



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
GRUPO DE PESQUISA EM QUÍMICA ANALÍTICA

SIDIMAR SANTOS OLIVEIRA

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL
MINERAL E ESTIMATIVA DA BIOACESSIBILIDADE DE ELEMENTOS
ESSENCIAIS E POTENCIALMENTE TÓXICOS EM AMOSTRAS DE
MEL**

SALVADOR - BAHIA

2018

SIDIMAR SANTOS OLIVEIRA

**ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL
MINERAL E ESTIMATIVA DA BIOACESSIBILIDADE DE ELEMENTOS
ESSENCIAIS E POTENCIALMENTE TÓXICOS EM AMOSTRAS DE
MEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos para obtenção de grau de mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Daniele Cristina Muniz
Batista dos Santos

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Elane Santos da Boa
Morte

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira, Sidimar Santos
ESTRATÉGIAS ANALÍTICAS PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL MINERAL E
ESTIMATIVA DA BIOACESSIBILIDADE DE ELEMENTOS ESSENCIAIS E
POTENCIALMENTE TÓXICOS EM AMOSTRAS DE MEL / Sidimar Santos
Oliveira. -- Salvador, 2018.
91 f.

Orientadora: Daniele Cristina Muniz Batista dos Santos.
Coorientadora: Elane Santos da Boa Morte.
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Química) --
Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, 2018.

1. mel. 2. preparo de amostra. 3. composição mineral. 4.
bioacessibilidade. 5. ICP OES. I. dos Santos, Daniele Cristina
Muniz Batista. II. da Boa Morte, Elane Santos. III. Título.

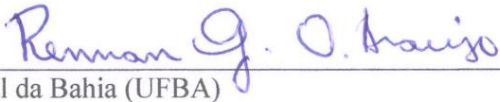
TERMO DE APROVAÇÃO

SIDIMAR SANTOS OLIVEIRA

"Estratégias analíticas para avaliação do perfil mineral e estimativa da bioacessibilidade de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em amostras de mel"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. Daniele Cristina Muniz Batista dos Santos 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Rennan Geovanny Oliveira Araújo 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Anibal de Freitas Santos Junior 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade do Estado da Bahia

Salvador, 22 de janeiro de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus acima de tudo, e a minha família por todo incentivo, todo apoio que têm me dado.

Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.

(Dalai Lama)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, porque sem Ele nada é feito com perfeição.

Aos meus pais, principalmente minha mãe que venceu o câncer durante todo o desenvolvimento deste trabalho, e hoje está curada, mas que sempre teve forças para me apoiar.

A toda minha família.

À Prof^a Daniele Cristina Muniz Batista dos Santos pela oportunidade, paciência, compreensão e discernimento, orientando de forma competente, com visão ética e profissional.

À Prof^a Elane Santos da Boa Morte pela co-orientação e contribuições agregativas e resolutivas a este trabalho.

Ao Prof. Rennan Geovanny pelas contribuições agregativas e resolutivas a este trabalho.

À Prof^a Maria das Graças A. Korn por ter sido minha mentora no início da carreira na Química Analítica.

À equipe do Laboratório de Estudos do Petróleo (LEPETRO), pelo equipamento cedido para as análises das amostras de mel na fase inicial do trabalho.

Aos membros do GPQA pela ajuda nas variadas tarefas que iam surgindo, em especial, a Isa, Luciane, Larissa, Thaís, Laís e Milena.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química da UFBA pela contribuição dada em disciplinas para a minha formação como mestre.

À Prof^a Maria de Lourdes Botelho Trino que com sua experiência, organização, disciplina e didática impecável me auxiliou no estágio docente juntamente com minha orientadora Prof^a Daniele Cristina Muniz.

Aos amigos e colegas do Instituto de Química e de outras Universidades.

Aos funcionários do Instituto de Química pela disponibilidade e atenção.

Às agências de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de mestrado concedida.

E a todos aqueles que não tenha lembrado, mas que contribuíram de alguma forma.

Obrigado!

RESUMO

O mel é produzido por abelhas (*Apis mellifera*) a partir do néctar ou secreções de diferentes plantas. A composição deste alimento depende de vários fatores como, por exemplo, florada, composição do pólen, composição do solo, localização geográfica e clima. Neste trabalho foram propostas estratégias analíticas para avaliação do perfil mineral e estimativa da bioacessibilidade de elementos essenciais e potencialmente tóxicos em amostras de mel. No desenvolvimento do método proposto de decomposição ácida do mel por bloco digestor acoplado com “dedo frio” utilizou-se a otimização multivariada, empregando o planejamento fatorial completo 2^3 e a matriz Doehlert. A condição ótima encontrada para o método de decomposição foi 1,60 mL de HNO_3 (65% m m⁻¹); 0,64 mL de H_2O_2 (30% m m⁻¹) e tempo de digestão de 46 minutos, mantendo-se a temperatura constante em 150°C e a massa da amostra em 500 mg com determinação por ICP OES. A resposta de interesse foi o teor de carbono residual para ambas as etapas. O método apresentou boa precisão (CV < 10%) e exatidão através do material de referência certificado de folha de tomate (CRM Agro C1003a) e tecido ostra (CRM NIST 1566b). As faixas de concentração, em mg kg⁻¹, dos analitos quantificados nas amostras mel foram: As (<1,62-3,25), B (<1,65-6,72), Ba (<0,03-0,25), Ca (28,4-216), Cd (<0,04-0,29), Cu (<0,07-0,29), Fe (<0,72-47,0), K (27,2-1210), Mg (2,82-96,0), Mn (0,17-4,62), Na (16,4-260), P (<15,8-128), Se (<0,09-0,45), Sr (<0,15-1,08) e Zn (<1,06-2,94). Foi observado que amostras de mel de coloração escura e âmbar tendem a apresentar maiores concentrações de Cu e Zn. A análise multivariada dos dados foi aplicada verificando-se que amostras de predominância urbana tendem a apresentar maior teor mineral que amostras de mel de predominância rural. A estimativa da bioacessibilidade foi realizada utilizando o método de extração *in vitro* SBET (*Simple Bioaccessibility Extraction Test*). As faixas de teor bioacessível, em %, para os analitos foram: Ca (<0,0004-21,4), Fe (<0,00006-21,8), K (9,4-20,0), Mg (15,0-25,0) e Na (0,0004-20,2). Os teores bioacessíveis nas amostras de mel foram menores que os descritos na literatura, devido ao método de extração simular apenas a fase gástrica, sendo que o mel foi digerido em maior proporção na fase salivar e intestinal. Os resultados obtidos neste trabalho trazem informações relevantes a respeito da composição mineral do mel de acordo com a coloração visual e origem geográfica, e do teor bioacessível de analitos na fase gástrica, contribuindo, assim, com o controle da qualidade de méis.

Palavras-chave: mel, preparo de amostra, composição mineral, bioacessibilidade, análise multivariada, ICP OES.

ABSTRACT

Honey is produced by bees (*Apis mellifera*) from the nectar or secretions of different plants. The composition of this food depends on several factors such as, for example, flowering, composition of the pollen, composition of the soil, geographic location and climate. In this work, analytical strategies were proposed to evaluate the mineral profile and to estimate the bioaccessibility of essential and potentially toxic elements in honey samples. In the development of the proposed method of acidic decomposition of honey by digester block coupled with "cold finger" the multivariate optimization was used, using the full factorial design 2^3 and the Doehlert matrix. The optimum condition found for the decomposition method was 1.60 mL of HNO_3 (65% m m⁻¹); 0.64 mL of H_2O_2 (30% m m⁻¹) and digestion time of 46 minutes, keeping the temperature constant at 150 ° C and the mass of the sample at 500 mg determined by ICP OES. The response of interest was the residual carbon content for both steps. The method presented good precision (CV <10%) and accuracy through the certified reference material of tomato leaf (CRM Agro C1003a) and oyster tissue (CRM NIST 1566b). The concentration ranges, in mg kg⁻¹, of the analytes quantified in the honey samples were As (<1.62-3.25), B (<1.65-6.72), Ba (<0.03- 0.25), Ca (28.4-216), Cd (<0.04-0.29), Cu (<0.07-0.29), Fe (<0.72-47.0), K (27.2-1210), Mg (2.82-96.0), Mn (0.17-4.62), Na (16.4-260), P (<15.8-128), Se (<0.09-0.45), Sr (<0.15-1.08) and Zn (<1.06-2.94). It was observed that dark honey and amber honey tend to have higher concentrations of Cu and Zn. The multivariate analysis of the data was applied verifying that samples of urban predominance tend to present a higher mineral content than samples of honey of rural predominance. The bioaccessibility estimation was performed using the *in vitro* extraction method SBET (Simple Bioaccessibility Extraction Test). The bands with bioaccum- ble content, in%, for the analytes were: Ca (<0.0004-21.4), Fe (<0.00006-21.8), K (9.4-20.0), Mg (15.0-25.0) and Na (0.0004-20.2). The bioaccessible contents in the honey samples were smaller than those described in the literature, due to the extraction method simulate only the gastric phase, and the honey was digested in greater proportion in the salivary and intestinal phase. The results obtained in this work bring relevant information about the honey mineral composition according to the visual coloration and geographical origin, and the bioaccessible content of analytes in the gastric phase, thus contributing to the control of honeys quality.

Keywords: honey, sample preparation, mineral composition, bioaccessibility, multivariate analysis, ICP OES.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Processo de homeostase que controla os níveis de nutrientes nos organismos vivos.	19
Figura 2	Abelha da espécie <i>Apis mellifera</i> , maior produtora de mel.	24
Figura 3	Produção anual de mel brasileiro por região, no período de 2010 a 2015, em toneladas.	26
Figura 4	Fontes naturais e antrópicas de elementos químicos em méis.	28
Figura 5	Número de publicações que utilizaram procedimentos de preparo de amostras com radiação micro-ondas agrupadas por ano de publicação.	31
Figura 6.	Sistema de refluxo com “dedo frio”. (a) tubo de “dedo frio”; (b) tubo digestor e (c) tubo de “dedo frio” acoplado ao tubo digestor.	32
Figura 7	Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo 2^3 aplicado a amostra de mel escuro.	53
Figura 8	Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo 2^3 aplicado a amostra de mel claro.	53
Figura 9	Curvas de nível da variação de %RCC com o HNO_3 x H_2O_2 .	56
Figura 10	Curvas de nível da variação de %RCC com o Tempo x H_2O_2 .	56
Figura 11	Curvas de nível da variação de %RCC com o Tempo x HNO_3 .	57
Figura 12	Classificação das amostras de mel de acordo com a coloração visual.	65
Figura 13	Gráfico de escores PC1 x PC3 para as amostras de mel.	73
Figura 14	Distribuição das variáveis no gráfico de <i>loadings</i> PC1 x PC3 para as amostras de mel.	74
Figura 15	Dendograma obtido para as amostras de mel a partir da HCA pelo método de Ward.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Aspectos nutricionais e toxicológicos de alguns minerais.	20
Tabela 2	Componentes básicos do mel de abelha.	25
Tabela 3	Determinação de compostos inorgânicos em amostras de méis utilizando técnicas espectrométricas.	40
Tabela 4	Condições operacionais do espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.	45
Tabela 5	Condições experimentais testadas na análise univariada com a amostra de mel escuro codificada MD-E.	46
Tabela 6	Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com triplicata do ponto central aplicado às amostras MD (mel escuro) e MDC (mel claro).	47
Tabela 7	Matriz de Doehlert com valores reais e codificados aplicada às amostras de mel claro e mel escuro.	48
Tabela 8	Concentrações médias, em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, de microelementos em diferentes condições de preparo de amostra em bloco digestor por ICP OES (média \pm desvio padrão, $n=3$).	51
Tabela 9	Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 para amostra de mel escuro.	52
Tabela 10	Matriz de Doehlert com quadruplicata do ponto central aplicada a amostra de mel de coloração escura.	55
Tabela 11	Valores críticos previstos pelo modelo quadrático do planejamento Doehlert.	57
Tabela 12	ANOVA dos parâmetros do modelo quadrático gerado pelo planejamento Doehlert.	58
Tabela 13	Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) para determinação dos analitos em amostras de mel por ICP OES.	59
Tabela 14	Curvas analíticas de calibração para determinação dos analitos nas amostras de mel por ICP OES.	60
Tabela 15	Determinação da composição mineral do CRM AGRO C1003a por ICP OES, após digestão em bloco digestor (média \pm IC, $n=2$).	62
Tabela 16	Determinação da composição mineral do CRM NIST 1566b por ICP OES, após digestão em bloco digestor (média \pm IC, $n=2$).	62

Tabela 17	Valores de percentagem encontrados para o teste de adição e recuperação para amostra de mel escuro MD, em bloco digestor, por ICP OES.	63
Tabela 18	Teste de repetibilidade para a amostra de mel MEMf, por ICP OES (n=10).	64
Tabela 19	Concentrações, em $\mu\text{g g}^{-1}$, de macromelementos para as amostras de mel por ICP OES.	66
Tabela 20	Concentrações, em $\mu\text{g g}^{-1}$, de microelementos para as amostras de mel por ICP OES.	67
Tabela 21	Comparação entre os teores médios de macromelementos nas amostras de mel com a Tabela TACO e a contribuição desses analitos para o IDR.	68
Tabela 22	Comparação entre as concentrações, em $\mu\text{g g}^{-1}$, de macro e microelementos nas amostras de mel estudadas com os valores obtidos por outros autores.	71
Tabela 23	Valores dos pesos para as três primeiras componentes principais nas amostras de mel.	72
Tabela 24	Limites de detecção e limites de quantificação do procedimento de extração <i>in vitro</i> SBET.	77
Tabela 25	Curvas analíticas de calibração para determinação dos analitos nas amostras de mel por ICP OES, após extração pelo método <i>in vitro</i> SBET.	78
Tabela 26	Teores bioacessíveis, em %, em nove amostras de mel por ICP OES.	79

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	do inglês: <i>Charge coupled device</i> (Dispositivo de carga acoplada)
CRM	do inglês: <i>Certified reference materials</i> (Material de referência certificado)
CV	Coeficiente de Variação
DOC	do inglês: <i>Dissolved organic carbon</i> (Carbono orgânico dissolvido)
DRI	do inglês: <i>Dietary reference intakes</i> (Ingestão dietética de referência)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GF AAS	do inglês: <i>Graphite furnace atomic absorption spectrometry</i> (Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite)
HCA	do inglês: <i>Hierarchical cluster analysis</i> (Análise de agrupamento hierárquico)
ICP OES	do inglês: <i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> (Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado)
ICP-AES	do inglês: <i>Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry</i> (Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado)
ICP-AFS	do inglês: <i>Inductively coupled plasma atomic fluorescence spectrometry</i> (Espectrometria de fluorescência atômica com plasma indutivamente acoplado)
ICP-MS	do inglês: <i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> (Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado)
IDR	Ingestão diária recomendada
INMETRO	Instituto nacional de metrologia, normalização e qualidade industrial
LOD	do inglês: <i>Limit of detection</i> (Limite de detecção)
LOQ	do inglês: <i>Limit of quantification</i> (Limite de quantificação)
NIST	do inglês: <i>National Institute of Standards and Technology</i> (Instituto nacional de padrões e tecnologia)

PBET	do inglês: <i>Physiological based extraction test</i> (Teste de extração baseado em fisiologia)
PCA	do inglês: <i>Principal components analysis</i> (Análise de componentes principais)
PFA	do inglês: <i>Perfluoroalkoxy</i> (Perfluoroalcoxi)
PP	do inglês: <i>Polypropylene</i> (Polipropileno)
PTFE	do inglês: <i>Polytetrafluoroethylene</i> (Politetrafluoroetileno)
RCC	do inglês: <i>Residual carbon content</i> (Conteúdo de carbono residual)
RSM	do inglês: <i>Response surface methodology</i> (Metodologia de superfície de resposta)
SBET	do inglês: <i>Simple bioaccessibility extraction test</i> (Teste de extração de bioacessibilidade simples)
SRM	do inglês: <i>Standard reference material</i> (Material de referência padrão)
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
UBM	Do inglês: <i>Unified bioaccessibility method</i> (Método de bioacessibilidade Unificado)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Princípios da Química de alimentos	18
1.1.1 Minerais	18
1.1.2.1 Biodisponibilidade	21
1.1.2.2 Bioacessibilidade.....	22
1.2 Tabela de Brasileira de Composição de Alimentos – Taco	23
1.3 Produtos Apícolas.....	23
1.3.1- Mel: Origem, Composição e Produção.....	24
1.3.2- Pólen.....	26
1.4- Uso de produtos apícolas no biomonitoramento ambiental	27
1.5- Métodos de preparo de amostras.....	28
1.5.1- Métodos de decomposição por via seca.....	29
1.5.2- Métodos de decomposição por via úmida	30
1.5.2.1 Radiação Micro-ondas	31
1.5.2.2 Aquecimento condutivo em bloco digestor.....	31
1.6 Eficiência dos métodos de digestão	33
1.7 Técnicas Espectrométricas	34
1.8 Ferramentas quimiométricas	34
1.9 Revisão bibliográfica	36
2- OBJETIVOS	42
2.1- Objetivo geral	42
2.2- Objetivos específicos	42
2.3- PARTE EXPERIMENTAL	43
2.3.1- Amostras e materiais de referência	43
2.3.2- Reagentes e soluções.....	43

2.3.3- Instrumentação.....	44
2.3.3.1- Especificações do sistema de digestão com bloco digestor e “dedo frio”.....	44
2.3.3.2- Espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.....	44
2.3.3.3- Especificações da incubadora utilizada no teste de extração de bioacessibilidade simples in vitro (SBET – Simple Bioaccessibility Extraction Test)	46
2.3.4- Procedimentos experimentais.....	46
2.3.4.1- Otimização univariada.....	46
2.3.4.2- Planejamento fatorial completo 2 ³	47
2.3.4.3- Matriz de Doehlert.....	48
2.3.4.4- Procedimento otimizado de decomposição da amostra em sistema de bloco digestor e “dedo frio”	48
2.3.4.5- Determinação do teor de carbono residual e da acidez residual.....	49
2.3.4.6- Ensaio de bioacessibilidade pelo teste de extração de bioacessibilidade simples (SBET).....	49
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.1- Otimização univariada da digestão de mel em bloco digestor	50
3.2- Otimização multivariada em bloco digestor	52
3.2.1- Estudo dos efeitos e das interações das variáveis com o planejamento fatorial 2 ³	52
3.2.2- Matriz de Doehlert para obtenção da condição ótima.....	54
3.3- Validação do procedimento de digestão proposto	58
3.3.1- Limites de detecção e de quantificação	59
3.3.2- Linearidade e faixa linear de trabalho	60
3.3.3- Exatidão.....	61
3.3.3.1- Exatidão por ensaio de adição e recuperação	63

3.3.4- Precisão.....	64
3.4- Aplicação do método nas amostras de mel	65
3.5- Aplicação de ferramentas estatísticas para a avaliação das amostras de mel	71
3.6- Estimativa da bioacessibilidade em amostras de mel utilizando o método <i>in vitro</i> SBET	76
3.6.1- Validação do método extração.....	76
3.6.1.1- Limites de detecção e de quantificação.....	76
3.6.1.2- Linearidade e faixa linear de trabalho	77
3.6.2- Aplicação do método de extração <i>in vitro</i> SBET nas amostras de mel.....	78
4- CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
5- REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Princípios da Química de alimentos

1.1.1 Minerais

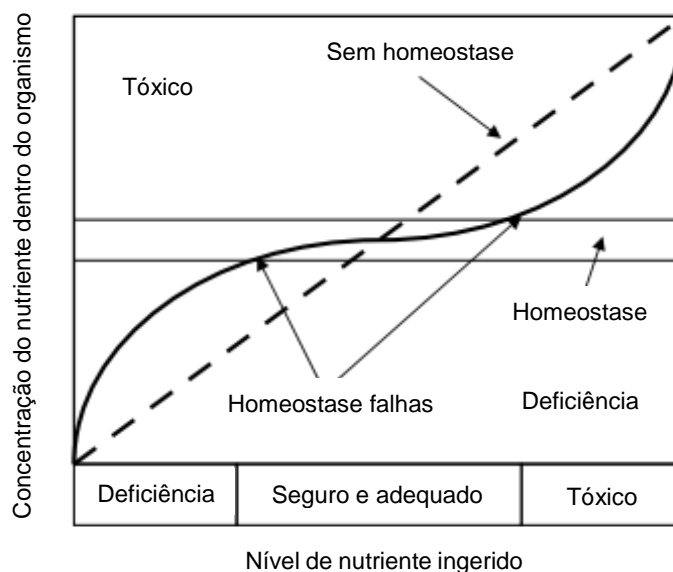
Os minerais são nutrientes inorgânicos presentes nos alimentos e, alguns deles desempenham papel fundamental em certos processos celulares que são essenciais à vida. Elementos como cálcio, fósforo, magnésio, potássio e sódio são considerados macroelementos porque são necessários mais do que 100 mg dia^{-1} por adulto. Os microelementos constituem aqueles que são necessários apenas em pequenas quantidades, da ordem de $\mu\text{g dia}^{-1}$ por adulto, sendo chamados também de elementos traço. São eles: cobre, cromo, cobalto, ferro, manganês, molibdênio, selênio e zinco. E existe, também, uma classe de elementos chamados de elementos ultra traço que incluem arsênio, boro, estanho, níquel e vanádio onde, atualmente, não há estudos suficientes evidenciando que estes elementos desempenham alguma função biológica benéfica para o organismo humano e de animais. Alguns elementos são considerados prejudiciais à saúde, como alumínio, arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio, por isto, são classificados como potencialmente tóxicos ([SOETAN, OLAIYA e OYEWOLE, 2010](#)).

A Portaria de nº 31, datada em 13 de janeiro de 1998, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define que nutriente essencial é toda substância normalmente consumida para o crescimento, desenvolvimento e manutenção da saúde e que não é biossintetizada pelo organismo ou é biossintetizada, porém em quantidade abaixo do adequado.

Essa e outras definições têm sido propostas, mas a definição amplamente aceita é que: “um elemento é essencial para a vida, se sua retirada da dieta resulta em um comprometimento consistente e reprodutível de uma função fisiológica”. Ou seja, se ocorrer a retirada ou a baixa ingestão por um período de tempo considerável, sinais de deficiência podem se desenvolver. Mas também o consumo excessivo pode resultar em toxicidade. Entretanto, a faixa de concentração dos minerais no organismo considerada segura e adequada, em geral, é ampla, graças a um processo chamado homeostase. Ela pode ser definida como um processo no qual o organismo mantém os níveis de nutrientes nos tecidos constante, controlando a absorção, metabolismo, excreção e armazenamento destes nutrientes. Sem a homeostase, seria muito difícil

controlar os níveis de nutrientes devido ao estreitamento da faixa considerada segura e adequada como mostrado na Figura 1, sendo necessário uma atenção maior na sua ingestão prevenindo toxicidade ou deficiência severa ([FENNEMA, PARKIN e DAMODARAN, 2008](#)).

Figura 1. Processo de homeostase que controla os níveis de nutrientes nos organismos vivos.



Fonte: adaptado de [FENNEMA, PARKIN e DAMODARAN, 2008](#).

A ingestão diária recomendada (IDR) para os minerais é um conjunto de recomendações para indivíduos aparentemente saudáveis ([BRASIL, 2005](#)). Tal recomendação se faz necessária uma vez que os minerais são essenciais para diversas funções biológicas, desempenhando papel crucial nas reações enzimáticas do organismo, regulação do metabolismo, para a resistência e rigidez dos ossos e dentes, para o transporte de oxigênio e dióxido de carbono no sangue, além de adesão e divisão de células. Entretanto, os minerais, podem também apresentar toxicidade considerável, existindo até casos documentados de lesões graves e, até mesmo, morte por exposição a alguns minerais. A Tabela 1 resume alguns dos aspectos nutricionais e toxicológicos de macro e microelementos ([MAHAN e RAYMOND, 2017](#)).

Tabela 1. Aspectos nutricionais e toxicológicos de alguns minerais.

Elemento	Funções	Deficiência	Ingestão Excessiva
Ca	Constituinte dos ossos e dentes, secreção hormonal, coagulação do sangue.	Osteoporose, hipertensão, risco de câncer.	Pode causar cálculos renais.
P	Síntese de DNA e RNA, síntese de fosfolípido, sinalização celular.	Baixa ingestão interfere na constituição óssea.	Cálculos renais, diminui a absorção de Ca, Fe e Zn.
Mg	Cofator em numerosas enzimas.	Rara deficiência em pacientes pós-cirurgia cardíaca.	Desconforto intestinal, diarreia, cólica e náusea.
Na	Controle do volume de fluidos extracelulares e da pressão arterial, necessário para o transporte de nutrientes para dentro ou fora das células.	Pode causar deficiência muscular.	Pode causar hipertensão.
Fe	Transporte de oxigênio, decomposição de peróxido de hidrogênio (hidrogeno peroxidase e catalase).	Anemia, fadiga, prejudica a capacidade cognitiva, diminui a defesa do organismo.	Pode levar a alguns tipos de câncer e doenças cardíacas.
Zn	Cofator em metaloenzimas, regulação da expressão gênica.	Retardamento do crescimento, prejudicial na cura de feridas, retarda a maturação sexual.	Inibe a absorção de Cu e Fe, e diminui a imunidade.
Se	Antioxidante (como componente em peroxidases).	Miocardite, osteoartrite, aumento do risco de alguns cânceres.	Perda de cabelo e unha, náusea e lesões na pele.
Pb	Nenhuma, não essencial.	Nenhuma.	Problemas na aprendizagem e comportamento de crianças, anemia, dano nos rins e câncer.
Cd	Desconhecido.	Aumento do risco de depressão em ratos.	Danos nos rins, doença óssea e câncer.
Hg	Nenhuma, não essencial.	Nenhuma.	Dormência, perda da visão e audição e danos nos rins.

Fonte: adaptado de [MAHAN e RAYMOND, 2017](#); [DE LA GUARDIA e GARRIGUES, 2015](#).

1.1.2.1 Biodisponibilidade

Diversas são as definições encontradas para o termo “biodisponibilidade” na literatura. Ainda não há uma definição amplamente aceita. Este termo originou-se na Farmacologia como um termo utilizado para indicar qual a extensão em que a fração de uma dose de fármaco alcança o seu local de ação ou um líquido biológico a partir do qual o fármaco tem acesso ao seu local de ação ([BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2012](#)).

Do ponto de vista da Química, pode ser definido como o grau em que um mineral se torna disponível a partir de uma matriz alimentar para uso pelo organismo humano ou de animais ([RUBY et al., 1999](#)). Na área da Nutrição, ela é definida como a fração do alimento ingerido disponível para utilização nos processos metabólicos e, que é determinada por ensaios *in vivo*. Indicadores podem ser utilizados para avaliar a biodisponibilidade de minerais como a retenção e a absorção, embora sejam parâmetros com ligeira diferença conceitual e incluam termos como absorção aparente (ingestão – excreção fecal total), retenção líquida [ingestão – (excreção fecal total + excreção urinária total)] e absorção verdadeira [ingestão – (excreção fecal total – excreção fecal endógena) – (excreção urinária total – excreção urinária endógena)] ([DE LA GUARDIA e GARRIGUES, 2015](#); [GALAN e DRAGO, 2014](#); [REEVES e CHANEY, 2008](#)).

Dentre os fatores que influenciam a biodisponibilidade de minerais, pode-se destacar a forma química como o mineral se encontra no alimento. Se o mineral é altamente insolúvel (hidrofóbico), o mesmo é pouco absorvido ([FENNEMA, PARKIN e DAMODARAN, 2008](#)).

Outro fator que influencia a biodisponibilidade são os tipos de ligante presentes nos alimentos. Ligantes que formam quelatos solúveis com metais podem aumentar a absorção desses metais no organismo. Ligantes com alta massa molecular diminuem a absorção de algumas espécies. Já, em relação ao potencial antioxidante de determinadas substâncias em alimentos, agentes redutores como o ácido ascórbico aumenta a absorção de ferro, mas a presença de agentes oxidantes em alimentos pode diminuir a absorção deste elemento ([FENNEMA, PARKIN e DAMODARAN, 2008](#)).

A interação mineral-mineral diminui a disponibilidade de espécies químicas, uma vez que a elevada concentração de minerais na dieta pode diminuir a absorção

de um outro mineral. Este e outros fatores como pH, salinidade, oxigênio dissolvido dentre outros, podem afetar de forma significativa a disponibilidade de alguns minerais. ([DE LA GUARDIA e CARRIGUES, 2015](#); [AMIARD, AMIARD-TRIQUET e MOUNEYRAC, 2015](#)).

1.1.2.2 Bioacessibilidade

O termo “bioacessibilidade” tem sua definição como a fração de nutriente que é liberada da matriz alimentar no fluido gastrintestinal, mas não necessariamente biodisponível. A bioacessibilidade é geralmente determinada por procedimentos *in vitro* que simulam a digestão gástrica do organismo humano ([CARBONELL-CAPELLA et al., 2014](#)).

Os métodos de extração *in vitro* simulam as condições gastrointestinais (temperatura, agitação, pH, tensão superficial, enzimas, etc.), e envolvem três áreas distintas do sistema digestivo humano: boca, estômago e intestino. A boca é onde se inicia o processo de moagem mecânica de produtos alimentares, ocorrendo a um pH 6,5 e com duração que varia de 10 s a 2 min. No estômago, o pH de aproximadamente de 1,5, sendo controlado através do ácido clorídrico presente, permitindo a dissolução de óxidos, sulfetos e carbonatos minerais lábeis, tornando os minerais bioacessíveis. A presença de pepsina no estômago agirá na quebra de proteínas, ajudando na digestão do alimento que pode durar de 8 min a 3 hs. No intestino delgado, o alimento é submetido a digestão por sucos intestinais compostos por tripsina, pancreatina, amilase, sais biliares e bicarbonato. O tempo de permanência no intestino influencia no processo de absorção de minerais, sendo que no duodeno pode durar de 30 a 45 min (a pH 4-5,5), no jejuno de 1,5 a 2 h (a pH 5,5-7,0) e no íleo de 5 a 7 h (a pH 7,0-7,5) ([DEAN, 2007](#); [MOREDA-PIÑEIRO et al., 2012](#)).

Há vários testes de extração fisiológicas na literatura que têm sido utilizados para estimar o teor bioacessível, dentre eles pode-se destacar o *Simple Bioaccessibility Extraction Test* (SBET) que simula somente as condições da fase gástrica. O *Physiological Based Extraction Test* (PBET) que simula não só a fase gástrica, mas também a fase intestinal. E o mais completo, o *Unified Bioaccessibility Method* (UBM) que simula as três fases de digestão: salivar, gástrica e intestinal. ([KOCH e REIMER, 2012](#); [OOMEN et al., 2002](#)).

1.2 Tabela de Brasileira de Composição de Alimentos – Taco

O projeto TACO (Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos) surgiu com o objetivo de gerar dados sobre a composição dos alimentos mais consumidos no território nacional, baseando-se em um plano de amostragem que garanta valores representativos e análises realizadas por laboratórios com capacidade analítica comprovada através de estudos interlaboratoriais, assegurando a confiabilidade dos resultados ([TACO, 2011](#)).

A tabela TACO pode fornecer informações cruciais para a educação nutricional, o controle da qualidade dos alimentos e a avaliação da ingestão de nutrientes de indivíduos e populações, garantindo a segurança alimentar e nutricional. Por meio destas informações, os órgãos competentes de saúde pública podem estabelecer instruções normativas e guias alimentares orientando para uma dieta mais saudável. Adicionalmente, tais dados podem nortear a produção agrícola e as indústrias alimentícias no desenvolvimento de novos produtos apoiar medidas de proteção ao meio ambiente e de sustentabilidade.

A primeira versão da tabela foi lançada em 2004 por meio do projeto TACO, desenvolvido pelo Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA/UNICAMP. A última versão já totaliza 597 alimentos, dentre eles, o mel de abelha, que fornece dados passíveis de comparação com os obtidos neste trabalho a respeito da concentração de minerais ([TACO, 2011](#)).

1.3 Produtos Apícolas

Os principais produtos derivados da apicultura são o mel, o pólen, a própolis, a cera, a geleia real e a apitoxina; sendo o mel de maior valor nutricional e de maior importância econômica. Na prática apícola, o mel é produzido em maior escala, mesmo com baixo valor agregado, a facilidade no manejo e escoamento do mel contribuem para o início da atividade apícola. Outros produtos como pólen, própolis e apitoxina são produzidos em menor escala, mas têm grande viabilidade econômica ([BERALDO e BARBOZA, 2011](#)).

1.3.1 Mel: Origem, Composição e Produção

O mel de abelha é um líquido viscoso, aromático e doce produzido a partir do néctar das flores, secreções de plantas ou, até mesmo, de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre as partes vivas das mesmas de onde as abelhas recolhem o néctar, transformam, combinam com substâncias específicas do seu intestino, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia ([BATISTA et al., 2012](#)).

O mel é produzido por variadas espécies de abelhas e, até por algumas vespas, porém a espécie *Apis mellifera* (Figura 2) é considerada como a principal produtora do mel destinado ao consumo humano ([ALVES et al., 2005](#)).

Figura 2. Abelha da espécie *Apis mellifera*, maior produtora de mel.



Fonte: [UNIVERSIDADE DE MINNESOTA, 2017](#).

A composição do mel depende principalmente da composição do néctar oriundo de diversas fontes vegetais produtoras, mas também de alguns fatores, como o solo, a espécie da abelha, o estado fisiológico da colônia, o estado de maturação do mel, as condições meteorológicas quando da colheita, variações sazonais, dentre outros. O mel é composto basicamente de açúcares, proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais, como mostrado na Tabela 2, sendo um dos alimentos mais complexos fornecido pela natureza e usado pelo homem como adoçante natural sem necessidade de processamento ([ALVES et al., 2005](#); [DEPOI, BENTLIN e POZEBON, 2010](#); [TUZEN et al., 2007](#)).

Tabela 2. Componentes básicos do mel de abelha.

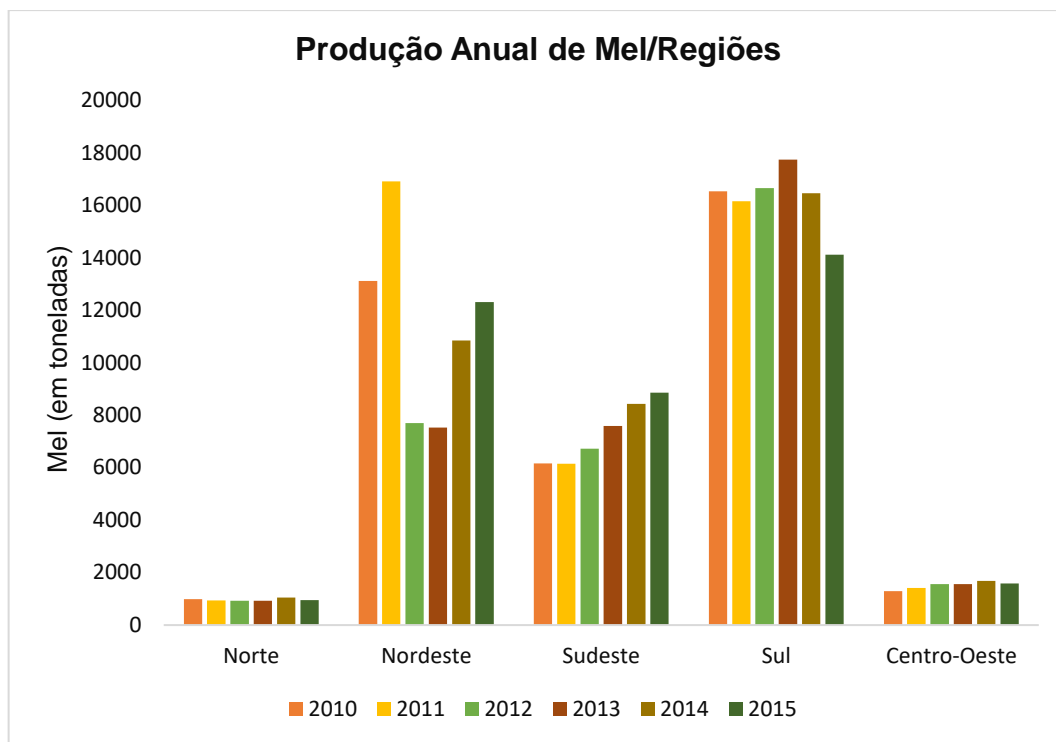
Composição básica do mel	
Componentes	Variação (%)
Frutose	27-44
Glicose	22-41
Maltose	2,7-16
Sacarose	1,5-3
Proteínas	Até 0,09
Aminoácidos	Até 0,09
Sódio	0,03-0,05
Potássio	0,04-0,12
Cálcio	0,03-0,15
Magnésio	0,05-0,08
Ferro	0,0005-0,004
Elementos traço	Até 0,01

Fonte: adaptado de [BENTLIN e POZEBON, 2010](#).

Outro fator que tem correlação com a composição do mel, é a sua coloração. Méis escuros e âmbar apresentam maiores concentrações de macro, micro e elementos traços, como por exemplo, Al, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn, do que méis claros. Sendo que, a coloração de méis escuros está intimamente ligada a maiores teores de Cd, Fe e Pb, e méis claros e castanhos claros, tendem a apresentar maiores valores de Al e Mg ([GONZALEZ-MIRET et al., 2005](#)).

O Brasil tem posição de destaque na produção de mel ficando em 8º lugar no *ranking* mundial. Dados de 2010 a 2015 mostram que a Região Sul mantém o posto de maior produtora seguida das Regiões Nordeste, Sudeste, Centro-Oeste e Norte, respectivamente, como mostra a Figura 3 ([ABEMEL, 2017](#)).

Figura 3. Produção anual de mel brasileiro por região, no período de 2010 a 2015, em toneladas.



Fonte: adaptado de [ABEMEL, 2017](#).

1.3.2 Pólen

O pólen é um elemento floral masculino de dimensões microscópicas, em média 50 micras, coletado e armazenado nos alvéolos pelas abelhas sendo utilizado como alimento proteico. Em uma determinada colmeia as abelhas utilizam cerca de 12 a 35 kg de pólen por ano para suprir suas necessidades. O pólen é um dos alimentos com maior valor nutritivo do mundo contendo uma rica composição de aminoácidos (32 aminoácidos) de proteínas, incluindo todos os essenciais para os seres humanos ([BARBOSA *et al.*, 2007](#); [ROMAN, 2009](#)).

Assim como o mel, o pólen é frequentemente utilizado em dietas *fitness*, devido ao seu potencial proteico sendo capaz de regular a função dos intestinos trazendo também benefícios para o sistema cardiovascular, pele, visão e para a próstata por ter efeitos anti-inflamatório e anti-androgênico ([HARMANESCU, POPOVICI e GERGEN, 2007](#)).

O mel pode ter vestígios de pólen, sendo que, os grãos de pólen da maioria das espécies podem ser distinguidos pela sua forma externa e pelo seu conteúdo mineral. Isto pode ser usado na identificação da origem geográfica e botânica dos méis ([ATROUSE, ORAN e AL-ABBADI, 2004](#)).

1.4 Uso de produtos apícolas no biomonitoramento ambiental

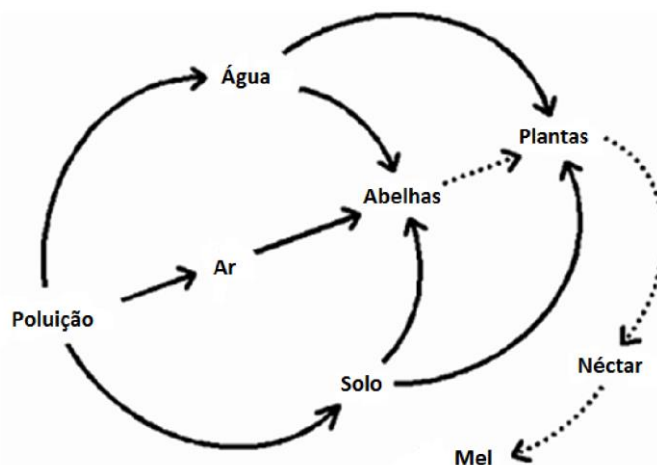
A procura do néctar pelas abelhas abrange uma superfície forrageira relativamente grande, cerca de 7 km², entrando em contato com a vegetação, o ar, a água e o solo (Figura 4). Evidentemente, as áreas industriais, urbanas e rodovias próximas à superfície forrageira das abelhas contribuem para um aumento das concentrações de alguns metais no mel, devido à poluição por resíduos químicos, gases de escape e agroquímicos. Ainda que os níveis de contaminantes na atmosfera sejam baixos, há uma contribuição para sua deposição e acumulação no solo ([POHL, 2009](#); [PEHLIVAN e GÜL, 2015](#)).

As plantas absorvem a poluição ambiental de distintas maneiras, e o nível de contaminação depende da origem floral destas plantas visitadas por abelhas. Abelhas que visitam plantas com maior nível de exposição, ou de espécies de plantas que absorvem poluentes com maior facilidade, são mais propícias a produzir mel com maiores teores de elementos tóxicos. Por exemplo, méis produzidos a partir do néctar colhido de plantas aromáticas são caracterizados por conter alto teores de metais tóxicos devido a facilidade dessas plantas de bioconcentrar os poluentes do que as plantas herbáceas ([DEVILLERS *et al.*, 2002](#)).

Cabe destacar é o fato do corpo da abelha ser peludo, isso facilita a absorção de poluentes atmosféricos. A fonte alimentar das abelhas como o néctar, o pólen e a água podem ser outra via de exposição à poluição. Portanto, o mel pode ser considerado um bioindicador da poluição ambiental podendo indicar o nível de contaminação do ar, da água, das plantas e do solo sobre a área forrageira das abelhas, sendo que os níveis de elementos traços no mel livre de contaminação severa são relativamente baixos ([POHL, 2009](#); [LAZOR, 2012](#)).

O pólen também pode ser utilizado como bioindicador da poluição ambiental uma vez que está exposto à contaminação por substâncias e compostos provenientes do solo onde a planta é cultivada, seja através de suas raízes ou através da sedimentação direta de poluentes oriundos de diferentes fontes, até mesmo antrópicas. Como o pólen coletado pelas abelhas não sofre quaisquer biotransformação, sendo apenas misturado com mel, o nível do elemento químico no pólen está mais próximo do valor real deste no ambiente ([ROMAN, 2009](#); [BARBOSA *et al.*, 2007](#)).

Figura 4. Fontes naturais e antrópicas de elementos químicos em méis.



Fonte: adaptado de [POHL, 2009](#).

Diante da importância abordada do mel e de outros produtos da colmeia na dieta alimentar e no biomonitoramento da poluição ambiental, são necessárias estratégias analíticas de preparo de amostras que permitam avaliar o perfil mineral e estimar a bioacessibilidade de minerais em méis de abelha.

1.5 Métodos de preparo de amostras

A missão da química analítica é desenvolver estratégias para a determinação de uma ou mais espécies químicas em diferentes materiais, com o objetivo de solucionar um problema analisando uma ou mais amostras pelo método mais apropriado e obrigatoriamente validado ([KRUG, 2010](#)).

Em geral, para a determinação de espécies químicas numa dada amostra, a mesma deve ser submetida a um tratamento adequado que pode variar desde um simples polimento da superfície de uma amostra, até a transformação completa da amostra sólida ou suspensão em uma solução homogênea compatível com o método de determinação. Há técnicas que possibilitam a análise de amostras no estado sólido, enquanto outras somente com amostras na forma de uma solução aquosa ou suspensão. Portanto, em análises químicas, a técnica utilizada pode necessitar de algum tipo de preparo de amostra, transformando a forma original da amostra numa forma mais apropriada para análise. Lembrando que em situações mais simples a amostra poderá ser analisada sem nenhum tipo de pré-tratamento, podendo incluir ou não alguma forma de separação ([KRUG, 2010](#)).

1.5.1 Métodos de decomposição por via seca

A decomposição por via seca é um método relativamente simples destinado às matrizes com alto teor de matéria orgânica para remoção da mesma. Pode ser principalmente aplicado à determinação de espécies inorgânicas não voláteis ([MITRA, 2004](#)).

O método de decomposição por fusão é o aquecimento até a fusão da matriz que ocorre em elevadas temperaturas e pressão ambiente, onde a amostra é colocada em um cadinho de porcelana ou platina e sua decomposição é realizada sob presença de um fundente como os hidróxidos de metais alcalinos, carbonatos e boratos usualmente em fornos mufla com temperaturas que variam de 400 a 900°C. Ao final do processo, o que se obtém são os óxidos, carbonatos e/ou boratos dos metais (analitos) de interesse, que em grande maioria são solúveis em água ou soluções aquosas ácidas ([HOENIG e KERSABIEC, 1996](#)).

A fusão é mais indicada para determinação de macroatômicos e suas principais vantagens são: eficiência no preparo de amostras geológicas de difícil solubilização em ácidos minerais e aplicabilidade para grandes quantidades de amostras que podem ser solubilizadas em pequenas quantidades de ácido facilitando assim a pré-concentração de analitos caso seja desejada. Dentre as desvantagens pode-se citar: tempo de digestão elevado, utilização de um fundente o que aumenta risco de contaminação, e não é indicado para determinações de elementos voláteis como As, Cd, Hg e Se devido a perdas, pois as temperaturas comumente utilizadas são elevadas ([MITRA, 2004](#); [MESTER e STURGEON, 2003](#)).

Assim como na fusão, na combustão também ocorre a “queima” da amostra, mas neste caso o oxigênio do ar que atua como agente oxidante. Neste procedimento existe a possibilidade do uso de aditivos para se evitar a perda de analitos como As, Hg e Pb por volatilização. O produto resultante deste método de preparo é um resíduo inorgânico denominado cinza, composto por óxidos, silicatos e sulfatos dos analitos que são solúveis em ácidos diluídos. Dentre suas principais vantagens pode-se citar a possibilidade de se usar grandes quantidades de amostras que podem ser solubilizadas em pequenos volumes de ácido, e a redução de reagentes utilizando apenas o oxigênio do ar, mais o calor, para promover a combustão diminuindo assim as fontes de contaminação. Como desvantagens deste método pode-se citar o fato de haver perdas da amostra como em forma de cinzas, perdas por volatilização, e o uso

de cadinhos para a combustão poder comprometer a exatidão uma vez que podem conter contaminantes em sua estrutura ([MESTER e STURGEON, 2003](#); [MITRA, 2004](#)).

1.5.2 Métodos de decomposição por via úmida

A decomposição por via úmida, também denominada de digestão ou, até mesmo, de decomposição oxidativa consiste em decompor os compostos orgânicos e inorgânicos em sais de seus elementos constituintes empregando ácidos minerais, oxidantes auxiliares (como o H_2O_2) e aquecimento ([MESTER e STURGEON, 2003](#)).

Os métodos de digestão por via úmida podem ser realizados em recipientes abertos ou tubos digestores, numa placa quente ou num bloco de aquecimento de alumínio. Também, podem ser feitos em recipientes fechados a pressão elevada com aquecimento térmico ou por radiação micro-ondas ([KORN et al., 2008](#)).

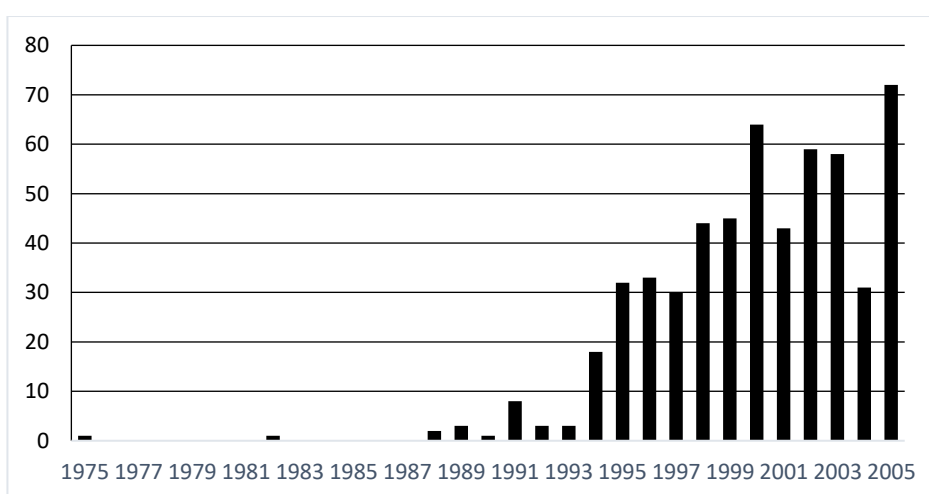
Geralmente, em matrizes orgânicas, é utilizada uma mistura oxidante para destruir toda a matéria orgânica e solubilizar a amostra, com o intuito de produzir uma solução clara contendo os constituintes inorgânicos para análise por técnicas como, por exemplo, a espectrometria de absorção atômica (AAS), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). O ácido nítrico é, mais frequentemente, utilizado porque diminui as chances de formar sais insolúveis como pode acontecer com HCl ou H_2SO_4 . O peróxido de hidrogênio pode ser adicionado para aumentar a eficiência de oxidação da solução de digestão ([MITRA, 2004](#)).

Este método de decomposição é muito indicado para determinação de baixas concentrações de constituintes inorgânicos em diversas matrizes, pois elementos de interesse são convertidos em cátions inorgânicos simples não voláteis, que permanecem no meio ácido. Pode também ser empregado para a determinação de nitrogênio, fósforo e enxofre, entre os não-metals. Contudo, alguns cátions inorgânicos disponibilizados podem ser perdidos por volatilização parcial ou completa, como por exemplo, os halogênios, além de Sb, As, B, Pb, Hg e Se a depender do procedimento empregado ([MESTER e STURGEON, 2003](#)). Logo, se faz necessário desenvolver procedimentos adequados para atender o objetivo da determinação de elementos químicos e a técnicas a ser utilizada.

1.5.2.1 Radiação Micro-ondas

O preparo de amostras assistida por radiação micro-ondas é um dos métodos de digestão mais utilizado atualmente, tanto na decomposição de materiais inorgânicos quanto orgânicos, na Figura 5 pode-se ver a quantidade de trabalhos que empregam o preparo de amostras com radiação micro-ondas no período entre 1975 e 2005 ([KRUG, 2010](#)).

Figura 5. Número de publicações que utilizaram procedimentos de preparo de amostras com radiação micro-ondas agrupadas por ano de publicação.



Fonte: adaptado [KRUG, 2010](#).

O preparo de amostra assistida por radiação micro-ondas apresenta como vantagens: tempo curto para o preparo de amostras; aquecimento direto das amostras e reagentes (o aquecimento ocorre de dentro para fora do sistema reacional); os recipientes são fabricados com polímeros de alta temperatura, que são menos propensos a conter contaminantes metálicos do que os vasos ou cadinhos de vidro ou cerâmica; uso reduzido de amostra e de reagentes, o que diminui o risco de contaminação, e também diminui o sinal do branco, aplicável às amostras que possuem compostos refratários; e perdas desprezíveis de elementos voláteis ([KRUG, 2010](#); [OLIVEIRA, 2003](#)).

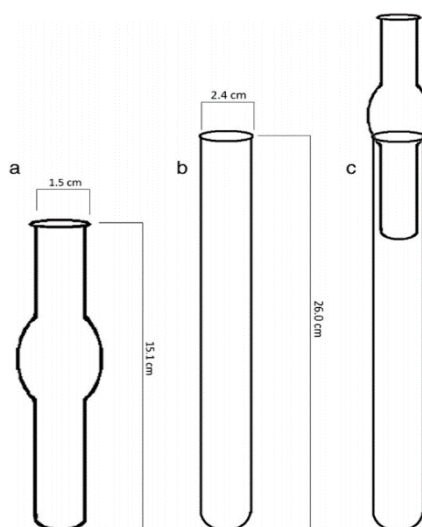
1.5.2.2 Aquecimento condutivo em bloco digestor

A digestão em bloco digestor é um procedimento de decomposição por via úmida, em que, de modo geral, um tubo digestor contendo a amostra e o(s)

reagente(s) é colocado num bloco de alumínio (que se assemelha a uma placa aquecedora, porém com um suporte contendo orifícios para encaixe dos tubos), controlando-se a temperatura através de um termostato que se conecta a um microprocessador digital (varia de acordo com o modelo) que indica e regula o valor da temperatura. O aquecimento no bloco é por condução, diferentemente do microondas que é induzido por radiação, ocorrendo de fora para dentro do sistema reacional, primeiro aquecendo-se o bloco, para posteriormente o tubo de borossilicato e por conseguinte a amostra com o(s) reagente(s) ([KRUG, 2010](#)).

O sistema de decomposição em bloco digestor é considerado um sistema aberto, porém pode-se fazer o uso de um sistema (semiaberto) de refluxo utilizando “dedo frio” quando pretende-se determinar elementos químicos voláteis. O “dedo frio” é um tubo de vidro fechado em uma das extremidades na forma de um dedo (Figura 6a). Antes de se iniciar a digestão ácida por aquecimento convencional usando bloco digestor, coloca-se água deionizada no “dedo frio” acoplando-o ao tubo digestor (Figura 6b e 6c). Os vapores dos elementos químicos voláteis formados com o aumento de temperatura entram em contato com o “dedo frio” na parte superior e condensam. Esse sistema de refluxo evita a perda de grande parte dos elementos voláteis. Os ácidos inorgânicos utilizados nestes sistemas de digestão com uso do “dedo frio” também se condensam por refluxo ([FERREIRA *et al.*; 2013](#); [FERREIRA *et al.*; 2015](#)).

Figura 6. Sistema de refluxo com “dedo frio”. (a) tubo de “dedo frio”; (b) tubo digestor e (c) tubo de “dedo frio” acoplado ao tubo digestor.



Fonte: [FERREIRA *et al.*, 2013](#).

As vantagens de se utilizar o método de decomposição em bloco digestor são: menor risco de contaminação comparado a sistemas abertos convencionais, alta frequência analítica, flexibilidade quanto à massa da amostra a ser utilizada, flexibilidade quanto ao uso de ácidos inorgânicos, aplicável a todos os tipos de amostras, exceto àquelas que contêm compostos refratários. Entretanto, como todo método de decomposição, há também algumas desvantagens como, por exemplo, tempo elevado de digestão comparado ao micro-ondas, perdas de elementos químicos por volatilização, limitação quanto à temperatura de decomposição que é dependente da temperatura de ebulição dos agentes oxidantes utilizados, e o teor de carbono residual que pode variar consideravelmente dependendo do tipo de ácido ou do tipo de amostra utilizados ([KRUG, 2010](#); [SANTOS, 2012](#); [OLIVEIRA, 2003](#)).

1.6 Eficiência dos métodos de digestão

Um dos mais importantes parâmetros para se avaliar a eficiência dos métodos de digestão é o teor de carbono residual (RCC), que é calculado usando-se os teores de carbono inicial da amostra (C_o) e o remanescente após o processo de digestão (C_R), podendo ser determinado, por exemplo, por ICP OES ([KRUG e ROCHA, 2016](#)).

Com a quantificação do teor de carbono residual pode-se obter informações quantitativas mais confiáveis sobre a eficiência de digestão da matéria orgânica. Quando o teor de carbono residual interfere na etapa de determinação, sua quantificação se torna muito importante. Na literatura há várias formas de expressar a eficiência de um método de digestão de amostras orgânicas. Entre as mais importantes podem-se destacar: *i*) o teor de carbono residual (RCC), que consiste na massa de carbono solúvel no digerido final em relação à massa de carbono inicial presente na matriz, frequentemente expresso em porcentagem e *ii*) o teor de carbono orgânico dissolvido (DOC), que representa a concentração de carbono presente no digerido final, sem relacionar com a massa inicial de carbono presente na matriz. O RCC pode fornecer informações importantes do quão próximo o procedimento está da oxidação total da matéria orgânica a CO_2 . Já o DOC, importante na etapa de determinação, indicando a quantidade de carbono que será introduzida nos equipamentos utilizados para a determinação elementar ([KRUG e ROCHA, 2016](#)).

1.7 Técnicas Espectrométricas

Atualmente, existem três tecnologias atômicas com plasma indutivamente acoplado (ICP): a espectrometria de emissão óptica (ICP OES), a espectrometria de massas (ICP-MS) e a espectrometria de fluorescência atômica (ICP-AFS). As fontes de plasma permitem a atomização e a ionização de uma grande parte dos elementos em variados tipos de amostras, tendo assim aplicação em diferentes matrizes, inclusive de alimentos como a matriz apícola ([LECLERCQ et al.; 2015a](#); [LECLERCQ et al.; 2015b](#)).

A espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), são as técnicas analíticas mais utilizadas para determinações de elementos traços devido à alta sensibilidade, seletividade e, principalmente, pela alta capacidade multielementar ([NOVAES et al.; 2016](#); [BINGS, NIESSEN e SCHAPER; 2014](#)).

A técnica ICP OES tem como principais vantagens: alta sensibilidade, análise multielementar simultânea, rapidez, ampla faixa linear dinâmica, boa precisão e exatidão e baixos limites de detecção. Sua principal desvantagem é relacionada com o custo operacional, pois para manter o plasma é necessário um fluxo elevado de gás, sendo o gás argônio e, principalmente, o gás hélio que apresentam um preço consideravelmente alto ([HILL, 2008](#)).

A espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) é uma técnica analítica que permite separar íons com base na sua razão massa/carga, sendo amplamente utilizada para a determinação de elementos traços. Em geral, o espectrômetro de massa quantifica os íons gerados por um plasma de argônio. O ICP-MS tem como principais vantagens permitir uma análise quantitativa rápida, baixos limites de detecção para muitos elementos, assim como análises semiquantitativas rápidas e ampla faixa linear dinâmica. A técnica de ICP-MS tem excelentes limites de detecção, com grande parte dos elementos podendo ser determinados com limites de detecção na faixa de ng L^{-1} ([KRZCIUK, 2016](#); [GINÉ-ROSIAS, 1999a](#)).

1.8 Ferramentas quimiométricas

As técnicas de planejamento de experimentos são ferramentas que empregam conceitos matemáticos e estatísticos aliados a recursos de informática para planejar e otimizar experimentos estabelecendo modelos matemáticos passíveis de

interpretação e validação. O planejamento fatorial completo de dois níveis é uma ferramenta de otimização de processos que tem como vantagem a não necessidade de programas estatísticos avançados para analisar as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação na(s) resposta(s) obtidas do planejamento experimental ([FERREIRA, 2015](#)).

Um planejamento multivariado tem um número de experimentos menor que um processo univariado, porém se seus experimentos forem feitos em replicatas, isso pode aumentar significativamente o número de experiências. Para contornar este problema e obter uma boa estimativa dos erros, um ponto é incluído no centro domínio experimental do planejamento em que o valor médio dos níveis de todas as variáveis é empregado, conhecido como experimento no ponto central (nível zero). Com isso, é possível avaliar a significância dos efeitos ou coeficientes, tanto em planejamentos de triagem (completos ou fracionários) como em metodologias de superfície de resposta ([TEOFILO e FERREIRA, 2006](#)).

Após o planejamento e triagem, os fatores significativos são analisados e/ou modificados e uma metodologia de análise de superfícies de respostas pode ser executada para otimização do experimento. O objetivo de se construir uma superfície de resposta é encontrar os valores críticos das variáveis que levam a melhor resposta desejada, isto é, encontrar o ponto ótimo na superfície definida pelos fatores em um dado domínio experimental ([BEZERRA et al., 2008](#)).

A metodologia de superfície de resposta (*RSM* – do inglês: *Response Surface Methodology*) empreende um grupo de técnicas matemáticas e estatísticas baseadas em ajustes de modelos empíricos obtidos de dados experimentais. Isto é, empregam-se funções polinomiais lineares ou quadradas para descrever o sistema em estudo, fazendo-se uma modelagem do domínio experimental até sua otimização ([TEOFILO e FERREIRA, 2006](#)).

Técnicas estatísticas de análises multivariadas como a análise de componentes principais (*PCA* – do inglês *Principal Component Analysis*) e análise de agrupamento hierárquica (*HCA* – do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*) estão cada vez mais em uso e, são de suma importância quando se pretende estudar padrões e variáveis de agrupamentos naturais com base em similaridades entre as amostras de mel ([YÜCEL e SULTANOĞLU, 2013](#); [YÜCEL e SULTANOĞLU, 2012](#)).

Informações relevantes sobre a origem botânica e geográfica de méis podem ser obtidas aplicando-se a análise de componentes principais (*PCA*) e a análise de

agrupamento hierárquico (HCA) como relatado por alguns autores ([TERRAB, HERNANZ e HEREDIA, 2004](#); [MADEJCZYK e BARALKIEWICZ, 2008](#); [KEK et al., 2017](#); [PURCAREA et al., 2017](#)).

1.9 Revisão bibliográfica

O aspecto do mel e a forma como é produzido pelas abelhas remete a uma ideia de ser um produto natural e saudável. De fato, o mel contribui como uma fonte de elementos essenciais na dieta alimentar. Mas, nos dias de hoje, todo alimento pode ser contaminado, ainda mais quando produzido de forma inadequada. Já houve relatos de méis contaminados em algumas partes do mundo, o que prejudica a confiabilidade na qualidade do mel produzido. Portanto, a determinação do perfil mineral de méis pode auxiliar o apicultor na localização das diferentes fontes de contaminação e, também, da necessidade de suplementação. Esta revisão tem por objetivo expor criticamente os trabalhos mais relevantes sobre a determinação de elementos essenciais e contaminantes inorgânicos em méis.

[VANHANEN, EMMERTZ E SAVAGE \(2011\)](#) analisaram o perfil mineral de 10 amostras de mel monofloral da Nova Zelândia. As amostras foram coletadas, e o procedimento de digestão ácida consistiu em pesar 1g de mel em uma bomba de Teflon™, adicionar 2,0 mL de peróxido de hidrogênio a 30% m m⁻¹ e adicionar 5,0 mL de ácido nítrico 69% m m⁻¹, deixando digerir *overnight*, a temperatura ambiente. Após isso, seguiu-se com a digestão em forno de micro-ondas a 100°C por 5 minutos e depois a 140°C por mais 5 minutos. As amostras digeridas foram analisadas por ICP OES. Os testes de adição e recuperação tiveram valores de percentagem que variaram de 92,2 a 123,4%. Foram quantificados 18 elementos com valores (mg kg⁻¹) variando de: Al (0,21-21,3), As (0,04-0,17), B (2,25-6,66), Ca (7,21-94,3), Cd (0,01-0,45), Cr (0,12-0,55), Cu (0,09-0,70), Fe (0,67-3,39), K (34,8-3640), Mg (7,52-86,3), Mn (0,18-4,75), Na (1,10-110), Ni (0,02-0,65), P (29,5-255), Pb (0,01-0,04), S (13,4-93,9) e Zn (0,20-2,46). Segundo os resultados obtidos pelos autores, os elementos mais abundantes foram Ca, K e P. Em algumas amostras de mel não foram detectadas concentrações de Zn acima do limite de quantificação, que segundo os autores esse resultado tem relação ao fato de o solo, da Ilha Sul da Nova Zelândia de onde as amostras foram coletadas, ser potencialmente deficiente em zinco.

[ALTUNDAG, BINA E ALTINTIG \(2016\)](#), fizeram uso da técnica ICP OES para avaliar o perfil mineral de mel e melaço comercializados na Turquia. Dois procedimentos de decomposição foram comparados, um deles usando chapa aquecedora e outro por forno de micro-ondas. No procedimento usando aquecimento condutivo foi pesado 1 g da amostra de mel, adicionando-se 6,0 mL de HNO₃ (65% m m⁻¹) e 2,0 mL de H₂O₂ (30% m m⁻¹) num frasco de 100 mL. A mistura reacional foi aquecida até 130°C. No segundo procedimento, empregando digestão assistida por radiação micro-ondas, 1 g de mel foi pesado e a proporção dos reagentes adicionados foi de 3:1 de HNO₃ e H₂O₂. A exatidão dos dois métodos foi avaliada utilizando-se material de referência certificado de folha de macieira e de chá, NIST 1515 e INCY-TL-1, respectivamente. A ordem de concentração de metais investigados no mel foi Fe>Zn>Mn>Al>Cu>Pb>Ni. Os autores verificaram através de testes estatísticos que o procedimento no micro-ondas gerou melhores resultados.

No Brasil, [BATISTA et al. \(2012\)](#) quantificaram 42 elementos em amostras de mel brasileiro por ICP-MS, estimando a origem geográfica através da técnica de extração de dados. No pré-tratamento da amostra, os méis sem granulações foram vigorosamente agitados, e méis com granulações (cristais de açúcar) foram aquecidos até 65°C em banho-maria por 30 minutos e ocasionalmente agitados. Os autores compararam dois procedimentos de preparo da amostra, um por diluição direta, e outro por digestão em forno de micro-ondas. As amostras foram separadas por região e por elemento químico para análise quimiométrica. As amostras analisadas pelos autores apresentaram valores médios de concentração mais altos para Al, Mg e Ni, e valores médios mais baixos para Cd, Cu e Pb. Outra constatação foi que a presença de elementos terras raras como La, Dy, Ce, Th, Sm, Ho e Er no mel; estes têm relação com o uso de fertilizantes contendo altos níveis desses elementos para o cultivo de plantas.

[LEME et al. \(2014\)](#) investigaram diferentes métodos de preparo de amostras de mel, a fim de obter uma maior eficiência na redução do teor de carbono residual e baixa acidez final. Para isto, foi realizada a otimização de dois procedimentos de digestão (bloco digestor e forno de micro-ondas). A otimização no bloco digestor não foi satisfatória para as duas respostas de interesse. Se o teor de carbono residual fosse baixo, a acidez era alta e vice-versa; isso porque para diminuir o teor de carbono foi necessário um aumento na concentração de oxidante no meio reacional. No procedimento usando forno de micro-ondas os autores optaram por fazer a otimização

através do desenho composto central composto por 13 experimentos, usando a função desejabilidade para encontrar a condição ótima do sistema. Para isto, variou-se a potência do forno micro-ondas e a concentração de HNO_3 , tendo também como resposta o RCC e a acidez final. A condição ótima encontrada usando o forno de micro-ondas foi com emprego de HNO_3 diluído ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) e 1000 W de potência. Os autores quantificaram 11 elementos em 54 amostras de méis brasileiros e em 6 amostras estrangeiras, sem evidências de contaminação.

[OLIVEIRA et al. \(2017\)](#) avaliaram o efeito de matriz na determinação de elementos terras raras e As, Bi, Cd, Pb, Se e In em amostras de mel e pólen de abelhas brasileiras. No preparo da amostra pesou-se 1,0 grama de mel, adicionou-se 7,0 mL de HNO_3 ($65\% \text{ m m}^{-1}$) e 1,0 mL de H_2O_2 ($30\% \text{ m m}^{-1}$). A digestão foi feita em forno de micro-ondas a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos e a determinação por ICP-MS. Os elementos terras raras e As, Bi, Cd, Pb, Se e In quantificados estavam abaixo do limite máximo permitido.

[ALTUN et al. \(2017\)](#) determinaram o conteúdo mineral (elementos essenciais e potencialmente tóxicos) em amostras de mel das regiões Sul e Leste da Turquia. No procedimento de preparo da amostra pesou-se 1,0 grama de mel, adicionando-se 4,0 mL de HNO_3 ($65\% \text{ m m}^{-1}$) e 0,5 mL de H_2O_2 ($30\% \text{ m m}^{-1}$). A digestão seguiu em forno de micro-ondas a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos e a $160 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. A determinação de Na, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Al, Cr, Ni, Cd, e Pb foi feita por ICP-MS. O método foi validado utilizando-se material de referência de folha de macieira (NIST 1515). Os autores concluíram que as amostras de mel provenientes dessas regiões da Turquia apresentam alta qualidade, visto que as concentrações dos metais tóxicos estavam abaixo do limite de detecção.

[RIBEIRO et al. \(2015\)](#) investigaram a variação sazonal dos teores de elementos traços e microelementos em amostras de mel brasileiros. No preparo da amostra, 500 μL de mel foi digerida em forno mufla a 550°C por 20 minutos com 5,0 mL de HCl ($50\% \text{ v v}^{-1}$). Os elementos K, Ca, Fe, Mn, Zn, Cr, Ni, Cu, Se, Br, Sr e Ti foram determinados por fluorescência de raios-X de reflexão total (TXRF). A validação do método foi realizada com material de referência certificado de fígado bovino (NIST 1577b). Os autores relataram que variações sazonais têm influência significativa na composição do mel, afetando principalmente os teores de Ca e K nas amostras analisadas, com valores mais altos na primavera e verão. Porém, não foi verificado diferenças sazonais nas concentrações de Cr, Ni, Se e Ti em quaisquer amostra,

mostrando que na região estudada há um baixo nível de contaminação em qualquer época do ano.

[KRAKOWSKA *et al.* \(2015\)](#) determinaram metais traço em amostras de mel da Argentina, Espanha, Grécia, Itália e Polônia. A determinação de Ca, K, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Pb e Cd foi feita por espectrometria de absorção atômica por chama, e o método foi validado usando-se material certificado de ervas polacas misturadas (CRM INCT-MPH-2). No preparo das amostras, 0,2 gramas de mel foi pesado e digerido com 8,0 mL de HNO₃ (65% m m⁻¹) e 4,0 mL de H₂O₂ (30% m m⁻¹) em forno de micro-ondas por 50 minutos. Os autores relataram baseados na análise multivariada de dados (PCA e HCA), que méis de mesma origem botânica podem apresentar diferentes composições se provenientes de lugares diferentes, além do mais são ricos em elementos essenciais, contribuindo com uma boa suplementação na dieta diária.

A Tabela 3 mostra resumidamente os trabalhos mais relevantes relacionados a determinação de espécies inorgânicas em amostras de mel e outros produtos apícolas.

Tabela 3. Determinação de compostos inorgânicos em amostras de méis utilizando técnicas espectrométricas.

Autor/Local	Tratamento da amostra	Massa/Volume de amostra utilizada	Reagentes utilizados	Técnica utilizada	Analitos estudados	Validação do método
RIBEIRO et al., 2015 /RJ, Brasil	Forno mufla a 550°C por 20 min	500 µL	5,0 mL de HCl (50% v v ⁻¹)	TXRF	K, Ca, Fe, Mn, Zn, Cr, Ni, Cu, Se, Br, Sr e Ti	CRM NIST 1577b (fígado bovino)
AGHAMIRLOU et al., 2015 /Tehran, Irã	Forno de micro-ondas	1 grama	10,0 mL de HNO ₃ (65% m m ⁻¹); H ₂ O ₂ (30% m m ⁻¹)	ICP OES	As, Cd, Cr, Pb, Ni, Zn e Cu	Adição e recuperação
PAUL et al., 2017 /Dhaka, Bangladesh	Placa aquecedora a 400°C	2 gramas	HClO ₄ / HCl numa proporção de 1:2	FAAS	Na, K, Mg, Ca, Fe, Zn, Cu, Ni, Co e Cd	Adição e recuperação
OLIVEIRA et al., 2017 /MG, Brasil	Forno de micro-ondas, 200°C por 15 min	1 grama	7,0 mL de HNO ₃ (65% m m ⁻¹) e 1,0 mL de H ₂ O ₂ (30% m m ⁻¹)	ICP-MS	Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Tm, Lu, Yb, As, Bi, Cd, Pb, Se e In	CRM NIST 1515 (folha de macieira)
CZIPIA, ANDRÁSI e KOVÁCS, 2015 /Debrecen, Hungria	Placa aquecedora, 30 min a 60°C e 90 min a 120°C	3 gramas	10,0 mL de HNO ₃ (65% m m ⁻¹) e 3,0 mL de H ₂ O ₂ (30% m m ⁻¹)	ICP OES e ICP-MS	Al, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, S e Zn por ICP OES e As, Cd, Cr, Mo, Pb, Se por ICP-MS	Método de referência
KRAKOWSKA et al., 2015 /Krakow, Polônia	Forno de micro-ondas, 50 min	0,2 gramas	8,0 mL de HNO ₃ (65% m m ⁻¹) e 4,0 mL de H ₂ O ₂ (30% m m ⁻¹)	FAAS	Ca, K, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Pb e Cd	CRM INCT-MPH-2 (Ervas polacas misturadas)
VANHANEN, EMMERTZ e SAVAGE, 2011 /Leeston, Nova Zelândia	Forno de micro-ondas, 5 min a 100°C e 5 a 140°C	1 grama	5,0 mL de HNO ₃ (65% m m ⁻¹) e 2,0 mL de H ₂ O ₂ (30% m m ⁻¹)	ICP OES	Al, As, B, Ca, Cd, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S e Zn	Adição e recuperação
ALTUNDAG, BINA e ALTINTIG, 2016 /Sakarya e Istambul, Turquia	Placa aquecedora até 130°C; Forno de micro-ondas	1 grama	6,0 mL de HNO ₃ (65% m m ⁻¹) e 2,0 mL de H ₂ O ₂ (30% m m ⁻¹)	ICP OES	Al, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn	CRM NIST 1515 (folha de macieira) e INCY-TL-1 (folha de chá)

Tabela 3 (PARTE 2). Determinação de compostos inorgânicos em amostras de méis utilizando técnicas espectrométricas.

ALTUN et al., 2017 /Sanliurfa, Turquia	Forno de micro-ondas, 10 min a 120°C e 15 min a 160°C	1 grama	4 mL de HNO ₃ (65% m m ⁻¹) e 0,5 de H ₂ O ₂ (30% m m ⁻¹)	ICP-MS	Na, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Al, Cr, Ni, Cd, e Pb	CRM NIST 1515 (folha de macieira)
LEME et al., 2014 /MT, Brasil	Forno de micro-ondas; Bloco digestor a 90°C por 3hs	0,200 grama e 0,250 grama	4,0 mL de HNO ₃ (65% m m ⁻¹) e 1,0 de H ₂ O ₂ (30% m m ⁻¹) no bloco; 4,0 mL de HNO ₃ (65% m m ⁻¹) e 1,0 de H ₂ O ₂ (30% m m ⁻¹) e 3,0 mL de H ₂ O no forno micro-ondas	ICP-MS	Se, Mg, Ca, Al, P, Mn, Fe, Cu, Zn, Ba, e Pb	CRM NIST 1573a (folha de tomate) e CRM NIST 1547 (folha de pessegueiro)
BATISTA et al., 2012 /SP, Brasil	Diluição direta a 65° por 30 min; Forno de micro-ondas, 5 min a 160°C e 20 min a 230°C	1 grama e 0,5 grama	1000 mg de H ₂ O + 400 µL de solução diluída + 200 µL de HNO ₃ (65% m m ⁻¹); 4,0 mL de HNO ₃ (65% m m ⁻¹) e 2,0 mL de H ₂ O ₂ (30% m m ⁻¹)	ICP-MS	Al, Cu, Pb, Zn, Mn, Cd, Tl, Co, Ni, Rb, Ba, Be, Bi, U, V, Fe, Pt, Pd, Te, Hf, Mo, Sn, Sb, P, La, Mg, I, Sm, Tb, Dy, Sd, Th, Pr, Nd, Tm, Yb, Lu, Gd, Ho, Er, Ce e Cr	CRM NIST 1568a (farinha de arroz) e Comparação de métodos
PERNA et al., 2014 /Potenza, Itália	Forno mufla e placa aquecedora, 12h a 80°C e 450°C até carbonizar	5 gramas	5 mL de HNO ₃ (0,1M) e 1 mL de H ₂ O ₂ (30% m m ⁻¹)	ICP-QMS	As, Cd, Cr e Pb	Amostra de mel sintética contendo (As, Cd, Cr e Pb)

TXRF: Fluorescência de Raio-X de Reflexão Total

ICP OES: Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

ICP-MS: Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

ICP-QMS: Espectrometria de massas quadrupolar com plasma indutivamente acoplado

De acordo com a Tabela 2 acima, pode-se ver que em alguns trabalhos, há o uso de grande volume de ácido nítrico, como em [AGHAMIRLOU *et al.*, 2015](#), e tempo de digestão elevado, como em [CZIPA, ANDRÁSI E KOVÁCS \(2015\)](#), em que o tempo de digestão total compreende um intervalo de duas horas. Tais condições de tratamento da amostra torna o método demorado e contribui para maior geração de resíduos, não atendendo assim, os princípios da Química Verde.

Na ausência de um material de referência de mel, é possível observar na Tabela 2, a tendência dos trabalhos em optar por um material de referência certificado que seja de folhas. A explicação para esse fato é que, CRM's de folhas apresentam maiores teores de carboidratos. Como o mel possui alto teor de carboidratos, esses materiais de referência se assemelham melhor à matriz apícola.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver estratégia analítica para avaliação da composição mineral e da estimativa da bioacessibilidade em méis brasileiros e portugueses.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver estratégia analítica de preparo de amostras de mel em bloco digestor;
- Caracterizar os parâmetros de mérito do método analítico;
- Avaliar as amostras de mel coletadas no Brasil e em Portugal;
- Avaliar a composição mineral e bioacessibilidade de elementos essenciais e tóxicos por ICP OES;
- Estabelecer a influência da cor e de aspectos geográficos na composição mineral do mel por análise multivariada de dados HCA e PCA;
- Comparar os valores obtidos com os valores encontrados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO).

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1 Amostras e materiais de referência

Um conjunto de 18 amostras de mel foram adquiridas junto a estabelecimentos comerciais da cidade de Salvador, Bahia (14 amostras); Amadora, Portugal (02 amostras) e através de apiários do estado da Bahia (02 amostras). As amostras de méis foram provenientes de diferentes cidades brasileiras. O conjunto de amostras compreende diversas marcas e diferentes floradas que foram classificadas pelos seguintes códigos: MFN-E, MAJ-A, MFO-A, MAB-C, MD-E, MAE-A, MER-A e MXX-C (Bahia); MVM-E e MDC-C (Minas Gerais); MCA-A (Piauí); MMN-E (Santa Catarina), MEM_F-A e MEM_L-C (São Paulo); MFT_M-C e MFT_V-E (Paraíba); MCM-A e MCM_p-A (Amadora/Portugal). As amostras selecionadas para desenvolvimento e otimização do método de digestão foram a amostra codificada MD-E para mel escuro e MDC-C para mel claro.

O critério de escolha do material de referência certificado utilizado foi o seguinte: o material deve conter majoritariamente em sua composição carboidratos, pelo fato de não se encontrar disponível no mercado material de referência de mel ([POHL, 2009](#)). Como o mel é rico em carboidratos de cadeia curta, preferiu-se os seguintes materiais de referência certificados para avaliar a exatidão dos métodos propostos: CRM 1566b NIST (tecido de ostra) e CRM-Agro C1003a (folha de tomate).

2.3.2 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados em todos os procedimentos analíticos foram: ácido nítrico 65% m m⁻¹ (Merck, Alemanha), o qual foi previamente destilado antes do uso; ácido clorídrico 37% m m⁻¹ (Merck, Alemanha); peróxido de hidrogênio 30% m m⁻¹ (Merck, Alemanha); hidróxido de sódio (Química Moderna, Brasil); ácido cítrico (J.T.Baker, México) e glicina (Merck, Alemanha). Todos esses reagentes são de grau analítico e foram utilizados nos procedimentos experimentais juntamente com água ultrapura com resistividade específica de 18,2 MΩ.cm⁻¹, fornecido por um sistema de purificação Elga[®] Purelab Option-Q DV 25 (Elga[®], Reino Unido).

Foram preparadas soluções de trabalho multielementares para macroelementos (com concentração de 500 mg L⁻¹) e microelementos, (com concentração de 20 mg L⁻¹, a partir de soluções monoelementares contendo 4000 mg

L⁻¹ de Ca, K, Mg e P (SpecSol, Brasil), 10000 mg L⁻¹ de Na (SpecSol, Brasil) e 1000 mg L⁻¹ de As, B, Ba, Cd, Cu, Fe, Mn, Se, Sr e Zn (SpecSol, Brasil). Para a avaliação do carbono residual na amostra digerida foi preparada uma solução de referência de 20000 mg L⁻¹ em carbono a partir de ácido cítrico (J.T.Baker, México).

Os tubos de polipropileno, as vidrarias e os materiais diversos foram descontaminados em banho de ácido nítrico 10% v v⁻¹ num período mínimo de 24 horas, sendo enxaguados com água deionizada e secos a temperatura ambiente.

2.3.3 Instrumentação

2.3.3.1 Especificações do sistema de digestão com bloco digestor e “dedo frio”

Nos procedimentos em que se utilizou o aquecimento condutivo, foi empregado um sistema com bloco digestor (Tecnal, Brasil), modelo TE-040/25 com um microprocessador digital para o controle de temperatura e uma galeria em alumínio com capacidade para 40 tubos em vidro borossilicato de 100 mL e dimensões de 25 x 250 mm, com “dedos frios” (Ver seção 1.4.2.2, Figura 6) acoplados na saída dos tubos.

2.3.3.2 Espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

A determinação multielementar foi realizada através do espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado VISTA PRO (Varian, Mulgrave, Austrália) equipado com nebulizador Seaspray e câmara de nebulização do tipo ciclônica. Esse espectrômetro foi equipado com o detector de estado sólido CCD (Charge Coupled Device) de 70 mil pixels. Este modelo tem visualização da tocha na posição axial e opera em comprimentos de onda na faixa de 167 a 785 nm. A Tabela 4 mostra as condições experimentais.

Tabela 4. Condições operacionais do espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.

Parâmetro instrumental		Condição operacional	
Rádio-frequência do gerador (MHz)		40	
Detector		CCD	
Diâmetro interno do tubo central da tocha (mm)		2,3	
Policromador		Grade de difração <i>Echelle</i> e prisma de dispersão de CaF ₂	
Faixa de comprimento de onda (nm)		167 – 785	
Câmara de nebulização		Ciclônica	
Nebulizador		Concêntrico (Tipo Seaspray)	
Potência de radiofrequência (W)		1200	
Tempo de integração do sinal (s)		1,0	
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)		15	
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)		1,5	
Vazão gás de nebulização (L min ⁻¹)		0,70	
Elementos	Linhas de emissão	Elementos	Linhas de emissão
As	188,980 (I)	K	766,491 (I)
B	249,678 (I)	Mg	285,213 (I)
Ba	493,408 (II)	Mn	260,568 (II)
C	193,027 (I)	Na	568,821 (I)
Ca	317,933 (II)	P	178,222 (I)
Cd	226,502 (II)	Se	203,965 (I)
Cu	324,754 (I)	Sr	216,596 (II)
Fe	259,940 (II)	Zn	213,857 (I)

(I): Linha atômica

(II): Linha iônica

O sistema óptico do espectrômetro foi calibrado com solução de referência multielementar e o alinhamento da tocha foi realizado com uma solução de Mn 5,0 mg L⁻¹. As linhas espectrais foram selecionadas considerando-se as intensidades dos sinais de emissão dos analitos e o coeficiente angular da curva analítica.

2.3.3.3 Especificações da incubadora utilizada no teste de extração de bioacessibilidade simples *in vitro* (SBET – Simple Bioaccessibility Extraction Test)

As extrações das amostras para determinação da bioacessibilidade dos macro e microelementos empregando o teste de extração de bioacessibilidade simples *in vitro* (SBET) foram feitas em uma incubadora TECNAL (São Paulo, Brasil), modelo TE-420 com controlador de temperatura e agitação, com capacidade para 30 béqueres de 50 mL.

2.3.4 Procedimentos experimentais

2.3.4.1 Otimização univariada

Inicialmente, baseando-se em procedimentos experimentais de digestão de mel existentes na literatura. Testaram-se 12 condições experimentais (Tabela 5), variando-se a massa, o volume de ácido nítrico (65% m m⁻¹) e o volume de peróxido de hidrogênio (30% m m⁻¹) empregados no processo de digestão. Mantendo-se a temperatura e o tempo de digestão fixos em 150°C e 1 hora, respectivamente. Ao final da digestão, os digeridos foram aferidos para 10,00 mL com água deionizada.

Tabela 5. Condições experimentais testadas na análise univariada com a amostra de mel escuro codificada MD-E.

Experimento	Massa da amostra (mg)	Volume de HNO ₃ (mL)	Volume de H ₂ O ₂ (mL)
1	500	5,0	0,0
2	500	5,0	2,0
3	1000	5,0	0,0
4	500	3,0	0,0
5	500	3,0	2,0
6	500	1,0	0,0
7	500	2,0	0,0
8	1000	2,0	0,0
9	500	1,0	1,0
10	1000	1,0	1,0
11	500	2,0	1,0
12	1000	2,0	1,0

2.3.4.2 Planejamento fatorial completo 2³

O planejamento experimental consistiu numa matriz de planejamento fatorial completo de dois níveis e três variáveis em bloco digestor com “dedo frio”. As variáveis otimizadas foram o volume de ácido nítrico (65% m m⁻¹) admitindo-se valores de 1,00 e 5,00 mL para os limites inferior e superior respectivamente, o volume de peróxido de hidrogênio (30% m m⁻¹) admitindo-se valores de 0,00 e 2,00 mL para os limites inferior e superior e o tempo de digestão admitindo-se valores de 30 e 90 min para os limites inferior e superior, respectivamente.

O domínio experimental escolhido foi selecionado baseando-se nos dados da otimização univariada tendo como resposta analítica a concentração dos analitos.

Foi adicionado ao planejamento uma triplicata do ponto central dos níveis das variáveis estudadas, podendo assim avaliar a significância dos efeitos. Assim como na análise univariada, a temperatura foi mantida fixa em 150°C, e fixou-se também a massa da amostra em 500 mg. A Tabela 6 apresenta os valores reais e codificados da matriz do planejamento 2³. O digerido de cada experimento foi aferido para 10,0 mL com água ultrapura.

Tabela 6. Matriz do planejamento fatorial completo 2³ com triplicata do ponto central aplicado às amostras MD (mel escuro) e MDC (mel claro).

Experimento	HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Tempo (min)
1	5,00(+1)*	2,00(+1)	90(+1)
2	5,00(+1)	2,00(+1)	30(-1)
3	5,00(+1)	0,00(-1)	90(+1)
4	5,00(+1)	0,00(-1)	30(-1)
5	1,00(-1)	2,00(+1)	90(+1)
6	1,00(-1)	2,00(+1)	30(-1)
7	1,00(-1)	0,00(-1)	90(+1)
8	1,00(-1)	0,00(-1)	30(-1)
9(PC)	3,00(0)	1,00(0)	60(0)
10(PC)	3,00(0)	1,00(0)	60(0)
11(PC)	3,00(0)	1,00(0)	60(0)

Valores codificados entre parênteses.

PC: Ponto central.

2.3.4.3 Matriz de Doehlert

Seguindo a otimização do método de digestão de mel em bloco digestor com “dedo frio”, uma metodologia de superfície de resposta Doehlert foi aplicada com quadruplicata do primeiro experimento que corresponde ao valor médio dos níveis das variáveis para estimativa do erro. As variáveis otimizadas foram o volume de ácido nítrico (65% m m⁻¹) admitindo-se valores de 1,00 e 5,00 mL para os limites inferior e superior respectivamente, o volume de peróxido de hidrogênio (30% m m⁻¹) admitindo-se valores de 0,00 e 2,00 mL para os limites inferior e superior e o tempo de digestão admitindo-se valores de 20 e 60 min para os limites inferior e superior, respectivamente. A temperatura e a massa da amostra foram mantidas fixas em 150 °C e 500 mg, respectivamente. A Tabela 7 mostra as condições da matriz de Doehlert com os valores reais e codificados. O digerido de cada experimento foi aferido para 10,0 mL com água deionizada, e as amostras utilizadas foram as mesmas do planejamento fatorial.

Tabela 7. Matriz de Doehlert com valores reais e codificados aplicada às amostras de mel claro e mel escuro.

Experimento	HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Tempo (min)
1	3,00(0)*	1,00(0)	40(0)
2	3,00(0)	2,00(1)	40(0)
3	5,00(0,866)	1,50(0,5)	40(0)
4	3,70(0,289)	1,50(0,5)	60(1)
5	3,00(0)	0,00(-1)	40(0)
6	1,00(-0,866)	0,50(-0,5)	40(0)
7	2,33(-0,289)	0,50(-0,5)	20(-1)
8	1,00(-0,866)	1,50(0,5)	40(0)
9	2,33(-0,289)	1,50(0,5)	20(-1)
10	5,00(0,866)	0,50(-1)	40(0)
11	4,33(0,577)	1,00(0)	20(-1)
12	3,70(0,289)	0,50(-1)	60(1)
13	1,67(-0,577)	1,00(0)	60(1)

Valores codificados entre parênteses.

2.3.4.4 Procedimento otimizado de decomposição da amostra em sistema de bloco digestor e “dedo frio”

Após a otimização as amostras de mel foram digeridas em bloco digestor com “dedo frio”, pesando-se 500 mg de mel no tubo digestor, adicionando-se 1,60 mL de

ácido nítrico 65% m m⁻¹ previamente destilado e 0,64 mL de peróxido de hidrogênio 30% m m⁻¹, deixando-se este sistema reacional no bloco por um tempo de 46 minutos, a 150°C. Em seguida, resfriou-se até a temperatura ambiente por 30 minutos e transferiu-se os digeridos para tubos Falcon® de 15,00 mL, aferindo-se com água ultrapura para 10,00 mL de solução final.

2.3.4.5 Determinação do teor de carbono residual e da acidez residual

O teor de carbono residual dos procedimentos anteriormente descritos foi determinado usando-se uma solução de ácido cítrico para o preparo da curva analítica de calibração para carbono e a leitura feita por ICP OES utilizando a linha de emissão 193,027 nm. A acidez residual foi determinada através de titulações ácido-base dos digeridos para os procedimentos descritos, usando-se uma solução padronizada de hidróxido de sódio (0,1030 mol L⁻¹) e indicador de fenolftaleína (1,0 % m v⁻¹ em etanol). As soluções padrões da curva analítica de calibração foram preparadas com a mesma concentração ácida dos digeridos (1,54 mol L⁻¹) para cada procedimento de digestão.

2.3.4.6 Ensaio de bioacessibilidade pelo teste de extração de bioacessibilidade simples (SBET)

Foram pesadas aproximadamente 500 mg da amostra em erlenmeyers de 125 mL, foi adicionado 25,00 mL de solução de 0,4 mol L⁻¹ de glicina/HCl em pH 1,5.

As amostras foram incubadas a 37 °C sob agitação orbital a 100 rpm por 60 minutos. Uma alíquota de 5,00 mL foi retirada da solução sobrenadante e submetida a digestão ácida nas condições do método otimizado. As amostras foram preparadas em triplicata. (Adaptado de [OOMEN et al., 2002](#)).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização univariada da digestão de mel em bloco digestor

Com o intuito de se ter uma noção da composição mineral da amostra realizou-se 12 experimentos em triplicata conforme Tabela 5, utilizando bloco digestor com “dedo frio” e determinação por ICP OES. A Tabela 8 apresenta os teores médios de As, Ba, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se, Sr e Zn para 12 diferentes condições de digestão. De modo geral, a condição que levou a maiores concentrações para os diferentes elementos foi a do experimento 4, em que se utiliza 500 mg da amostra, 3,0 mL de HNO_3 (65% m m⁻¹) e não se adiciona H_2O_2 (30% m m⁻¹).

Em geral, espera-se que quanto maior a quantidade de reagente oxidante, melhor será a decomposição da matriz. Porém, quando se utiliza alguns ácidos, quanto maior a acidez do meio reacional, maior será a viscosidade, interferindo no modo de transporte e nebulização da amostra digerida até o plasma no ICP OES, o que dificulta a determinação dos analitos ([GINÉ-ROSIAS, 1999b](#)). Isso pode explicar as concentrações médias da maioria dos elementos nos experimentos 1 e 2 serem menores do que no experimento 4. Havendo assim, uma condição ótima para o volume de ácido nítrico utilizado.

Aplicou-se a análise de variância (ANOVA) como teste estatístico para os dados da Tabela 8, onde observou-se diferenças significativas a um nível de 95% de confiança para a maioria dos elementos quando comparado os valores entre os diferentes experimentos.

Portanto, tendo apresentado os maiores teores de microelementos o experimento 4 foi escolhido como a melhor condição de digestão do mel, com 3,0 mL de HNO_3 (65% m m⁻¹), 500 mg de amostra e sem adição de H_2O_2 (30% m m⁻¹).

No experimento 6 não foi possível detectar e quantificar a maioria dos elementos devido à condição ácida mais branda e a não adição de H_2O_2 , o que afetou a disponibilização dos analitos para determinação por ICP OES.

Tabela 8. Concentrações médias, em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, de microelementos em diferentes condições de preparo de amostra em bloco digestor por ICP OES (média \pm desvio padrão, n=3).

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
As	1,51 \pm 0,53	4,30\pm0,50	0,66 \pm 0,69	2,01 \pm 0,52	2,08 \pm 0,07	ND	1,53 \pm 0,17	0,80 \pm 0,27	1,46 \pm 0,11	0,99 \pm 0,02	0,07 \pm 0,05	ND
Ba	0,71 \pm 0,02	1,40 \pm 0,01	0,38 \pm 0,03	2,01\pm0,08	0,63 \pm 0,01	ND	1,08 \pm 0,02	0,50 \pm 0,04	1,14 \pm 0,04	0,57 \pm 0,01	0,37 \pm 0,03	0,22 \pm 0,01
Ca	243,5\pm23,4	173,1 \pm 21,2	201,2 \pm 44,4	96,8 \pm 12,7	129,3 \pm 9,6	ND	141,3 \pm 46,1	144,8 \pm 2,5	146,2 \pm 2,5	115,7 \pm 11,0	140,4 \pm 8,8	142,2 \pm 10,6
Cd	1,34 \pm 0,04	2,33 \pm 0,03	0,68 \pm 0,01	2,53\pm0,14	1,31 \pm 0,04	ND	1,25 \pm 0,01	0,61 \pm 0,01	1,34 \pm 0,05	0,64 \pm 0,01	0,66 \pm 0,00	0,35 \pm 0,00
Cu	1,29 \pm 0,05	2,40 \pm 0,05	0,66 \pm 0,03	4,04\pm0,21	1,28 \pm 0,04	ND	2,11 \pm 0,02	1,02 \pm 0,04	2,26 \pm 0,11	1,08 \pm 0,02	0,64 \pm 0,01	0,35 \pm 0,00
Fe	26,54\pm0,52	24,48 \pm 2,03	26,34 \pm 3,01	21,60 \pm 0,26	24,29 \pm 0,08	22,39 \pm 0,33	19,12 \pm 0,34	15,68 \pm 0,21	18,09 \pm 0,62	16,22 \pm 0,69	22,97 \pm 0,43	21,97 \pm 1,34
K	75,11 \pm 2,50	97,53 \pm 6,18	103,8 \pm 16,1	143,3\pm1,8	86,68 \pm 2,50	ND	122,5 \pm 16,1	106,1 \pm 2,2	141,4 \pm 3,9	105,6 \pm 0,7	94,17 \pm 0,84	91,03 \pm 1,67
Mg	ND	118,4\pm0,3	ND	52,8 \pm 0,72	ND	ND	29,45 \pm 0,31	14,33 \pm 1,80	31,16 \pm 1,04	15,96 \pm 0,26	ND	ND
Mn	2,18 \pm 0,04	2,66 \pm 0,04	1,35 \pm 0,07	4,15\pm0,05	2,07 \pm 0,04	ND	2,36 \pm 0,06	1,18 \pm 0,19	2,49 \pm 0,08	1,34 \pm 0,02	1,26 \pm 0,01	0,86 \pm 0,03
Na	72,16 \pm 6,13	ND	38,59 \pm 0,90	87,07\pm6,49	71,54 \pm 5,75	ND	48,04 \pm 3,16	24,14 \pm 0,96	50,49 \pm 0,97	24,74 \pm 0,41	30,26 \pm 0,46	22,54 \pm 0,92
P	33,82 \pm 0,79	144,3 \pm 1,4	20,11 \pm 1,09	144,6\pm6,6	33,04 \pm 1,18	ND	77,00 \pm 0,90	38,13 \pm 2,85	82,21 \pm 3,37	41,37 \pm 0,50	18,95 \pm 0,06	12,51 \pm 0,23
Se	0,76 \pm 0,09	1,25\pm0,25	0,53 \pm 0,09	1,24 \pm 0,04	1,23 \pm 0,03	ND	0,46 \pm 0,15	0,35 \pm 0,09	0,75 \pm 0,11	0,44 \pm 0,08	0,96 \pm 0,06	0,20 \pm 0,05
Sr	1,55 \pm 0,04	1,61 \pm 0,05	0,84 \pm 0,09	2,00\pm0,02	0,83 \pm 0,02	ND	1,23 \pm 0,02	0,79 \pm 0,02	1,25 \pm 0,01	0,82 \pm 0,03	0,61 \pm 0,01	0,57 \pm 0,04
Zn	1,56 \pm 0,01	2,73\pm0,32	1,20 \pm 0,05	2,60 \pm 0,18	1,76 \pm 0,03	ND	1,59 \pm 0,02	0,86 \pm 0,01	1,69 \pm 0,08	0,86 \pm 0,02	1,07 \pm 0,06	0,59 \pm 0,01

ND: Não detectado.

Valor maior em negrito.

3.2 Otimização multivariada em bloco digestor

3.2.1 Estudo dos efeitos e das interações das variáveis com o planejamento fatorial 2³

Com base na análise preliminar, foi escolhido um domínio experimental (Tabela 6) para realização de um planejamento fatorial completo 2³ com triplicata do ponto central. As variáveis escolhidas para otimização foram: o volume de ácido nítrico, o volume de peróxido de hidrogênio e o tempo de digestão. O estudo dos efeitos e das interações destas variáveis foram em função do teor de carbono residual (RCC). Os teores de carbono residual para cada experimento do planejamento 2³ para a amostra de mel escuro e mel claro encontram-se na Tabela 9.

Tabela 9. Matriz do planejamento fatorial completo 2³ para amostra de mel escuro.

Experimento	HNO ₃ (mL)	H ₂ O ₂ (mL)	Tempo (min)	%RCC (mel escuro)	%RCC (mel claro)
1	5,00	2,00	90	0,26	0,24
2	5,00	2,00	30	0,29	0,27
3	5,00	0,00	90	0,14	0,23
4	5,00	0,00	30	0,30	0,32
5	1,00	2,00	90	0,38	0,34
6	1,00	2,00	30	0,41	0,56
7	1,00	0,00	90	0,62	0,60
8	1,00	0,00	30	0,63	0,65
9(PC)	3,00	1,00	60	0,35	0,36
10(PC)	3,00	1,00	60	0,36	0,37
11(PC)	3,00	1,00	60	0,34	0,37

O planejamento fatorial completo foi aplicado tanto para amostras de mel claro quanto para amostras de mel escuro, com o intuito de se verificar se há alguma interferência na eficiência de digestão de diferentes tipos de méis. Através dos resultados da Tabela 9, obteve-se dois gráficos de Pareto para amostra de mel escuro (Figura 7) e para amostra de mel claro (Figura 8).

Figura 7. Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo 2^3 aplicado a amostra de mel escuro.

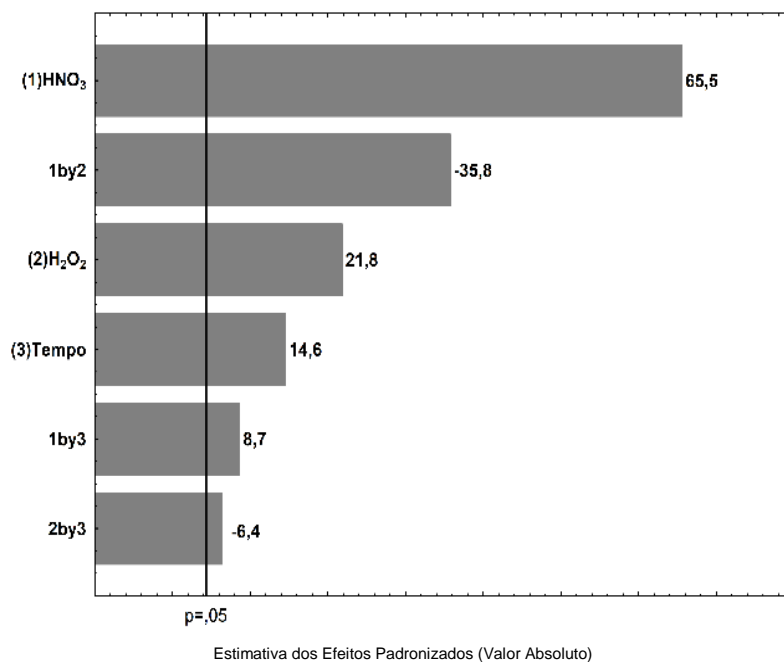
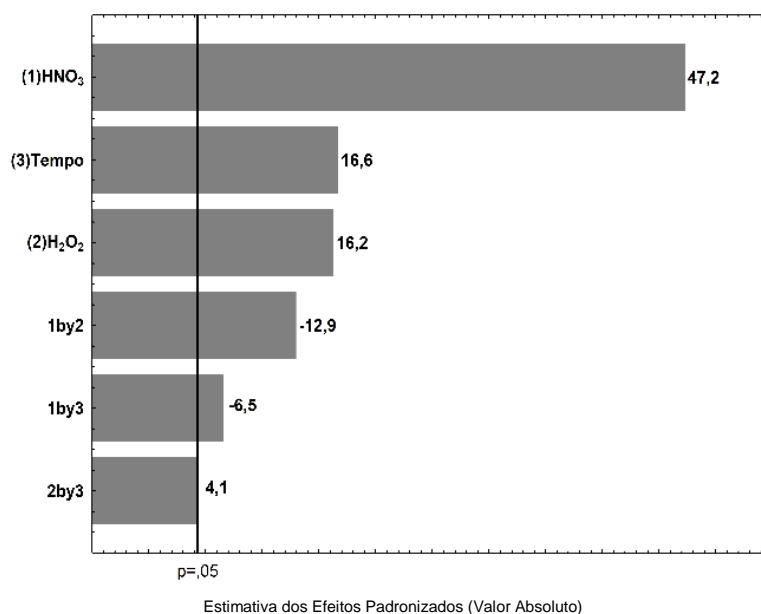


Figura 8. Gráfico de Pareto do planejamento fatorial completo 2^3 aplicado a amostra de mel claro.



O teor de carbono residual foi escolhido como resposta de interesse porque, quanto menor este teor mais eficiente será o método de digestão, indicando o nível de mineralização da matriz orgânica (LEME *et al.*, 2014). Com isso, na elaboração do

gráfico de Pareto multiplicou-se os valores das respostas (%RCC) por -1 para melhor visualização dos efeitos dos fatores, o mesmo foi feito para o planejamento Doehlert.

No gráfico de Pareto para a amostra de mel escuro, o fator volume de HNO_3 exerceu a maior influência positiva sobre o sistema. Ou seja, ao aumentar o volume de ácido nítrico pode aumentar a quantidade de íons H_9O_4^+ no meio reacional facilitando, juntamente com a presença de outros íons, a decomposição da matriz e reduzindo assim o teor de carbono residual ([SCHNEIDER, 2000](#)).

A interação entre volume de HNO_3 e volume de H_2O_2 tem efeito negativo sobre o sistema, consequência de um dos fatores ser negativo e outro positivo como visto no experimento 3 da Tabela 9. E, por conseguinte, os fatores volume de peróxido de hidrogênio e tempo de digestão têm efeitos positivos sobre o sistema, como visto nos experimentos 7 e 8, onde a ausência de peróxido de hidrogênio aumenta o teor de carbono, e no experimento 4 mostrando que um tempo de digestão menor pode dobrar o teor de carbono residual quando comparado ao experimento 3. Outras interações mostraram-se significativas, porém com menor efeito sobre o sistema.

No gráfico de Pareto da amostra de mel claro, os fatores e interações entre os fatores mostraram-se significativamente diferentes ao Pareto da amostra de mel escuro. Havendo um aumento da significância do tempo de digestão na amostra de mel claro comparada a amostra de mel escuro e diminuição da significância do volume de HNO_3 da amostra escura para a amostra clara. O efeito da interação entre volume de HNO_3 e volume de H_2O_2 também é negativo sobre o sistema para a amostra de mel claro, porém com menor magnitude o que é evidenciado pelo experimento 3 da amostra de mel claro, que tem teor de carbono maior que o experimento 3 da amostra escura.

3.2.2 Matriz de Doehlert para obtenção da condição ótima

A matriz de Doehlert foi escolhida com o intuito de encontrar uma condição de ótimo do procedimento de digestão do mel. O planejamento Doehlert tem a vantagem de ter a quantidade de níveis diferentes para cada fator, com isso baseando-se no planejamento fatorial completo optou-se em colocar o fator volume de HNO_3 com maior número de níveis (7 níveis) por este ser mais significativo segundo os gráficos de Paretos, seguido de volume de H_2O_2 (5 níveis) e tempo de digestão (3 níveis).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) foi aplicada apenas para a amostra escura, uma vez que amostras de méis com coloração escura tende, de modo geral, apresentar maior teor mineral ([POHL, 2009](#)).

A matriz de Doehlert com quadruplicata do ponto central para estimativa do erro encontra-se na Tabela 10 com os valores de %RCC para cada experimento.

Tabela 10. Matriz de Doehlert com quadruplicata do ponto central aplicada a amostra de mel de coloração escura.

Experimento	H ₂ O ₂ (mL)	HNO ₃ (mL)	Tempo (min)	%RCC
1	1,00	3,00	40	0,66
2	2,00	3,00	40	0,52
3	1,50	5,00	40	0,46
4	1,50	3,70	60	0,56
5	0,00	3,00	40	0,58
6	0,50	1,00	40	0,81
7	0,50	2,33	20	0,88
8	1,50	1,00	40	0,53
9	1,50	2,33	20	0,62
10	0,50	5,00	40	0,50
11	1,00	4,33	20	0,46
12	0,50	3,70	60	0,44
13	1,00	1,67	60	0,65
14	1,00	3,00	40	0,46
15	1,00	3,00	40	0,44
16	1,00	3,00	40	0,65

Na Tabela 10 observa-se que os menores teores de carbono residual foram para os experimentos 3, 11, 12, 14 e 15, dentre estes, os experimentos 14 e 15 situam-se na região do ponto central, indicando uma condição de máximo no ponto central do domínio experimental escolhido. A condição experimental com maior valor de %RCC foi para o experimento 7, em que o volume de H₂O₂ e o tempo de digestão estão nos menores níveis, com o HNO₃ em um dos níveis mais baixos.

A matriz de planejamento proposta fornece três diferentes gráficos de curvas de contorno da matriz Doehlert, como pode ser visto na Figura 9 (HNO₃ x H₂O₂), Figura 10 (Tempo x H₂O₂) e Figura 11 (HNO₃ x tempo), em função do teor de carbono residual.

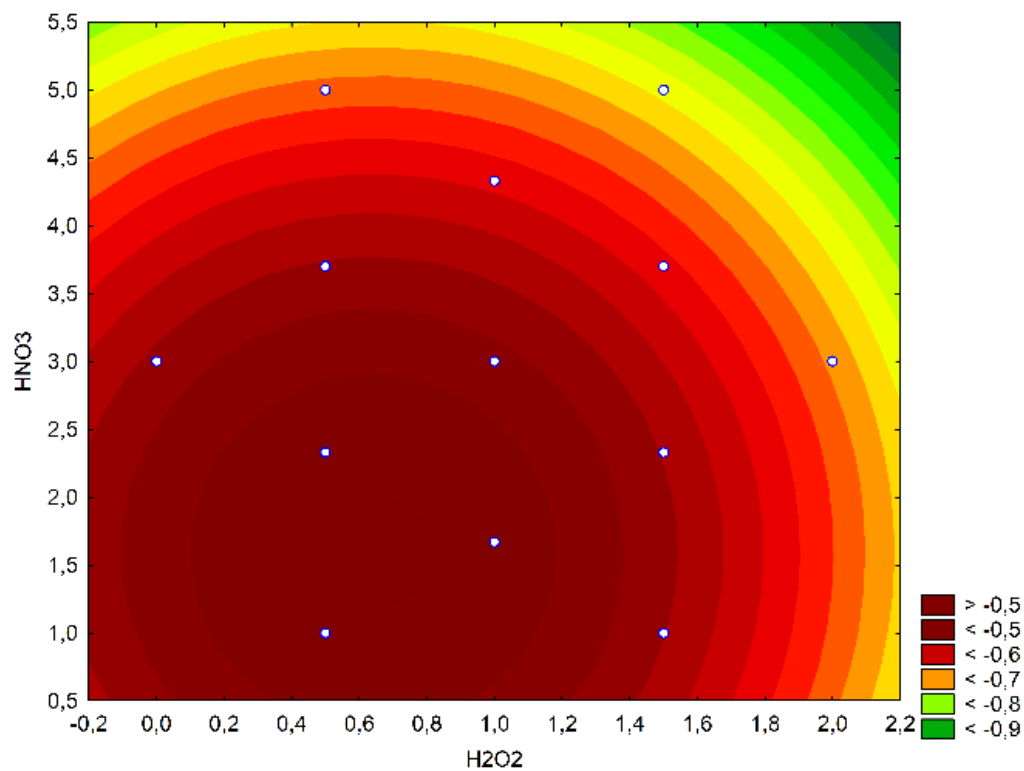
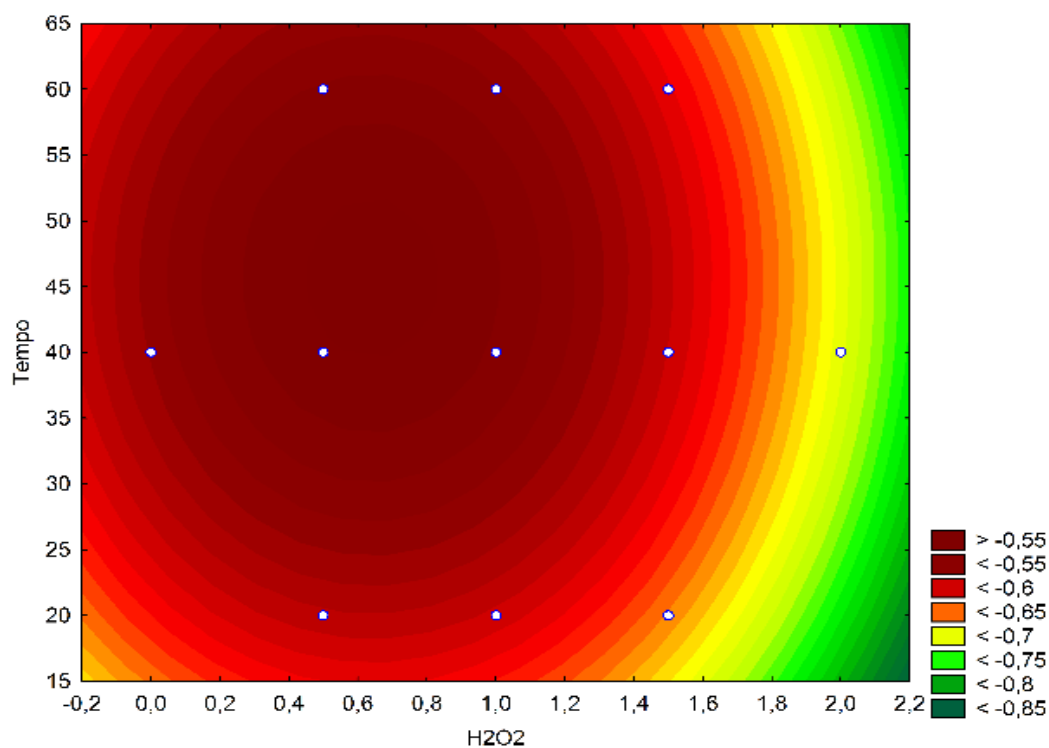
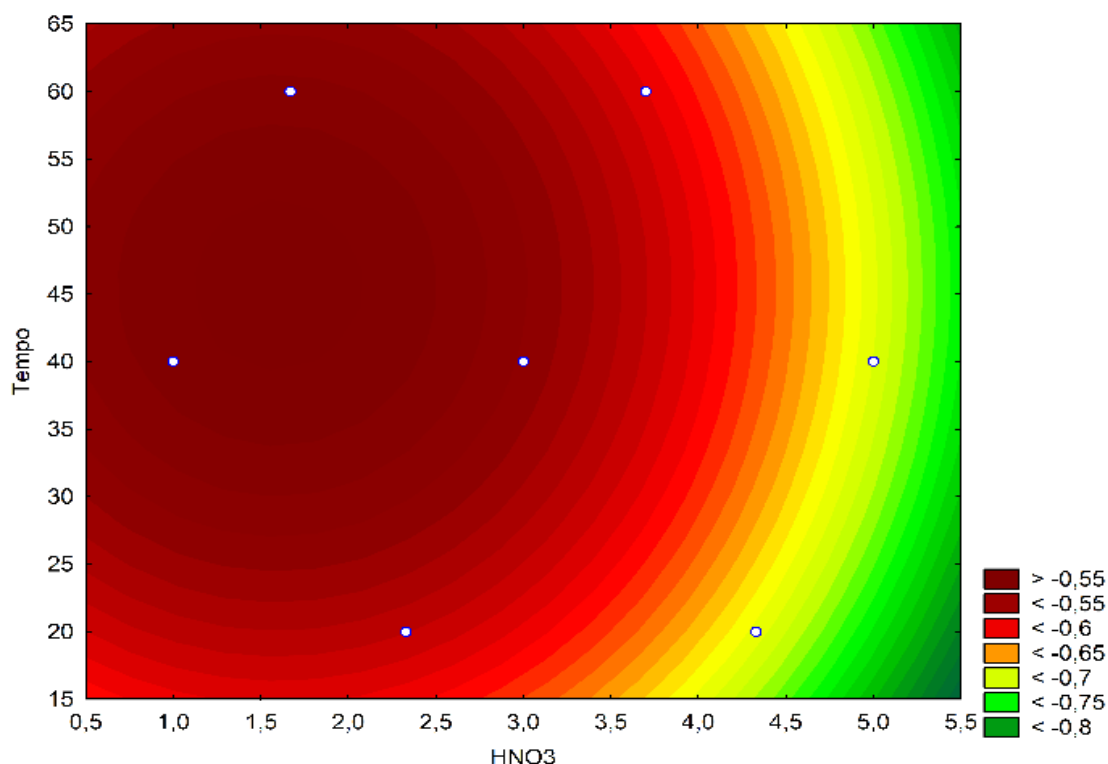
Figura 9. Curvas de nível da variação de %RCC com o HNO_3 x H_2O_2 .**Figura 10.** Curvas de nível da variação de %RCC com o Tempo x H_2O_2 .

Figura 11. Curvas de nível da variação de %RCC com o Tempo x HNO₃.



Nas figuras mencionadas pode ser visto a região em vermelho escuro que corresponde a condição de máximo, dentro do domínio experimental escolhido. Os valores críticos encontrados no domínio experimental estudado encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Valores críticos previstos pelo modelo quadrático do planejamento Doehlert.

Fator	Mínimo Observado	Valor Crítico	Máximo Observado
H ₂ O ₂ (30% <i>m.m</i> ⁻¹)(mL)	0,00	0,64	2,00
HNO ₃ (65% <i>m.m</i> ⁻¹)(mL)	1,00	1,60	5,00
Tempo (minutos)	20	46	60

Com o intuito de se verificar a concordância entre os valores preditos pelo modelo quadrático com os valores experimentais, o software *Statistica*[®] fornece o cálculo de falta de ajuste do planejamento. Uma tabela ANOVA é fornecida mostrando qual parâmetro foi significativo. Como pode ser observado na Tabela 12, não houve falta de ajuste ($p > 0,05$), e o erro experimental foi pequeno, indicando concordância entre o modelo quadrático com os valores experimentais.

A aplicação do planejamento Doehlert forneceu a seguinte condição otimizada: 1,60 mL de HNO₃ (65% m m⁻¹); 0,64 mL de H₂O₂ (30% m m⁻¹) e 46 minutos de digestão em bloco digestor com “dedo frio”.

Tabela 12. ANOVA dos parâmetros do modelo quadrático gerado pelo planejamento Doehlert.

Fator	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	Teste F	Valor de p
(1) H ₂ O ₂ (L)	1,90 x10 ⁻²	1	1,90 x10 ⁻²	1,69	2,85 x10 ⁻¹
H ₂ O ₂ (Q)	1,28 x10 ⁻²	1	1,28 x10 ⁻²	1,13	3,65 x10 ⁻¹
(2) HNO ₃ (L)	4,59 x10 ⁻²	1	4,59 x10 ⁻²	4,07	1,37 x10 ⁻¹
HNO ₃ (Q)	1,08 x10 ⁻²	1	1,08 x10 ⁻²	9,53 x10 ⁻¹	4,01 x10 ⁻¹
(3) Tempo (L)	2,92 x10 ⁻³	1	2,93 x10 ⁻³	2,59 x10 ⁻¹	6,46 x10 ⁻¹
Tempo (Q)	5,16 x10 ⁻³	1	5,16 x10 ⁻³	4,57 x10 ⁻¹	5,47 x10 ⁻¹
Falta de ajuste	1,09 x10 ⁻¹	6	1,82 x10 ⁻²	1,61	3,73 x10 ⁻¹
Erro puro	3,39 x10 ⁻²	3	1,13 x10 ⁻²		
Soma quadrática total	2,32 x10 ⁻²	15			

(L): Linear

(Q): Quadrático

Com o planejamento fatorial completo 2³ foi estabelecido a significância das variáveis escolhidas e com a matriz Doehlert foi obtido um modelo quadrático que forneceu a condição otimizada. Porém, os resultados obtidos com esta condição otimizada só terão confiabilidade se o método analítico passar por um processo chamado validação.

3.3 Validação do procedimento de digestão proposto

Segundo a [ANVISA \(2017\)](#), a validação deve mostrar que o método analítico produz resultados confiáveis, e sendo adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos. Ou também, validação pode ser conceituada como um processo que define uma exigência analítica e confirma que o método sob investigação tem capacidade de desempenho analítico consistente com o requerido pela aplicação segundo a [EURACHEM WORKING GROUP \(1998\)](#).

No Brasil, a competência de laboratórios de ensaios é verificada por duas agências credenciadoras, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Normalmente, a validação de métodos analíticos ocorre após a avaliação de

parâmetros de mérito como especificidade e seletividade, linearidade e faixa linear de trabalho, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão e precisão.

3.3.1 Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LOD) pode ser normalmente definido como a quantidade mínima ou a menor concentração da substância que pode ser detectada de forma confiável, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas ([BRASIL, 2017](#)). O limite de quantificação (LOQ) é um critério de validação que marca a capacidade de um processo de medição química para quantificar adequadamente um analito e é definido como a menor quantidade ou concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão ([BRASIL, 2016](#)).

Os limites de detecção e de quantificação foram obtidos considerando-se a razão de três vezes o desvio padrão das intensidades de 10 brancos sobre a inclinação da curva de calibração. Os valores de LOD e LOQ obtidos para o método de digestão proposto, expressos em mg L^{-1} e em $\mu\text{g g}^{-1}$, estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) para determinação dos analitos em amostras de mel por ICP OES.

Elementos	LOD (mg L^{-1})	LOQ (mg L^{-1})	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
As	0,02	0,08	0,5	1,6
B	0,02	0,08	0,5	1,6
Ba	0,0004	0,001	0,008	0,03
Ca	0,2	0,6	3,5	11,5
Cd	0,001	0,002	0,01	0,04
Cu	0,001	0,003	0,02	0,07
Fe	0,01	0,04	0,2	0,7
K	0,04	0,1	0,8	2,5
Mg	0,009	0,03	0,2	0,6
Mn	0,001	0,002	0,01	0,05
Na	0,02	0,08	0,4	1,5
P	0,2	0,8	4,7	15,8
Se	0,001	0,005	0,03	0,09
Sr	0,002	0,007	0,04	0,1
Zn	0,02	0,05	0,3	1,1

3.3.2 Linearidade e faixa linear de trabalho

A linearidade é a capacidade de um método analítico em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa de trabalho. A linearidade pode ser obtida por padronização interna ou externa obtendo-se uma equação de regressão linear usada para o cálculo de concentração do analito a ser determinado na amostra real. O coeficiente de correlação linear (r) é usado para avaliar a linearidade da curva como modelo matemático. Segundo a ANVISA o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990 ([BRASIL, 2017](#)).

De acordo com o [INMETRO \(2010\)](#), a faixa linear de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para o qual o método analítico será usado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante será o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem de aspectos operacionais do equipamento ou da perda de linearidade ([SKOOG et al., 2006](#)).

A Tabela 14 apresenta as curvas de calibração para determinação de 14 elementos em amostras de mel. Vale ressaltar que, os coeficientes de correlação foram superiores a 0,99 conforme recomendado pela [ANVISA \(2017\)](#).

Tabela 14. Curvas analíticas de calibração para determinação dos analitos nas amostras de mel por ICP OES.

Elementos	Equação da reta	R	Faixa linear (mg L ⁻¹)
As	$y = 236,11x + 44,324$	0,9974	0,081 a 5,0
B	$y = 2833,7x + 174,31$	0,9995	0,083 a 5,0
Ba	$y = 770830x + 13783$	0,9978	0,001 a 2,5
C	$y = 54,23x + 23903$	0,9970	33,5 a 10000
Ca	$y = 4633,4x + 557,33$	0,9991	0,576 a 25,0
Cd	$y = 10036x + 71,818$	0,9991	0,002 a 2,5
Cu	$y = 10651x + 52,129$	0,9985	0,003 a 2,5
Fe	$y = 2676,3x - 57,822$	0,9987	0,036 a 5,0
K	$y = 3500,2x + 1575,2$	0,9967	0,127 a 75,0
Mg	$y = 4910,2x + 88,057$	0,9995	0,593 a 25,0

Tabela 14 (PARTE 2). Curvas analíticas de calibração para determinação dos analitos nas amostras de mel por ICP OES.

Mn	$y = 3312,6x + 226,56$	0,9966	0,002 a 5,0
Na	$y = 11371x - 835,59$	0,9984	0,075 a 7,5
P	$y = 28,012x + 28,138$	0,9970	0,788 a 25,0
Se	$y = 114,05x + 5,6073$	0,9986	0,005 a 5,0
Sr	$y = 2625,2x + 30,1$	0,9989	0,007 a 2,5
Zn	$y = 7974,7x + 73,162$	0,9993	0,053 a 2,5

3.3.3 Exatidão

Segundo a Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (*FDA* – do inglês: *Food Drugs Administration*), a exatidão é definida como o grau de concordância entre os valores experimentais e o valor de referência aceito como verdadeiro. Sendo considerada dentro de limites estabelecidos, a um dado nível de confiança. Tais limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. As opções mais utilizadas para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência certificados (*CRM*– do inglês: *Certified Reference Material*); comparação de métodos; ensaios de adição e recuperação e adição de analito ([FDA, 2001](#); [ICH, 2005](#)).

De acordo com [POHL \(2009\)](#), ainda não há um material de referência certificado de mel disponível no mercado, devido a problemas de homogeneidade do mel. Como 80 a 85% ($m\ m^{-1}$) da composição do mel são de mono e dissacarídeos, escolheu-se optar por um material de referência certificado que tivesse majoritariamente em sua composição carboidratos ([LAZOR et al., 2012](#)). Portanto, a exatidão do método de digestão proposto nas condições otimizadas foi avaliada com CRM de folhas de tomate AGRO C1003a e CRM de tecido de ostra NIST 1566b. Sendo que materiais de referência de folhas de vegetais, possuem como característica, alto teor de carboidratos.

Ambos CRM's foram submetidos as mesmas condições e digestão do mel (diferindo apenas no valor de massa) e os resultados das concentrações médias dos analitos e os percentuais de recuperação são apresentados na Tabela 15 para o CRM de folha de tomate, e na Tabela 16 para o CRM de tecido de ostra.

Tabela 15. Determinação da composição mineral do CRM AGRO C1003a por ICP OES, após digestão em bloco digestor (média \pm IC, n=2).

Elementos	Valor Encontrado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor Certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)	Teste t-Student
As	21,6 \pm 5,8	19,0 \pm 2,8	113,6	5,7
Ca	28609 \pm 3587	27400 \pm 4400	104,4	4,3
Cd	25,7 \pm 1,4	26,6 \pm 2,1	96,8	-2,0
Cu	1234 \pm 105	1130 \pm 140	109,2	4,2
Fe	1081 \pm 206	1120 \pm 190	96,5	-0,8
Mn	475 \pm 44	470 \pm 69	101,0	0,3
P	4400 \pm 681	4370 \pm 740	100,7	0,2
Sr	162 \pm 26	154 \pm 49	105,4	1,0
Zn	34,9 \pm 3,1	37,5 \pm 5,0	93,2	-2,6

Valor de T-tabelado: 12,6 (n=2).

Tabela 16. Determinação da composição mineral do CRM NIST 1566b por ICP OES, após

Elementos	Valor Obtido ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor Certificado ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Recuperação (%)	Teste t-Student
As	6,87 \pm 2,83	7,65 \pm 0,65	89,7	-1,2
Ca	866 \pm 311	838 \pm 20	103,4	0,4
Cd	2,28 \pm 0,25	2,48 \pm 0,08	91,8	-2,6
Cu	71,6 \pm 16,4	71,6 \pm 1,6	99,9	0,0
K	6738 \pm 526	6520 \pm 90	103,3	5,3
Mg	1214 \pm 351	1085 \pm 23	111,9	1,6
Mn	17,5 \pm 2,8	18,5 \pm 0,2	94,8	-4,3
Se	2,15 \pm 0,23	2,06 \pm 0,15	104,2	4,7
Zn	1496 \pm 493	1424 \pm 46	105,0	0,6

digestão em bloco digestor (média \pm IC, n=2).

Valor de T-tabelado: 12,6 (n=2).

Para verificar se há diferença significativa entre os valores obtidos e os valores certificados foi aplicado o teste t pareado, que é um teste estatístico que pode ser utilizado na comparação de dois métodos de análise para um mesmo material

(MILLER e MILLER, 2005). Ao nível de confiança de 95% o teste estatístico revelou que não houve diferença significativa entre os valores obtidos e certificados ($p > 0,05$). Os valores de concentração encontrados para o sódio foram acima dos valores certificados, tanto para o CRM de tecido de ostra, como para o CRM de folha de tomate. Os elementos bário e boro, quantificados em algumas amostras de mel, não foram validados devido à ausência de valores certificados destes elementos.

3.3.3.1 Exatidão por ensaio de adição e recuperação

O ensaio de adição e recuperação é a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou dosada na amostra, que é extraída e passível de ser determinada. Os testes de recuperação são mais utilizados quando se tem dificuldade em adquirir um CRM com composição similar à matriz. As medições de recuperação são expressas em termos da porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz (RIBANI *et al.*, 2004).

Os valores do teste de adição e recuperação obtidos para a amostra de mel MD, em %, estão apresentados na Tabela 17. Apenas para o analito Fe foi obtida recuperações abaixo do esperado.

Tabela 17. Valores de percentagem encontrados para o teste de adição e recuperação para amostra de mel escuro MD, em bloco digestor, por ICP OES.

Elementos	Recuperações em %	
	Nível 1 (5 µg g ⁻¹)	Nível 2 (20 µg g ⁻¹)
As	95,1 ± 7,2	92,6 ± 0,8
Ba	92,7 ± 1,9	86,5 ± 0,8
Cd	88,5 ± 1,6	82,7 ± 1,0
Cu	93,1 ± 0,7	86,9 ± 2,0
Fe	15,2 ± 44,0	69,4 ± 7,6
Mn	90,8 ± 2,7	85,3 ± 1,5
Se	104,9 ± 5,5	101,9 ± 3,1
Sr	85,3 ± 1,7	82,9 ± 0,4
Zn	87,4 ± 9,1	84,9 ± 3,3

Resultados expressos em média ± desvio padrão, n=3.

3.3.4 Precisão

De acordo com a [ANVISA \(2017\)](#), a precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado. Quanto menor a amplitude das medidas, maior será a precisão. Para verificar tal concordância, utiliza-se, em geral, o coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR).

Para o método proposto, a precisão foi avaliada através da repetibilidade, que mostra a concordância nos valores obtidos para a mesma amostra, mesmo analista, mesmo equipamento, mesma calibração, mesmo ajuste e mesmo momento ([BRASIL, 2016](#)). Os valores de coeficiente de variação para os elementos estudados nas amostras de mel estão apresentados na Tabela 18. Foram realizados dez ensaios para a amostra de mel codificada MEMf nas condições otimizadas.

Tabela 18. Teste de repetibilidade para a amostra de mel MEMf, por ICP OES (n=10).

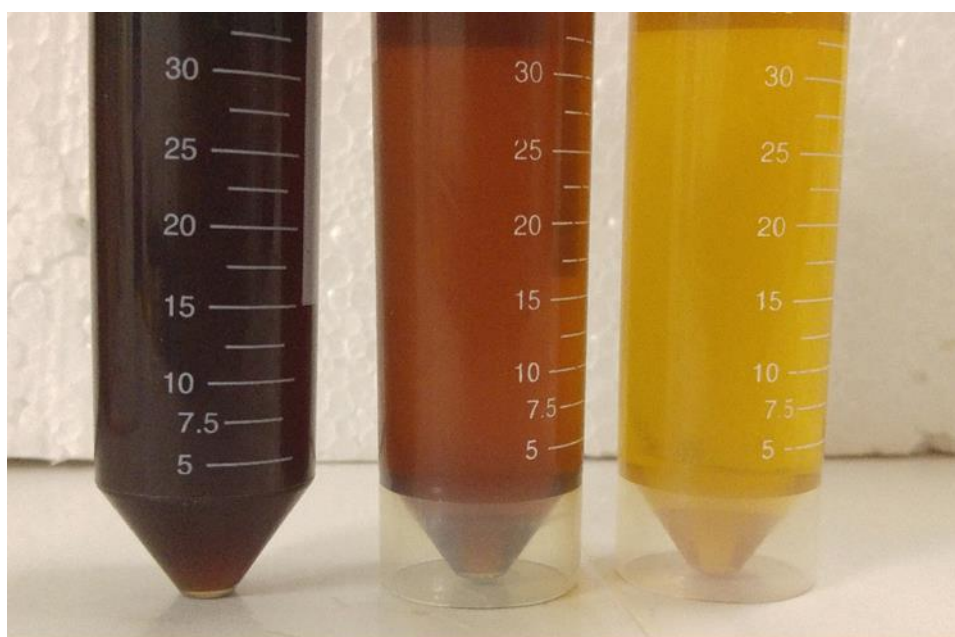
Elementos	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Coeficiente de variação (%)
B	2,81 \pm 0,26	9,23
Ca	122,4 \pm 10,9	8,88
Fe	5,73 \pm 0,31	5,44
K	1219 \pm 92	7,52
Mg	108,5 \pm 9,5	8,74
Mn	5,68 \pm 0,29	5,04
Na	95,7 \pm 6,8	7,08
P	113,7 \pm 10,9	9,59

Resultados de concentração expressos em média \pm desvio padrão, n=10.

3.4 Aplicação do método nas amostras de mel

O método proposto validado foi aplicado em dezoito amostras de mel, codificadas, classificadas em cores: mel claro, mel escuro e mel âmbar (Figura 12), e organizadas por predominância, rural e urbana, sendo que onze amostras são de origem urbana e sete são de origem rural.

Figura 12. Classificação das amostras de mel de acordo com a coloração visual.



Mel escuro

Mel âmbar

Mel claro

Os valores de concentração dos macro e microelementos para as dezoito amostras de mel estão apresentados nas Tabelas 19 e 20, respectivamente.

Tabela 19. Concentrações, em $\mu\text{g g}^{-1}$, de macrolementos para as amostras de mel por ICP OES.

Amostra	Predominância	Ca	K	Mg	Na	P
MMN-E	Urbana	57,99 ± 2,69	1023 ± 39	38,66 ± 1,15	61,1 ± 6,8	70,27 ± 6,99
MFO-A	Urbana	38,79 ± 2,30	571 ± 18	16,49 ± 0,46	16,4 ± 8,4	31,77 ± 4,64
MVM-E	Urbana	31,00 ± 0,90	500 ± 16	18,55 ± 0,61	53,3 ± 6,8	51,12 ± 6,30
MAE-A	Urbana	124,3 ± 7,6	1210 ± 97	58,87 ± 4,39	83,8 ± 8,0	39,05 ± 2,63
MAJ-A	Urbana	107,9 ± 6,9	818 ± 28	19,11 ± 0,81	115,7 ± 17,0	25,83 ± 1,78
MCM-A	Urbana	58,09 ± 2,33	354 ± 22	15,38 ± 1,01	110,1 ± 13,0	47,19 ± 5,09
MCMp-A	Urbana	121,1 ± 4,6	289 ± 15	28,89 ± 1,43	115,8 ± 18,1	21,66 ± 2,76
MER-A	Urbana	216,2 ± 23,4	1033 ± 85	66,96 ± 7,80	260,4 ± 1,0	<15,77
MCA-A	Urbana	28,68 ± 1,54	282 ± 5	7,39 ± 0,18	19,5 ± 1,8	41,62 ± 0,51
MEM _L -C	Urbana	44,44 ± 1,18	332 ± 20	17,36 ± 0,79	52,4 ± 0,5	22,96 ± 0,76
MEM _F -A	Urbana	128,01 ± 4,03	1180 ± 31	95,96 ± 3,63	185,3 ± 5,2	111,6 ± 3,3
MDC-C	Rural	41,32 ± 1,00	27,2 ± 0,9	2,82 ± 0,02	28,4 ± 2,7	<15,77
MD-A	Rural	96,88 ± 3,62	51,9 ± 0,9	7,91 ± 0,07	70,0 ± 4,2	<15,77
MXX-C	Rural	31,95 ± 1,32	51,5 ± 1,5	7,69 ± 0,19	77,0 ± 16,2	<15,77
MAB-C	Rural	34,72 ± 1,36	391 ± 12	18,34 ± 0,13	47,9 ± 8,9	48,86 ± 1,96
MFN-E	Rural	65,53 ± 0,71	1058 ± 32	44,22 ± 0,99	73,0 ± 0,2	59,87 ± 5,88
MFT _V -E	Rural	57,46 ± 2,68	821 ± 41	71,61 ± 3,61	66,0 ± 6,3	128,8 ± 9,1
MFT _M -C	Rural	28,37 ± 0,97	300 ± 12	11,19 ± 0,56	86,3 ± 1,2	61,64 ± 4,01
FAIXA		28,37-216,2	27,2-1210	2,82-95,96	16,4-260,4	<15,77-128,8

Terminação da legenda da amostra em: E: Escuro; C: Claro; A: Âmbar.

Resultados expressos em média ± desvio padrão, n=4.

Tabela 20. Concentrações, em $\mu\text{g g}^{-1}$, de microelementos para as amostras de mel por ICP OES.

Amostra	As	B	Ba	Cd	Cu	Fe	Mn	Se	Sr	Zn
MMN-E	<1,624	4,020 ± 0,618	0,069 ± 0,009	<0,037	0,169 ± 0,006	1,443 ± 0,053	2,803 ± 0,058	0,195 ± 0,109	0,335 ± 0,059	1,116 ± 0,110
MFO-A	<1,624	4,255 ± 0,570	<0,027	0,074 ± 0,011	0,178 ± 0,011	<0,723	1,015 ± 0,035	<0,094	<0,145	<1,060
MVM-E	<1,624	5,821 ± 0,651	<0,027	0,294 ± 0,006	0,472 ± 0,003	<0,723	1,341 ± 0,017	0,339 ± 0,004	0,169 ± 0,010	1,345 ± 0,259
MAE-A	<1,624	4,495 ± 0,501	0,138 ± 0,035	<0,037	0,682 ± 0,020	1,368 ± 0,391	0,830 ± 0,078	<0,094	0,916 ± 0,018	1,600 ± 0,219
MAJ-A	<1,624	3,606 ± 0,585	0,192 ± 0,020	<0,037	0,951 ± 0,036	<0,723	1,375 ± 0,040	<0,094	0,171 ± 0,007	1,361 ± 0,023
MCM-A	<1,624	5,375 ± 0,065	0,145 ± 0,013	<0,037	0,602 ± 0,021	4,168 ± 0,223	0,403 ± 0,021	<0,094	0,158 ± 0,001	<1,060
MCMp-A	3,253 ± 0,061	2,077 ± 0,100	0,254 ± 0,030	<0,037	0,566 ± 0,023	2,599 ± 0,149	0,432 ± 0,011	<0,094	0,690 ± 0,029	<1,060
MER-A	<1,624	4,766 ± 0,122	0,216 ± 0,021	<0,037	0,556 ± 0,007	<0,723	1,475 ± 0,201	<0,094	0,686 ± 0,039	<1,060
MCA-A	1,983 ± 0,124	2,632 ± 0,365	0,174 ± 0,011	<0,037	0,592 ± 0,003	<0,723	0,590 ± 0,012	<0,094	<0,145	2,026 ± 0,331
MEM _L -C	<1,624	6,720 ± 0,516	<0,027	<0,037	<0,067	<0,723	0,671 ± 0,149	<0,094	0,155 ± 0,005	<1,060
MEM _F -A	<1,624	2,809 ± 0,428	0,135 ± 0,010	<0,037	0,153 ± 0,009	4,183 ± 0,188	4,624 ± 0,244	<0,094	0,277 ± 0,003	2,940 ± 0,192
MFT _V -E	<1,624	2,548 ± 0,035	0,048 ± 0,005	<0,037	0,333 ± 0,025	<0,723	0,290 ± 0,028	<0,094	0,186 ± 0,010	1,147 ± 0,077
MFT _M -C	2,040 ± 0,314	3,877 ± 0,343	<0,027	<0,037	0,090 ± 0,001	<0,723	0,351 ± 0,014	<0,094	<0,145	<1,060
MFN-E	<1,624	4,075 ± 0,403	<0,027	0,102 ± 0,002	0,238 ± 0,005	<0,723	0,835 ± 0,048	0,205 ± 0,080	0,310 ± 0,008	<1,060
MDC-C	<1,624	1,851 ± 0,064	<0,027	<0,037	0,134 ± 0,054	1,791 ± 0,112	0,172 ± 0,006	0,446 ± 0,119	0,265 ± 0,016	<1,060
MD-A	<1,624	2,206 ± 0,962	<0,027	<0,037	<0,067	47,0 ± 0,2	0,296 ± 0,001	0,380 ± 0,063	1,084 ± 0,075	<1,060
MXX-C	<1,624	<1,651	<0,027	<0,037	<0,067	8,226 ± 0,141	0,286 ± 0,017	<0,094	<0,145	<1,060
MAB-C	<1,624	5,257 ± 0,840	<0,027	<0,037	0,103 ± 0,003	<0,723	0,762 ± 0,033	0,159 ± 0,058	<0,145	<1,060
FAIXA	<1,624-3,253	<1,651-6,720	<0,027-0,254	<0,037-0,294	<0,067-0,951	<0,723-47,0	0,172-4,624	<0,094-0,446	<0,145-1,084	<1,060-2,940

Terminação da legenda da amostra em: E: Escuro; C: Claro; A: Âmbar.

Resultados expressos em média ± desvio padrão, n=4.

Foram quantificados quinze elementos, sendo evidente que, o elemento mais abundante nas amostras de mel analisadas foi o potássio, com concentrações variando de $27,2 \pm 0,9$ a $1210 \pm 97 \mu\text{g g}^{-1}$, seguido do sódio com concentrações variando de $16,4 \pm 8,4$ a $260,4 \pm 1,0 \mu\text{g g}^{-1}$, cálcio com concentrações variando de $28,37 \pm 0,97$ a $216,2 \pm 23,4 \mu\text{g g}^{-1}$, fósforo com concentrações variando de $21,66 \pm 2,76$ a $111,60 \pm 3,32 \mu\text{g g}^{-1}$ e magnésio com concentrações variando de $2,82 \pm 0,02$ a $95,96 \pm 3,63 \mu\text{g g}^{-1}$. Estes valores estão de acordo com o relatado por POHL (2009), onde o autor cita trabalhos em que o elemento potássio é o mais predominante no perfil mineral do mel, representando cerca de 45% a 85% do total mineral, e o elemento sódio é o segundo mais predominante na composição mineral.

Observa-se que na Tabela 19, que as amostras codificadas MMN, MAE e MER, provenientes de cidades litorâneas apresentam altos teores de K comparado as demais amostras, o que segundo [POHL \(2009\)](#), isso foi provavelmente consequência do aerossol marinho que pode ser uma fonte externa de K em méis de regiões costeiras.

A Tabela 21 compara as concentrações médias dos macrossubstâncias nas amostras de mel com os teores fornecidos pela TACO e a contribuição para o índice de ingestão diária recomendada (IDR).

Tabela 21. Comparação entre os teores médios de macrossubstâncias nas amostras de mel com a Tabela TACO e a contribuição desses analitos para o IDR.

Analitos	Este trabalho ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Tabela TACO ($\mu\text{g g}^{-1}$)	IDR para adultos (mg) ¹	Contribuição (%)
Ca	72,93	100	1000	0,11
K	572	990	--	--
Mg	30,41	60	260	0,04
Na	84,56	60	--	--
P	45,85	40	700	0,10

[BRASIL, 2005.](#)

Porção de 15g.

A média das concentrações de Ca, K e Mg nas amostras de mel encontraram-se abaixo do valor fornecido pela Tabela TACO. Apenas Na e P obtiveram

concentrações médias das amostras acima do valor fornecido pela tabela de composição de alimentos para mel de abelha.

Nas amostras de mel analisadas, o Ca foi o elemento que apresentou a maior contribuição diária de 0,11%, sendo também o que possui o maior valor de IDR. O P é o segundo que melhor contribui para a ingestão diária quando se utiliza uma porção de 15 g de mel, sendo de 0,10%. Por fim, o Mg apresentou um valor de 0,04%.

As amostras MCM e MCMp de Amadora em Portugal apresentaram concentrações de Ca e Mg similares ao relatado por [SILVA et al. \(2009\)](#), em que os autores determinaram Ca, K, Mg e Na por FAAS em amostras de méis.

Analisando a Tabela 20, as amostras MCMp, MCA e MFT_M apresentaram concentrações de arsênio acima do limite máximo tolerado para mel estabelecido pela ANVISA, que é 0,10 µg g⁻¹ ([BRASIL, 2013](#)). Tais concentrações de arsênio em mel determinadas por ICP OES não foram relatadas por outros autores. Porém, as amostras MCM e MCMp só diferem na embalagem, e as amostras MFT_M e MFT_V só diferem no tipo de florada, o que pode indicar uma contaminação durante o armazenamento da amostra em tubos de polipropileno de 50 mL.

Para a maioria das amostras, os teores de B foram similares àqueles relatados por [CHUDZINSKA e BARALKIEWICZ \(2010\)](#), que obtiveram teor médio de B de 6,92 µg g⁻¹ para amostras de méis poloneses. [OZCAN e JUHAIMI \(2012\)](#) também relataram teor médio de B de 4,05 ± 0,12 µg g⁻¹ para amostras de mel turco. Para a amostra codificada MXX proveniente de um apiário localizado em Xique-Xique/Bahia o teor obtido ficou abaixo do LOQ (1,6 µg g⁻¹).

Quanto à toxicidade do B, de acordo com [BAKIRDERE, ORENAY e KORKMAZ \(2010\)](#), os humanos apresentam certa tolerância a doses elevadas de B, podendo causar apenas irritabilidade e distúrbios gastrointestinais. Porém, para as abelhas a presença de baixas concentrações de B na rota alimentar pode apresentar toxicidade considerável de acordo com o relatado por [SOUZA et al. \(2004\)](#).

Os teores médios de Ba variaram de 0,048 ± 0,005 a 0,254 ± 0,030 µg g⁻¹ estando similares com valores obtidos por [FERNANDÉZ-TORRES et al. \(2005\)](#), onde os autores obtiveram teores de Ba variando de 0,044 ± 0,049 a 1,264 ± 0,089 µg g⁻¹ em amostras de méis espanhóis.

A concentração média de Cd na amostra MVM ficou acima do limite máximo tolerado para mel de acordo com o estabelecido pela Resolução nº42 do ano de 2013,

da ANVISA de $0,10 \text{ mg kg}^{-1}$. As amostras MMN, MFN e MFO ficaram abaixo do limite máximo e, as demais amostras apresentaram teores abaixo do LOQ ($0,04 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$).

Os teores de Cu nas amostras variaram de $0,090 \pm 0,001$ a $0,951 \pm 0,036 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, valores estes similares aos obtidos por [LACHMAN *et al.* \(2007\)](#), [AJTONY *et al.* \(2007\)](#), [IOANNIDOU *et al.* \(2007\)](#), [OSMAN *et al.* \(2007\)](#), [BATISTA *et al.* \(2012\)](#) e [LEME *et al.* \(2014\)](#), sendo os dois últimos trabalhos com amostras de mel brasileiro. As amostras MD, MXX e MEM_L apresentaram teores abaixo do LOQ ($0,07 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$).

Dentre as 18 amostras analisadas, somente foi possível quantificar Fe em 8 delas, observando-se também uma ampla faixa de concentração, variando de $1,368 \pm 0,391$ a $47,0 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$, sendo a amostra MD que apresentou maior valor. Com base na literatura, apenas [RASHED E SOLTAN \(2004\)](#) obtiveram concentrações de Fe a níveis tão elevados, de $3690 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$. Vários fatores podem contribuir para a concentração do Fe, como por exemplo, o tipo de recipiente onde foi armazenado o mel e/ou a adição de aditivos. Segundo relatado pelos mesmos autores, méis que são produzidos com a adição de açúcares tendem a apresentar maiores concentrações deste elemento.

A cristalização é um processo natural do mel puro, sendo que, a glicose cristaliza mais rápido que a frutose, por ser mais solúvel, portanto, a razão glicose/água indica a tendência de cristalização do mel ([CAMARGO *et al.*, 2006](#)). Porém, a adição de sacarose favorece a cristalização parcial do mel, formando uma faixa de precipitado no fundo da embalagem. As amostras MD e MXX apresentaram este aspecto de formação de cristais no fundo do recipiente, o que foi um indicativo de adição de sacarose, assim sendo, de acordo com [RASHED E SOLTAN \(2004\)](#), isso aumentaria a possibilidade do aumento da concentração de Fe. Na Tabela 20 pode-se observar que as maiores concentrações de Fe foram nas amostras MD e MXX, evidenciando a possibilidade de adulteração do mel.

Segundo [POHL \(2009\)](#), méis com coloração visual escura e âmbar tendem a conter maiores concentrações de Cu e Zn. Observa-se na Tabela 20 que as amostras MDC, MXX, MAB, MFT_M e MEM_L de coloração visual clara, apresentam os menores teores de Cu e Zn entre as 18 amostras analisadas, o que corrobora com o relatado pelos autores.

A comparação entre as concentrações de macro e microelementos nas amostras de mel estudadas com os valores obtidos por outros autores é apresentada na Tabela 22.

Tabela 22. Comparação entre as concentrações, em $\mu\text{g g}^{-1}$, de macro e microelementos nas amostras de mel estudadas com os valores obtidos por outros autores.

Analitos	Este trabalho	Nova Zelândia (VANHANEN, EMMERTZ E SAVAGE, 2011)	Polônia (CHUDZINSKA E BARALKIEWICZ, 2010)	Bangladesh (PAUL <i>et al.</i> , 2017)	Turquia (ALTUN <i>et al.</i> , 2017)	Brasil (RIBEIRO <i>et al.</i> , 2015)
As	1,76* (<1,62-3,25)	0,08* (0,04-0,17)				
B	3,78* (<1,65-6,72)	4,42* (0,05-6,66)	6,92* (1,03-15,9)			
Ba	0,09* (<0,03-0,25)		0,12* (<LD-0,91)			
Ca	72,9* (28,4-216)	50,9* (7,21-94,3)	44,4* (<LD-159)	0,73* (0,13-1,20)	1,67* (<0,001-4,5)	253* (17,9-794)
Cd	0,06* (<0,04-0,29)	0,15* (0,01-0,45)	0,02* (<LD-0,10)	0,024* (0,006-0,06)		
Cu	0,33* (0,07-0,95)	0,25* (0,09-0,70)	0,82* (<LD-2,63)	2,32* (1,54-2,85)	0,07* (<0,001-0,93)	10,4* (1,5-38,8)
Fe	4,33* (0,72-47,0)	1,71* (0,67-3,39)		4,10* (0,41-28)	0,27* (<0,001-7,3)	6,5* (0,9-40,3)
K	572* (27,2-1210)	1050* (34,8-3640)	1346* (7,77-4222)	971* (579-2219)	45,5* (1,18-268)	344* (78,0-1683)
Mg	30,4* (2,82-96,0)	24,8* (7,52-86,3)	18,5* (0,07-64,8)	178* (69,4-632)		
Mn	1,03* (0,17-4,62)	1,04* (0,18-4,75)	4,96* (0,13-13,2)		0,05* (<0,001-0,27)	1,0* (ND-6,9)
Na	84,6* (16,4-260)	23,9* (1,10-110)	24,8* (0,38-89,6)	164* (62,8-617)	2,92* (0,48-13,1)	
P	45,9* (<15,8-128)	46,0* (29,5-255)				
Se	0,16* (<0,09-0,45)				0,05* (<0,001-0,07)	0,1* (ND-0,4)
Sr	0,34* (<0,15-1,08)					5,1* (ND-38,0)
Zn	1,29* (<1,06-2,94)	1,18* (0,20-2,46)	3,22* (<LD-39,7)	0,89* (0,12-3,5)	0,05* (<0,001-0,24)	4,2* (0,1-21,2)

Média e faixa.

As concentrações dos analitos obtidas neste trabalho foram similares com o relatado por [VANHANEN, EMMERTZ E SAVAGE \(2011\)](#), sendo que no método relatado por eles, utilizou-se 5,0 mL de HNO_3 65% m m⁻¹ e 2,0 mL de H_2O_2 30% m m⁻¹ em forno de micro-ondas com determinação por ICP OES. A quantidade de reagente utilizado foi maior que o relatado neste trabalho, contribuindo assim para a maior geração de resíduos.

3.5 Aplicação de ferramentas estatísticas para a avaliação das amostras de mel

A busca em verificar como as amostras se relacionam, ou melhor, o quanto estas são semelhantes segundo as variáveis investigadas, destacam-se dois métodos amplamente utilizados: a análise por agrupamento hierárquico (HCA) e a análise por componentes principais (PCA). Na análise por HCA, é possível tratar cada variável como um ponto no espaço multidimensional descrito pelas amostras, ou seja, podem-se avaliar agrupamentos de amostras ou de variáveis de acordo com o interesse em

cada situação. Já a análise por PCA fornece uma classificação para identificar as variáveis mais importantes no espaço das componentes principais, reduzindo-as para fornecer uma visão estatisticamente mais clara do conjunto de dados ([NETO e MOITA, 1998](#)).

Na construção da matriz de dados utilizou-se 12 variáveis como colunas, sendo que as variáveis são os minerais: B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Sr e Zn, e 18 amostras de mel (12x18), considerando a concentração média para cada amostra. Estes valores médios foram autoescalados utilizando-se o software *Statística*® versão 6. Aplicando-se a análise de componente principal (PCA), as três primeiras componentes principais acumularam 73,35% da variância total dos dados, o que é representativo o suficiente para explicar os dados obtidos do perfil mineral do mel. Os valores dos pesos para as três primeiras componentes principais, a variância total e o acúmulo da variância para análise dos dados encontram-se na Tabela 23.

Os analitos As, Cd e Se foram excluídos da análise multivariada pelo fato de muitas amostras apresentarem teores abaixo do limite de quantificação, o que limita a análise do conjunto de dados.

Tabela 23. Valores dos pesos para as três primeiras componentes principais nas amostras de mel.

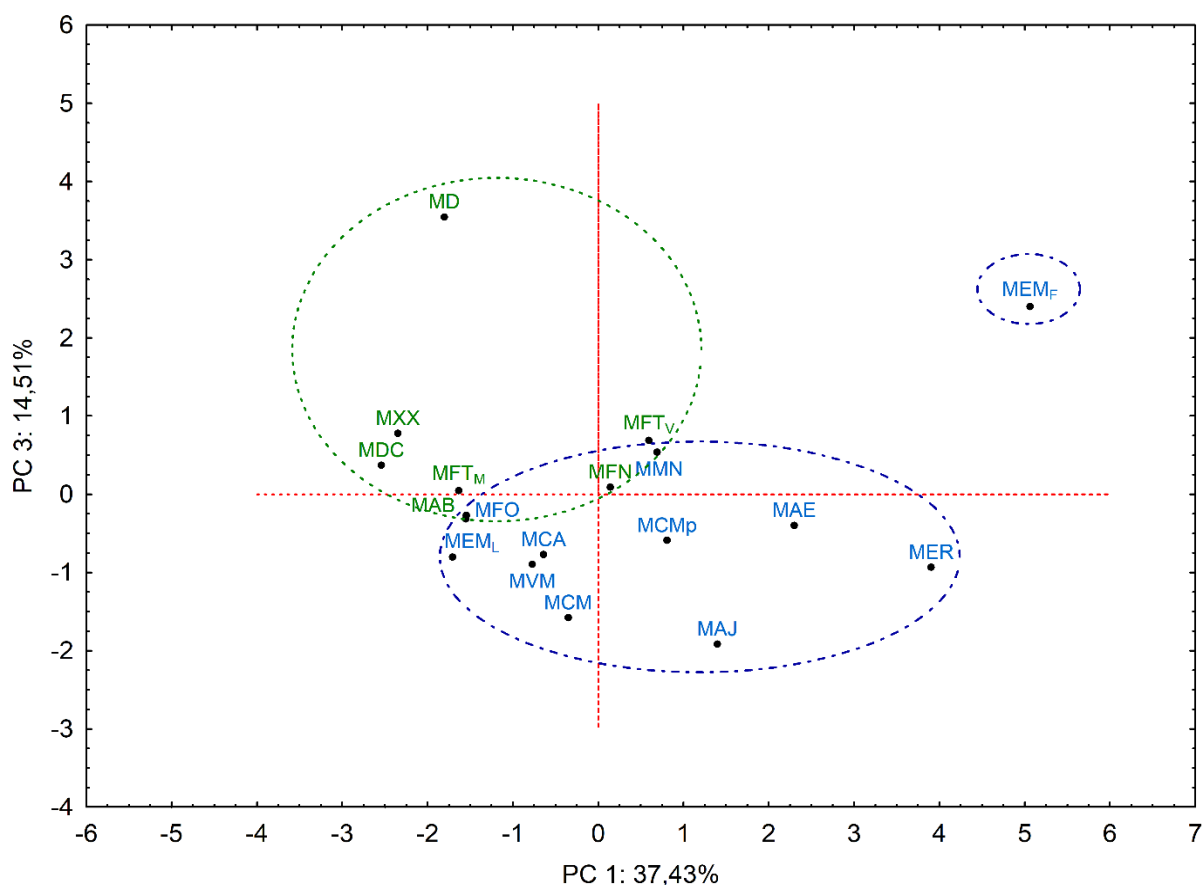
Variáveis	PC1	PC2	PC3
B	0,030	-0,253	-0,522
Ba	0,655	0,464	-0,381
Ca	0,805	0,535	0,037
Cu	0,453	0,348	-0,641
Fe	-0,215	0,529	0,709
K	0,824	-0,286	-0,072
Mg	0,877	-0,250	0,217
Mn	0,705	-0,417	0,256
Na	0,788	0,300	-0,008
P	0,388	-0,727	0,263
Sr	0,298	0,744	0,394
Zn	0,597	-0,335	0,259
Variância total (%)	37,43	21,41	14,51
Variância acumulada (%)	37,43	58,83	73,35

A primeira componente principal (PC1) explicou 37,43% da variância total dos dados, obtendo-se como principais variáveis as concentrações de Ca, K, Mg, Mn e Na com pesos próximos e positivos, mostrando uma correlação entre esses elementos na primeira componente. Na segunda componente principal (PC2), com variabilidade

de 21,41% dos dados obtidos, as variáveis com maiores pesos foram P e Sr, ambas com valores próximos, porém de sinal contrário, mostrando uma tendência inversa entre as concentrações das mesmas. Na PC3 as variáveis com maiores pesos foram Fe e Cu, com valores próximos e de sinais contrários.

Para a construção do gráfico de escores (Figura 13) utilizou-se a PC1 versus a PC3, sendo que a PC1 versus PC2 não mostrava claramente uma separação efetiva de grupos entre as amostras. Examinando a Figura 13, observa-se a separação de dois grupos de acordo com a predominância rural (em verde) ou urbana (em azul) das amostras.

Figura 13. Gráfico de escores PC1 x PC3 para as amostras de mel.



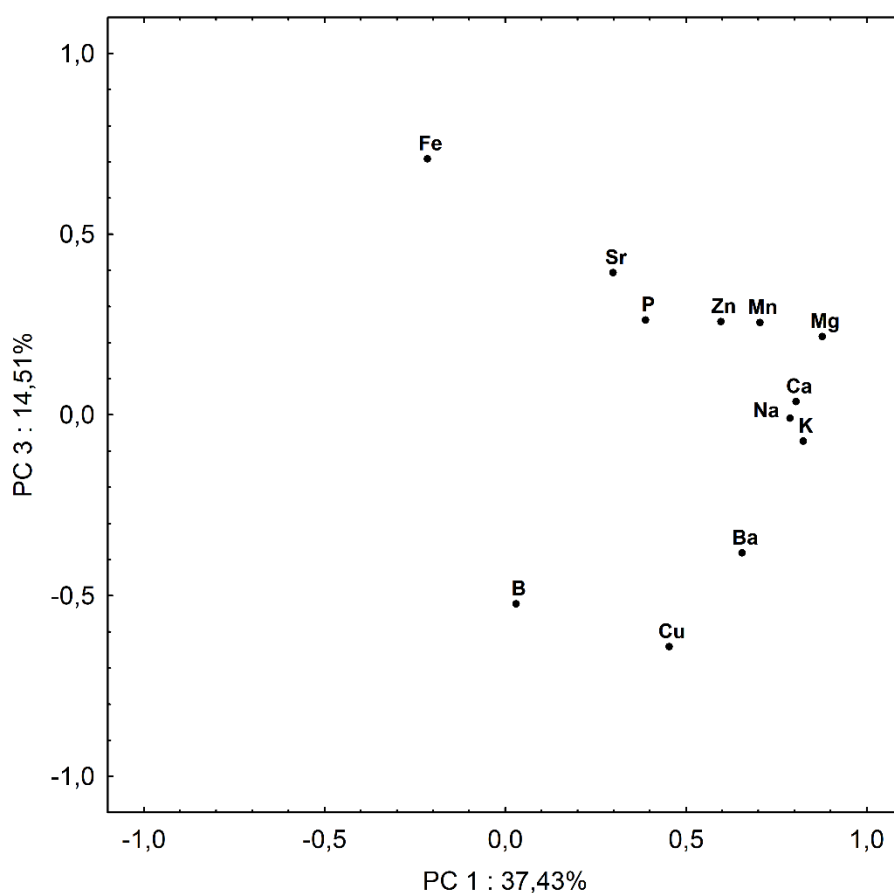
Em azul: amostras de predominância urbana.

Em verde: amostras de predominância rural.

A Figura 13 foi interpretada utilizando-se o gráfico de pesos das variáveis analisadas, o qual é apresentado na Figura 14. No gráfico de pesos pode-se observar que a variável Fe está deslocada para valores mais positivos da PC3, o que influenciou as amostras MD e MEM_F ficarem mais distantes do grupo de amostras de méis. A

amostra MEM_F não apresenta cristalização parcial, o que é indicativo que o teor de Fe relativamente alto na amostra MEM_F seja proveniente de contaminações por atividade industrial. A amostra MEM_F provém da cidade Mairinque em São Paulo, de predominância urbana/industrial, que pode ter contribuído para um aumento na concentração de Fe e de outros analitos como Ba, Mn e Zn.

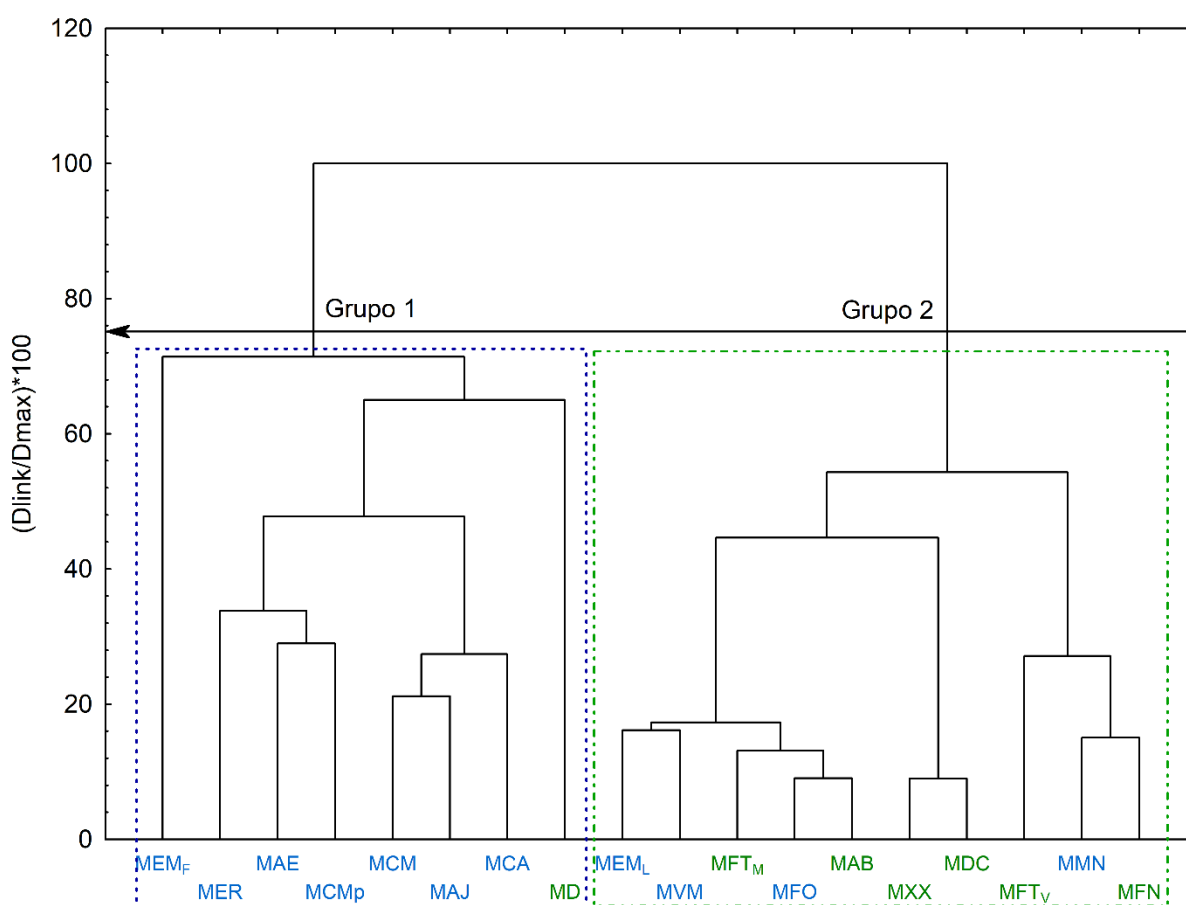
Figura 14. Distribuição das variáveis no gráfico de *loadings* PC1 x PC3 para as amostras de mel.



As amostras MAJ, MCM, MCM_p, MAE e MER, de predominância urbana, obtiveram maiores concentrações de B, Ba e Cu. O bário e o boro são muito utilizados na fabricação de vidro, tubo de imagem de televisão, etc. O elemento Ba, em particular, é um valioso rastreador para as emissões de veículos, fazendo parte da composição de poeira urbana ([MORGANO et al., 2010](#)). E, o Cu está relacionado com as emissões de desgaste do freio de veículos automotores, adicionalmente com os aspectos de Ba e B citados, estes fatos corroboram para a proximidade do apiário de cada amostra com indústrias ou rodovias ([LOYOLA et al., 2012](#)).

A análise de agrupamento hierárquico foi aplicada também à matriz dos dados já anteriormente citada, para confirmação das informações obtidas na PCA. Analisando o dendograma na Figura 15, observa-se a formação de dois grupos, que já foram discutidos na PCA. Observa-se que o grupo 1 foi composto por amostras de predominância urbana, sendo que aparece neste grupo a amostra MD (rural) devido ao alto teor de Fe.

Figura 15. Dendograma obtido para as amostras de mel a partir da HCA pelo método de Ward.



Em verde: predominância rural.

Em azul: predominância urbana.

O grupo 2 é composto por amostras de predominância rural, sendo que aparece neste grupo a amostra codificada MEM_L que é de predominância urbana. Porém, a florada predominante na amostra MEM_L é de laranjeira que, em geral, tendem a apresentar menores teores de Ca, Cu, K, Mg, Mn e Na, o que explica também o fato de se ter grande distância (alta dissimilaridade) entre as amostras MEM_L e MEM_F,

sendo que ambas provêm da mesma localidade (mesmo apiário) ([FERNANDÉZ-TORRES et al., 2005](#); [BILANDIZIC et al., 2017](#); [ALDA-GARCILOPE et al., 2012](#)).

As amostras codificadas MVM, MFO e MMN aparecem no grupo 2 composto por amostras de predominância rural porque corroboram com o agrupamento da PCA no eixo da PC1, devido as menores concentrações de Ca, K, Mg e Na.

3.6 Estimativa da bioacessibilidade em amostras de mel utilizando o método *in vitro* SBET

Para a estimativa da bioacessibilidade nas amostras de mel analisadas, utilizou-se o método *in vitro* SBET adaptado de [OOMEN et al. \(2002\)](#). Como reportado na literatura, o método SBET simula apenas a fase gástrica, com solução de ácido clorídrico e glicina, em pH igual a 1,5. A glicina é o aminoácido mais simples produzido pelo corpo humano, e age tamponando a solução gástrica simulada, devido ao caráter anfótero da sua molécula. Como este teste não simula a fase intestinal e o pH do meio é baixo, obtém-se resultados superestimados de bioacessibilidade ([BOSSO E ENZWEILER, 2008](#)).

3.6.1 Validação do método extração

A validação do método de extração foi realizada através dos seguintes parâmetros de desempenho: limites de detecção e de quantificação, linearidade e faixa linear de trabalho.

3.6.1.1 Limites de detecção e de quantificação

Os resultados obtidos para os limites de detecção e de quantificação do teste de extração utilizando o método *in vitro* SBET, expressos em mg L⁻¹ e em µg g⁻¹, estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Limites de detecção e limites de quantificação do procedimento de extração *in vitro* SBET.

Elementos	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	LOD (µg g ⁻¹)	LOQ (µg g ⁻¹)
As	0,1	0,4	2,5	8,5
B	0,03	0,1	0,7	2,3
Ba	0,001	0,003	0,02	0,05
Ca	0,05	0,2	1,1	3,6
Cd	0,002	0,006	0,04	0,1
Cu	0,001	0,005	0,03	0,1
Fe	0,008	0,03	0,2	0,6
K	0,02	0,06	0,4	1,2
Mg	0,006	0,02	0,1	0,4
Mn	0,02	0,07	0,4	1,4
Na	0,06	0,2	1,3	4,2
P	0,4	1,5	8,8	29
Se	0,1	0,3	2,0	6,8
Sr	0,002	0,006	0,04	0,1
Zn	0,06	0,2	1,1	3,8

Os limites de detecção e de quantificação do procedimento de extração *in vitro* SBET foram maiores comparados ao método analítico proposto porque as condições são diferentes, com uso de reagentes diferentes, e isso implica na obtenção de diferentes valores de LOD e LOQ.

3.6.1.2 Linearidade e faixa linear de trabalho

As curvas de calibração e a faixa linear para cada analito nas amostras de mel, após extração pelo método *in vitro* SBET estão apresentadas na Tabela 25.

As faixas lineares para Ca, K, Mg, Na e P foram mais extensas devido as maiores concentrações destes elementos nas amostras de mel.

Tabela 25. Curvas analíticas de calibração para determinação dos analitos nas amostras de mel por ICP OES, após extração pelo método *in vitro* SBET.

Elementos	Equação da reta	R ²	Faixa linear (mg L ⁻¹)
As	y = 152,95x + 34,953	0,9983	0,424 a 5,0
B	y = 4190x + 256,99	0,9992	0,115 a 5,0
Ba	y = 791991x + 54236	0,9956	0,003 a 5,0
Ca	y = 3813,1x + 2219,5	0,9988	0,178 a 75,0
Cd	y = 6701x + 277,13	0,9974	0,006 a 5,0
Cu	y = 11558x + 442,51	0,9996	0,005 a 5,0
Fe	y = 2128,3x + 103,13	0,9976	0,028 a 5,0
K	y = 4819x + 1088,7	0,9987	0,059 a 75,0
Mg	y = 6152,2x - 237,71	0,9995	0,022 a 20,0
Mn	y = 3166x + 118,56	0,9979	0,071 a 5,0
Na	y = 19817x + 446,74	0,9989	0,210 a 25,0
P	y = 22,462x + 37,412	0,9994	1,465 a 75,0
Se	y = 141,45x + 31,626	0,9974	0,339 a 5,0
Sr	y = 1863,7x + 70,393	0,9978	0,006 a 5,0
Zn	y = 5936,4x + 149,48	0,9983	0,192 a 5,0

3.6.2 Aplicação do método de extração *in vitro* SBET nas amostras de mel

Dentre as dezoito amostras estudadas, escolheu-se nove amostras com maiores concentrações para aplicação do método de extração SBET visando a determinação da bioacessibilidade de As, B, Ba, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se, Sr e Zn por ICP OES. O teor bioacessível em porcentagem foi calculado segundo a equação abaixo.

$$\text{Equação 1. Teor bioacessível (\%)} = \frac{\text{Teor bioacessível}}{\text{Teor total}} \times 100$$

Os teores bioacessíveis (em %) dos analitos estudados em nove amostras de mel por ICP OES são mostrados na Tabela 26.

Tabela 26. Teores bioacessíveis, em %, em nove amostras de mel por ICP OES.

Amostra	Ca	Fe	K	Mg	Na
MDC-C	10,9 ± 0,6	<0,00006	9,4 ± 0,9	25,0 ± 0,7	<0,0004
MD-A	17,9 ± 0,6	21,8 ± 0,4	13,6 ± 0,6	22,9 ± 0,3	<0,0004
MMN-E	14,3 ± 0,4	<0,00006	14,7 ± 0,4	17,7 ± 0,6	<0,0004
MVM-E	<0,0004	<0,00006	14,6 ± 0,7	19,6 ± 0,3	<0,0004
MAE-A	15,5 ± 0,6	<0,00006	16,3 ± 0,2	18,4 ± 0,3	20,2 ± 1,3
MCM-A	12,9 ± 2,0	14,3 ± 2,1	15,5 ± 0,9	19,9 ± 1,2	4,0 ± 1,1
MER-A	13,4 ± 1,3	<0,00006	14,5 ± 0,5	15,0 ± 1,1	9,7 ± 0,6
MCA-A	<0,0004	<0,00006	13,7 ± 0,4	19,5 ± 0,3	<0,0004
MEM _F -A	21,4 ± 0,1	16,3 ± 0,4	20,0 ± 1,6	23,0 ± 0,2	8,7 ± 0,8
FAIXA	<0,0004-21,4	<0,00006-21,8	9,4-20,0	15,0-25,0	<0,0004-20,2

E: Escuro; C: Claro; A: Âmbar.

Em azul: predominância urbana.

Em verde: predominância rural.

De modo geral, o teor bioacessível (em %) de Ca, Fe e Mg foram menores que as relatadas por [POHL et al. \(2012\)](#) e [BILUCA et al. \(2017\)](#). A explicação para este ocorrido é o fato de o mel ser rico em carboidratos, que são digeridos principalmente pela enzima amilase, localizada na boca e no intestino delgado, e pelas enzimas sacarase, maltase e lactase encontradas também no intestino delgado ([MAHAN e RAYMOND, 2017](#)), como [POHL et al. \(2012\)](#) e [BILUCA et al. \(2017\)](#) simularam a fase gástrica e principalmente a fase intestinal, os mesmos obtiveram bioacessibilidades maiores em comparação aos resultados da Tabela 26, provenientes da extração *in vitro* SBET que simula apenas a fase gástrica.

O analito que apresentou maiores porcentagens de bioacessibilidade foi o Mg seguido do K. E entre as amostras analisadas, a amostra MEM_F apresentou teores bioacessíveis mais elevados. O teor bioacessível dos analitos As, B, Ba, Cd, Cu, Mn, P, Se, Sr e Zn ficaram abaixo do LOQ.

As amostras de mel analisadas apresentaram teores bioacessíveis que podem contribuir para uma dieta equilibrada, rica em minerais. Contudo, como o mel é um

alimento consumido em quantidades não muito expressivas, sua contribuição de elementos essenciais na dieta é relevante, mas não é suficiente para o índice diário recomendado.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método para a digestão de mel proposto neste trabalho foi otimizado com o planejamento fatorial 2^3 e a matriz Doehlert. O planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado com dois tipos de mel, o mel de coloração clara e o mel de coloração escura, onde verificou-se que houve diferenças significativas entre os gráficos de Pareto para o mel claro e para o mel escuro. Sendo assim, o planejamento multivariado permitiu otimizar um método de digestão de mel reduzindo o gasto com reagentes e diminuindo o tempo de análise, seguindo os Princípios da Química Verde.

O método proposto foi validado e aplicado para a determinação de As, B, Ba, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se, Sr e Zn em dezoito amostras de mel onde, as concentrações dos analitos, em geral, foram maiores para as amostras de mel de coloração visual escura e âmbar do que para as amostras de mel clara. Entretanto, tanto méis claros quanto méis escuros apresentaram concentrações similares aos reportados pela literatura. Algumas amostras de mel claro apresentaram, para a maioria dos microelementos, teores abaixo do limite de quantificação.

A análise de componentes principais (PCA) e a análise de agrupamento hierárquico (HCA) colaboraram na identificação de grupos entre as amostras, onde amostras de predominância urbana tendem a apresentar maiores de B, Ba e Cu em virtude da possível contribuição antropogênica, em comparação com amostras de predominância rural, que estão menos expostas a fatores que contribua para o aumento de tais concentrações.

Os teores bioacessíveis de minerais foram menores que os relatados na literatura, uma vez que neste trabalho o ensaio de extração do teor bioacessível simulou apenas as condições gástricas e, visando comparar a bioacessibilidade de amostras de mel brasileiras e portuguesas com a de outros países pretende-se aplicar um ensaio de extração que simule também as fases salivar e intestinal como, por exemplo, o teste PBET (gástrica + intestinal) e o teste UBM (salivar + gástrica +intestinal).

Os resultados obtidos neste trabalho trazem informações relevantes a respeito da composição mineral do mel de acordo com a coloração visual e origem geográfica, e do teor bioacessível dos analitos na fase gástrica, contribuindo, assim, com o controle da qualidade de méis.

5 REFERÊNCIAS

ABEMEL. Relatórios Atuais; Dados das exportações de mel. Disponível em: http://brazilletsbee.com.br/INTELIG%C3%8ANCIA%20COMERCIAL%20ABEMEL_MARCO_CONSOLIDADO_2017.pdf. Acesso em 12 de maio de 2017.

AGHAMIRLOU, H. M. et al.; Heavy metals determination in honey samples using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 13, n. 1, p. 39, 2015.

AJTONY, Z. et al.; Study on the simultaneous determination of some essential and toxic trace elements in honey by multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 71, n. 2, p. 683-690, 2007.

ALDA-GARCILOPE, C. et al.; Characterization of Spanish honeys with protected designation of origin "Miel de Granada" according to their mineral content. **Food chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1785-1788, 2012.

ALTUN, S. K. et al.; Analyses of Mineral Content and Heavy Metal of Honey Samples from South and East Region of Turkey by Using ICP-MS. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2017, 2017.

ALTUNDAG, H.; BINA, E.; ALTINTIG, E.; The levels of trace elements in honey and molasses samples that were determined by ICP-OES after microwave digestion method. **Biological trace element research**, v. 170, n. 2, p. 508-514, 2016.

ALVES, R. M. O. et al. Physico-chemical characteristics of honey samples of stingless bee *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 25, n. 4, p. 644-650, 2005.

AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.; MOUNEYRAC, C. (Ed.). **Aquatic ecotoxicology: advancing tools for dealing with emerging risks**. Academic Press, 2015.

ATROUSE, O. M.; ORAN, S. A.; AL-ABBADI, S. Y.; Chemical analysis and identification of pollen grains from different Jordanian honey samples. **International journal of food science & technology**, v. 39, n. 4, p. 413-417, 2004.

BAKIRDERE, S.; ORENAY, S.; KORKMAZ, M.; Effect of boron on human health. **The Open Mineral Processing Journal**, v. 3, n. 1, 2010.

BARBOSA, A. L. et al. **Criação de Abelhas: apicultura**. Embrapa Informação Tecnológica, 2007.

BATISTA, B. L. et al.; 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, n. 1, p. 209-215, 2012.

BERALDO, R. M.; BARBOZA, R. A. B.; **Dossiê técnico: Apicultura orgânica**. Sistema Integrado de Resposta Técnicas – SIRT/UNESP, 2011. Disponível em: <respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTQzMg==>. Acesso em: 31 de julho de 2017.

BEZERRA, M. A. et al.; Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BILANDŽIĆ, N. et al.; Essential and toxic element concentrations in monofloral honeys from southern Croatia. **Food chemistry**, v. 234, p. 245-253, 2017.

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

BINGS, N. H.; V. NIESSEN, J. O.; SCHAPER, J. N.; Liquid sample introduction in inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry—critical review. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 100, p. 14-37, 2014.

BOSSO, S. T.; ENZWEILER, J. et al.; Ensaios para determinar a (bio)disponibilidade de chumbo em solos contaminados: revisão. **Química Nova**, v. 31, nº 2, p. 394-400, 2008.

BRASIL. Orientação sobre validação de métodos analíticos; DOQ-GCCRE-008, Revisão 03, de 2010 do INMETRO. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_03.pdf>. Acesso em 08 de novembro de 2017.

BRASIL. Orientação sobre validação de métodos analíticos; DOQ-GCCRE-008, Revisão 05, 2016 do INMETRO. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf>. Acesso em 08 de novembro de 2017.

BRASIL. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos; DOQ-GCCRE-008, Revisão 01, 2003 do INMETRO. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_01.pdf>. Acesso em 08 de novembro de 2017.

BRASIL. Regulamento técnico mercosul sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. Resolução RDC, nº 42, de 29 de agosto de 2013 da ANVISA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/393845/RDC%2Bn%C2%BA%2B42_2013_final.pdf/eec629cf-8d17-422b-a362-366b275c1a00?version=1.0>. Acesso em 08 de novembro de 2017.

BRASIL. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos adicionados de nutrientes essenciais. Portaria nº 31, de 13 de janeiro de 1998 da ANVISA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/portarias/31_98.htm>. Acesso em 24 de abril de 2017.

BRASIL. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (idr) de proteína, vitaminas e minerais. Resolução RDC, nº269, de 22 de setembro de 2005 da ANVISA. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_269_2005.pdf/2e95553c-a482-45c3-bdd1-f96162d607b3>. Acesso em 08 de novembro de 2017.

BRASIL. Validação de métodos analíticos. Resolução RDC, nº166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em 08 de novembro de 2017.

BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. AMGH Editora, 2012.

CAMARGO, R. C. R. et al.; Mel: características e propriedades. **Embrapa Meio-Norte-Documentos (INFOTECA-E)**, 2006.

CARBONELL-CAPELLA, J. M. et al.; Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 2, p. 155-171, 2014.

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, n. 1, p. 284-290, 2010.

CZIPA, N.t; ANDRÁSI, D.; KOVÁCS, B.; Determination of essential and toxic elements in Hungarian honeys. **Food chemistry**, v. 175, p. 536-542, 2015.

DE LA GUARDIA, M.; GARRIGUES, S.; **Handbook of mineral elements in food**. John Wiley & Sons, p.23-147, 2015.

DEAN, J. R. **Bioavailability, bioaccessibility and mobility of environmental contaminants**. John Wiley & Sons, p. 191-198, 2007.

DEPOI, F. S.; BENTLIN, F. R.S.; POZEBON, D.; Methodology for Hg determination in honey using cloud point extraction and cold vapour-inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Analytical Methods**, v. 2, n. 2, p. 180-185, 2010.

DEVILLERS, J. et al.; Chemometrical analysis of 18 metallic and nonmetallic elements found in honeys sold in France. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5998-6007, 2002.

EURACHEM WORKING GROUP. A aptidão para fins de métodos analíticos: um guia de laboratório para validação de métodos e tópicos relacionados. 1998; Disponível em: <<http://www.eurachem.org/guides/pdf/válido.pdf>>. Acesso em 08 de novembro de 2017.

FDA, US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION; guidance for industry: bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research: Rockville, MD, 2001. Disponível em: < <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm368107.pdf>>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2018.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. (Ed.). **Fennema's food chemistry**. CRC, p.524-564, 2008.

FERNÁNDEZ-TORRES, R. et al.; Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. **Talanta**, v. 65, n. 3, p. 686-691, 2005.

FERREIRA, S. L. C. et al.; A review of reflux systems using cold finger for sample preparation in the determination of volatile elements. **Microchemical Journal**, v. 106, p. 307-310, 2013.

FERREIRA, S. L. C. et al.; Analytical strategies of sample preparation for the determination of mercury in food matrices—a review. **Microchemical Journal**, v. 121, p. 227-236, 2015.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. Editora Vento Leste, Salvador, p.13-32, 2015.

GALÁN, M. G.; DRAGO, S. R.; Food matrix and cooking process affect mineral bioaccessibility of enteral nutrition formulas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 3, p. 515-521, 2014.

GINÉ-ROSIAS, M. F.; **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES)**. Piracicaba: CENA/USP, p. 33-37, 1999b.

GINÉ-ROSIAS, M. F.; **Espectrometria de massas com fonte de plasma (ICP-MS)**. Piracicaba: CENA/USP, p. 1-6, 1999a.

GONZÁLEZ-MIRET, M. L. et al.; Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2574-2580, 2005.

HARMANESCU, M.; POPOVICI, D.; GERGEN, I.; Mineral micronutrients composition of bee's pollen. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 13, n. 1, p. 175-182, 2007.

HILL, S. J. (Ed.). **Inductively coupled plasma spectrometry and its applications**. John Wiley & Sons, p. 61-72, 2008.

HOENIG, M.; KERSABIEC, A.M.; Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 51, n. 11, p. 1297-1307, 1996.

ICH, International Conference on Harmonization; Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). In: International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland, p. 11-12, 2005.

IOANNIDOU, M. D. et al.; Direct determination of toxic trace metals in honey and sugars using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **Talanta**, v. 65, n. 1, p. 92-97, 2005.

KEK, S. P. et al.; Classification of honey from its bee origin via chemical profiles and mineral content. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 1, p. 19-30, 2017.

KOCH, I.; REIMER, K.; **Bioaccessibility extractions for contaminant risk assessment**. Ed. Oxford, 2012.

KORN, M. G. A. et al. Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods—a review. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 43, n. 2, p. 67-92, 2008.

KRAKOWSKA, A. et al.; Trace metal analyses in honey samples from selected countries. A potential use in bio-monitoring. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 95, n. 9, p. 855-866, 2015.

KRUG, F. J.; ROCHA, F. R. P. **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. Edit.SBQ, Sociedade Brasileira de Química, São Paulo, p. 35-37, 2016.

KRUG, F.J.; **Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Ed. FJ Krug, 2010.

KRZCIUK, K.; Intelligent Analysis of Samples by Semiquantitative Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS) Technique: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 284-290, 2016.

LACHMAN, J. et al. Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. **Food chemistry**, v. 101, n. 3, p. 973-979, 2007.

LAZOR, P. et al.; Monitoring of air pollution and atmospheric deposition of heavy metals by analysis of honey. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 1, n. 4, p. 522, 2012.

LECLERCQ, A. et al.; Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part I. Practical considerations. **Analytica chimica acta**, v. 885, p. 33-56, 2015.

LECLERCQ, A. et al.; Introduction of organic/hydro-organic matrices in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mass spectrometry: A tutorial review. Part II. Practical considerations. **Analytica chimica acta**, v. 885, p. 57-91, 2015.

LEME, A. B.P. et al.; Optimization of sample preparation in the determination of minerals and trace elements in honey by ICP-MS. **Food analytical methods**, v. 7, n. 5, p. 1009-1015, 2014.

LOYOLA, J. et al.; Trace metals in the urban aerosols of Rio de Janeiro city. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 628-638, 2012.

MADEJCZYK, M.; BARALKIEWICZ, D.; Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES. **Analytica Chimica Acta**, v. 617, n. 1-2, p. 11-17, 2008.

MAHAN, L. Kathleen; RAYMOND, Janice L. **Krause Food & the Nutrition Care Process-E-Book** . Elsevier Health Sciences, 14 ed., p. 174-259, 2017.

MESTER, Z.; STURGEON, R. E.; **Sample preparation for trace element analysis**. Elsevier, p. 235-242, 2003.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C.; **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. Pearson Education, 6^a ed., p. 43-45, 2005.

MITRA, S.; **Sample preparation techniques in analytical chemistry**. John Wiley & Sons, p. 227-240, 2004.

MOREDA-PIÑEIRO, J. et al.; Trace metals in marine foodstuff: bioavailability estimation and effect of major food constituents. **Food chemistry**, v. 134, n. 1, p. 339-345, 2012.

MORGANO, Marcelo A. et al.; Inorganic contaminants in bee pollen from southeastern Brazil. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6876-6883, 2010.

NETO, J.M M.; MOITA, G. C.; Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

NOVAES, C. G. et al.; A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). **Microchemical Journal**, v. 128, p. 331-346, 2016.

OLIVEIRA, E.; Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 174-182, 2003.

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

OOMEN, A. G. et al.; Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. **Environmental science & technology**, v. 36, n. 15, p. 3326-3334, 2002.

OSMAN, K. A. et al.; Mineral contents and physicochemical properties of natural honey produced in Al-Qassim region, Saudi Arabia. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 5, n. 3/4, p. 142, 2007.

ÖZCAN, M. M.; JUHAIMI, F. Y. AL.; Determination of heavy metals in bee honey with connected and not connected metal wires using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP–AES). **Environmental monitoring and assessment**, v. 184, n. 4, p. 2373-2375, 2012.

PAUL, S. et al.; Minerals, Toxic Heavy Metals, and Antioxidant Properties of Honeys from Bangladesh. **Journal of Chemistry**, p. 1-11, 2017.

PEHLIVAN, T.; GÜL, A.; Determination of Heavy Metals Contents of Some Monofloral Honey Produced in Turkey. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, V. 5 (08), pp. 042-045, 2015.

PERNA, A. et al.; Metals in honeys from different areas of Southern Italy. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 92, n. 3, p. 253, 2014.

POHL, P. et al.; Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn and Zn from commercial bee honeys. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 392-396, 2012.

POHL, P.; Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 117-128, 2009.

PURCAREA, C. et al.; A Comparative Study of Metal Content in Selected Polish and Romanian Honey Samples. **REVISTA DE CHIMIE**, v. 68, n. 6, p. 1163-1169, 2017.

RASHED, M. N.; SOLTAN, M. E.; Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee honeys. **Journal of food composition and analysis**, v. 17, n. 6, p. 725-735, 2004.

REEVES, P. G.; CHANEY, R. L.; Bioavailability as an issue in risk assessment and management of food cadmium: A review. **Science of the Total Environment**, v. 398, n. 1, p. 13-19, 2008.

RIBANI, M. et al.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, nº 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, R. O. R. et al.; Seasonal variation in trace and minor elements in Brazilian honey by total reflection X-ray fluorescence. **Environmental monitoring and assessment**, v. 187, n. 3, p. 1, 2015.

ROMAN, A.; Concentration of chosen trace elements of toxic properties in bee pollen loads. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 18, n. 2, p. 265-272, 2009.

RUBY, M. V. et al. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. **Environmental Science & Technology**, v. 33, n. 21, p. 3697-3705, 1999.

SANTOS, D. C. M. B.; Estratégias para determinação espectrométrica de ozônio em águas e de elementos traço em leite de coco; **Tese de doutorado**; UFBA; 2012.

SCHNEIDER, N.S.H.; **Fundamentos da Potenciometria**. Santa Maria: Ed. Imprensa Universitária, UFSM, 2000.

SILVA, L. R. et al.; Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. **Microchemical Journal**, v. 93, n. 1, p. 73-77, 2009.

SKOOG, W.; HOLLER, C.; **Fundamentos de Química Analítica**, Tradução da 8ª Edição norte-americana, Editora Thomson, São Paulo-SP, 2006.

SOETAN, K. O.; OLAIYA, C. O.; OYEWOLE, O. E.; The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants-A review. **African Journal of Food Science**, v. 4, n. 5, p. 200-222, 2010.

SOUZA, T. F. et al.; Toxicidade do ácido bórico para abelha apis mellifera. **XX Congresso Brasileiro de Entomologia**, Gramado/RS, 2004.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos / NEPA – UNICAMP - 4ª edição revisada e ampliada. Campinas-SP: NEPA-UNICAMP, 2011, p. 61-62.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C.; Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338, 2006.

TERRAB, A.; HERNANZ, D.; HEREDIA, F. J.; Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of minerals in thyme honeys and their contribution to geographical discrimination. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3441-3445, 2004.

TUZEN, M. et al.; Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 325-330, 2007.

UNIVERSIDADE DE MINNESOTA. Identificação de abelhas nativas. Disponível em: <http://ncipmhort.cfans.umn.edu/id-native-bees-scroll-down-see-pictures-and-information-24-families-native-bees>. Acessado em: 5 de julho de 2017.

VANHANEN, L. P.; EMMERTZ, A.; SAVAGE, G. P.; Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 236-240, 2011.

YÜCEL, Y.; SULTANOĞLU, P.; Characterization of Hatay honeys according to their multi-element analysis using ICP-OES combined with chemometrics. **Food Chemistry**, v. 140, n. 1, p. 231-237, 2013.

YÜCEL, Y.; SULTANOĞLU, P.; Determination of industrial pollution effects on citrus honeys with chemometric approach. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 170-178, 2012.