg(NO₃)₂ como modificador de matriz.

Além da avaliação dos sinais de absorvância obtidas nas curvas de pirólise, devem ser avaliados os sinais de fundo obtidos para as mesmas curvas das suspensões de mel por GF AAS, conforme mostra Figura 11B.

Os sinais de fundo obtidos na determinação de Cd não foram tão baixos quando se utilizou temperaturas de pirólise menores para as três suspensões. O sinal de BG para a solução de mel sem modificador químico foi elevada, quando não ocorreu perda de Cd. Com relação aos sinais de fundo (Figura 11B) para ambos as suspensões com modificadores, observa-se uma similaridade. Para estas suspensões foram notados sinais muito baixos quando se utilizou temperaturas adequadas para pirólise. Essas temperaturas aliadas à adição de agentes oxidantes como ácido nítrico e peróxido de hidrogênio na suspensão de mel garantiram a completa eliminação da matriz orgânica do mel, e conseqüentemente uma baixa interferência dessa matriz.

Comparando os sinais de ruído entre a suspensão de mel sem modificador com as suspensões com modificadores, nota-se que a intensidade do BG (Figura 11B), para ambos os modificadores ficou em média menos elevada.

Portanto, a condição escolhida para a determinação direta de Cd por GF AAS foi o uso de suspensão de mel com a mistura de Pd/Mg(NO₃)₂ como modificador de matriz e temperatura de pirólise de 900 °C. Essa condição foi escolhida devido à sensibilidade, baixo sinal ruído e por ser uma condição que garante eliminação completa da matriz orgânica do mel. Tendo-se encontrado a temperatura de pirólise mais adequada, esta foi fixada e curvas de atomização de Cd foram obtidas, cujos resultados estão apresentados na Figura 12.

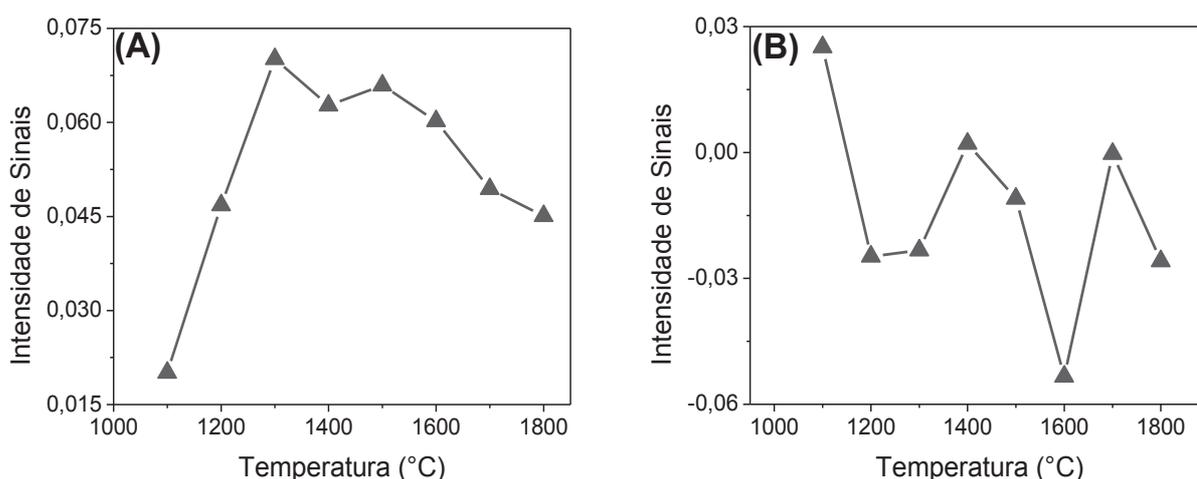


Figura 12. Otimização da temperatura de atomização usada na determinação direta de Cd em mel empregando GF AAS e amostragem em suspensão. (A) Sinais de absorvância referentes à área do pico de Cd e (B) Sinais de fundo, background (BG). Suspensão de mel enriquecida com Cd²⁺ na presença de uma mistura de Pd e Mg(NO₃)₂ (▲). T_{pirólise} fixa em 900 °C.

Como a temperatura de pirólise para Cd foi mais significativa para a suspensão de mel contendo Pd-Mg(NO₃)₂, avaliou-se a variação da temperatura de atomização somente para essa suspensão. Na Figura 12A é possível observar que há um máximo de absorbância em 1300°C. Contudo, os sinais de absorbância apresentam uma estabilidade entre uma faixa de temperatura de 1400 a 1600 °C, próximos ao sinal obtido em 1300 °C. Portanto, a escolha da melhor condição de atomização foi 1350 °C, a fim de garantir a total atomização do cádmio durante a medida. Além disso, por ser uma temperatura menor do que a indicada pelo fabricante (1800 °C) representa uma economia da superfície de atomização a cada medida.

Avaliando-se os sinais de BG para o estudo da temperatura de atomização (Figura 12B), os valores obtidos foram bem menores que os valores de absorbância, inclusive na melhor temperatura de atomização obtida, o que é considerado adequado, demonstrando a eficiência na eliminação da matriz durante a pirólise e ausência de resíduos carbonáceos no tubo de grafite.

Portanto, devido aos aspectos aqui apresentados, escolheu-se trabalhar com as suspensões de mel com modificador de matriz Pd-Mg(NO₃)₂ e com temperaturas de pirólise e atomização de 900 °C e 1350 °C, respectivamente.

Os perfis de atomização obtidos para cádmio empregando GF AAS e amostragem em suspensão para amostras de mel em diferentes condições do programa de aquecimento do forno estão apresentados na Figura 13.

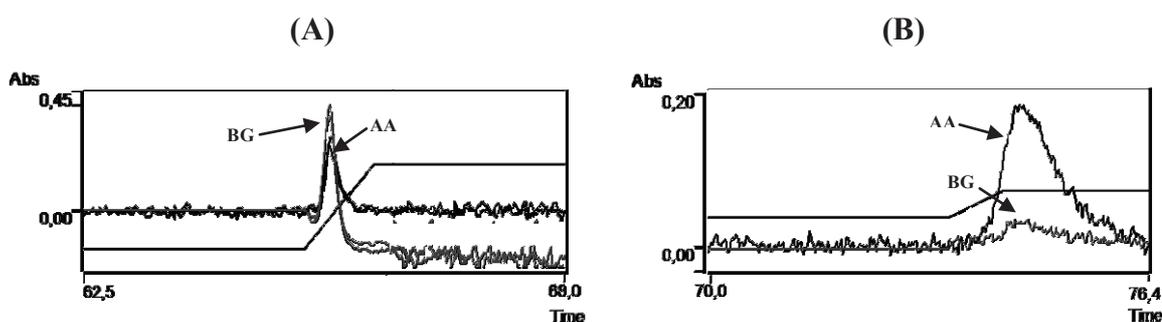


Figura 13. Perfis de atomização para Cd na análise de suspensões de mel com modificador químico Pd-Mg por GF AAS, empregando diferentes programas de aquecimento do forno de grafite. (A) Condição inicial de trabalho com T_{pirólise} de 400 °C e T_{atomização} de 1800 °C; (B) Condição otimizada de trabalho com T_{pirólise} de 900 °C e T_{atomização} de 1350 °C. Sinais atômicos (AA) e sinais de background (BG) estão representados nas cores em negro e cinza, respectivamente. Nas figuras são apresentadas também as rampas de aquecimento.

De acordo com a Figura 13, é possível observar que o programa de aquecimento do forno influenciou nos perfis de atomização para o Cd. Na Figura 13A nota-se que o sinal de fundo (BG) é superior ao sinal de absorção atômica (AA) quando foram utilizadas as

condições sugeridas pelo fabricante. Esse comportamento impossibilita realizar determinações de Cd e indica que a matriz influenciou no sinal do analito, provavelmente devido a sua eliminação incompleta durante a pirólise. A Figura 13B mostra o perfil de atomização do Cd na condição otimizada e nota-se que o sinal de BG foi bastante inferior ao sinal de absorção atômica, o que indica que a matriz do mel pode ser eliminada com eficácia. Além disso, nota-se que houve um aumento da sensibilidade, pois a área do pico na condição otimizada foi bem maior do que na condição apresentada pelo fabricante. Portanto, a otimização das condições para determinação direta de Cd em mel são adequadas e permitem que não haja interferência da matriz nas medidas.

Comparando os resultados obtidos nesse trabalho com a literatura podem ser observadas algumas diferenças. Por exemplo, García *et al.* (2003), propuseram a determinação direta de Cd em méis da Galícia na Espanha, e definiram como temperaturas ótimas para pirólise e atomização valores de 650 °C e 1500° C, respectivamente. Vale ressaltar que as condições apresentadas no presente trabalho são as mesmas apresentadas por García e colaboradores, com a diferença de que eles utilizaram em seu trabalho plataforma de L'vov como superfície de atomização. Viñas *et al.* (1997) também desenvolveram um método analítico para a determinação direta de Pb, Cd, Zn e Cu, em méis comerciais de Murcia, na Espanha. Os autores conseguiram temperaturas de calcinação de 650 °C e de atomização de 1600 °C, utilizando NH₄H₂PO₄ como modificador e plataforma de L'vov como superfície de atomização. Isso indica que neste trabalho, em relação à literatura, as temperaturas de pirólise foram mais elevadas e de atomização foram inferiores, o que proporciona uma melhor eliminação da matriz na etapa de pirólise, sem perdas de Cd na etapa de atomização. Isso possibilita realizar medidas de baixo custo, sem a necessidade de usar tubo de grafite com plataforma de L'vov.

5.2.3. Cromo

No desenvolvimento do procedimento a ser utilizado na determinação direta de cromo em amostras de mel empregando GF AAS, a proposta inicial foi utilizar condições similares no preparo das suspensões de mel para sua injeção no forno de grafite. Contudo, é conhecido que o cromo apresenta um caráter refratário e pode formar carbetos entre o elemento e o material da superfície de atomização, o que pode influenciar a atomização do elemento em amostras complexas, a exemplo de amostras com elevado teor de açúcar. Assim, a presença

de agentes oxidantes como peróxido de hidrogênio pode influenciar na determinação de cromo por GF AAS (QUINÁIA e NÓBREGA, 1999; GARCÍA *et al.*, 2005b; DOBROWOLSKI *et al.*, 2012). Portanto, neste trabalho avaliou-se a porcentagem de peróxido de hidrogênio a ser empregada no preparo das suspensões de mel para análise de Cr por GF AAS. Suspensões de mel utilizadas com o padrão foram preparadas de formas distintas: (i) Suspensão com 70 g L⁻¹ de mel na presença de 8 µg L⁻¹ de Cr³⁺, 0,1 mol L⁻¹ de HNO₃ e 3% de H₂O₂; (ii) Suspensão com 70 g L⁻¹ de mel na presença de 8 µg L⁻¹ de Cr³⁺, 0,1 mol L⁻¹ de HNO₃ e 9% de H₂O₂. As suspensões foram injetadas (20 µL) no forno de grafite e realizaram-se as medidas, com o programa de aquecimento indicado pelo fabricante (T_{atomização}: 2600 °C, T_{pirólise}: 1000 °C). Os sinais médios de absorvância e BG obtidos, em triplicata, nessas medidas estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados obtidos na determinação direta de Cr por GF AAS em suspensões de mel enriquecidas com cromo e contendo diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio.

H ₂ O ₂ (%)	Sinais Médios	
	Absorvância	Background (BG)
3	0,0392 ± 0,0016	0,0183 ± 0,0270
9	0,1143 ± 0,0052	0,0449 ± 0,0081

Na Tabela 5 observa-se que a concentração de peróxido de hidrogênio influencia nos sinais obtidos na determinação direta de cromo por GF AAS em suspensões de mel. Valores mais elevados de absorvância foram obtidos para as suspensões de mel com maior teor de peróxido de hidrogênio, o que pode representar uma condição que acarretará em uma melhor sensibilidade analítica. Observa-se também que o sinal de BG também foi mais elevado para suspensão com 9% de H₂O₂, indicando a necessidade de otimizar o programa de aquecimento do forno de grafite empregado para cromo. Nesse sentido, optou-se por preparar as soluções de mel em meio de 9% de peróxido de hidrogênio e otimizar as condições das medidas visando minimizar os sinais de fundo (BG).

A determinação de cromo por GF AAS geralmente utiliza temperatura de pirólise e atomização de 1000 °C e 2600 °C, respectivamente. Além disso, geralmente utiliza-se solução de Paládio (Pd) como modificador de matriz, permitindo que possam ser usadas maiores temperaturas de pirólise (AGILENT TECHNOLOGIES, 2010). Neste trabalho, foi realizado a otimização do programa de aquecimento do forno de grafite utilizado na determinação direta de cromo em mel empregando GF AAS. Inicialmente, foi avaliada a temperatura de pirólise

($T_{\text{pirólise}}$) que variou entre 1000 a 1900 °C para a suspensão de mel com temperatura de atomização ($T_{\text{atomização}}$) fixa em 2600 °C. Os resultados obtidos no estudo da otimização da temperatura de pirólise na análise de suspensões de mel preparadas sem modificador químico e na presença de Pd utilizado como modificador de matriz estão mostrados na Figura 14.

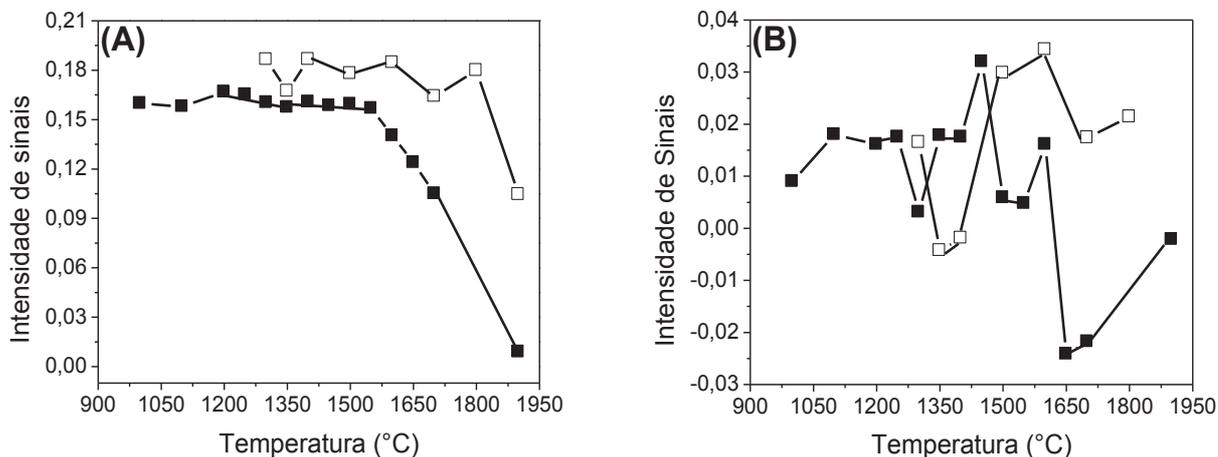


Figura 14. Otimização da temperatura de pirólise usada na determinação direta de Cr em mel empregando GF AAS e amostragem em suspensão e estudo da influência de modificador de matriz. (A) Sinais de absorvância referentes à área do pico de Cr e (B) Sinais de fundo, background (BG). Suspensão de mel enriquecida com Cr com ausência de modificador químico (■) e na presença de 323,3 mg L⁻¹ de Pd (□). $T_{\text{atomização}}$ fixa em 2600 °C.

A Figura 14 mostra os sinais de absorvância e BG obtidos para as curvas de pirólise que foram avaliadas na determinação direta do cromo por GF AAS para suspensões de mel. Na Figura 14A, em relação aos sinais de absorvância, nota-se um comportamento similar para as suspensões com ou sem Pd. Para a suspensão de mel sem modificador químico, a máxima temperatura de pirólise que pode ser alcançada sem perda de Cr foi 1500 °C. Acima dessa temperatura, o Cr é volatilizado. Para a suspensão de mel que foi co-injetada com Pd no Forno de Grafite, observa-se uma estabilidade da temperatura até 1800 °C. Esse comportamento é esperado, pois os modificadores químicos tem como função minimizar a perda de metais devido a temperaturas elevadas de pirólise (GARCÍA *et al.*, 2005b). Contudo, o uso de modificadores tem a desvantagem de elevar o custo da análise, devido ao seu alto custo, além de aumentar a chance de contaminação, devido à adição de mais reagente na amostra. Em estudos preliminares para curvas analíticas de Cr, foi observado um comportamento diferente para a suspensão de mel com Pd e para o padrão aquoso de Cr com Pd, sendo que a inclinação da curva analítica para este último foi muito menor do que para a

suspensão de mel, demonstrado que, para solução aquosa, Cr volatilizava em 1800 °C mesmo usando modificador químico, o que não é adequado.

Portanto, apesar da intensidade de absorvância ser um pouco mais elevada para a suspensão com paládio, a ausência do modificador não impossibilita as medidas, pois o cromo é um elemento refratário e não há uma perda significativa durante a etapa de mineralização da matriz orgânica do mel.

Além da avaliação dos sinais de absorvância obtidas nas curvas de pirólise é necessário também avaliar os sinais de fundo (BG) obtidos no estudo da pirólise, conforme mostra Figura 14B.

Os sinais de fundo obtidos na determinação de Cr podem ser considerados baixos, tanto para a suspensão de mel sem modificador, quanto para a suspensão de mel com Pd. Esses sinais baixos podem indicar que ocorreu uma eliminação completa da matriz orgânica e ausência de resíduos carbonáceos dentro do atomizador. Na temperatura de pirólise de 1500 °C para a suspensão sem modificador observa-se que o sinal de BG cai significativamente, o que indica que a matriz orgânica do mel é eficientemente eliminada. Essa temperatura de pirólise adequada aliada ao uso de agentes oxidantes como ácido nítrico e peróxido de hidrogênio na suspensão possibilitou a eliminação completa de concomitantes.

Portanto, a condição escolhida para a determinação direta de Cr por GF AAS foi o uso de suspensão sem modificador com temperatura de pirólise de 1500 °C. Essa condição foi escolhida devido à simplicidade, sensibilidade, menor custo, baixo sinal ruído e por ser uma condição na qual se pode ter a máxima eliminação da matriz/interferentes na determinação de Cr em mel. Tendo-se encontrado a temperatura de pirólise mais adequada, esta foi fixada e curvas de atomização de Cr foram obtidas, cujos resultados estão apresentados na Figura 15.

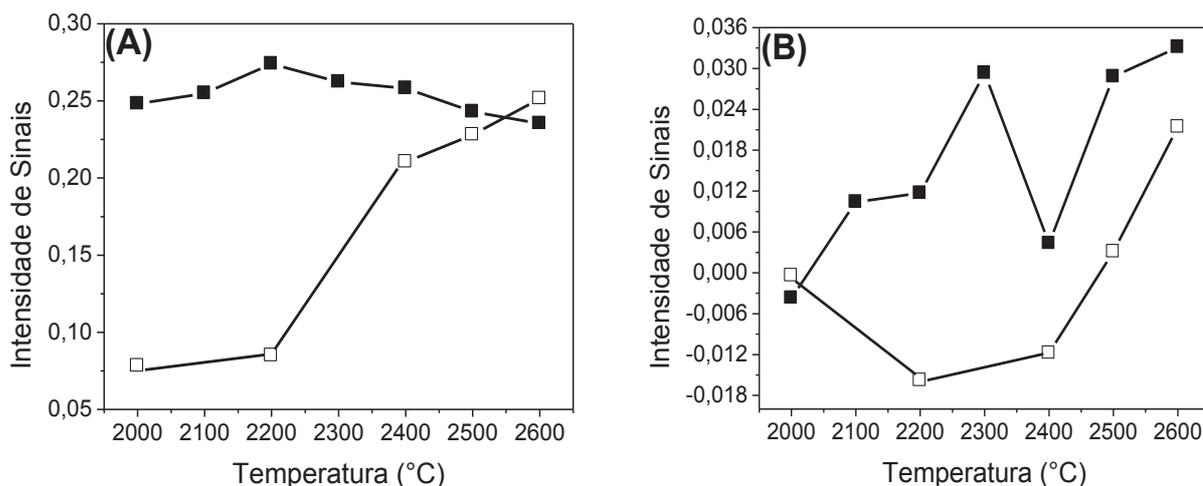


Figura 15. Otimização da temperatura de atomização usada na determinação direta de Cr em mel empregando GF AAS e amostragem em suspensão. (A) Sinais de absorvância referentes à área do pico de Cr e (B) Sinais de fundo, background (BG). Diferentes suspensões de mel enriquecidas com Cr foram utilizadas: (i) na ausência de modificador (■); (ii) na presença de Pd (□). $T_{\text{pirólise}}$ fixa em 1500 °C.

Para a curva de atomização pode-se observar uma diferença significativa nos sinais de absorvância (Figura 15A) para as suspensões de mel com e sem modificador químico (Pd). De modo geral, as intensidades da absorvância foram mais elevadas para a suspensão sem Pd, na faixa de temperatura de atomização estudada (2000-2600 °C). Para esta suspensão observa-se uma estabilidade das temperaturas de atomização na faixa de 2100-2400 °C, com um pico máximo em 2200 °C. Para a suspensão de mel com Pd, o máximo de absorvância é obtido em 2600 °C, condição igual à apresentada pelo fabricante.

Além da avaliação dos sinais de absorvância, é necessário avaliar os sinais de fundo (BG) devido à complexidade da amostra. Na Figura 15B notam-se sinais baixos de BG para as diferentes condições estudadas. Esses valores indicam a ausência de interferências nas medidas, ou seja, não há presença de resíduos carbonáceos no tubo de grafite devido a problemas de mineralização da matriz durante aquecimento da amostra. Comparando-se as curvas de atomização das duas suspensões avaliadas, observa-se que a suspensão de mel sem modificador teve sinais de BG mais elevados, porém isso não afeta a determinação do analito, pois os sinais são muito menores se comparado aos sinais de absorvância da amostra.

Portanto, visando obter sinais mais elevados de absorvância e menores sinais de fundo (BG), optou-se por uma metodologia mais simplificada, ou seja, sem o uso de modificador químico e com as temperaturas de pirólise e atomização de 1500 °C e 2200 °C, respectivamente.

Os perfis de atomização para Cr que foram obtidos em diferentes condições do programa de aquecimento do GF AAS são apresentados na Figura 16.

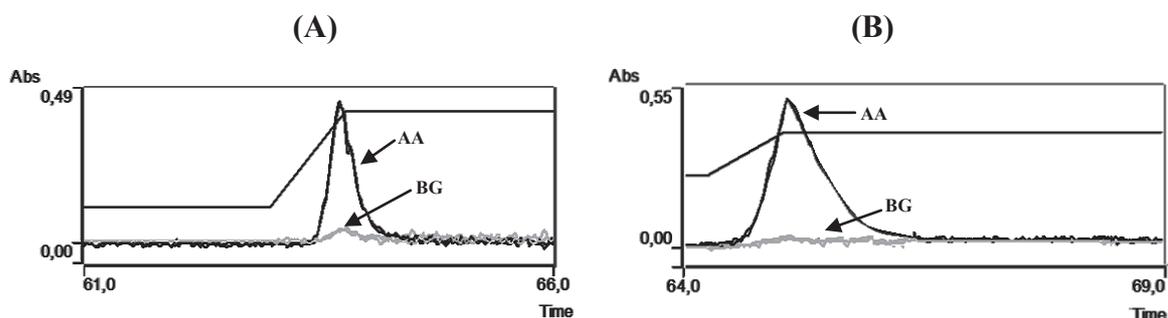


Figura 16. Perfis de atomização para Cr na análise de suspensões de mel sem modificador químico por GF AAS, empregando diferentes programas de aquecimento do forno de grafite. (A) Condição inicial de trabalho com $T_{\text{pirólise}}$ de 1000 °C e $T_{\text{atomização}}$ de 2600 °C; (B) Condição otimizada de trabalho com $T_{\text{pirólise}}$ de 1500 °C e $T_{\text{atomização}}$ de 2200 °C. Sinais atômicos (AA) e sinais de background (BG) estão representados nas cores em negro e cinza, respectivamente. Nas figuras são apresentadas também as rampas de aquecimento.

Na Figura 16 é possível observar diferenças nos perfis de atomização obtidos para Cr em suspensões de mel em diferentes condições de pirólise e atomização. A Figura 16A apresenta o pico do sinal de absorção atômica (AA) quando foi utilizado o programa de aquecimento do forno sugerido pelo fabricante, sendo este mais estreito que o pico do sinal de AA obtido em uma condição otimizada para temperatura de pirólise e atomização (Figura 14B). Isso demonstra uma maior sensibilidade da análise, considerando a maior intensidade de sinal obtida na condição otimizada. Esse perfil indica a necessidade de otimizar as condições de trabalho a fim de aumentar a sensibilidade do método, eliminar a matriz orgânica e minimizar o sinal de fundo.

Comparando os resultados obtidos nesse trabalho com a literatura notam-se diferenças, que podem estar relacionadas com a superfície de atomização e também às diferenças de matriz do mel brasileiro. García *et al.* (2005b), relataram as condições adequadas para a determinação direta de Cr, Cu e Ni em méis da Galícia na Espanha. Os autores descrevem que as temperaturas de pirólise e atomização foram 1265 °C e 2700 °C, respectivamente. Nessas medidas foram utilizados Pd como modificador de matriz, e plataforma de L'vov como superfície de atomização. No presente trabalho, mesmo utilizando uma condição similar a apresentada pela literatura (mesmo modificador químico, porém usando tubo de grafite pirolítico), foi possível obter maiores temperaturas de pirólise e menores temperaturas de atomização. Isso demonstra que as condições alcançadas neste trabalho são adequadas, visto que quanto maior for a temperatura de pirólise maior será a eficiência de eliminação da matriz

orgânica e quanto menor a temperatura de atomização maior será a economia do tubo de grafite, e conseqüentemente mais simples e viável será o método.

5.2.4. Condição otimizada

A partir dos resultados apresentados, a determinação direta de Pb, Cd e Cr em amostras de mel empregando GF AAS pode ser realizada com o uso de suspensões de mel e em condições de menor custo, como por exemplo, o uso de tubos de grafite pirolítico sem plataforma de L'vov. Na determinação de Pb as suspensões de mel foram preparadas com 70 g L⁻¹ de mel, 0,1 mol L⁻¹ de HNO₃ e 3% de H₂O₂. Para Cd, as suspensões foram preparadas com 70 g L⁻¹ de mel, 0,1 mol L⁻¹ de HNO₃ e 3% de H₂O₂ e 0,59 mg de Pd e 6 mg de Mg(NO₃)₂. Para medidas de Cr, as suspensões de mel foram otimizadas na condição de 70 g L⁻¹ de mel, 0,1 mol L⁻¹ de HNO₃ e 9% de H₂O₂. O programa de aquecimento do forno de grafite otimizado encontra-se descrito na Tabela 6.

Tabela 6. Programas de aquecimento do forno de grafite otimizados para a determinação direta de Pb, Cd e Cr em amostras de mel empregando GF AAS e amostragem em suspensão.

Elemento	Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Vazão de Ar (L min ⁻¹)	Leitura do sinal
Pb	Secagem 1	85	5	2	0,3	Não
	Secagem 2	95	40	1	0,3	Não
	Secagem 3	120	10	1	0,3	Não
	Calcinação	650	5	6	0,3	Não
	Atomização	2000	0,9	4	0	Sim
	Limpeza	2000	2	1	0,3	Não
Cd	Secagem 1	85	5	2	0,3	Não
	Secagem 2	95	40	1	0,3	Não
	Secagem 3	120	10	1	0,3	Não
	Calcinação	900	5	13,2	0,3	Não
	Atomização	1350	0,8	4	0	Sim
	Limpeza	1350	2	0	0,3	Não
Cr	Secagem 1	85	5	2	0,3	Não
	Secagem 2	95	40	1	0,3	Não
	Secagem 3	120	10	1	0,3	Não
	Calcinação	1500	5	6	0,3	Não
	Atomização	2200	0,8	4	0	Sim
	Limpeza	2200	2	1	0,3	Não

É importante destacar que as condições escolhidas visaram também minimizar custos e aumentar a vida útil da superfície de atomização. A vida útil dos tubos de grafite pirolíticos

foi de aproximadamente 1500 queimas, sem perda da sensibilidade ou perda de repetibilidade. Após o estabelecimento dos procedimentos para obter suspensões estáveis e homogêneas de mel e as condições instrumentais de determinação direta de Pb, Cr e Cd por GF AAS, avaliou-se a performance analítica da metodologia analítica empregada nas quantificações.

5.3. Avaliação das Características Analíticas dos Métodos Desenvolvidos para a Determinação Direta de Pb, Cr e Cd em Amostras de Mel empregando GF AAS e Amostragem em Suspensão

O desempenho analítico da metodologia desenvolvida para determinação direta de Pb, Cd e Cr em mel por GF AAS foi avaliada e validada através de diversos testes que incluíram formas de calibração, linearidade, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), massa característica, exatidão e precisão.

5.3.1. Avaliação da forma de calibração, linearidade e sensibilidade dos métodos desenvolvidos

A forma de calibração instrumental foi estudada para a quantificação de Cr, Pb e Cd empregando GF AAS e amostragem em suspensão de mel. Curvas analíticas foram construídas para cada metal utilizando duas faixas de concentração, a fim de verificar o comportamento das curvas em concentrações menores e maiores, e diferentes meios, tais como solução aquosa, solução de mel e solução contendo frutose. Assim como a forma de calibração, também foram avaliadas a sensibilidade e a linearidade através de testes estatísticos.

5.3.1.1. Chumbo

Para chumbo, as faixas de concentração empregadas na calibração instrumental foram 0 a 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0 a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$. Dois procedimentos distintos foram investigados na quantificação de Pb. Em um dos procedimentos, foi utilizada a calibração por padrão externo em meio aquoso. Soluções de referência de Pb foram preparadas com concentração conhecida e diluições foram realizadas na construção da curva analítica. Outro procedimento adotado utilizou o método de adição de padrão, ou seja, curvas de adição de padrão foram construídas através das medidas realizadas com solução de mel (na presença de HNO_3 e H_2O_2). O método

de adição de padrão foi empregado neste trabalho para verificar se a matriz orgânica do mel poderia interferir na determinação dos metais por GF AAS. As curvas analíticas construídas para chumbo em suspensão de mel e em meio aquoso são apresentadas na Figura 17.

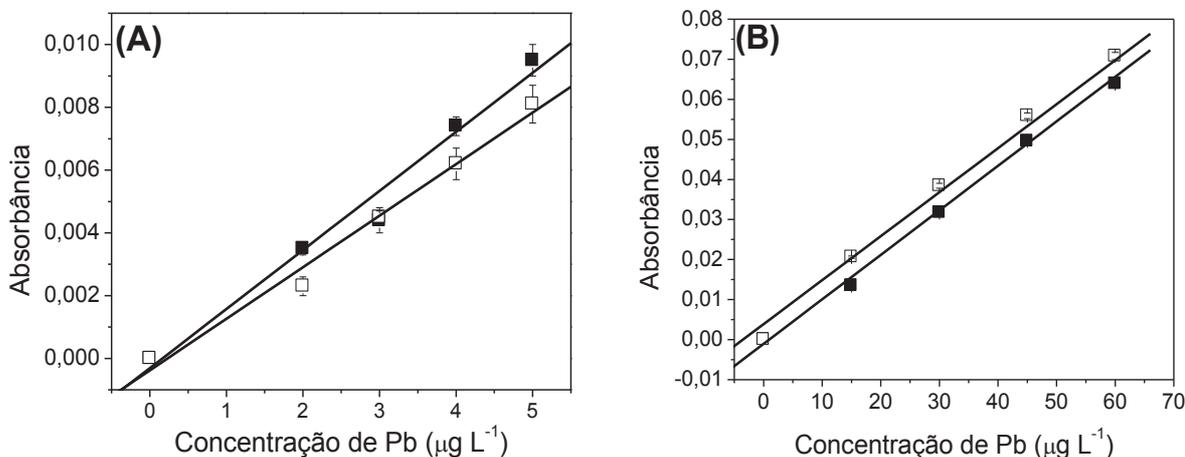


Figura 17. Curvas analíticas obtidas na determinação de Chumbo por GF AAS empregando calibração por padrão externo em meio aquoso (símbolo preto) e com adição de padrão (símbolo branco) em meio de solução de mel para duas faixas de concentração. (A) Faixa de concentração de 0 a 5 µg L⁻¹ e; (B) Faixa de concentração de 0 a 60 µg L⁻¹.

Conforme pode ser observado nas Figuras 17A e 17B, independente da faixa de concentração avaliada, a atomização do chumbo parece ser similar nos dois meios estudados, meio aquoso e com adição de mel. Os resultados obtidos foram utilizados no cálculo de regressão linear a fim de obter uma equação de reta e o coeficiente de determinação (R^2). Nos cálculos foi utilizado o software Minitab. A Tabela 7 apresenta as regressões lineares obtidas bem como os coeficientes de determinação.

Tabela 7. Parâmetros de calibração obtidos na quantificação de Pb por GF AAS empregando amostragem em suspensão de mel.

Conc. (µg L ⁻¹)	Calibração / Meio	Parâmetros da Regressão Linear	
		Equações de Reta*	R ²
0 – 5,0	Externa / Aquoso	A = -0,0003 (±0,0005) + 0,0019 (±0,0002) [Pb]	0,997
0 – 5,0	Adição Padrão / Mel	A = -0,0003 (±0,0004) + 0,0016 (±0,0001) [Pb]	0,997
0 – 60	Externa / Aquoso	A = -0,00104 (±0,0005) + 0,0011 (±0,0001) [Pb]	0,999
0 – 60	Adição Padrão / Mel	A = 0,0039 (±0,0031) + 0,0011 (±0,0001) [Pb]	1,00

*valores em parênteses correspondem aos erros padrão dos coeficientes linear e angular.

A Tabela 7 mostra as equações geradas pela regressão linear de mínimos quadrados ordinários para as curvas analíticas obtidas em meio aquoso (calibração por padrão externo) e solução de mel (calibração por adição de padrão). Para cada faixa de concentração avaliada,

foi comparada a sensibilidade, ou seja, o coeficiente angular (slope) das equações de reta obtidas. Em ambas as curvas, calibração externa e por adição de padrão, foi possível observar a similaridade entre os coeficientes angulares. Esse comportamento sugere que as diferenças da matriz das soluções utilizadas na calibração não influenciaram nas medidas. Assim, as quantificações de Pb podem ser realizadas de maneira mais rápida e com maior simplicidade por utilizar calibração externa em meio aquoso. Esse aspecto é uma vantagem porque minimiza custos, aumenta a vida útil do tubo de grafite e, diminui tempo de análise.

Em todos os casos, os coeficientes de correlação variaram entre 0,99 e 1,00, indicando uma forte relação linear entre absorvância e concentração do padrão ($r > 0,99$) (AOAC, 2002).

A linearidade das curvas analíticas e o ajuste dos dados ao modelo de regressão linear obtidos com a calibração externa e por adição de padrão foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) característica da regressão linear em um nível de 95% de confiança. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Avaliação estatística da linearidade das curvas analíticas obtidas na quantificação de Pb por GF AAS e amostragem em suspensão.

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Calibração / Meio	Validação da linearidade (ANOVA)			
		Regressão*		Falta de ajuste**	
		$F_{\text{observado}}$	p	$F_{\text{observado}}$	p
0 – 5,0	Externa / Aquoso	2550,25	0,000	0,90	0,476
0 – 5,0	Adição Padrão / Mel	2027,79	0,000	0,40	0,694
0 – 60	Externa / Aquoso	7706,28	0,000	0,45	0,669
0 – 60	Adição Padrão / Mel	29592,55	0,000	0,49	0,647

* $F_{\text{crítico}}(1, 4, 0,05) = 7,71$; ** $F_{\text{crítico}}(2, 4, 0,05) = 6,94$

A linearidade das curvas analíticas obtidas para Pb com calibração externa e com calibração por adição de padrão foi avaliada pela ANOVA, conforme dados da Tabela 8. Para as duas faixas de concentração, os valores de $F_{\text{observado}}$ foram muito superiores ao $F_{\text{crítico}}$ cujo valor foi 7,71. Esses resultados indicam que existe uma elevada significância estatística da curva ajustada e, portanto, as curvas em meio aquoso e solução de mel apresentaram linearidade adequada no intervalo de confiança estudado. Esse fato é ressaltado pelo valor de p (valor de probabilidade em determinado nível de confiança), que neste caso foi $p = 0,000$, ou seja, $p < 0,05$, indicando que dentro do nível de significância estipulado (95%), o valor de $F_{\text{observado}}$ é significativo. Além disso, o gráfico de resíduos do modelo de regressão linear

(dados não apresentados) apresenta um padrão aleatório, indicando um modelo bem ajustado aos dados experimentais.

As curvas analíticas obtidas pela regressão linear também foram analisadas estatisticamente para verificar a adequação do modelo escolhido (Tabela 8). Um teste de falta de ajuste do modelo linear, do inglês, *lack-of-fit*, foi aplicado para verificar a linearidade das curvas (NETO, et al.; 2007). Esse teste indica se o modelo linear é adequado para o ajuste de uma curva analítica aos dados experimentais. Nota-se que para as duas faixas de concentração os valores de $F_{observado}$ (0,40 - 0,90) foram menores que o $F_{crítico}$ para cada forma de calibração, indicando a ausência de significância estatística do $F_{observado}$ ($p > 0,05$) e confirmando que a linearidade das curvas é aceita. Portanto, não há falta de ajuste nos modelos construídos, sendo que os modelos lineares são adequados tanto para calibração externa quanto para a adição de padrão.

Portanto, conforme já descrito, a forma de calibração escolhida para Pb foi o uso de calibração externa com padrão em meio aquoso.

5.3.1.2. Cromo

Para cromo, também foram avaliadas duas faixas de concentração empregadas na calibração instrumental sendo essas de 0 a 8,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Os procedimentos utilizando calibração externa com padrão externo em meio aquoso e o método de adição de padrão (medidas realizadas com solução de mel na presença de HNO_3 e H_2O_2) foram empregados. As curvas analíticas construídas para cromo em suspensão de mel e em meio aquoso são apresentadas na Figura 18.

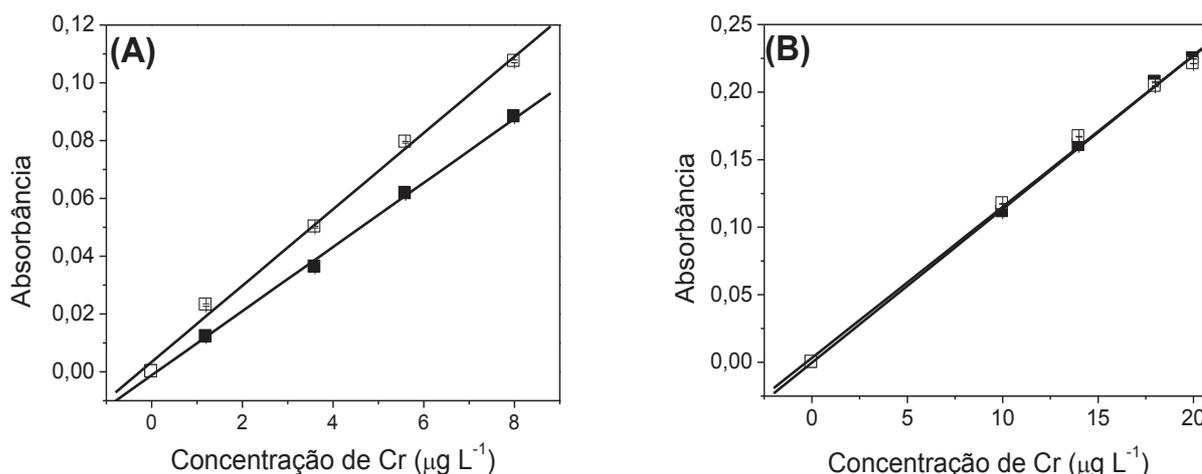


Figura 18. Curvas analíticas obtidas na determinação de Cromo por GF AAS empregando calibração externa com padrão em meio aquoso (símbolo preto) e calibração por adição de padrão (símbolo branco) em meio de solução de mel para duas faixas de concentração. **(A)** Faixa de concentração de 0 a 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ e; **(B)** Faixa de concentração de 0 a 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Como pode ser observado nas Figuras 18A e 18B, independente do meio e da faixa de concentração avaliada, há uma similaridade na atomização de cromo. Os resultados obtidos foram utilizados no cálculo de regressão linear, no intuito de obter a equação de reta e o coeficiente de determinação (R^2). Para isso foi utilizado o software Minitab. A Tabela 9 apresenta as regressões lineares obtidas bem como os coeficientes de determinação.

Tabela 9. Parâmetros de calibração obtidos na quantificação de Cr por GF AAS empregando amostragem em suspensão de mel.

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Calibração / Meio	Parâmetros da Regressão Linear	
		Equações de Reta*	R^2
0 – 8,0	Externa / Aquoso	$A = -0,001(\pm 0,001) + 0,0111(\pm 0,0003)[\text{Cr}]$	1,00
0 – 8,0	Adição Padrão / Mel	$A = -0,003(\pm 0,002) + 0,0132(\pm 0,0005)[\text{Cr}]$	1,00
0 – 20	Externa / Aquoso	$A = -0,0003 (\pm 0,0024) + 0,0114 (\pm 0,0002) [\text{Cr}]$	1,00
0 – 20	Adição Padrão / Mel	$A = 0,0032 (\pm 0,0053) + 0,0112 (\pm 0,0004) [\text{Cr}]$	1,00

*valores em parênteses correspondem aos erros padrão dos coeficientes linear e angular.

A Tabela 9 mostra as equações geradas pela regressão linear de mínimos quadrados ordinários para as curvas analíticas obtidas em meio aquoso (calibração externa) e em solução de mel (calibração por adição de padrão) para Cr. Para cada faixa de concentração avaliada, foi comparada a sensibilidade (coeficiente angular) das equações de reta obtidas. Em ambas as curvas, calibração externa e por adição de padrão, foi possível observar a similaridade entre os coeficientes angulares. Isso sugere que as diferenças da matriz das soluções utilizadas na calibração não influenciaram nas medidas. Assim, as quantificações de Cr podem ser

realizadas utilizando calibração externa em meio aquoso, tornando o procedimento mais rápido e mais simples, além de apresentar vantagem em relação à diminuição de custos e aumento da vida útil do tubo de grafite.

Em todos os casos, os coeficientes de correlação foram iguais a 1,00, indicando uma forte relação linear entre absorvância e concentração do padrão ($r > 0,99$) (AOAC, 2002).

Para avaliar a linearidade das curvas analíticas e o ajuste dos dados ao modelo de regressão linear obtidos com a calibração externa e a calibração por adição de padrão, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) característica de regressão linear em um nível de 95% de confiança. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Avaliação estatística da linearidade das curvas analíticas obtidas na quantificação de Cr por GF AAS e amostragem em suspensão.

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Calibração / Meio	Validação da linearidade (ANOVA)			
		Regressão*		Falta de ajuste**	
		$F_{\text{observado}}$	p	$F_{\text{observado}}$	p
0 – 8,0	Externa / Aquoso	442716,76	0,000	0,13	0,880
0 – 8,0	Adição Padrão / Mel	271678,36	0,000	1,68	0,295
0 – 20	Externa / Aquoso	113019,64	0,000	3,92	0,114
0 – 20	Adição Padrão / Mel	90709,73	0,000	3,34	0,140

* $F_{\text{crítico}}(1, 4, 0,05) = 7,71$; ** $F_{\text{crítico}}(2, 4, 0,05) = 6,94$

Conforme dados da Tabela 10 para ANOVA da linearidade, pode-se observar para as duas faixas de concentração, que os valores de $F_{\text{observado}}$ foram superiores ao $F_{\text{crítico}}$. Esses resultados indicam que o $F_{\text{observado}}$ é significativo no nível de confiança de 95% e, portanto, sugerem que as curvas em meio aquoso e solução de mel apresentaram linearidade adequada, fato ressaltado pelo valor de $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

As curvas analíticas obtidas pela regressão linear também foram analisadas estatisticamente para verificar a adequação do modelo escolhido (Tabela 11). Para isso foi aplicado um teste de falta de ajuste do modelo linear. Nota-se que para as duas faixas de concentração os valores de $F_{\text{observado}}$ (0,13 – 3,92) foram menores que o $F_{\text{crítico}}$ para cada forma de calibração, indicando a ausência de significância estatística do $F_{\text{observado}}$ ($p > 0,05$) e confirmando que a linearidade das curvas é aceita. Portanto, não há falta de ajuste nos modelos construídos, e modelos lineares são adequados para satisfazer o ajuste dos dados experimentais tanto para calibração externa quanto para a calibração por adição de padrão.

Portanto, conforme já descrito, a forma de calibração escolhida para Cr foi a calibração com padrão externo em meio aquoso.

5.3.1.3. Cádmio

Para a quantificação de cádmio nas amostras de mel por GF AAS foi avaliada a forma de calibração instrumental em apenas uma faixa de concentração que variava de 0 a $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$, pois em testes iniciais verificou-se que acima de $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$ a curva analítica já apresentava perda da linearidade, não sendo viável realizar um estudo em uma faixa de concentração maior. As curvas analíticas foram obtidas para cádmio empregando dois procedimentos para calibração, que consistiram em utilizar calibração externa com padrões de Cd em meio aquoso na presença do modificador químico Pd-Mg e calibração por adição padrão em meio da suspensão de mel. A Figura 19 apresenta as curvas analíticas obtidas para Cd empregando os dois procedimentos.

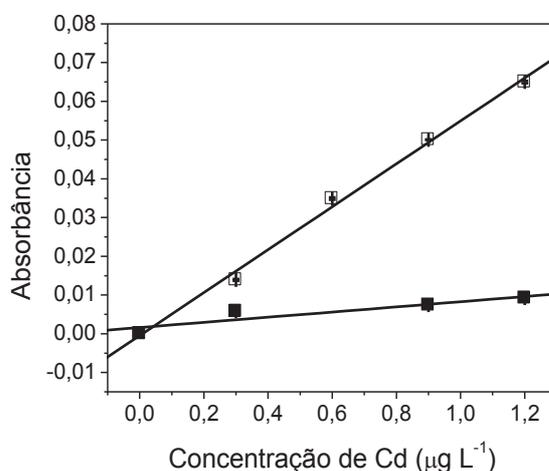


Figura 19. Curvas analíticas obtidas na determinação de Cádmio por GF AAS empregando calibração externa com padrão em meio aquoso (símbolo preto) e calibração por adição de padrão (símbolo branco) em meio de solução de mel na faixa de concentração de 0 a $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$.

Com relação à Figura 19, é possível observar que a atomização de Cd foi diferente nos dois meios estudados sugerindo um efeito de matriz significativo. A intensidade de absorvância foi muito diferente para a solução aquosa com modificador de matriz e suspensão de mel para as mesmas concentrações de cádmio. Esse comportamento pode estar relacionado com o fato de se utilizar uma maior temperatura de calcinação (resultado obtido na otimização do programa de aquecimento do forno de grafite). Em solução aquosa, mesmo utilizando modificador químico ($\text{Pd-Mg}(\text{NO}_3)_2$), ocorreu perda do cádmio por volatilidade. Nas medidas realizadas com solução de mel, não ocorreu perdas de Cd, provavelmente devido a matriz complexa do mel que pode agir como um modificador de matriz natural não deixando o

analito volatilizar mesmo a altas temperaturas, além da presença do modificador de matriz universal (Pd-Mg).

Portanto, esse comportamento verificado invalida a quantificação de cádmio em amostras de mel empregando simples calibração instrumental com soluções aquosas de cádmio. Assim, outra abordagem deve ser empregada, como por exemplo, a adição de carboidratos na solução aquosa contendo o analito. Essa abordagem foi investigada com testes de adição de frutose a solução com padrão de Cd, pois a frutose pode simular a matriz orgânica do mel (VIÑAS *et al.*, 1997). Esse carboidrato é um dos principais constituintes do mel e optou-se por construir curvas analíticas para cádmio com calibração externa empregando soluções de Cd em meio de 2 e 3 % (m/V) de frutose e curvas com adição de padrão em meio de solução de mel. Em todas as soluções utilizou-se o modificador universal Pd-Mg. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 20.

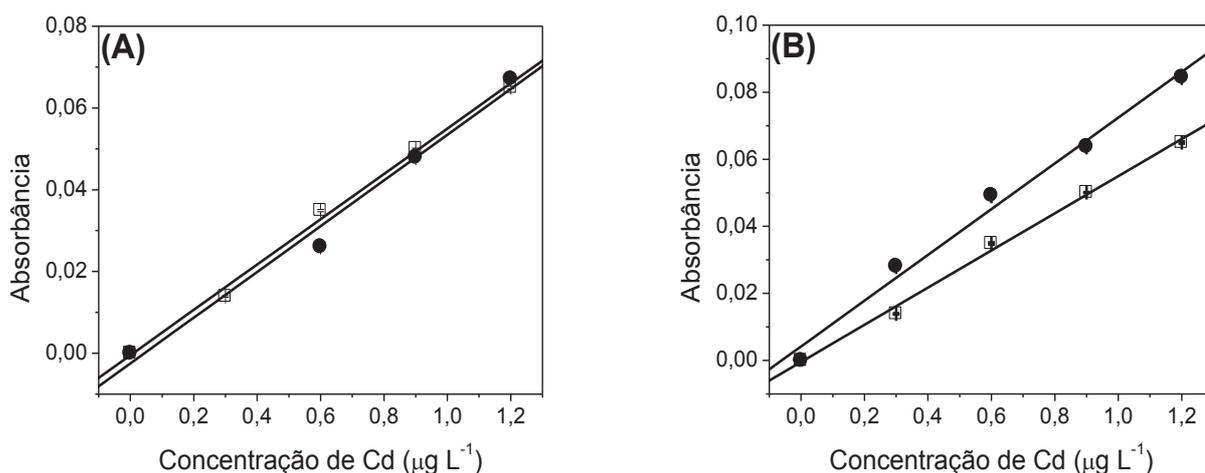


Figura 20. Curvas analíticas obtidas na determinação de Cádmio por GF AAS empregando diferentes formas de calibração: externa com solução padrão de cádmio em meio de frutose (símbolo preto) e com método de adição de padrão (símbolo branco). (A) Calibração externa em meio de frutose 2% (m/V); (B) Calibração externa em meio de frutose 3% (m/V).

As Figuras 20A e 20B apresentam comportamentos distintos em relação a curva de calibração externa e a concentração de frutose adicionada. Visualmente pode-se observar que a curva com padrão externo e frutose 2% (m/V) (Figura 20A) apresentou uma inclinação similar a curva de adição de padrão em suspensão de mel. Na Figura 20B, a adição de frutose 3% (m/V) a curva de padrão externo apresentou uma inclinação maior do que para a curva de em suspensão de mel. Isso sugere que a adição de 2% (m/V) de frutose a solução do padrão de

Cd é necessária para originar uma sensibilidade similar a apresentada pela curva de adição padrão.

A Tabela 11 apresenta as equações de reta referentes a cada curva analítica obtida para cádmio através da regressão linear calculada pelo método dos mínimos quadrados ordinários.

Tabela 11. Parâmetros de calibração obtidos na quantificação de Cd por GF AAS empregando calibração externa em meio de frutose e calibração por adição de padrão.

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Calibração / Meio	Parâmetros da Regressão Linear	
		Equações de Reta*	R ²
1,2	Adição Padrão / Mel	$A = -0,0005 (\pm 0,0015) + 0,0554 (\pm 0,0020)[\text{Cd}]$	1,00
	Externa / Frutose 2% (m/V)	$A = -0,0025 (\pm 0,0039) + 0,0559 (\pm 0,0048)[\text{Cd}]$	1,00
	Externa / Frutose 3% (m/V)	$A = 0,0042 (\pm 0,0032) + 0,0682 (\pm 0,0044)[\text{Cd}]$	1,00

*valores em parênteses correspondem aos erros padrão dos coeficientes linear e angular.

Em relação à Tabela 11, para cada faixa de concentração avaliada, foi comparada a sensibilidade (coeficiente angular) das equações de reta obtidas. É possível observar que em ambas as curvas, calibração externa em meio de frutose 2% (m/V) e calibração por adição de padrão em suspensão de mel, existe uma similaridade entre os coeficientes angulares. Isso sugere que não há efeito de matriz e que não houve nenhuma influencia das matrizes nas medidas para a construção das curvas analíticas. Em relação à inclinação da curva de padrão externo com frutose 3% (m/V), essa é aproximadamente 1,23 vezes maior do que a inclinação da curva de adição padrão em mel. Isso demonstra que pode estar ocorrendo uma interferência da quantidade de frutose adicionada a solução de padrão de Cd na construção da curva analítica. Portanto, as quantificações de Cd podem ser realizadas utilizando calibração externa em meio de frutose 2% (m/V) com modificador universal Pd-Mg, tornando o procedimento rápido e simples.

Em todos os casos, os coeficientes de correlação foram iguais á 1,00, indicando uma forte relação linear entre absorbância e concentração do padrão ($r > 0,99$) (AOAC, 2002).

Para avaliar a linearidade das curvas analíticas e o ajuste dos dados ao modelo de regressão linear obtidos com a calibração externa para Cd em meio de frutose 2% (m/V) e calibração por adição de padrão, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) característica da regressão linear em um nível de 95% de confiança. Os dados obtidos estão mostrados na Tabela 12.

Tabela 12. Avaliação estatística da linearidade das curvas analíticas obtidas na quantificação de Cd por GF AAS e amostragem em suspensão.

Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Calibração / Meio	Validação da linearidade (ANOVA)			
		Regressão*		Falta de ajuste**	
		$F_{\text{observado}}$	p	$F_{\text{observado}}$	p
0 – 1,2	Adição Padrão / Mel	181050,25	0,000	0,40	0,694
	Externa / Frutose 2% (m/V)	125765,81	0,000	0,60	0,592

* $F_{\text{crítico}}(1, 4, 0,05) = 7,71$; ** $F_{\text{crítico}}(2, 4, 0,05) = 6,94$

Conforme dados da Tabela 12 para ANOVA da linearidade, pode-se observar para as duas curvas analíticas, que os valores de $F_{\text{observado}}$ foram superiores ao $F_{\text{crítico}}$. Esses resultados indicam que o $F_{\text{observado}}$ de regressão é significativo no nível de confiança de 95% e, portanto, sugerem que as curvas em meio de frutose e solução de mel apresentaram linearidade adequada, fato ressaltado pelo valor de $p = 0,000$ ($p < 0,05$).

As curvas analíticas obtidas pela regressão linear também foram analisadas estatisticamente para verificar a adequação do modelo escolhido (Tabela 12). Para isso foi aplicado um teste de falta de ajuste do modelo linear. Nota-se que para as duas curvas analíticas, padrão externo e adição de padrão, os valores de $F_{\text{observado}}$ (0,40 - 0,60) foram menores que o $F_{\text{crítico}}$, indicando a ausência de significância estatística do $F_{\text{observado}}$ ($p > 0,05$) e confirmando a linearidade das curvas. Portanto, não há falta de ajuste nos modelos construídos, e modelos lineares são adequados para o ajuste dos dados experimentais, tanto para calibração externa quanto para a calibração por adição de padrão.

5.3.2. Avaliação dos limites de detecção, quantificação e massa característica

Este trabalho envolve a realização de quantificações de metais traço, ou seja, em concentrações bastante baixas em amostras complexas como o mel, assim é necessário conhecer a concentração do analito que pode ser detectado ou quantificado pelo método proposto. Portanto, os limites de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e massa característica foram determinados para os métodos desenvolvidos e otimizados para a quantificação de Pb, Cd, Cr em amostras de mel por GF AAS.

O limite de detecção (LD) é definido como a menor concentração do analito que pode ser distinguida em certo nível de confiança (SKOOG, 2006). O LD depende da razão entre a magnitude do sinal analítico e o tamanho das flutuações estatísticas no sinal do controle, ou

normalmente chamado de branco, e pode ser calculado através da equação 1 (ANVISA, 2003; SKOOG, 2006).

$$LD = \frac{3 \times s}{S} \quad \text{Equação (1)}$$

s é a estimativa de desvio padrão das medidas do controle analítico, e S é a inclinação (coeficiente angular) da curva analítica para a espécie de interesse.

O limite de quantificação (LQ) pode ser definido como a menor quantidade do analito que pode ser quantificada na amostra, com precisão e exatidão aceitáveis (ANVISA, 2003). O LQ pode ser calculado pela equação 2. Experimentalmente, para a análise de traços, o LQ pode ser considerado a concentração mais baixa da curva analítica.

$$LQ = \frac{10 \times s}{S} \quad \text{Equação (2)}$$

s é a estimativa de desvio padrão das medidas do controle analítico, e S é a inclinação (coeficiente angular) da curva analítica para a espécie de interesse.

Neste trabalho, os LQ e LD foram determinados através das estimativas de desvio padrão de 10 medidas consecutivas do controle analítico (branco) e a inclinação (coeficiente angular) da curva analítica para a espécie de interesse, conforme as equações 1 e 2. Para as medidas para chumbo e cromo o controle analítico consistiu de uma solução aquosa contendo peróxido de hidrogênio e ácido nítrico. Para cádmio, o controle analítico utilizado foi uma solução aquosa contendo peróxido de hidrogênio, ácido nítrico e o modificador Pd-Mg(NO₃)₂.

Os resultados obtidos no trabalho estão mostrados na Tabela 13 e dados da literatura também estão apresentados na mesma tabela.

Tabela 13. Limites de detecção e quantificação e massa característica (m_0) obtidos para Pb, Cr e Cd, empregando GF AAS e amostragem em suspensão.

Elemento	LD (ng g ⁻¹)	LD (Literatura)	LQ (ng g ⁻¹)	LQ (Literatura)	m_0 (pg)
Pb	1,60	1,6*	5,40	5,5*	23
Cr	2,84	1,7**	9,45	5,8**	4,0
Cd	0,60	0,54***	1,97	1,8***	0,79

* García et al. (2005a); ** García et al. (2005b); *** García et al. (2003)

Como pode ser observado na Tabela 13, os valores de LD foram baixos, na faixa de 0,60 a 2,84 ng g⁻¹ para Pb, Cd e Cr, seguindo uma sequência crescente com Cd < Pb < Cr. O LD maior para Cr pode ser atribuído ao alto sinal de absorbância referente ao reagente peróxido de hidrogênio, o qual estava presente em maior concentração na suspensão de mel. No entanto, os LD obtidos podem ser considerados adequados para o método analítico

proposto. Em relação ao LQ, os valores obtidos ficaram entre 1,97 a 9,45 ng g⁻¹, que são valores aceitáveis quando comparados a literatura.

Os valores de LQ e LD para Pb obtidos no trabalho foram similares aos apresentados por García *et al.* (2005a), que obtiveram valores de 1,6 e 5,5 ng g⁻¹ para LD e LQ, respectivamente. Deve-se levar em consideração que os autores utilizaram plataforma de L'vov como superfície de atomização, o que normalmente aumenta a sensibilidade do método. Além disso, eles relatam o uso de modificadores químicos, diferentemente do método adotado no presente trabalho, em que para Pb não é utilizado nenhum tipo de modificador.

Para cromo, os LD e LQ obtidos foram 2,8 e 9,4 ng g⁻¹, respectivamente. Esses valores são superiores aos apresentados por García *et al.* (2005b) que foram 1,7 e 5,8 ng g⁻¹ para LD e LQ, respectivamente. Porém, os autores utilizam Pd como modificador químico e plataforma de L'vov como superfície de atomização. Isso indica que os valores obtidos no presente trabalho são adequados, considerando que não se utilizou nenhum tipo de modificador para Cr e a superfície de atomização utilizada consistia apenas do tubo de grafite pirolítico.

Os valores de LD e LQ obtidos para Cd no presente trabalho foram similares aos apresentados por García *et al.* (2003). No referido trabalho os autores utilizaram plataforma de L'vov como superfície de atomização, o que proporciona um ambiente mais estável termicamente, proporcionando um aumento na sensibilidade do método. Viñas *et al.* (1997), também apresentam LD e LQ similares para Cd, em relação ao presente trabalho, com valores de 0,83 e 1,5 ng g⁻¹, respectivamente. Os autores utilizam NH₄H₂PO₄ como modificador de matriz e uma suspensão de mel com concentração de 60 g L⁻¹, além de utilizar plataforma de L'vov como superfície de atomização. Os baixos valores de LQ e LD para Pb, Cd e Cr alcançados neste trabalho indicaram elevada sensibilidade do método proposto.

A legislação brasileira fornece dados de LQ para Pb e Cd em mel como sendo 500 ng g⁻¹ (MAPA, 2009). Para Cr são apenas relatados dados em relação ao limite máximo permitido em mel, sendo este 100 ng g⁻¹ (ANVISA, 1965).

Além dos cálculos de LD e LQ, outra forma de avaliar a capacidade de quantificação de um analito através de um método proposto empregando espectrometria de absorção atômica é calcular a massa característica (m_0). A m_0 é definida como a massa do analito (em pg) que produz um sinal de absorbância integrada de 0,0044, ou 1% da absorbância (IUPAC, 1997; L'VOV *et al.*, 1986). Os valores de massa característica (m_0) variam de acordo com o

analito, com a superfície de atomização empregada, e com o gradiente de temperatura que ocorre no interior do tubo de grafite durante o aquecimento (DIONÍSIO *et al.*, 2011).

A equação 3 apresenta a fórmula para o cálculo de m_0 .

$$m_0 = \frac{\text{volume}_{\text{amostra}} \times \text{concentração}_{\text{analito}} \times 0,0044}{\text{Absorbância}} \quad \text{Equação (3)}$$

Os valores de m_0 obtidos para Pb, Cr e Cd estão descritos na Tabela 13. Para m_0 os valores foram baixos seguindo a ordem Cd < Cr < Pb. Isso indica que os métodos são sensíveis para determinação direta dos três elementos em mel. Esses resultados são similares aos apresentados em estudos prévios em que se utilizaram diferentes superfícies de atomização e modificadores de matriz, que normalmente, aumentam a sensibilidade instrumental (tubo de grafite com plataforma, atomizador aquecido transversalmente com plataforma de grafite integrada, entre outras). Na literatura, para m_0 são encontrados valores de 0,63 a 33 pg para Pb; 2,3 a 4,0 pg para Cr; e 0,7 a 1,3 pg para Cd (AJTONY *et al.*, 2007; GARCÍA *et al.*, 2005a; 2005b; GARCÍA *et al.*, 2003; PAES, 2007), valores próximos aos alcançados no presente trabalho.

5.3.3. Avaliação da precisão dos métodos desenvolvidos

A precisão do método desenvolvido neste trabalho também foi avaliada através dos testes de repetibilidade e precisão intermediária. A amostra de mel (modelo) enriquecida com os elementos de interesse foi preparada várias vezes nas mesmas condições, no mesmo dia (repetibilidade) e em dias diferentes (precisão intermediária). As amostras foram analisadas por GF AAS com condições previamente otimizadas, em que as medidas foram realizadas no mesmo dia em que se prepararam as amostras. Os resultados da precisão podem ser expressos pela estimativa de desvio padrão ou coeficiente de variação (CV) que normalmente também é chamado de estimativa de desvio padrão relativo (RSD). Os valores de RSD foram obtidos pela Equação 4 (DOQ-CGCRE-008, 2011):

$$RSD\% = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

onde s representa a estimativa de desvio padrão das replicatas e \bar{x} é a média das replicatas realizadas.

Como o teste de precisão foi realizado em um único laboratório, pelo mesmo analista, além de calcular-se a precisão intermediária (reprodutibilidade) com medidas em dias diferentes, foi determinada a precisão intermediária do método (GONZÁLES *et al.*, 2010).

Na literatura, trabalhos de autores como Jain e Arnold (2007) e Gonzáles *et al.* (2010), trazem que a precisão intermediária pode ser dada pela equação de Horrat, Equação 5.

$$Horrat = \frac{RSD_{ri}}{PRSD_r} \quad \text{Equação (5)}$$

onde RSD_{ri} , é o desvio padrão relativo para análises em dias diferentes, e $PRSD_r$, é o desvio padrão relativo predito que é dado pela Equação 6.

$$PRSD_r \% = 2C^{-0,15} \quad \text{Equação (6)}$$

onde C é a concentração do analito de interesse adicionado na amostra de mel, sendo esta expressa em massa com unidade de $\mu\text{g g}^{-1}$ (JAIN E ARNOLD, 2007).

No cálculo da Equação de Horrat foi utilizado software Gnumeric (*Freestistics*, 2012).

A Tabela 14 mostra os dados de precisão para Cr, Cd e Pb obtidos no trabalho.

Tabela 14. Avaliação da precisão do método para determinação direta de Pb, Cd e Cr em mel.

Elemento	Repetibilidade (% RSD)	Precisão Intermediária	
		RSD (%)	Valor de Horrat
Pb	4,3	9,1	0,69
Cd	5,4	6,1	0,27
Cr	2,8	4,4	0,28

Na Tabela 14, é possível observar que para repetibilidade, os valores de RSD variaram entre 2,8 a 5,4%, enquanto para precisão intermediária os valores de RSD ficaram na faixa de 4,4 a 9,1%. Esses valores são adequados, pois ficaram abaixo de 10%, considerando que o limite recomendado para concentrações traço é de 20% (WOOD, 1999). Na literatura podem ser encontrados valores de RSD entre 5 e 10% para Pb e Cd (GARCÍA *et al.*, 2003; GARCÍA *et al.*, 2005a; VIÑAS *et al.*, 1997) e 10% para Cr (GARCÍA *et al.*, 2005b). Portanto, os resultados obtidos para RSD neste trabalho sugerem que o método desenvolvido para determinação de Pb, Cd e Cr em mel é preciso.

No cálculo do valor de Horrat (Tabela 14) obtido para precisão intermediária na determinação direta de Pb, Cd e Cr em mel os valores foram menores que 0,7 para os três metais. Segundo a literatura, os valores aceitos para precisão intermediária de análises intra-

laboratoriais devem ser menores que 1,3 (GONZÁLES *et al.*, 2010). Isso indica que os valores alcançados no estudo são adequados e sugerem boa precisão ao método.

5.3.4. Avaliação da exatidão dos métodos desenvolvidos

Outros ensaios de validação dos métodos propostos neste trabalho consistiram em realizar testes a fim de avaliar a exatidão do método. Normalmente a exatidão de um método é avaliada pelo uso de materiais de referência certificados (MRC), comparações de resultados interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (DOQ-CGCRE-008, 2011). Neste trabalho optou-se por realizar testes de recuperação em triplicata, a fim de obter dados confiáveis (desvio padrão das medidas) em relação à concentração do analito a ser recuperada.

Assim, a amostra modelo de mel foi enriquecida com Pb, Cd e Cr com concentrações na faixa de 11 a 214 ng g⁻¹. A faixa de concentração escolhida levou em consideração as concentrações desses elementos normalmente encontradas em amostras de mel. Inicialmente foram quantificadas as concentrações de Pb, Cr e Cd na amostra de mel antes do enriquecimento. Posteriormente, as amostras enriquecidas com os elementos foram analisadas. As concentrações determinadas foram utilizadas no cálculo de recuperação.

Para melhor avaliar os resultados de recuperação foi realizado um teste estatístico, teste *t*, em um nível de confiança de 95%. O teste *t* foi calculado através da Equação 7 (VAN DER VOET *et al.*, 1999; BRITO *et al.*, 2003).

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\text{recuperação}_{\text{média}} - 100}{\frac{s}{\sqrt{n - 1}}} \quad \text{Equação (7)}$$

onde *recuperação*_{média}, *s*, e *n* referem-se ao valor médio da recuperação de cada metal em mel, a estimativa de desvio padrão das replicatas da recuperação, e o número de replicatas realizadas para o teste de recuperação, respectivamente.

Os resultados dos testes de recuperação por adição de padrão e a avaliação estatística encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15. Resultados de recuperação por adição de padrão para Pb, Cd e Cr em mel.

	Concentração Inicial no mel (ng g⁻¹)	Conc. Adicionada no mel (ng g⁻¹)	Conc. Total (ng g⁻¹)	Conc. Determinada (ng g⁻¹)	Recuperação (%)	<i>t</i>_{calculado}
Pb	< LQ	71	71	69 ± 14	97	0,215
		210	210	207 ± 8	99	0,372
Cr	86,0	86	172	174 ± 17	101	0,143
		143	229	209 ± 10	91	2,893
Cd	5,7	11	16,7	16 ± 1	95	1,198

Com relação à Tabela 15 pode-se observar que a faixa de recuperação dos metais em mel ficou em uma faixa de 95 - 101%. Esses resultados são adequados em toda faixa de concentração, pois estão dentro de um limite aceitável de $100 \pm 10\%$, em relação à grandeza de concentração estudada (WOOD, 1999). Os valores obtidos para *t*_{calculado} de cada suspensão de mel enriquecida com Pb, Cd e Cr foram menores que o *t*_{crítico} (4,303) para os graus de liberdade avaliados e no nível de 95% de confiança. Esses resultados mostraram que não existe diferença significativa entre o valor da recuperação obtida e o valor de recuperação esperada para cada concentração. Portanto, pode-se sugerir que o método desenvolvido para determinação direta de Pb, Cd e Cr em mel é exato.

Em virtude de todos os resultados apresentados nos testes para validação da metodologia, pode-se concluir que os métodos propostos para determinação de Pb, Cd e Cr em mel apresentaram precisão, exatidão, linearidade e limites de detecção e quantificação adequados. Isso permite que o método seja considerado válido para aplicação em diferentes amostras de mel.

5.4. Aplicação do Protocolo Analítico em Amostra de Mel do Paraná, Brasil

Após ter-se definido a metodologia ótima para determinação direta de chumbo, cromo e cádmio em mel por GF AAS, realizou-se a aplicação do método analítico desenvolvido em amostras de méis coletadas em diferentes regiões do Estado do Paraná, Brasil (Tabela 4). Na Tabela 16 são apresentados os valores de concentração de Pb, Cd e Cr encontrados nas 52 amostras de mel analisadas, separadas pela mesorregião a que pertencem.

Tabela 16. Teores de Pb, Cd e Cr encontrados nas 52 amostras de mel de diferentes regiões do Estado do Paraná.

*ID	Amostra	Messoregião	Concentrações (ng g ⁻¹)		
			Cromo	Chumbo	**Cádmio
1	Campina do Simão		80 ± 1,1	304 ± 2,0	11,9 ± 0,25
46	Campina do Simão		83 ± 2,8	206 ± 10,8	2,89 ± 0,04
2	Rio Piquiri		87 ± 6,1	159 ± 6,2	16,3 ± 1,48
3	Candói		90 ± 6,3	413 ± 1,5	7,4 ± 0,15
4	Laranjeiras do Sul		85 ± 3,3	269 ± 9,7	13,4 ± 0,15
26	Laranjeiras do Sul		94 ± 2,5	126,3 ± 0,0	< LQ
44	Laranjeiras do Sul		58,3 ± 0,2	220 ± 0,0	2,4 ± 0,21
25	Guarapuava	Centro- Sul	94 ± 3,1	141 ± 7,0	< LQ
5	Guairacá		83 ± 6,9	228 ± 7,7	8 ± 0,76
49	Guairacá		54,9 ± 0,8	214 ± 6,2	2,74 ± 0,09
8	Reserva indígena de Marrecas		88 ± 7,3	193 ± 4,6	6,3 ± 0,16
9	Faxinal dos Ribosinos		61 ± 1,7	271 ± 1,5	7 ± 0,13
48	Faxinal dos Ribosinos		75 ± 7,1	289 ± 1,5	5,6 ± 0,43
30	Cantagalo		80 ± 8,0	139 ± 3,5	< LQ
43	Marquinho		67 ± 7,3	321 ± 7,7	3,6 ± 0,25
45	Nova Laranjeiras		96 ± 4,6	281 ± 9,2	4 ± 0,29
6	Despraiado-Relógio		99 ± 10,7	165 ± 7,7	8,3 ± 0,72
15	Marcondes		93 ± 7,4	305 ± 8,2	4,5 ± 0,37
16	Linha Brasília		89 ± 9,1	196 ± 9,2	9 ± 0,57
10	Divisa Guamiranga e Prudentópolis	Sudeste	97 ± 9,8	204 ± 10,8	5,8 ± 0,16
13	Divisa Guamiranga e Prudentópolis		93 ± 9,0	171 ± 7,7	7,4 ± 0,71
14	Divisa Guamiranga e Prudentópolis		87 ± 5,7	159 ± 6,2	8,4 ± 0,31
17	Barra Grande		98 ± 1,9	368 ± 8,2	4,5 ± 0,34
18	Barra Mansa		98 ± 1,4	151 ± 2,3	3,4 ± 0,29
19	Esperança		88 ± 4,2	125 ± 3,5	< LQ
11	Cruz Machado		89 ± 1,7	144 ± 6,2	7,2 ± 0,00
7	Cruz Machado	88 ± 8,1	116 ± 3,1	7,5 ± 0,51	
34	Bituruna		97 ± 9,8	86 ± 8,2	< LQ
22	Terra Roxa		98 ± 3,0	334 ± 4,7	< LQ
24	Entre Rios do Oeste		95 ± 4,2	111 ± 7,0	< LQ
27	Santa Helena		76 ± 5,0	138 ± 7,0	2,1 ± 0,17
28	Quatro Pontes		82 ± 1,5	95 ± 4,7	< LQ
31	Mercedes		86,2 ± 0,3	122 ± 8,2	< LQ
33	Toledo		64 ± 1,7	129 ± 5,9	< LQ
38	Nova Santa Rosa	Oeste	81 ± 2,4	356 ± 7,0	< LQ
41	Palotina		132 ± 1,1	185 ± 6,2	2,2 ± 0,20
23	Cascavel		93 ± 6,6	149 ± 1,2	< LQ
40	Guaraniaçu		97,3 ± 0,4	280 ± 8,2	3,31 ± 0,03
29	Missal		80 ± 5,9	164 ± 7,0	7,3 ± 0,71
32	Céu Azul		46 ± 4,0	107 ± 3,5	< LQ
52	Foz do Iguaçu		99 ± 9,7	231 ± 3,1	6,2 ± 0,08
35	Rolândia		96 ± 9,8	186 ± 2,3	< LQ
37	Londrina		90 ± 1,0	167 ± 5,9	< LQ
36	Maringá	Norte Central	85 ± 6,4	173 ± 2,3	< LD
12	Manoel Ribas		98 ± 5,7	225 ± 6,2	10 ± 0,67
47	Manoel Ribas		71 ± 7,5	231 ± 6,2	6 ± 0,58
21	Pérola	Noroeste	99,3 ± 0,8	142 ± 5,9	< LQ
39	Altônia		106,4 ± 0,0	145 ± 7,0	< LQ
50	Curitiba		86,1 ± 0,7	185 ± 3,1	4,1 ± 0,20
51	Paranaguá	Metropolitana	84 ± 2,5	204 ± 4,6	4,13 ± 0,04
20	Quarto Centenário	Centro Ocidental	82 ± 5,7	130 ± 3,5	2,4 ± 0,19
42	Realeza	Sudoeste	108 ± 4,0	231 ± 6,2	5,8 ± 0,33

*ID: Identificação das amostras de mel; **LQ: 2,0 ng g⁻¹ para Cd.

De modo geral, é possível observar pela Tabela 16 que foram quantificados todos os analitos nas amostras, com exceção de Cd. Para algumas amostras, os teores de Cd foram

inferiores ao limite de quantificação que é $2,0 \text{ ng g}^{-1}$. Os teores médios dos elementos seguiram a ordem de $\text{Pb} > \text{Cr} \gg \text{Cd}$, com valores médios de $200 \pm 76 \text{ ng g}^{-1}$; $88 \pm 14 \text{ ng g}^{-1}$; e $4,1 \pm 4 \text{ ng g}^{-1}$ para Pb, Cr e Cd, respectivamente. A mediana para amostras foi 185; 88,5 e $3,5 \text{ ng g}^{-1}$ para Pb, Cr e Cd, respectivamente. A ordem de concentração encontrada para o mel paranaense está concordante com dados de outros méis apresentados na literatura (VIÑAS *et al.*, GARCÍA *et al.*, 2003; GARCÍA *et al.*, 2005a; 2005b). Se relacionar os teores desses elementos presentes no mel com a presença desses elementos no ambiente, os dados para os méis estão concordantes uma vez que normalmente os teores de cádmio são inferiores a Pb e Cr. Contudo, Pb e Cr são elementos considerados tóxicos, pois não apresentam função biológica conhecida e para uma melhor qualidade do mel paranaense seria indicado a ausência ou teores baixos para esses elementos. O cromo pode ser considerado um micronutriente, se presente na forma de cromo trivalente (Cr^{3+}).

Pela grande quantidade de dados apresentados na Tabela 16, foram construídos gráficos para ilustrar melhor os resultados. As Figuras 21, 22 e 23 mostram resultados para Pb, Cr e Cd, respectivamente, para as amostras de mel paranaense.

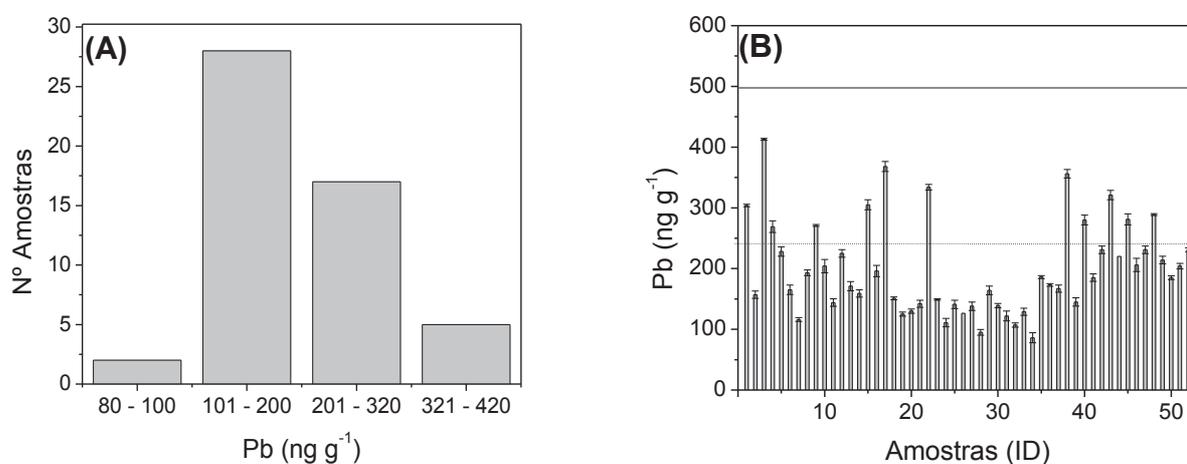


Figura 21. Resultados obtidos na quantificação de chumbo em amostras de mel do Estado do Paraná. (A) Histograma da concentração de Pb em 52 amostras de mel. (B) Concentrações de Pb para 52 amostras, linha tracejada refere-se a concentração média das amostras; linha contínua refere-se ao limite máximo permitido pela legislação brasileira de Pb em mel (500 ng g^{-1}).

A Figura 21A mostra a distribuição das amostras de mel paranaenses entre diferentes faixas de concentração de chumbo. Dentre as 52 amostras de mel analisadas, todas apresentam teores superiores ao limite de quantificação ($5,4 \text{ ng g}^{-1}$). Duas amostras apresentaram os menores teores de Pb, e 45 amostras (86,5% do total) apresentaram teores

entre 101 e 320 ng g⁻¹. Cinco amostras apresentaram teores mais elevados do elemento, com teor máximo de 413 ng g⁻¹. A Figura 21B mostra os níveis de Pb quantificados nas 52 amostras de mel do Paraná e nota-se que os teores apresentaram grande variabilidade. As concentrações de Pb foram elevadas e variaram de 86 a 413 ng g⁻¹ com teor médio de 200 ± 76 ng g⁻¹. A amostra com menor concentração de Pb foi coletada em Rolândia, na região Norte Central. Essa cidade apresenta como atividade majoritária a agropecuária, com pouca atividade industrial. A amostra com maior concentração de Pb foi encontrado para a amostra de Candói – mesorregião Centro-Sul, uma cidade com economia agrícola, porém é uma importante rota de tráfego rodoviário do Estado, o que pode influenciar no elevado teor de poluentes atmosféricos, devidos as fumaças dos veículos.

Os teores encontrados neste trabalho foram bastante superiores às concentrações de Pb em méis da Galícia na Espanha, onde o teor de Pb não passa de 75 ng g⁻¹ (GARCÍA, *et al.* 2005a). Contudo, é conhecido que os teores de metais em mel podem variar bastante de país para país, pois dependem de fatores como localização geográfica, clima, atividades humanas e diferenças florais.

Os teores de Pb em países como Índia e Itália variam entre 3 a 920 ng g⁻¹ (BULDINI *et al.*, 2001).

Na literatura, alguns estudos indicam que o mel pode ser um biomarcador de contaminação ambiental por chumbo. Lambert *et al.* (2012), ao avaliarem abelhas, mel e pólen de diferentes apiários de Pays de la Loire (França) como marcadores de contaminação ambiental por Pb, verificaram que a vizinhança dos apiários influenciava nos teores de Pb. Eles observaram que apiários próximos a lugares mais urbanizados, com pequenas indústrias, apresentaram maiores teores de Pb em mel se comparados a apiários que não eram muito afetados por fontes antrópicas. A variação do teor de Pb em mel em relação a todos os apiários estudados foi de 0,004 a 0,378 µg g⁻¹.

Com relação à legislação brasileira para teor máximo de contaminantes inorgânicos em mel, considera-se como limite tolerável 500 ng g⁻¹ de Pb em mel (MAPA, 2009). Os teores deste metal obtido nos méis paranaenses estão abaixo do limite tolerável, porém grandes diferenças nos teores de Pb de uma amostra ou conjunto de amostras em relação a outras sugerem que pode existir contaminação por chumbo em alguns méis do Estado do Paraná.

Com relação ao cromo, os resultados obtidos para os méis paranaenses encontram-se na Figura 22.

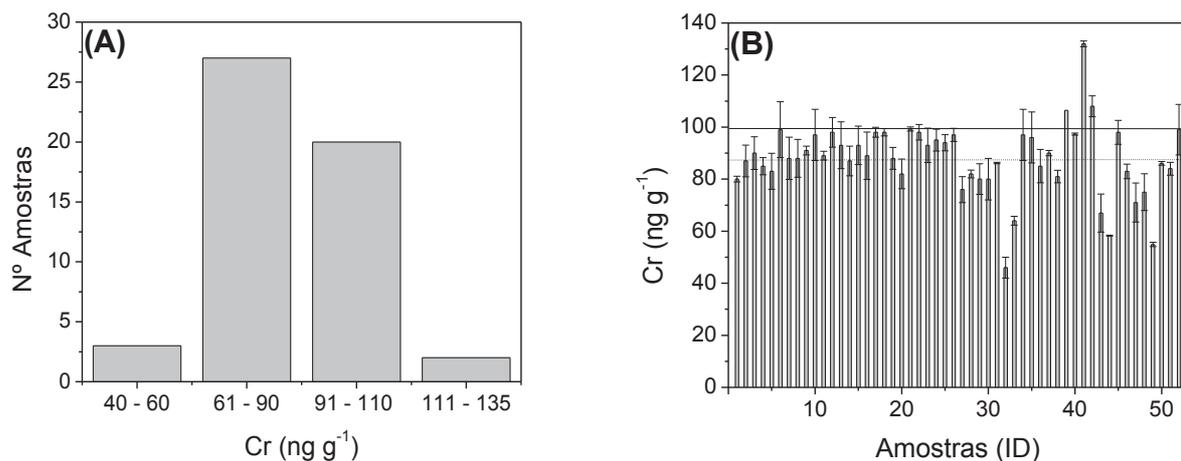


Figura 22. Resultados obtidos na quantificação de cromo em amostras de mel do Estado do Paraná. **(A)** Histograma da concentração de Cr em 52 amostras de mel. **(B)** Concentrações de Cr para 52 amostras, linha tracejada refere-se à concentração média das amostras; linha contínua refere-se ao limite máximo permitido pela legislação brasileira de Cr em mel (100 ng g^{-1}).

A Figura 22A mostra a distribuição das amostras de mel entre diversas faixas de concentração de Cr. Todas as amostras de mel analisadas apresentam teores superiores a $9,4 \text{ ng g}^{-1}$. Dentre as 52 amostras, 3 apresentaram os menores teores de cromo, e 90% das amostras (47) apresentaram teores na faixa de 61 a 110 ng g^{-1} . Apenas duas amostras apresentaram teores mais elevados do elemento (teor máximo de 135 ng g^{-1}).

A Figura 22B mostra que os níveis de Cr determinados nas 52 amostras de mel do Paraná apresentaram pequena variação, pois a grande maioria das amostras teve teores similares à média $88 \pm 14 \text{ ng g}^{-1}$ de Cr. As concentrações de Cr foram intermediárias em relação às concentrações de Cd e Pb determinadas nos méis paranaenses e variaram entre 46 e 132 ng g^{-1} .

A amostra com menor concentração de Cr foi coletada em Céu Azul, mesorregião Oeste. Essa cidade apresenta população estimada em 11.032 habitantes com atividade majoritária na área da agropecuária e com pouca atividade industrial, sendo relatado em 2010 apenas 5 estabelecimentos de indústria metalúrgica com 7 empregos (IPARDES, 2011). A amostra com maior concentração também foi encontrada na região Oeste, amostra de Palotina. A região de Palotina apresenta uma população maior, com 28907 habitantes. Além disso, apresenta uma maior atividade metalúrgica, com 14 estabelecimentos e 64 empregos (IPARDES, 2011).

Os teores encontrados para cromo neste trabalho foram mais elevados quando comparados às concentrações encontradas em méis da Galícia (Espanha), que compreende

uma faixa de 5,75 a 26,4 ng g⁻¹ (GARCÍA, *et al.* 2005b). Os méis da Hungria apresentam teores de Cr similares aos alcançados neste trabalho, com faixa de concentração entre 1,8 e 109 ng g⁻¹ (AJTONY *et al.*, 2007).

A legislação brasileira considera como limite tolerável de Cr em mel, 100 ng g⁻¹ (ANVISA, 1965). A quantificação de Cr em amostras de méis paranaenses mostrou que algumas amostras tiveram níveis maiores do que permite a legislação brasileira para este metal. Isso pode sugerir que essas amostras tenham sofrido um processo de contaminação, já que os teores de Cr na maior parte das amostras de mel foram similares.

Com relação ao cádmio, os resultados obtidos para os méis paranaenses encontram-se na Figura 23.

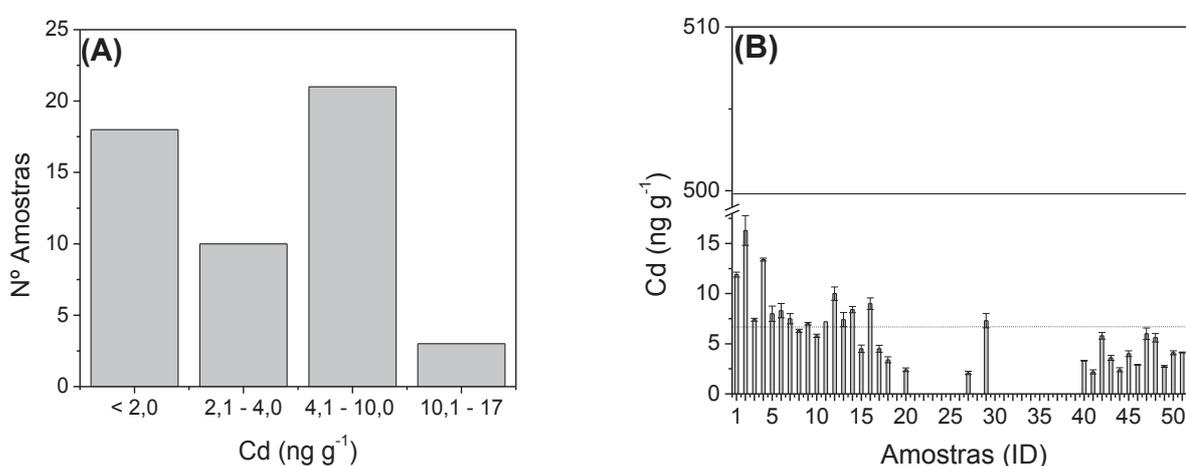


Figura 23. Resultados obtidos na quantificação de cádmio em amostras de mel do Estado do Paraná. (A) Histograma da concentração de Cd em 52 amostras de mel. (B) Concentrações de Cd para 52 amostras, linha tracejada refere-se a concentração média das amostras; linha contínua refere-se ao limite máximo permitido pela legislação brasileira de Cd em mel (500 ng g⁻¹).

A Figura 23A mostra a distribuição das amostras de mel entre diversas faixas de concentração de Cd. Dentre as 52 amostras de mel analisadas, 18 amostras (34,6%) apresentaram teores inferiores ao limite de quantificação (2,0 ng g⁻¹). 31 amostras de mel apresentaram teores intermediários de Cd na faixa entre 2,1 e 10 ng g⁻¹. Apenas três amostras apresentaram teores mais elevados do elemento, na faixa entre 10,1 e 17 ng g⁻¹.

A Figura 23B mostra que os níveis de Cd determinados nas 52 amostras de mel do Paraná apresentaram uma relativa variação em função do local de coleta. As concentrações de Cd foram baixas e variaram entre < 2,0 e 16,3 ng g⁻¹, com teor médio de 4,0 ± 4 ng g⁻¹.

A amostra com menor concentração determinada de Cd (excluindo amostras com teor inferior a 2,0 ng g⁻¹) foi coletada na Mesorregião Oeste, em Santa Helena. Entre as amostras nas quais não se detectou Cd, 8 são da mesorregião Oeste, 3 das mesorregiões Centro-sul e Norte Central (3 para cada), 2 amostras cada para as mesorregiões Sudeste e Noroeste. A amostra com maior concentração foi coletada no Rio Piquiri, divisa entre Campina do Simão e Santa Maria do Oeste, na Mesorregião Centro-Sul.

Os níveis de Cd dos méis paranaenses foram bem inferiores aos encontrados em países como Índia e Grécia (1-305 ng g⁻¹) (BULDINI *et al.*, 2001; IOANNIDOU *et al.*, 2005), porém grande parte das amostras apresentaram concentrações de Cd que ficaram próximas da faixa de concentração de países como a Hungria (0,8 a 3,3 ng g⁻¹) (AJTONY *et al.*, 2007).

Com relação à legislação brasileira para teor máximo de Cd em mel, considera-se como limite tolerável 500 ng g⁻¹ (MAPA, 2009). Os teores deste metal obtido nos méis paranaenses estão bem abaixo do limite tolerável, porém, dentro do grupo, algumas amostras de mel apresentaram teores um pouco mais elevados de Cd se comparados ao restante das amostras, o que pode sugerir a existência de contaminação por cádmio em algumas localidades do Estado. Comparando dados para Pb, maiores teores para esse elemento foram obtidos nos méis da região Centro-Sul, portanto é interessante avaliar os dados para os metais em função da origem geográfica. A Figura 24 mostra os teores médios para os metais determinados em função da origem geográfica.

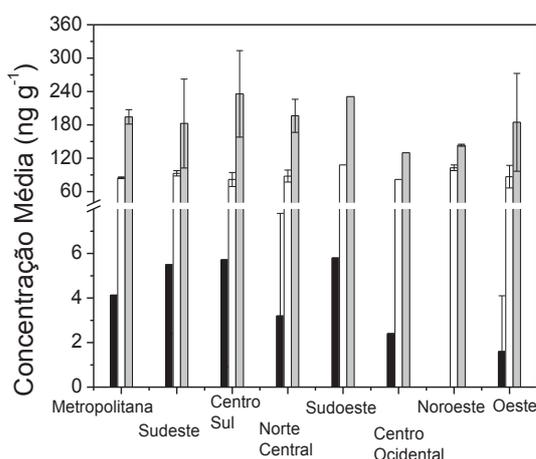


Figura 24. Relação entre as concentrações médias de Pb (cinza), Cr (branco) e Cd (negro) determinadas em amostras de mel em função da origem geográfica representada pelas Mesorregiões do Estado do Paraná, Brasil.

A Figura 24 mostra os níveis médios dos elementos traço determinados nas 52 amostras de mel do Paraná. É possível notar que avaliando as concentrações médias dos metais não foram observadas diferenças evidentes ou significativas nos teores em função da

origem da amostra. Para cádmio, notam-se teores médios superiores para amostras coletadas nas regiões Sudeste, Centro Sul e Sudoeste que são mesorregiões que fazem divisa entre si. Para cromo, as concentrações médias não sofreram influência em função da localização geográfica. Pode-se observar também, que as amostras das mesorregiões Centro Ocidental e Noroeste apresentaram teores médios inferiores para chumbo. Esses resultados podem indicar que Pb e Cd possivelmente poderiam diferenciar as amostras de mel do Estado do Paraná em função da sua localização geográfica e também possivelmente poderiam atuar como bioindicadores de contaminação ambiental do Estado do Paraná. Contudo, avaliações mais profundas devem ser realizadas com auxílio de ferramentas quimiométricas que realizam análises de modo multivariado. Para tal, foi aplicada a análise dos componentes principais (PCA).

5.5. Análise Estatística dos Teores de Pb, Cd e Cr em Amostras de Mel do Estado do Paraná empregando Análise dos Componentes Principais (PCA)

A análise dos componentes principais (PCA) é uma ferramenta quimiométrica baseada em um projeto de dados multidimensionais que são dispostos em diferentes coordenadas de um gráfico, dependendo da variância máxima e da correlação mínima entre esses dados. Os dados experimentais são transformados dentro de coordenadas 2D ou 3D, que correspondem aos gráficos de escores, mostrando a relação entre esses valores experimentais. Os grupos de valores que são formados no gráfico de escores podem ser usados na classificação/separação de amostras com dados similares (WEI *et al.*, 2010). A PCA é um método que visa à análise exploratória de dados, considerando todas as variáveis envolvidas. Para isso, os fatores principais (PCs) identificados devem melhor explicar a variabilidade que possa existir nessa matriz dos dados (PELLERANO *et al.*, 2012).

No presente trabalho, os parâmetros utilizados para a análise de componentes principais foram Pb, Cd, Cr, mesorregião e microrregião.

A partir dos parâmetros utilizados foi construída uma matriz de dados de dimensão que corresponde aos cinco parâmetros e seus respectivos valores obtidos para 52 amostras de mel do Estado do Paraná. Os dados originais foram autoescalados e utilizados para gerar o modelo de regressão multivariada. A Figura 25 mostra a porcentagem de variância capturada para cada uma das cinco componentes principais fornecidas e a variância capturada na análise de PCA.

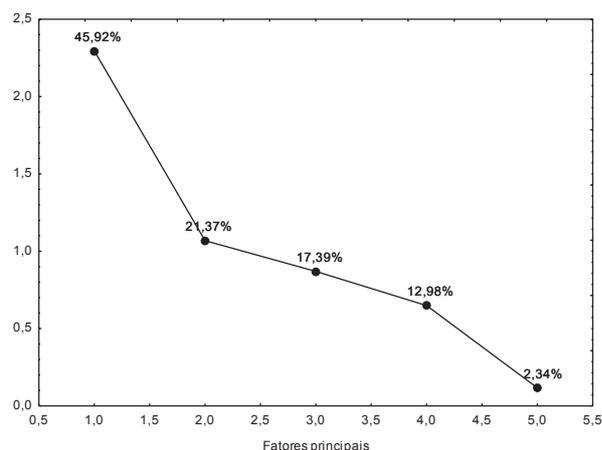


Figura 25. Principais fatores de correlação entre as amostras de mel e suas variáveis.

A Figura 25 mostra a variância capturada, em termos percentuais, para cada componente principal durante a análise multivariada. A 1ª e 2ª componentes principais foram suficientes para explicar 67,29% de toda a variância dos dados, sendo que a primeira componente foi responsável por explicar 45,92% da relação existente entre as variáveis. A explicação de 67% da variância dos dados pelas duas componentes é satisfatória, pois os parâmetros utilizados apresentam certa variabilidade em função de aspectos como clima, posição geográfica, atividades antrópicas, etc.

Na Tabela 17 são observados os escores das cinco variáveis estudadas para os dois fatores principais, PC1 e PC2, mostrando a correlação entre essas variáveis.

Tabela 17. Escores das variáveis Cr, Pb, Cd, meso e microrregião dos PC1 e PC2 das amostras de mel.

Variáveis	PC1	PC2
Cromo	0,221924	0,761715
Chumbo	-0,464479	0,510885
Cádmio	-0,629640	0,404257
Mesorregião	0,903869	0,190942
Microrregião	0,904088	0,166136

Com base na Tabela 17, é possível observar pela primeira componente principal (PC1) que existe uma relação entre as variáveis, chumbo e cádmio, para as amostras de mel. Além disso, nota-se que há uma relação inversamente proporcional entre Pb, Cd e as variáveis cromo, mesorregião e microrregião. Para segunda componente (PC2) existe um elevado coeficiente de correlação para as variáveis Cr, Pb e Cd. Para as variáveis meso e microrregião, os coeficientes de correlação não foram tão significativos em relação às outras três variáveis.

A Figura 26 mostra o gráfico de escores para as duas primeiras componentes principais. Neste gráfico é possível observar um agrupamento das amostras de mel analisadas, ou seja, uma distribuição espacial das amostras, em função da influência de cada um dos parâmetros. A Figura 27 apresenta o gráfico de pesos obtido que mostra a influência dos parâmetros correlacionada com o gráfico de escores (Fig. 26) através da distribuição das variáveis nos quadrantes formados pela intersecção de PC1 e PC2.

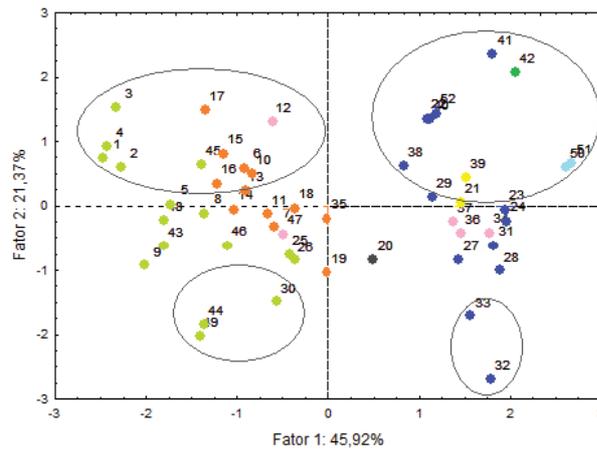


Figura 26. Gráfico de escores para as componentes principais 1 e 2 obtidas com a análise multivariada dos dados para méis do Paraná. Números de 1 a 52 referem-se à identificação das amostras de mel e cores as mesorregiões. Mesorregiões: ● Sudeste; ● Centro Sul; ● Oeste; ● Norte Central; ● Noroeste; ● Metropolitana; ● Centro Ocidental; ● Sudoeste.

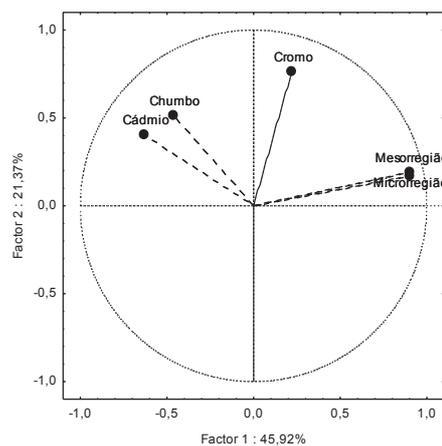


Figura 27. Gráfico de pesos para PC1 e PC2 obtido através da análise multivariada dos dados.

Avaliando os dados contidos na Figura 26 nota-se que apenas a primeira componente principal foi responsável pela separação das amostras de mel em função da sua distribuição geográfica por mesorregiões. Em relação à PC1 (eixo X) as amostras de mel pertencente às

mesorregiões Centro-Sul e Sudeste encontram-se à esquerda do gráfico (eixo negativo de X). Enquanto que as amostras das mesorregiões Oeste, Noroeste, Metropolitana, Centro Ocidental, Sudoeste e Norte Central encontram-se à direita do gráfico (eixo positivo de X). Através da avaliação conjunta da Figura 26 e 27 nota-se que os teores de Pb e Cd (elementos não essenciais) encontram-se relacionados com as mesorregiões Centro-Sul e Sudeste. Enquanto que o elemento Cr encontra-se associado às outras 6 mesorregiões, locais onde foram coletadas as amostras de mel.

A segunda componente principal, responsável pela explicação de 21,37% da variabilidade dos dados, foi responsável pela separação das amostras de mel em função dos teores de elementos traço (Pb, Cr e Cd). Observa-se que algumas amostras de mel das mesorregiões Sudeste, Centro-Sul, Oeste, Metropolitana e Sudoeste encontram-se acima da linha correspondente a 2ª componente principal (eixo y) que divide horizontalmente o gráfico em duas partes. Essas amostras contêm concentrações mais elevadas dos elementos traço no mel. As amostras localizadas no quadrante negativo em relação ao eixo X e positivo do eixo Y e distantes da linha zero “0” apresentam teores mais elevados de Cd e Pb. As amostras localizadas na linha zero apresentam pouca significância em relação aos parâmetros estudados. De modo oposto, as amostras localizadas no quadrante negativo em relação ao eixo X e Y e distantes da linha 0 apresentam teores inferiores para os elementos Cd e Pb.

As amostras de mel localizadas no quadrante positivo em relação ao eixo X (PC1) e eixo Y (PC2) e distantes da linha zero apresentam teores mais elevados para cromo. Conseqüentemente, as amostras localizadas no quadrante positivo em relação PC1 e negativo da PC2, distantes da linha 0, apresentam teores inferiores para cromo.

Portanto, com a análise de componentes principais nota-se que a característica do mel paranaense, em termos da presença de metais traço, depende da sua origem geográfica. Além disso, algumas amostras se destacam em relação às demais por apresentarem teores superiores desses elementos, o que pode estar relacionado com processos de contaminação ambiental. Assim, os resultados parecem indicar que o mel se mostrou como um bioindicador de contaminação ambiental no Estado do Paraná, Brasil. Esses resultados são inéditos frente à bibliografia nacional e internacional, pois nenhum estudo brasileiro com méis e metais traço levantou essa hipótese.

Alguns aspectos observados na PCA serão discutidos mais detalhadamente.

Através da PC1 (Figura 26) nota-se que as amostras de mel das mesorregiões Centro-Sul e Sudeste encontram-se separadas no eixo negativo de X, ou seja, essas amostras apresentam uma similaridade em relação às variáveis (concentrações dos metais traço). Essas mesorregiões tem localização próxima (Figura 5). As amostras 12 e 47 também se encontram na mesma posição do gráfico. Essas amostras foram coletadas em Manoel Ribas da microrregião Ivaiporã e da mesorregião Norte Central em diferentes períodos 2010 e 2011. As amostras 12 e 47 foram tratadas como exceção frente à quantidade de amostras das outras mesorregiões. É importante conhecer algumas características dessas regiões.

Segundo o IparDES – Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social (IPARDES, 2012) a mesorregião Centro-Sul Paranaense é formada pela união de 29 municípios onde se destacam Guarapuava e Palmas em função das suas dimensões populacionais. A ocupação do seu território baseou-se em grandes propriedades rurais com atividades de cunho extensivo e extrativo. A pequena base populacional e a baixa densidade de ocupação mantêm essa mesorregião como uma das menos urbanizadas do Paraná. Isso é reforçado pelo fato da mesorregião concentrar 34% das famílias assentadas em projetos de reforma agrária e 62% das áreas indígenas do Paraná. Em relação à proteção ambiental, a região concentra 15% da cobertura florestal estadual remanescente, além de uma importante extensão de área reflorestada. Essa mesorregião é caracterizada por ser uma região de baixa urbanização e com baixos indicadores sociais, representando a região de maior pobreza no Estado do Paraná. Além disso, a agropecuária é a principal atividade econômica e em termos industriais destacam-se as atividades de papel e gráfica, madeira, alimentação e bebidas.

A mesorregião Sudeste é formada pela união de 21 municípios onde se destaca Irati e União da Vitória em função das suas dimensões populacionais. Apresenta uma das menores bases populacionais e em 1/3 dos municípios, a taxa de pobreza é superior a 40%, o que representa mais que o dobro da média do Estado. Do total da população, 46% das pessoas vivem em áreas rurais e a estrutura fundiária tem se mantido estável, conservando a expressividade dos produtores familiares. Em relação ao meio ambiente, a região preserva o maior contingente de floresta de araucárias no Paraná, sendo a terceira área que mais contribui para o estoque florestal e de reflorestamento do Estado.

Dentre as amostras de mel obtidas nas mesorregiões Centro-Sul e Sudeste destacam-se o grupo formado pelas amostras 1, 2, 3, 4 e 45 (Centro-Sul); 6, 10, 13, 15, 16,17 (Sudeste) e 12 (Norte Central), devido as concentrações mais elevadas de Pb e Cd.

As amostras 1, 2, 3 e 4 são as que apresentam um maior teor de Cd e Pb; há uma relação muito forte entre si, devido a proximidade na distribuição espacial das amostras na PCA. Essas amostras fazem parte da mesorregião Centro-Sul e microrregião de Guarapuava e foram coletadas em Campina do Simão, Rio Piquiri (na divisa de Campina do Simão e Santa Maria do Oeste), Candói e Laranjeiras do Sul, respectivamente.

Essas amostras podem indicar algum processo de contaminação ambiental nas regiões onde foram coletadas, pois o mel produzido reproduz as condições ambientais. Essa hipótese é baseada no fato que a amostra 8 (Turvo- Reserva Indígena de Marrecas) que pode ser considerada uma amostra referência da região, pois trata-se de uma região não urbanizada, área de preservação ambiental, baixa influência de atividades antrópicas, ter apresentado teores de Cd e Pb não significativos (localizada próximo a linha zero). Além disso, a amostra 1 foi coletada na mesma região que a amostra 46, porém em períodos distintos. E a amostra 4 foi coletada na mesma região das amostras 26 e 44. Nota-se que as amostras 26, 44 e 46 apresentaram comportamento diferente da 1 e 4, respectivamente, pois localizam-se na PCA no quadrante referente às baixas concentrações de Cd e Pb.

As cidades de Campina do Simão, Candói e Laranjeiras do Sul tem sua economia baseada na atividade agrícola, mas sua economia também tem uma expressiva participação industrial (IPARDES, 2012). Isso pode sugerir uma explicação para a quantidade mais elevada para Cd e Pb no mel desta localidade, aspectos como a falta de tratamento adequado de efluentes domésticos e rurais, água de escoamento rural (ruoff) e atividade agrícola devido a presença de resíduos de fertilizantes e agrotóxicos que contém metais tóxicos podem contribuir no aumento dos teores desses elementos no ambiente. Isso pode fazer com que estes elementos acabem sendo transferidos para a abelha e, conseqüentemente, para o mel produzido na região (PERUGINI *et al.*, 2011; EPIFÂNIO, 2012). Por exemplo, fertilizantes e agroquímicos podem apresentar pequenas concentrações de metais tóxicos, incluindo o Pb, que podem se acumular nos solos e nas plantas e assim serem transportados pelas abelhas e acabar se acumulando no mel (EPIFÂNIO, 2012; LAMBERT *et al.*, 2012). Outro aspecto interessante foi observado para Candói (3), pois o mel dessa localidade apresentou maior teor de chumbo em relação a todas as outras amostras. A cidade de Candói é uma das principais rotas de tráfego do Estado, o que pode aumentar a concentração de poluentes atmosféricos na região, através das fumaças de veículos, partículas suspensas. O chumbo apresenta uma elevada afinidade por material particulado atmosférico, ou partículas de rodovias provenientes

do asfalto, pneus e freios (PRESTES *et al.*, 2006; PUSCH, 2007). Além disso, as práticas apícolas também podem influenciar na concentração de metais em mel, principalmente chumbo. Por exemplo, o uso inadequado de fumigadores para afastar as abelhas no momento da colheita do mel, pode ser uma fonte de contaminação das colméias, inclusive por metais que possam estar presentes na fumaça utilizada (SEBRAE, 2009). Todos os aspectos mencionados podem indicar possíveis explicações para os teores de Pb observados.

As amostras da mesorregião Sudeste 6, 10, 13, 15, 16, e 17 apresentaram uma relação significativa entre si, com teores de Cd e Pb. Essas amostras são pertencentes a microrregião de Prudentópolis. Para os teores mais elevado de Cd e Pb nessas amostras podem ser sugeridas algumas explicações.

(i) A grande quantidade de olarias e indústrias cerâmicas existentes na cidade de Prudentópolis, principalmente nas regiões apicultoras, pode influenciar na concentração deste metal no ambiente. Essas indústrias podem causar contaminação dos solos por metais como Pb e Cd, presente em pigmentos utilizados na fabricação de cerâmicas e pela emissão de gases que contém metais em nível traço (OLIVEIRA, 2006; GONÇALVES, 2008);

(ii) A região de Prudentópolis tem uma economia voltada à agricultura e isso pode também ser uma boa fonte de metal tóxico, pelo extensivo uso de agrotóxicos e fertilizantes, como já foi citado.

Através da PC1 (Figura 26) nota-se que as amostras de mel das mesorregiões Oeste, Noroeste, Metropolitana, Centro Ocidental, Sudoeste e Norte Central encontram-se à direita do gráfico, ou seja, essas amostras apresentam uma similaridade em relação às variáveis (concentrações dos metais traço e meso e microrregião). É importante conhecer algumas características dessas regiões.

Segundo o IparDES – Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social (IPARDES, 2012) pode-se observar que:

(i) A mesorregião Norte Central é formada pela união de 79 municípios e apresenta o segundo maior parque industrial do Paraná, com produção na área alimentícia, têxtil, mobiliário, açúcar e álcool, agroquímicos, embalagens plásticas e equipamentos para instalações industriais e comerciais. A atividade agrícola nessa região continua sendo importante mesmo tendo diminuído e se industrializado nos últimos anos.

- (ii) A mesorregião Oeste é formada por 50 municípios e o agronegócio cooperativo serve de base para a sua expansão econômica. Cidades como Toledo e Cascavel são eixos de desenvolvimento agroindustrial que impulsionam a economia da região.
- (iii) A região Noroeste possui uma extensiva ocupação na pecuária devido à boa parte de seu solo não ser ideal a produção agrícola. O uso inadequado da terra e o desmatamento fazem da mesorregião noroeste a mais degradada em termos de preservação ambiental.
- (iv) Em relação à Mesorregião Centro Ocidental, esta é formada pela união de 25 municípios com destaque para Campo Mourão e Goioerê. Sua economia é baseada na agroindústria onde se estima que 77% dos solos da região sejam aptos à prática agrícola mecanizável. A cobertura vegetal original foi amplamente reduzida em favor do uso agrícola das terras, restando atualmente apenas cerca de 5% dela.
- (v) A mesorregião Metropolitana de Curitiba é a região paranaense com maior desenvolvimento industrial, se comparado às demais. Além disso, a concentração populacional é maior nessa região, já que ali é possível encontrar um conjunto diversificado de instituições com capacidades para a implementação da Ciência, Tecnologia e Inovação, como universidades, institutos de pesquisa, entre outros.
- (vi) A mesorregião Sudoeste é formada por 37 municípios com destaque para Francisco Beltrão e Pato Branco. Apesar do número de habitantes rurais ter diminuído na década de 90 (queda de 25%), a região aparece como a segunda menos urbanizada do Estado. Devido as características de relevo, a economia rural sempre foi baseada em minifúndios, contando com pequenas propriedades com mão de obra familiar.

Dentre as amostras de mel obtidas nas mesorregiões citadas (localizadas no eixo positivo de X) tem-se o grupo formado pelas amostras 22, 38, 41, 40 e 52 (Oeste); 42 (Sudoeste); 50 e 51 (Metropolitana de Curitiba); e 39 (Noroeste) devido às concentrações mais elevadas de cromo e a similaridade entre as mesorregiões. Dentre essas amostras, destaca-se a 41 que é proveniente da cidade de Palotina e a amostra 42 da cidade de Realeza, pelos teores mais elevados de Cr. A cidade de Palotina é caracterizada por uma economia baseada na agricultura e agroindústria, apesar de passar por crescimento urbano nos últimos anos. Sua população é estimada em 30 mil habitantes (IPARDES, 2012). A cidade de Realeza também tem uma economia voltada à agricultura e pecuária, tendo uma população de aproximadamente 17 mil habitantes (IPARDES, 2012). Essa característica mais rural das cidades e o índice habitacional significativo podem ter contribuído para esse maior teor de Cr

encontrado nas amostras de mel provenientes dessa região, devido ao extensivo uso de agrotóxicos e fertilizantes, e de adubos naturais (MERLINO, 2010). Esse tipo de metal pode ser encontrado naturalmente no solo, rochas, ou por emissões industriais, automobilísticas, e fumaça de cigarro (KE e COSTA, 2007). Isso pode explicar o fato de nas outras regiões as concentrações serem similares o que pode indicar ser uma ocorrência natural de Cr.

Ainda é possível observar que há uma separação das amostras por meso e microrregião, representado pela formação de um grupo pelas amostras 50 e 51, pertencentes à mesorregião Metropolitana e microrregião de Curitiba.

No quadrante do eixo positivo de X e negativo de Y, 2 amostras ganham destaque em relação as demais. As amostras 32 e 33 da região Oeste estão localizadas na parte mais inferior deste quadrante e, como já foi observado, se opõe as altas concentrações de cromo, já que ambas possuem duas das mais baixas concentrações deste metal, e teores de Pb e Cd não foram muito significativos. A amostra 32, proveniente da cidade de Céu Azul na região Oeste, foi a que apresentou menor teor de Cr. Esse local de clima úmido tem a economia baseada na indústria química, alimentícia e mineral. A segunda atividade econômica do município é relacionada à agropecuária, através da produção suína, soja e aves de corte. A sua população é de aproximadamente 11 mil habitantes (IPARDES, 2012). Esse baixo índice populacional pode sugerir baixa influência antrópica e conseqüentemente baixo nível de Cr nos méis deste local.

Na literatura, alguns trabalhos também apresentam a separação de méis por regiões ou por conteúdo mineral utilizando ferramentas quimiométricas.

Chudzinska e Baralkiewicz (2010) estimaram a autenticidade dos méis de diferentes regiões da Polônia através da suas características multielementares. Foram determinados 13 elementos (Al, B, Ba, Ca, Cd, Cu, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Zn) utilizando ICP MS. Para tal, as amostras de mel foram digeridas com HNO₃ e H₂O₂, em sistema de digestão por forno microondas. Com a análise dos componentes principais (PCA), os autores conseguiram perceber que existe uma relação bastante significativa entre a origem botânica e o conteúdo mineral dos méis da Polônia. Além disso, os pesquisadores conseguiram concluir que os elementos K, Al, Ni e Cd foram os que conseguiram melhor predizer a autenticidade dos méis estudados, pois na PCA, eles ficaram conectados com o primeiro componente principal (PC1) que explicou cerca de 35% (dos 77% total) de variabilidade dos dados.

Yücel e Sultanoğlu (2012) estudaram o efeito da poluição industrial em 15 amostras de méis de citrus de diferentes regiões (industrializadas e não industrializadas) da área de Hatay, Turquia. As amostras de mel foram digeridas (sistema de digestão por microondas) com HNO₃ e H₂O₂, e os elementos majoritários e em nível traço (Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Zn, Se, P e Sn) foram determinados por ICP OES. Os pesquisadores observaram que as amostras de mel coletadas de regiões industrializadas tiveram teores maiores de metais Fe, Cu, Al, Ni, Sn, Pb, Cd, Co e Sr do que as amostras provenientes de regiões não industrializadas, indicando que o conteúdo mineral do mel é afetado pela poluição industrial. De acordo com a PCA, os méis se separaram em grupos correspondentes aos diferentes minerais presentes, e que de modo geral, estão relacionados com as regiões (industrial e não industrial) das quais provêm às amostras de mel.

Portanto, a análise de componentes principais (PCA) conseguiu mostrar uma separação geográfica dos méis paranaenses, principalmente pelos teores de Pb e Cd encontrados nas amostras através deste estudo. Além disso, o alto teor de metais apresentados por alguns méis do Estado aponta para a necessidade de verificar a segurança alimentar do produto para os seres humanos, avaliando o grau de ingestão destes metais pelo consumo frequente do mel paranaense.

5.6. Grau de Ingestão Humana de Pb, Cd e Cr em função do consumo do Mel Paranaense

Sabe-se que o mel é bastante utilizado como alimento e em receitas para remédio natural, inclusive para crianças menores de 3 anos que empregam o mel como substituinte ao açúcar. Nesse sentido, devido à presença de elementos inorgânicos, como as espécies metálicas, é necessário avaliar se o mel produzido no Paraná é adequado para o consumo humano através de cálculos de ingestão diária ou anual do mel. Assim, a quantificação de metais em mel pode auxiliar na avaliação da segurança alimentar do produto.

A quantidade recomendada de mel, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), do inglês World Health Organization-WHO, para consumo humano de um adulto é de 01 colher de sopa (aproximadamente 10 g) diariamente.

Com base nisso, é possível verificar o grau de ingestão humana de Pb, Cd e Cr através do consumo do mel paranaense. Na Tabela 18 são apresentados os valores de uma estimativa de dose de ingestão de Pb, Cd e Cr através do consumo de 10 g de mel. Nestes cálculos,

foram utilizados os teores médios de Pb, Cr e Cd obtidos nas 52 amostras de mel do Paraná. E também se estimou uma faixa de ingestão, considerando o teor mais elevado e o mais baixo encontrado para cada elemento nas amostras de mel.

Tabela 18. Estimativa da ingestão humana de Pb, Cd e Cr através do consumo frequente de mel.

Frequência de ingestão	Pb (µg)		Cr (µg)		Cd (µg)	
	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa
Diariamente	2	0,86 - 4,13	0,87	0,46 - 1,32	0,041	0,021 - 0,16
Semanalmente	14	6,02 - 28,91	6,09	3,22 - 9,24	0,287	0,15 - 1,14
Mensalmente	60	25,80 - 123,90	26,10	13,80 - 39,60	1,23	0,63 - 4,89
Anualmente	730	313,9 - 1507,4	317,55	167,90 - 481,80	14,97	7,67 - 59,50

Com base na Tabela 18 é possível observar que o teor de ingestão humana dos metais seguiu a ordem de Pb > Cr > Cd. Um indivíduo, consumidor do mel do Estado do Paraná, pode estar ingerindo uma quantidade máxima de 4,13 µg de Pb diariamente. Esse valor é cerca de 3 vezes maior do que a quantidade de Cr e 25 vezes maior do que o quantidade de Cd ingerida no mesmo período. Em relação à frequência de ingestão anual de mel, a quantidade de metais ingeridos é elevada.

Considerando a ingestão de mel por uma pessoa adulta de aproximadamente 70 kg, foi calculado uma estimativa de ingestão de Pb, Cd e Cr através do consumo frequente do produto. Os dados obtidos para diferentes frequências de consumo do mel paranaense estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Estimativa da ingestão humana de Pb, Cd e Cr (µg kg⁻¹ de peso corpóreo) para um adulto que consome mel do Estado do Paraná.

Frequência de ingestão	Pb (µg)		Cr (µg)		Cd (µg)	
	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa
Diariamente	0,029	0,012 - 0,059	0,012	0,0066 - 0,019	0,00059	0,0003 - 0,0029
Semanalmente	0,2	0,086 - 0,41	0,087	0,046 - 0,13	0,0041	0,0021 - 0,016
Mensalmente	0,86	0,37 - 1,77	0,37	0,20 - 0,57	0,018	0,009 - 0,070
Anualmente	10,43	4,48 - 21,54	4,54	2,40 - 6,88	0,21	0,11 - 0,85

Na Tabela 19 observa-se que através do consumo semanal de 50 g de mel paranaense os teores médios ingeridos para Cd, Cr e Pb foram 0,0041, 0,087 e 0,2 µg kg⁻¹ por peso corporal. A JECFA (FAO/WHO) - Joint Food and Agricultural Organization/World Health

Organization Expert Committee on Food Additives - considera aceitável uma dose semanal de $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ por peso corpóreo para Pb; e $7 \mu\text{g kg}^{-1}$ por peso corpóreo para Cd, respectivamente (CODEX ALIMENTARIUS, 2012). Para Cr, em relação ao limite aceitável de ingestão humana, não foi encontrado um valor legalizado por algum órgão de saúde para este metal.

Observando-se os dados obtidos neste trabalho para Pb, Cd e Cr em mel, todos os valores de ingestão dos metais por este alimento estão abaixo do limite aceitável, o que demonstra a qualidade do mel paranaense e que há baixa chance de ocorrer uma intoxicação aguda por estes metais através do consumo do mel.

Nesse sentido, acredita-se que as 52 amostras de mel do Paraná apresentam segurança alimentar adequada para consumo humano em termos da presença de espécies metálicas tais como Pb, Cr e Cd.

6. CONCLUSÕES

De modo geral, o protocolo analítico proposto se mostrou adequado na determinação direta de Pb, Cr e Cd (concentrações traço) em amostras de mel empregando Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica em Forno de Grafite (GF AAS).

A amostragem em suspensão mostrou ser adequada para análise de mel por GF AAS, pois a adição de reagentes como ácido nítrico e peróxido de hidrogênio foram bastante eficazes na destruição da matéria orgânica do mel. Fato este, que pode ser observado pelos baixos sinais de fundo (BG) apresentados nas determinações dos três metais. Com amostragem em suspensão, em relação aos procedimentos tradicionais de tratamento das amostras de mel, tem-se a minimização dos custos da análise, maior rapidez e diminuição das possíveis causas de contaminação da amostra.

Os metais Pb e Cr, puderam ser determinados sem o uso de modificadores de matriz, alcançando temperaturas de pirólise e atomização adequadas, e com tubo de grafite pirolítico como superfície de atomização, o que proporciona menores custos para as análises. Para Cd foi necessário uso de modificador químico Pd-Mg, porém a parede do tubo de grafite pirolítico foi adequada como superfície de atomização, minimizando custos.

As quantificações dos três metais puderam ser realizadas por curva analítica, dispensando métodos de quantificação mais dispendiosos e morosos a exemplo da adição de padrão, o que garante rapidez e diminuição do custo da análise de mel por GF AAS.

Todas as curvas analíticas foram lineares, apresentaram homogeneidade de variância em toda a faixa de concentração investigada, independente do meio utilizado. Fato que pode ser confirmado com o uso de ferramentas estatísticas, como a regressão linear de mínimos quadrados ordinários.

Todos os testes de validação dos protocolos analíticos propostos para cada metal demonstraram que a metodologia pode ser aplicada em amostras de mel, pois é possível obter dados precisos, exatos, de maneira rápida e com um baixo custo.

Aplicando a metodologia desenvolvida em 52 diferentes amostras de mel provenientes de municípios distintos do Estado do Paraná pode-se realizar a quantificação dos metais por GF AAS, com exceção de algumas amostras para Cd, em que os teores ficaram abaixo do limite de quantificação do metal em mel ($< 2 \text{ ng g}^{-1}$).

Os níveis de Pb e Cd determinados ficaram abaixo do que permite a legislação brasileira, porém algumas amostras tiveram teores muito elevados destes metais, se comparado com a média total para cada metal. Portanto, conclui-se que há indícios de contaminação das amostras de mel por Pb e Cd. Para Cr, algumas amostras tiveram teores maiores do que permite a legislação vigente, sugerindo assim, a existência de algum processo de contaminação de regiões produtoras de mel por este metal.

Com auxílio de ferramentas quimiométricas, como análise dos componentes principais (PCA), foi possível concluir que existe uma relação entre o conteúdo mineral e a origem geográfica do mel paranaense, e os teores de Pb e Cd foram bastante significantes na diferenciação das amostras de mel do Estado. Além disso, algumas amostras se destacaram em relação às demais por apresentarem teores superiores desses elementos, o que pode estar relacionado com processos de contaminação ambiental. Por esses motivos, sugere-se que o mel se mostrou como um bioindicador de contaminação ambiental no Estado do Paraná. Os resultados alcançados neste estudo são inéditos para o mel brasileiro, visto que nenhum estudo nacional com mel e metais em nível traço havia sugerido essas hipóteses.

Pode-se concluir também que o mel do Estado do Paraná apresenta segurança alimentar, pois o consumo frequente deste produto não apresenta riscos à saúde humana, em relação à ingestão de espécies metálicas, tais como Pb, Cd e Cr.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGILENT TECHNOLOGIES, Inc. Analytical Methods for Graphite Tube Atomizers. 7ed. Austrália: 2010. p. 11-26.
- AJTONY, Z.; BENCS, L.; HARASZI, R.; SZIGETI, J.; SZOBOSZLAI, N. Study on the simultaneous determination of some essential and toxic trace elements in honey by multi element graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*. v. 71, p. 683–690. 2007.
- AJTONY, Z.; SZOBOSZLAI, N.; SUSKÓ, E. K.; MEZEI, P.; GYÖRGY, K.; BENCS, L. Direct sample introduction of wines in graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper and lead content. *Talanta*. v. 76, p. 627–634. 2008.
- ALDA-GARCILOPE, C.; GALLEGÓ-PICÓ, A.; BRAVO-YAGÜE, J. C.; GARCINUÑO-MARTÍNEZ, R. M.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, P. Characterization of Spanish honeys with protected designation of origin “Miel de Granada” according to their mineral content. *Food Chemistry*. v. 135, p. 1785–1788. 2012.
- ALVES, F. L.; JARDIM, W. F.; CADORE, S.; ARRUDA, M. A. Z.; SMICHOWSKI, P.; MARRERO, J. Emprego da amostragem de suspensão na determinação de Cu e Zn em lapa antártica e Ni em sedimentos de rio por Espectrometria de Absorção Atômica com Chama. *Química Nova*, v. 24, n. 6, p.756-760. 2001.
- ANKLAN, E. A Review of the Analytical Methods to Determine the Geographical and botanical Origin of Honey. *Food Chemistry*. v 63, p. 549-562. 1998.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos. Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em junho de 2012.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em setembro de 2012.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2002. p. 11-29.
- BALDAN, A. P. *Suplementação de cromo na dieta, utilização de carboidrato e desempenho produtivo do Pacu*. 2004. 47f. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo. p. 9.
- BATISTA, B.L.; DA SILVA, L.R.S.; ROCHA, B.A.; RODRIGUES, J.L.; BERRETTA-SILVA, A.A.; BONATES, T.O.; GOMES, V.S.D.; BARBOSA, R.M.; BARBOSA, F. Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic origin with data mining techniques. *Food Research International*. v. 49, p. 209–215. 2012.

- BILANDZIC, N.; DOKIĆ, M.; SEDAK, M.; M.; KOLANOVIĆ, B. S.; VARENINA, I.; KONČURAT, A.; RUDAN, N. Determination of trace elements in Croatian floral honey originating from different regions. *Food Chemistry*. v. 128, p. 1160–1164, 2011.
- BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*. v. 13, p. 130-137. 2003.
- BULDINI, P. L.; CAVALLI, S.; MEVOLI, A.; SHARMA, J. L. Ion Chromatographic and Voltammetric Determination of Heavy and Transition Metals in Honey. *Food Chemistry*. v. 73, p. 487-495. 2001.
- CAMPOS, M. L. A. M.; BENDO, A.; VIEL, F. C. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle da contaminação para a determinação de metais traços em águas naturais. *Química Nova*. v. 25, p. 808-813. 2002.
- CAROLI, S.; FORTE, G.; IAMICELI, A.L., GALOPPI, B. Determination of essential and potentially toxic trace elements in honey by inductively coupled plasma-based techniques. *Talanta*. v. 50, n. 2, p. 327-336. 1999.
- CBA, Confederação Brasileira de Apicultura. Disponível em: <http://www.brasilapicola.com.br>. Acessado em junho de 2011.
- CHUDZINSKA, M.; BARALKIEWICZ, D. Estimation of honey authenticity by multielements characteristics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) combined with chemometrics. *Food and Chemical Toxicology*. v. 48, p. 284–290. 2010.
- CHUA, L. S.; ABDUL-RAHAMAN, N.; SARMIDI, M. R.; AZIZ, R. Multi-elemental composition and physical properties of honey samples from Malaysia. *Food Chemistry*. v. 135, p. 880–887. 2012.
- CODEX ALIMENTARIUS, C. Joint FAO/WHO food Standards programme codex committee on contaminants in foods. *Working document for information and use in discussions related to contaminants and toxins in the GSCTFF*. Prepared by Japan and the Netherlands. 2012. p. 13-18.
- DAMIN, I. C. F. *Investigação da amostragem direta para determinação de elementos traço em carne in natura e em petróleo usando espectrometria de absorção atômica com forno de grafite*. 2009. 134f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. p. 2-21.
- DE PAULA, J. Mel do Brasil: as exportações brasileiras de mel no período de 2000/2006 e papel do Sebrae. Brasília: SEBRAE, 2008. 99f. p. 47-58.
- DIONÍSIO, A. G. G.; GONZALEZ, M. H.; NÓBREGA, J. A. Determinação de arsênio em amostras da cadeia produtiva de frangos de corte por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. *Química Nova*. v. 34, n. 1, p. 49-52. 2011.

- DOBROWOLSKI, R.; PAWLOWSKA-KAPUSTA, I.; DOBRZYNSKA, J. Chromium determination in food by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry using classical and permanent modifiers. *Food Chemistry*. v. 132, p. 597–602. 2012.
- DOQ-CGCRE-008. Orientação sobre validação de métodos analíticos. *Documento de caráter orientativo*. Revisão 04, julho de 2011. p. 7-11.
- DOS ANJOS, V. E. *Especiação de cobre e arsênio no complexo estuarino da baía de Paranaguá*. 2006. 175f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, p. 20-61.
- DOS ANJOS, V. E.; ABATE, G.; GRASSI, M. T. Comparação da labilidade de metais empregando voltametria, difusão em filmes finos por gradiente de concentração (DGT) e modelo computacional. *Química Nova*. v. 33, p. 1307-1312. 2010.
- DOS SANTOS, J. S.; DOS SANTOS, N. S.; DOS SANTOS, M. L. P.; DOS SANTOS, S. N.; LACERDA, J. J. Honey classification from semi-arid, Atlantic and transitional Forest Zone in Bahia, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. v. 19, p. 502. 2008.
- EMBRAPA, Meio-Norte. Sistema de Produção do mel, 3 ISSN 1678-8818. Versão Eletrônica Julho de 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acessado em dezembro de 2012.
- EPIFÂNIO, A. F. R. P. *Determinação de metais pesados em mel nacional por espectrometria de absorção atômica*. 2012. 75f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal. p. 20-36.
- FERNÁNDEZ-TORRES, R.; PÉREZ-BERNAL, J. L.; BELLO-LÓPEZ, M. A.; CALLEJÓN-MOCHÓN, M.; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, J. C.; GUIRÁUM-PÉREZ, A. Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta*. v. 65, p. 686–691. 2005.
- GARCÍA, J. C. R.; GARCÍA, J. B.; LATORRE, C. H.; FREIRE, M. R. S.; MARTÍN, 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.
- ^aGARCÍA, J. C. R.; GARCÍA, J. B.; LATORRE, C. H.; MARTÍN, S. G.; CRECENTE, R. M. P. Comparison of Palladium-magnesium Nitrate and Ammonium Dihydrogenphosphate Modifiers for Lead Determination in Honey by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. *Food Chemistry*. v. 91, p. 435-442. 2005a.
- ^bGARCÍA, J. C. R.; GARCÍA, J. B.; LATORRE, C. H.; MARTÍN, S. G.; CRECENTE, R. M. P. Direct and combined methods for the determination of chromium, copper, and nickel in honey by electrothermal atomic absorption spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 53, p. 6616-6623. 2005b.

- GARCÍA, J. C. R.; RODRÍGUEZ, R. I.; CRECENTE, R. M. P.; GARCÍA, J. B.; MARTÍN, S. G.; LATORRE, C. H. Preliminary chemometric study on the use of honey as an environmental marker in Galicia (Northwestern Spain). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 54, n. 19, p. 7206-7212. 2006.
- GOLOB, T.; DOBERŠEK, U.; KUMP, P.; NEČEMER, M. Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*. v. 91, p. 593–600. 2005.
- GONÇALVES, D. C. *A emissão de resíduos de esmalte na água da região de Criciúma: uma questão didático-pedagógica*. 2008. 56f. Especialização (Metodologia do Ensino de Química) – Faculdades Integradas de Jacarepaguá, Braço do Norte, Santa Catarina. p. 25-32.
- GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards. *Talanta*. v. 82, p. 1995-1998. 2010.
- HERNÁNDEZ, O. M.; FRAGA, J. M. G.; JIMÉNEZ, A. I.; JIMÉNEZ, F.; ARIAS, J. J. Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. *Food Chemistry*, v. 93, p. 449-458. 2005.
- IOANNIDOU, M. D.; ZACHARIADIS, G. A.; ANTHEMIDIS, A. N.; STRATIS, J. A. Direct determination of toxic trace metals in honey and sugars using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*. v. 65, p. 92-97. 2005.
- IPARDES, Instituto paranaense de desenvolvimento social. Caderno estatístico município de Cândói. Disponível em: <http://www.Ipardes.gov.br>. Acessado em outubro de 2012.
- IPARDES, Instituto paranaense de desenvolvimento social. Caderno estatístico município de Céu Azul. Disponível em: <http://www.Ipardes.gov.br>. Acessado em outubro de 2012.
- IPARDES, Instituto paranaense de desenvolvimento social. Caderno estatístico município de Palotina. Disponível em: <http://www.Ipardes.gov.br>. Acessado em outubro de 2012.
- IPARDES, Instituto paranaense de desenvolvimento social. Caderno estatístico município de Realeza. Disponível em: <http://www.Ipardes.gov.br>. Acessado em outubro de 2012.
- IPARDES, Instituto paranaense de desenvolvimento social. Disponível em: <http://www.Ipardes.gov.br>. Acessado em novembro de 2012.
- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins. ISBN 0-9678550-9-8. doi:10.1351/goldbook.
- JAIN, A. V.; ARNOLD, B. *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. Edited by Ramesh C. Gupta. First Edition. New York: Elsevier, 2007. p.1067-1070.

- KOTAS, J.; STASICKA, Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental Pollution*. v. 107, p. 263-283. 2000.
- KE, Q.; COSTA, M. The Nutritional Biochemistry of Chromium(III). *Chapter 12: Overview of chromium(III) toxicology*. Edited by John B. Vincent. First Edition. New York: Elsevier, 2007. p. 257-263.
- LACHMAN, J.; KOLIHOVÁ, D.; MIHOLOVÁ, D.; KOSATA, J.; TITERA, D.; KULT K. Analysis of minority honey components: possible use for the evaluation of honey quality. *Food Chemistry*. v 101, p. 973-979. 2007.
- LAJUNEN, L. H. J.; PERÄMÄKI, P. Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission. 2ed. Published by The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK: R.S.C., 2004. p. 109-154.
- LAMBERT, O.; PIROUX, M.; PUYO, S.; THORIN, C.; LARHANTEC, M.; DELBAC, F.; POULIQUEN, H. Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. *Environmental Pollution*. v. 170, p. 254-259. 2012.
- LATORRE, M. J.; PENA, R.; GARCIA, S.; HERRERO, C. *Analyst* (Cambridge, UK), v. 125, p. 307, 2000.
- L'VOV, B. V.; NIKOLAEV, V. G.; NORMAN, E. A.; POLZIK, L. K.; MOJICA, M. Theoretical calculation of the characteristic mass in graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta*. v. 418, n. 10, p. 1043-1053. 1986.
- MAGALHÃES, C. E. C.; ARRUDA, M. A. Z. Amostragem de suspensões: emprego da técnica na análise direta de amostras. *Química Nova*. n. 21, v. 4, p. 459-466. 1998.
- MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Instrução Normativa nº14 de 25 de maio de 2009. "Programa de controle de resíduos e contaminantes em mel – PNCRC/2009". Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 28 de maio de 2009.
- MAUÁ, Município. Estudos de avaliação de risco por resíduos perigosos no condomínio Barão de Mauá. *Capítulo 7: Implicações para a saúde pública*. Mauá, São Paulo. 2004. p. 159-160.
- 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.
- MERLINO, L. C. S. *Bário, cádmio, cromo e chumbo em plantas de milho e em latossolo que recebeu lodo de esgoto por onze anos consecutivos*. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, p. 4-14.

- MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Revista Panam. Salud Publica*. v. 15, n. 2, p. 119–29. 2004.
- NACKE, H. *Produtividade e componentes de produção do milho fertilizado com diferentes fontes e doses de Zn e disponibilidade dos metais pesados tóxicos Cd, Pb e Cr*. 2011. 80f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, Paraná. p. 23-31.
- NETO, B. B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na indústria. 3ed. Campinas, São Paulo: Editora da Unicamp, 2007. p. 263-290.
- OLIVEIRA, E. P. *Aplicação da espectrometria de absorção atômica com forno de grafite na determinação direta de manganês, chumbo e cromo em águas de produção*. 2004. 107f. Dissertação (Mestrado em Geociências) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, p. 27-37.
- OLIVEIRA, M. C.; MAGANHA, M. F. B. *Guia técnico ambiental da indústria de cerâmicas branca e de revestimentos*. São Paulo: CETESB, 2006. p. 49-55.
- OLIVEIRA, R. F. *Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de As, Cd, Ni e Pb em batata e em mandioca produzidas em regiões mineiras empregando espectrometria de absorção atômica em forno de grafite*. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, p. 4-7, 10-12.
- PAES, L. C. *Determinação de cobre, manganês e cádmio em mel por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite*. 2007. 71f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. p. 3-12.
- PAMPLONA, B. C. *Exame dos elementos químicos inorgânicos encontrados em méis brasileiros de *Apis mellifera* e suas relações físico-químicas*. 1989. 131f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- PELLERANO, R. G.; UÑATES, M. A.; CANTARELLI, M. A.; CAMIÑA, J. M.; MARCHEVSKY, E. J. Analysis of trace elements in multiflora Argentine honeys and their classification according to provenance. *Food Chemistry*. v. 134, p. 578-582. 2012.
- PERUGINI, M.; MANERA, M.; GROTTA, L.; ABETE, M. C.; TARASCO, R.; AMORENA, M. Heavy metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. *Biol. Trace Elem. Res.* v. 140, n. 2, p. 170-176. 2011.
- PISANI, A.; PROTANO, G.; RICCOBONO, F. Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chemistry*. v. 107, p. 1553–1560. 2008.
- POHL, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. *Trends in Analytical Chemistry*. v. 28, p. 117-128. 2009.

- 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. *Microchimica Acta*. v. 168, p. 9-15. 2010.
- PRESTES, E. C.; ANJOS, V. E.; SODRÉ, F. F.; GRASSI, T. M. Copper, lead and cadmium loads and behavior in urban stormwater runoff in Curitiba, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, p. 53-60. 2006.
- PUSCH, P. B. *Inventário de cargas de metais a partir de fontes difusas de poluição*. 2007. 118f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Campinas, São Paulo. p. 7-16.
- QUINÁIA, S. P.; NÓBREGA, J. A. Direct determination of chromium in gelatine by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. *Food Chemistry*. v. 64, p. 429-433. 1999.
- QUINÁIA, S. P.; NÓBREGA, J. A. Determinação direta de cromo em açúcar e leite por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite. *Química nova*. v. 23, n. 2, p. 185-190. 2000.
- RIBEIRO, A. S. *Determinação de elementos traço em amostras de cabelo humano por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica*. 1999. 84f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina. p. 10-14.
- SANNA, G.; PILO, M. I.; PIU, P. C.; TAPPARO, A.; SEEBER, R. Determination of heavy metals in honey by anodic stripping voltammetry at microelectrodes. *Analytica Chimica Acta*. v. 415, p. 165–173. 2000.
- 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*. v. 65, p. 97–112. 2010.
- SCHIFER, T. S.; JUNIOR, S. B.; MONTANO, M. A. E. Aspectos toxicológicos do chumbo. *Infarma*. v. 17, n. 5/6, p. 67-72. 2005.
- SEAB, Secretaria de estado da agricultura e do abastecimento, Estado do Paraná. Disponível em: <http://www.seab.pr.gov.br>. Acessado em dezembro 2012.
- SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Manual de boas práticas apícolas - Campo. Brasília: 2009. p. 14-21.
- SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Boletim setorial do Agronegócio: Apicultura. Recife: 2011. p. 7-12.
- SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. “Aumento das exportações amplia mercado do mel brasileiro”. Disponível em: <http://www.agenciasebrae.com.br>. Acessado em fevereiro de 2012.

- SEBRAE, Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. “Exportações”. Disponível em: <http://www.agenciasebrae.com.br>. Acessado em dezembro de 2012.
- SILVEIRA, T. A. *Caracterização sazonal do pólen apícola quanto à origem botânica, aspectos físico-químicos e elementos traços como bioindicadora de poluição ambiental*. 2012. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo. p. 20-21.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. *Fundamentos de Química Analítica*. Tradução 8ª edição norte-americana. São Paulo: Thomson, 2006.
- SOUZA, P. F. *Determinação de Pb em açúcar por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite tratado com tungstênio e ródio*. 2004. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, São Paulo. p. 3, 13-23.
- TAVARES, A. D. *Determinação de Cádmio e Chumbo em Alimentos e Bebidas Industrializados por Espectrometria de Absorção Atômica com Atomização Eletrotérmica*. 2010. 98f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. p. 8-21.
- TEMPLETON, D. M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSSON, L. G.; MUNTAU, H.; van LEEUWEN, H. P.; LOBINSKI, R. 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.
- VAN DER VOET, H.; VANRHIJN, H.; VAN DER WIEL, H. J. Inter-laboratory, time, and fitness-for-purpose aspects of effective validation. *Analytica Chimica Acta*. v. 391, p. 159-171. 1999.
- VANHANEN, L. P.; EMMERTZ, A.; SAVAGE, G. P. Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey. *Food Chemistry*. v. 128, p. 236–240. 2011.
- VENEZUELA, T. C. *Determinação de contaminantes metálicos (metal tóxico) num solo adubado com composto de lixo em área olerícola no município de Nova Friburgo*. 2001. 96f. Dissertação (Mestrado em Saúde pública) – Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, p. 3-23.
- VIÑAS, P.; LÓPEZ-GARCÍA, I.; LANZÓN, M.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Direct determination of lead, cadmium, zinc, and copper in honey by electrothermal atomic absorption spectrometry using hydrogen peroxide as a matrix modifier. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 45, p. 3952-3953. 1997.
- YÜCEL, Y.; SULTANOĞLU, P. Determination of industrial pollution effects on citrus honeys with chemometric approach. *Food Chemistry*. v. 135, p. 170–178. 2012.
- WAALKES, M. P. Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research*. v. 533, p. 107–120. 2003.

- WANG, J.; KLIKS, M. M.; JUN, S.; LI, Q. X. Residues of organochlorine pesticides in honeys from different geographic regions. *Food Research International*. v. 43, 2329–2334. 2010.
- WEI, Z.; WANG, J.; WANG, Y. Classification of monofloral honeys from different floral origins and geographical origins based on rheometer. *Journal of Food Engineering*. v. 96, p. 469–479. 2010.
- WELZ, B.; SPERLING, M. Atomic Absorption Spectrometry. 3ed. Alemanha: Wiley – VCH, 1999. p. 27-46, 170-202, 451-463.
- WOOD, R. How to validate analytical methods. *Trends Analytical Chemistry*. v. 18, p. 624-632. 1999.