

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Camila Maria Aguiar da Costa Alves

**DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Hg E Pb EM MEL EMPREGANDO  
COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS E ICP-MS**

Santa Maria, RS  
2020

**Camila Maria Aguiar da Costa Alves**

**DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Hg E Pb EM MEL EMPREGANDO COMBUSTÃO  
INICIADA POR MICRO-ONDAS E ICP-MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Orientador: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

Santa Maria, RS  
2020

Alves, Camila Maria Aguiar da  
Determinação de As, Cd, Hg e Pb em mel empregando  
combustão iniciada por micro-ondas e ICP-MS / Camila  
Maria Aguiar da Alves.- 2020.  
70 p.; 30 cm

Orientador: Érico Marlon de Moraes Flores  
Coorientador: Rodrigo Cordeiro Bolzan  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Química, RS, 2020

1. Contaminantes Inorgânicos 2. Mel 3. Preparo de  
Amostras 4. MIC 5. ICP-MS I. Marlon de Moraes Flores,  
Érico II. Cordeiro Bolzan, Rodrigo III. Título.

**Camila Maria Aguiar da Costa Alves**

**DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Hg E Pb EM MEL EMPREGANDO COMBUSTÃO  
INICIADA POR MICRO-ONDAS E ICP-MS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Química**.

Aprovado em 19 de MARÇO de 2020:

  
\_\_\_\_\_  
**Érico Marlon de Moraes Flores, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Jussiane Souza da Silva, Dra. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Paola de Azevedo Mello, Dra. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2020

## DECLARAÇÃO

A pesquisa descrita nesta dissertação foi totalmente elaborada por mim e as informações retidas na literatura estão devidamente referenciadas. Esta dissertação não foi apresentada anteriormente para a obtenção de qualquer outro grau.

*Camila m.a.c alves*

---

Camila Maria Aguiar da Costa Alves

## AGRADECIMENTOS

À **Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)**, ao **Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ)** e ao **Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA)**, pela oportunidade de execução deste trabalho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela bolsa de estudo concedida.

Ao Prof. Dr. **Érico Marlon de Moraes Flores**, pela orientação neste trabalho, pelo exemplo de dedicação profissional, pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal, pelo convívio, amizade e incentivo.

À Prof. Dra. **Paola de Azevedo Mello** e a Prof. Dra. **Jussiane Souza da Silva**, por participar como membro no exame de qualificação e da banca examinadora desta dissertação, pelas valiosas contribuições e sugestões que contribuíram que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Aos Profs. Drs, **Cezar Augusto Bizzi, Edson Irineu Muller, Fábio Andrei Duarte, José Neri Gottfried Paniz, Juliano Smanioto Barin, Rodrigo Cordeiro Bolzan e Valderi Luiz Dressler**, e a Prof, Dra. **Rochele Sogari Picoloto** pelas contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho, bem como a amizade e convívio.

Aos colegas e funcionários do **LAQIA/CEPETRO**, pelo convívio, amizade e colaboração. Em especial, à **Gabriel Toneto Druzian, Mariele Samuel do Nascimento e Vitoria H. Cauduro** pelo auxílio, disposição e contribuição direta durante a execução deste trabalho, e também, à **Renan B. Pardino, Paula Dalla Vecchia e Samuel R. Waechter** pela ajuda, amizade e convívio.

Ao funcionário da secretaria do PPGQ, **Ademir**, pelo auxílio durante a execução deste trabalho.

Em especial, agradeço à minha família, **Maria J. A. da Costa, Maria A. da Costa e Carolina A. C. Alves** pelo incentivo, compreensão, apoio incondicional durante esse período e toda a minha vida. Agradeço, também, ao **Brendon B. Lima** pelo companheirismo, apoio e força durante todos estes anos.

*O mundo inteiro está naquela estrada ali em frente (...) Sim, já é outra viagem e o meu coração selvagem tem essa pressa de viver.*

*(Belchior)*

## RESUMO

### DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Hg E Pb EM MEL EMPREGANDO COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS E ICP-MS

AUTORA: Camila Maria Aguiar da Costa Alves  
ORIENTADOR: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

Neste trabalho foi proposto um método de decomposição de mel por combustão iniciada por micro-ondas (MIC) visando à determinação de As, Cd, Hg e Pb por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Foram avaliados parâmetros como a massa de amostra (com ou sem a utilização de auxiliares de combustão), a composição e a concentração da solução absorvedora e programa de irradiação do forno de micro-ondas. Massas de até 0,8 g de mel (com a adição de 0,4 g de celulose microcristalina e 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{L}^{-1}$ ) puderam ser decompostas com o método desenvolvido, utilizando apenas 6 mL de  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  como solução absorvedora. Os digeridos apresentaram concentração de carbono dissolvido abaixo de 25 mg  $\text{L}^{-1}$ , possibilitando a determinação por ICP-MS livre de interferências causadas por compostos de carbono. A exatidão foi avaliada com base em ensaios de recuperação com adição de padrão e por comparação utilizando o método de decomposição por via úmida assistida por micro-ondas em câmara única de reação (MAWD-SRC). O método proposto possibilitou recuperações entre 99 e 104% para os analitos estudados e não apresentou diferença significativa em comparação com a MAWD-SRC. Os valores de LOD obtidos para as condições otimizadas foram 1,10, 1,70, 2,90 e 4,60 ng  $\text{g}^{-1}$  para As, Cd, Hg e Pb, respectivamente. Dessa forma, foi possível desenvolver um método adequado para a decomposição de mel e posterior determinação desses elementos de modo a atender a legislação vigente, utilizando reagentes diluídos. O método proposto foi, também, aplicado para amostras de mel de diferentes origens geográficas, as quais apresentaram concentrações variadas dos analitos.

**Palavras-chave:** Contaminantes inorgânicos. Mel. Preparo de amostras. MIC. ICP-MS.



## ABSTRACT

### As, Cd, Hg AND Pb DETERMINATION IN HONEY USING MICROWAVE-INDUCED COMBUSTION AND ICP-MS

AUTHOR: Camila Maria Aguiar da Costa Alves  
ADVISOR: Prof. Dr. Érico Marlon de Moraes Flores

In this work, a microwave-induced combustion (MIC) method was proposed for the decomposition of honey, aiming at As, Cd, Hg and Pb determination by ICP-MS. Parameters such as sample mass (with or without the use of combustion aids), composition and concentration of the absorbing solution and microwave oven irradiation program were evaluated. Mass of 0.8 g of honey (with 0.4 g of microcrystalline cellulose and 100  $\mu\text{L}$  of 6 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) was decomposed by MIC, using 6 mL of 1 mol  $\text{L}^{-1}$   $\text{HNO}_3$  as absorbing solution. The digests presented carbon concentration below 25 mg  $\text{L}^{-1}$ , allowing the determination by ICP-MS free of interference caused by carbon compounds. The accuracy of the proposed method was evaluated based on recovery tests using standard addition and by comparison using microwave-assisted wet digestion with single reaction chamber (MAWD-SRC). The proposed method allowed recoveries between 99 and 104% for the studied analytes and did not show any significant difference in comparison to the results obtained by MAWD-SRC. The LOD values obtained using the optimized conditions were 1.10, 1.70, 2.90 and 4.60 ng  $\text{g}^{-1}$  for As, Cd, Hg and Pb, respectively. In this way, it was possible to develop a suitable method for the decomposition of honey and subsequent determination of these elements in order to meet the current legislation, using diluted reagents. The proposed method was also applied to honey samples from different geographical origins, which presented varying concentrations of analytes.

**Keywords:** Inorganic contaminants. Honey. Sample preparation. MIC. ICP-MS.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Frasco e suporte utilizado para a decomposição de amostras por MIC (Adaptado de Anton Paar, 2019).....	33
Figura 2 – (A) Forno de micro-ondas Synthos 3000, Anton Paar (B) Rotor equipado com 4 frascos de quartzo, utilizados na MAWD e na MIC (capacidade de até 8 frascos).....	35
Figura 3 – Procedimento de confecção dos invólucros de PE (A) Mel foi adicionado sobre metade da massa de celulose microcristalina utilizada; (B) O restante da celulose foi adicionada sobre o mel; (C) 100 µL de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> foi pipetado sobre a mistura de mel e celulose; (D) O invólucro foi selado para ser posteriormente inserido no suporte de quartzo para a MIC .....	40
Figura 4 – Fluxograma dos procedimentos experimentais avaliados neste estudo. ....	44
Figura 5 – Aspecto do digerido/solução resultante da MIC de (A) 0,2 g e (B) 0,4 g de mel utilizando 6 mL de água como solução absorvedora e 20 bar de O <sub>2</sub> para a pressurização dos frascos .....	47
Figura 6 – Aspecto do digerido obtidos na MIC de 0,6 g de mel com 0,1 g de celulose, utilizando água como solução absorvedora. ....	48
Figura 7 – Aspecto dos digeridos em triplicata após a combustão de 1 g de mel, 0,4 g de celulose, 100 µL de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 6 mol L <sup>-1</sup> e orifícios no invólucro, utilizando o Programa A. ....	49
Figura 8 – Concentração de carbono em solução para diferentes condições de massa de mel, utilizando 6 mL de água como solução absorvedora.....	50
Figura 9 – Recuperação de (■) As, (■) Cd, (■) Hg e (■) Pb após procedimento de MIC usando água e HNO <sub>3</sub> 0,5; 1; 3; 5; 7; 14,4 mol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora. Invólucro de PE contendo 0,8 g de mel, 0,4 g de celulose e 100 µL de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , programa de irradiação A. ....	51
Figura 10 – Recuperação para (■) As, (■) Cd, (■) Hg e (■) Pb após aplicação dos programas de irradiação. Invólucro de PE contendo 0,8 g de mel, 0,4 g de celulose e 100 µL de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , HNO <sub>3</sub> 1 mol L <sup>-1</sup> como solução absorvedora.....	53

Figura 11 – Concordância entre a recuperação de As, Cd, Hg e Pb utilizando o método de referência e o método proposto (MIC): 0,8 g de mel + 0,4 g de celulose microcristalina + 100 µL de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, utilizando 6 mL de HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> com o programa de irradiação B. A linha representa os valores obtidos pelo método de referência (MAWD, n = 3).....54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química do mel (Adaptado de BANDINI e SPISSO, 2017).....	20
Tabela 2 – Métodos de decomposição de mel para posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb (período de 2013 a 2019). ....	27
Tabela 3 – Condições operacionais para a determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS, e de C e Y por ICP-OES.....	36
Tabela 4 – Programa de irradiação utilizado para a decomposição de mel por MIC.....	42
Tabela 5 – Avaliação do aspecto dos digeridos de MIC após adição de celulose microcristalina a diferentes massas de mel. Usou-se 6 mL de água ultrapura como solução absorvedora e programa de irradiação A. Os frascos foram pressurizadas com 20 bar de O <sub>2</sub> em todas as condições.....	48
Tabela 6 – Resumo dos parâmetros dos métodos de decomposição de mel avaliados neste trabalho. ....	55
Tabela 7 – Limites de detecção para a determinação de As, Cd, Hg e Pb em mel em trabalhos da literatura (período de 2013 a 2020). Os valores estão expressos em ng g <sup>-1</sup> . ....	58
Tabela 8 – Determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS em amostras de mel de diferentes origens geográficas após decomposição usando o método proposto. (valores em ng g <sup>-1</sup> , média ± desvio padrão, n = 3).....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>DLLME</b>	Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês, <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>
<b>F AAS</b>	Espectrometria de absorção atômica com chama, do inglês, <i>flame atomic absorption spectroscopy</i>
<b>FI-CVG-ICP-MS</b>	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com geração de vapor a frio e injeção em fluxo, do inglês, <i>flow injection cold vapor generation coupled inductively coupled plasma mass Spectrometry</i>
<b>GF-AAS</b>	Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite, do inglês, <i>graphite furnace atomic absorption spectrometry</i>
<b>ICP-MS</b>	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
<b>ICP-OES</b>	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, do inglês, <i>inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i>
<b>LOD</b>	Limite de detecção, do inglês, <i>limit of detection</i>
<b>LOQ</b>	Limite de quantificação, do inglês, <i>limit of quantification</i>
<b>MAWD</b>	Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas, do inglês, <i>microwave-assisted wet digestion</i>
<b>MAWD-SRC</b>	Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas em câmara única de reação, do inglês, <i>microwave-assisted wet digestion with single reaction chambre</i>
<b>MIC</b>	Combustão iniciada por micro-ondas, do inglês, <i>microwave-induced combustion</i>
<b>PE</b>	Polietileno, do inglês, <i>polyethylene</i>
<b>PTFE</b>	Politetrafluoretileno, do inglês, <i>polytetrafluoroethylene</i>
<b>SPE</b>	Extração em fase sólida, do inglês, <i>solid phase extraction</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1	COMPOSIÇÃO QUÍMICA E APLICAÇÕES DO MEL.....	19
2.2	FONTES DE CONTAMINAÇÃO: As, Cd, Hg E Pb.....	21
2.3	LEGISLAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DO MEL .....	23
2.4	PRINCIPAIS TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO ELEMENTAR EM MEL.....	24
<b>2.4.1</b>	<b>Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado</b> .....	24
2.5	MÉTODOS UTILIZADOS PARA A DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE MEL .....	26
<b>2.5.1</b>	<b>Decomposição por via úmida</b> .....	29
2.5.1.1	<i>Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas</i> .....	29
<b>2.5.2</b>	<b>Métodos de extração</b> .....	31
<b>2.5.3</b>	<b>Combustão</b> .....	31
2.5.3.1	<i>Combustão iniciada por micro-ondas</i> .....	32
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
3.1	INSTRUMENTAÇÃO.....	35
3.2	REAGENTES .....	37
3.3	AMOSTRAS .....	38
3.4	PROCEDIMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO .....	39
3.5	COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS .....	39
<b>3.5.1</b>	<b>Avaliação da massa de amostra</b> .....	41
3.5.1.1	<i>Auxiliares de combustão: celulose microcristalina e solução de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></i> .....	41
<b>3.5.2</b>	<b>Avaliação da solução absorvedora</b> .....	42
<b>3.5.3</b>	<b>Avaliação do programa de irradiação</b> .....	42
3.6	DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS.....	42
3.7	CÁLCULO DO LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO .....	43
3.8	RESUMO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	43
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
4.1	MAWD PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Hg E Pb POR ICP-MS .....	46
4.2	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA MIC PARA A DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Hg E Pb POR ICP-MS .....	46
<b>4.2.1</b>	<b>Avaliação da massa de amostra</b> .....	46

4.2.1.1	<i>Uso de auxiliares de combustão: celulose microcristalina e solução de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></i> .....	47
4.2.2	<b>Avaliação da solução absorvedora</b> .....	51
4.2.3	<b>Avaliação do programa de irradiação</b> .....	52
4.3	<b>AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO DA MIC</b> .....	53
4.3.1	<b>Figuras de mérito</b> .....	54
4.4	<b>APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA MEL DE DIFERENTES ORIGENS GEOGRÁFICAS</b> .....	59
5	<b>CONCLUSÃO</b> .....	62
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	63

## 1 INTRODUÇÃO

O mel é uma substância viscosa, formada a partir de néctar de flores, nectários extraflorais ou exsudatos de sacarina vegetal. Cerca de 80% deste insumo é constituído por açúcares (na forma de glicose, frutose, sacarose e maltose), 17% por água e o restante por enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas e minerais. O mel é considerado um alimento energético de alta qualidade com propriedades medicinais, sendo geralmente usado como adoçante natural (CAMARGO, 2006; MIZRAHI e LENSKY, 1996).

Apesar dos inúmeros benefícios oferecidos por este produto natural, alguns contaminantes podem ser encontrados no mel, provenientes do meio ambiente ou fontes antropogênicas, os quais podem ocasionar problemas de saúde. Existem diversos trabalhos na literatura voltados à determinação de impurezas no mel, como os pesticidas e antibióticos (ORSO *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2018; TETTE *et al.*, 2015), que são contaminantes orgânicos, bem como trabalhos que visam a determinação de contaminantes inorgânicos (POHL *et al.*, 2017) que possuem elevada toxicidade, mesmo em baixas concentrações (RU *et al.*, 2013).

Dentre as impurezas elementares estudadas, arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio destacam-se por sua elevada toxicidade e meia-vida biológica elevada (BARBIER *et al.*, 2015; POHL *et al.*, 2017). A incidência desses elementos no mel pode advir de fontes de poluição industrial, procedimentos incorretos durante o processamento e conservação do produto, ou pela utilização de agrotóxicos contendo cádmio, espécies orgânicas de mercúrio ou arsênio (ANDRADE *et al.*, 2014; RU *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2010).

Devido aos malefícios que estes contaminantes podem causar à saúde humana, o monitoramento da presença de As, Cd, Hg e Pb no mel faz-se necessário. A Comissão Europeia (CE) estabeleceu em 1999 os limites máximos de 1, 0,5, 0,15 e 5 ppm para As, Cd, Hg e Pb, respectivamente, em alimentos em geral (CE, 1999). Já no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa Nº 11 de 2014, estabeleceu o limite máximo de 500 ng g<sup>-1</sup> para As, Cd e Pb em mel. Apesar desse limite não ser estabelecido para Hg em mel, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu o limite



máximo de 0,01 ppm de Hg como contaminante alimentar, no Decreto N° 55871 (BRASIL, 1965).

As técnicas mais utilizadas para a determinação de impurezas elementares em mel são a espectrometria de absorção atômica com chama (F-AAS) (ROSA *et al.*, 2015), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS) (MONIRUZZAMAN *et al.*, 2014), espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (ZHOU *et al.*, 2013) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (QUINTO *et al.*, 2016; STECKA *et al.*, 2014). Devido às baixas concentrações de impurezas elementares em mel, geralmente é preferível o emprego de técnicas mais sensíveis como a ICP-MS para a determinação de As, Cd e Pb e a ICP-MS acoplada com geração de vapor a frio e injeção em fluxo (FI-CVG-ICP-MS) para determinação de Hg (KRUG, 2016).

Vale salientar, entretanto, que apesar de existirem técnicas em que é possível realizar a análise direta (como a análise por ativação neutrônica instrumental (INAA) (MESSAOUDI E BEGAA, 2018), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e amostragem direta por sólidos (DSS-GF AAS) (OLIVEIRA *et al.*, 2014), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com vaporização eletrotérmica por amostragem sólida (SS-ETV-ICP-MS) (WOHLMANN *et al.*, 2018), entre outras), grande parte da instrumentação, em sua montagem convencional, envolve a introdução da amostra na forma de solução/suspensão (KRUG, 2016). Desta forma, métodos de preparo de amostra são necessários para se obter uma solução compatível com a técnica de determinação (KRUG, 2016).

O método de preparo mais utilizado para a decomposição de mel é a decomposição por via úmida assistida por micro-ondas (MAWD) (QUINTO *et al.*, 2016; STECKA *et al.*, 2014). A MAWD apresenta boa eficiência de digestão com baixos valores de carbono residual, porém esse método faz uso de ácidos concentrados, resultando em uma elevada acidez residual, além do elevado consumo de reagentes (em média 10 mL) aumentar a geração de resíduos (KRUG, 2016; ROSA *et al.*, 2015).

Além disso, a massa de amostra relativamente limitada, geralmente em torno de 0,5 g (BILANDŽIĆ *et al.*, 2014; BILANDŽIĆ *et al.*, 2017; ROSA *et al.*, 2015; SPIRIC *et al.*, 2019a; SPIRIC *et al.*, 2019b) quando comparada a combustão iniciada por micro-ondas (MIC), pode resultar em limites de detecção (LODs) relativamente mais altos (KRUG, 2016). Outra desvantagem, referente ao uso da MAWD no preparo de mel, é o elevado tempo de preparo da amostra quando comparada a MIC (COSTA *et al.*, 2015).

A MIC, já mencionada anteriormente, é outro método já utilizado para a decomposição de mel, que possui vantagens como a decomposição total da matriz com tempo de preparo menor, possibilidade de uso de ácidos diluídos como solução absorvedora e uso de massa de amostra relativamente elevada. A possibilidade de um método de preparo de amostras que permita a determinação de As, Cd, Hg e Pb em baixas concentrações, com baixos LODs e com baixos teores de carbono em solução, pode ser uma alternativa para viabilizar este tipo de análise em amostras complexas, como o mel (COSTA *et al.*, 2015).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo propor um método de decomposição de mel por MIC para posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS. Parâmetros como a massa de amostra (com ou sem a utilização de auxiliares de combustão), composição e concentração da solução absorvedora e programa de irradiação do forno de micro-ondas foram avaliados. Cabe destacar que o emprego de ácido diluído foi priorizado, com o intuito de reduzir o volume de reagentes, sem que prejudique a eficiência de decomposição das amostras estudadas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

*Nesta seção, serão apresentados os aspectos gerais do mel, bem como a importância da determinação de arsênio, cádmio, chumbo e mercúrio nesta matriz. Além disso, serão discutidas as principais técnicas de determinação empregadas na determinação destes metais e os métodos de preparo de amostras utilizados para este tipo de análise.*

## 2.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E APLICAÇÕES DO MEL

O mel é uma substância viscosa composta majoritariamente por açúcares e água. Esse produto natural é produzido principalmente pelas abelhas, a partir do néctar de flores e, em outros casos, por alguns insetos sugadores de seiva ou de exsudatos extraflorais (CAMARGO, 2006; MIZRAHI e LENSKY, 1996).

Uma das aplicações mais antigas deste insumo é como produto medicinal, devido às suas propriedades antibacterianas, antimicrobianas e antioxidantes (BANDINI e SPISSO, 2017; MIZRAHI e LENSKY, 1996). Além disso, o mel é utilizado na indústria alimentícia (sendo consumido *in natura* ou utilizado como ingrediente na produção de outros alimentos, como produtos de panificação, confeitaria, cereais matinais, geleias, produtos lácteos, bebidas, entre outros), bem como na indústria cosmética (BANDINI E SPISSO, 2017; CAMARGO, 2006).

Apesar do mel ser caracterizado principalmente por parâmetros físico-químicos como a cor, teor de umidade e teor de açúcares, por exemplo (BRASIL, 2000) esse produto natural possui elevada complexidade e pode conter mais de 100 substâncias (CAMARGO, 2006). Essa composição pode variar de acordo com a origem biológica do mel, composição de fontes florais que são forrageadas pelas abelhas, incluindo néctar e pólen (POHL *et al.*, 2017). Os principais componentes do mel estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química do mel (Adaptado de BANDINI e SPISSO, 2017).

<b>Composição</b>	<b>Concentração média (%)</b>
<b>Açúcares</b>	
Monossacarídeos (glicose e frutose)	68
Dissacarídeos (sacarose e maltose)	10
<b>Água</b>	17
<b>Enzimas</b>	
Invertase, diastase, catalase, $\alpha$ -glicosidase, peroxidase, lipase, amilase, fosfatase ácida e inulase.	Não informado
<b>Proteínas</b>	
Aminoácidos como leucina, isoleucina, histidina, metionina, alanina, fenilalanina, glicina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, valina, cisteína, tirosina, lisina e arginina.	Não informado
<b>Ácidos Orgânicos</b>	
Glucônico, acético, butírico, láctico, oxálico, fórmico, málico, succínico, pirúvico, glicólico, cítrico, butíricolático, tartárico, maléico, piroglutâmico, $\alpha$ -cetoglutárico, 2- ou 3-fosfoglicérico, $\alpha$ - ou $\beta$ -glicerofosfato e vínico.	0,5
<b>Minerais</b>	
Cálcio, cloro, cobre, ferro, manganês, magnésio, fósforo, boro, potássio, silício, sódio, enxofre, zinco, nitrogênio, iodo, chumbo, entre outros.	0,02 a 1
<b>Vitaminas</b>	
E1 (tiamina), complexo E2 (riboflavina, niacina), E6 (piridoxina), ácido pantotênico, C (ácido ascórbico) e D.	0,01
<b>Outros</b>	Não informado

Como pode ser observado na Tabela 1, apesar de majoritariamente composto por sacarídeos, o mel contém elevada quantidade de substâncias, cuja concentração varia de acordo com a sua origem. No entanto, fatores ambientais, pedológicos e antropológicos (como atividades industriais, emissões veiculares, uso de agrotóxicos, por exemplo) também podem interferir na composição e qualidade desse produto (YÜCEL *et al.*, 2012), tornando o mel exposto a impurezas elementares como As, Cd, Hg e Pb (ANDRADE *et al.*, 2014; POHL *et al.*, 2017).

## 2.2 FONTES DE CONTAMINAÇÃO: As, Cd, Hg e Pb

Apesar da complexidade nutricional e dos benefícios que o mel oferece, contaminantes como As, Cd, Hg e Pb podem ser encontrados nas matérias-primas dos produtos apícolas, sendo transportados através do ar, água, plantas e solo para a colmeia pelas abelhas (SILICI *et al.*, 2013). Esse transporte ocorre de modo que, dependendo do histórico de atividades vulcânicas e hidrotérmicas locais, das condições regionais, das mudanças climáticas ocorridas e da contaminação antropogênica na área forrageira das abelhas, as impurezas presentes no solo são transportadas para as plantas, passando para o néctar e, conseqüentemente, para o mel produzido (POHL *et al.*, 2017; STANKOSVSKA *et al.*, 2008).

O solo e, conseqüentemente, a vegetação local, são passíveis de contaminação por substâncias utilizadas na proteção dos enxames de abelhas (como acaricidas, antimicrobianos, repelentes, inseticidas, entre outros) (BANDINI e SPISSO, 2017), o que pode acarretar na exposição a contaminantes como As, Cd, Hg e Pb. O uso de agrotóxicos à base de As e Hg, são relatados desde o século XIV, para controle de insetos. Um exemplo é o “verde de Paris” que é um sal de cobre contendo o íon arsenito ( $\text{AsO}_3^{3-}$ ), inseticida teve uso popular introduzido nos EUA, em 1967 (JARDIM *et al.*, 2009). Outros sais contendo esse íon ou o íon arsenato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ), como o arsenato de chumbo, também foram utilizados para este fim (JARDIM *et al.*, 2009). Quanto ao Hg, ele também pode ser utilizado como fungicida e se apresenta na forma de acetato de fenilmercúrio (FOURNIERE *et al.*, 2007).

Além do solo e da vegetação, o ar também pode se tornar um veículo de impurezas elementares (POHL *et al.*, 2017). As emissões industriais e automotivas, também demonstraram potencial para afetar a qualidade do mel produzido próximo a áreas urbanas (POHL *et al.*, 2017). Esse tipo de contaminação é uma das principais vias de contaminação por Hg em mel, tendo em vista que descargas industriais e urbanas, atividade de mineração e combustão são fontes pontuais desse analito nesse insumo (RU *et al.*, 2013).

Atualmente, com o avanço da tecnologia e a utilização de materiais diversos no processo de fabricação do mel, esse produto tornou-se ainda mais exposto aos contaminantes inorgânicos (POHL *et al.*, 2017). Por exemplo, os equipamentos e materiais como aço inoxidável, aço galvanizado e alumínio, utilizados pelos apicultores durante os processos de colheita, produção e preparo do mel, são uma

das principais fontes de contaminação do mel por Cd e Pb (POHL *et al.*, 2017). Esses contaminantes podem entrar em contato com o mel durante os processos de extração, centrifugação e amadurecimento, e pelo contato com recipientes utilizados na sedimentação, armazenamento e transporte do mel (POHL *et al.*, 2017). Além disso, a acidez natural do mel (pH entre 3,5 e 4,8) pode causar a lixiviação desses analitos presentes nos materiais utilizados nesse processo (MELI *et al.*, 2015). Outra fonte de contaminação por Cd e Pb é através da introdução de substâncias utilizadas para o tratamento farmacológico das abelhas e conservantes derivados de processamentos industriais (RASHED e SOLTAN, 2004).

Cabe salientar que a contaminação antropogênica pode causar um processo de bioacumulação no mel. A presença de contaminantes pode ser um indicador biológico de contaminação ambiental, fornecendo sobre o ambiente das abelhas (OLIVEIRA *et al.*, 2017; POHL *et al.*, 2017). Em suma, a presença de contaminantes inorgânicos no mel, além de indicar um risco potencial à saúde, pode ser utilizada para diferenciar tanto sua origem botânica, quanto geográfica, podendo também ser utilizada para o monitoramento da poluição ambiental (ANDRADE *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

O consumo de mel contendo impurezas elementares como As, Cd, Hg e Pb pode causar efeitos adversos à saúde, devido à toxicidade destes elementos (BANDINI e SPISSO, 2017). O As e Hg podem ligar-se a grupos sulfidrilas, causando alterações secundárias do DNA, do RNA e das modificações estruturais nas proteínas ribossômicas (BJØRKLUND *et al.*, 2017; SODHI *et al.*, 2019). Já o Cd e Pb, podem gerar alteração intracelular do nível de Ca (por substituição, causando alterações na expressão gênica, além de inibir o reparo do DNA, contribuindo para a transformação maligna celular (CAO *et al.*, 2007; ĐUKIĆ-ĆOSIĆ *et al.*, 2020; JAISHANKAR *et al.*, 2014).

Como consequência, estas alterações podem levar a problemas de saúde, como disfunções imunológicas (BOSKABADY *et al.*, 2018), o que torna o corpo mais propenso a infecções (SATTAR *et al.*, 2016), bem como insuficiência renal (BARBIER *et al.*, 2015; BOSKABADY *et al.*, 2018), distúrbios ósseos e neurológicos (MAHBUB *et al.*, 2017), problemas no sistema reprodutor masculino, câncer, entre outros (ZHANG *et al.*, 2019).

### 2.3 LEGISLAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DO MEL

Devido aos malefícios que As, Cd, Hg e Pb podem causar à saúde humana, foram estabelecidas algumas normativas que regulam as concentrações máximas em que esses contaminantes podem estar presentes em diversos alimentos. Na Europa, o padrão internacional CODEX estabeleceu através da normativa 12-1981 alterado em 2019, que o mel deveria estar em conformidade com os níveis máximos para metais pesados estabelecidos pela Comissão Europeia (CE) de alimentos em geral (CODEX, 2019). Em 1999, o Regulamento da CE estabeleceu os limites máximos de 1, 0,5, 0,15 e 5 ppm para As, Cd, Hg e Pb, respectivamente, em alimentos (CE, 1999). Já em dezembro de 2006 estabeleceu-se os limites máximos de 500 ng g<sup>-1</sup> para Cd e Pb e 1000 ng g<sup>-1</sup> para Hg, em alimentos (CE, 2006).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), agência reguladora vinculada ao Ministério da Saúde, estabeleceu o Decreto Nº 55871, de 26 de março de 1965, referente à normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos. Neste decreto, limites máximos de tolerância (LMT) de 1 ppm de As e Cd, 0,8 ppm de Pb e 0,01 ppm de Hg são estabelecidos para contaminantes em produtos alimentícios (BRASIL, 1965).

Quanto ao controle de qualidade do mel, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel (2000), trata das definições, parâmetros de rotulagem e especificações físico-químicas (como análise de cor, umidade, acidez livre, teor de hidroximetilfurfural, cinzas, entre outros) (BRASIL, 2000). Em 2014, foi publicada uma Instrução Normativa relativa ao Subprograma de Monitoramento do Plano Nacional de Controles de Resíduos e Contaminantes (PNCRC), em que são estabelecidos os limites máximos permitidos para diversas classes de compostos presentes no mel, como os antimicrobianos, compostos orgânicos halogenados, organoclorados e fosforados, entre outros. Para contaminantes inorgânicos como As, Cd e Pb, foi estabelecido o limite máximo de 500 ng g<sup>-1</sup> (BRASIL, 2014). Apesar de não haver legislação específica para a concentração de Hg em mel, o controle desse elemento também se faz necessário, mesmo em níveis de ng g<sup>-1</sup> (POHL *et al.*, 2017).



## 2.4 PRINCIPAIS TÉCNICAS DE DETERMINAÇÃO ELEMENTAR EM MEL

A instrumentação a ser utilizada na determinação elementar depende de fatores como a faixa de concentração esperada para os analitos, quantidade de analitos a serem determinados, quantidade de amostra disponível e número de amostras a serem quantificadas. Além disso, fatores como a sensibilidade da técnica, faixa linear, seletividade, entre outros, devem ser avaliados (BEAUCHEMIN, 2000).

As técnicas mais utilizadas para este tipo de determinação elementar em mel são a espectrometria de absorção atômica com chama (F-AAS) (ROSA *et al.*, 2015), a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF-AAS) (MONIRUZZAMAN *et al.*, 2014), a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) (YÜCEL *et al.*, 2012), e a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (BILANDZIC *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2017). Entretanto, para elementos presentes na faixa de concentração de partes por trilhão, a ICP-MS tem sido a técnica de escolha para a análise de mel (CZIPA, *et al.*, 2015; QUINTO *et al.*, 2016; STECKA *et al.*, 2014).

### 2.4.1 Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado

O plasma indutivamente acoplado (ICP) é uma das principais fontes de ionização na espectrometria de massa para análise elementar (NELMS, 2005; TAYLOR, 2000). Essa técnica, apesar de seu custo relativamente elevado de aquisição e operação, possui vantagens como a alta sensibilidade, ampla faixa linear ( $0,001 \mu\text{g g}^{-1} - 100.000,00 \mu\text{g g}^{-1}$ ), baixos limites de detecção e quantificação, além de permitir a determinação simultânea de vários elementos (BEAUCHEMIN, 2000).

Apesar de ser uma técnica de grande sensibilidade, a ICP-MS é mais suscetível a interferências não espectrais (como efeitos físicos, deposição sob os cones de amostragem, entre outros) e espectrais (TAYLOR, 2000). Os efeitos de transporte relacionados ao uso de ácido nítrico em concentração diferente da curva são uns dos mais pronunciados na determinação por ICP-MS. Isso pode ser relacionado às alterações na extensão da evaporação do aerossol na câmara de nebulização, afetando a taxa de transporte do analito (STEWART e OLESIK, 1998). Além de efeitos físicos, interferências espectrais, também podem ser observadas. Esse tipo de interferência pode ser ocasionado pela formação de íons de óxidos de carga dupla,

interferências isobáricas e da formação de íons poliatômicos, causando um sinal maior ou menor na razão  $m/z$  dos analitos estudados (NELMS, 2005).

Essas interferências podem ser observadas na determinação de As. A presença de carbono no plasma pode causar um aumento de sinal por transferência de carga de espécies  $C^+$  para átomos de difícil ionização, como o As (9,82 eV) (PETTINE *et al.*, 2007). Além do carbono, dependendo da concentração de Cl em solução, o As também pode sofrer interferências espectrais poliatômicas, pela formação de  $ArCl^+$  (ALI e JAIN, 2004).

A técnica de ICP-MS, em sua montagem convencional, é amplamente utilizada na determinação de As, Cd e Pb na faixa de ppt em uma ampla variedade de matrizes. Entretanto, algumas dificuldades são encontradas para a determinação de Hg total. Esse elemento possui um elevado primeiro potencial de ionização (10,44 eV) e sua ionização pode ser suprimida por elementos com baixo potencial de ionização, quando presentes em altas concentrações (JIAN *et al.*, 2000). Este comportamento também pode ser observado para As (PETTINE *et al.*, 2007). Outro problema relacionado à determinação de Hg é o efeito de memória, causado pela adsorção de Hg no sistema de introdução de amostras tradicional (HARRINGTON *et al.*, 2004; KENDUZLER *et al.*, 2012). As consequências dos efeitos de nebulização incluem calibrações não lineares, necessidade de longos tempos de lavagem, sensibilidade decrescente com o tempo e sinais dependentes da matriz (HARRINGTON *et al.*, 2004; KENDUZLER *et al.*, 2012).

Uma forma de contornar essa problemática, é através da determinação de Hg total por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com geração de vapor a frio e injeção em fluxo (FI-CVG-ICP-MS). Esta técnica emprega um agente redutor, geralmente  $NaBH_4$ , que possibilita a redução de todas as formas de Hg a  $Hg^0$ . Esse sistema possui diversas vantagens, como a capacidade de minimizar os efeitos de memória, além de obter menores LODs quando comparado ao sistema convencional (GAO *et al.*, 2013). Apesar das limitações que a técnica oferece quanto à quantificação de Hg utilizando a montagem convencional, a quantificação de As, Cd e Pb já é bem estabelecida, sendo a ICP-MS uma das técnicas mais sensíveis para sua determinação em nível traço.

Vale ressaltar que a ICP-MS tradicional requer que a amostra esteja em forma líquida para que possa ser feita a determinação (KRUG, 2016). Com exceção das técnicas que permitem o uso da análise direta (como a análise por ativação neutrônica

instrumental (INAA) (MESSAOUDI E BEGAA, 2018), espectrometria de absorção atômica com forno de grafite e amostragem direta por sólidos (DSS-GF AAS) (OLIVEIRA *et al.*, 2014), espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado com vaporização eletrotérmica por amostragem sólida (SS-ETV-ICP-MS) (WOHLMANN *et al.*, 2018), entre outras), é necessária uma etapa prévia de preparo de amostras que permita esta conversão física da matriz (KRUG, 2016).

## 2.5 MÉTODOS UTILIZADOS PARA A DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE MEL

Cerca de 80% do tempo de análise é gasto na coleta e no preparo de amostras, sendo essa etapa uma parte crítica do processo analítico (KRUG, 2016; PLOTKA-WASYLKA *et al.*, 2015). Com isso, a escolha do método de preparo deve ser baseada em critérios como a eficiência de separação dos analitos da matriz, simplicidade e rapidez, bem como o baixo consumo de reagentes. Além disso, a solução resultante deve ser compatível com a técnica de determinação e a perda dos analitos por volatilização deve ser evitada (FLORES, 2014).

Trabalhos da literatura indicam que os métodos de preparo de amostras mais utilizados para a posterior determinação de impurezas em mel são decomposições por via úmida, como a decomposição por via úmida assistida por micro-ondas (MAWD) (OLIVEIRA *et al.*, 2017; POHL *et al.*, 2017) e métodos de extração, como a SPE e DLLME (ROSA *et al.*, 2015; SPIRIC *et al.*, 2019a; STECKA *et al.*, 2014). Dentre eles, a MAWD foi o método mais utilizado para a decomposição do mel para a posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb (POHL *et al.*, 2017).

Apesar de não haver trabalhos que utilizem a MIC para a posterior determinação desses analitos em mel, esse método pode se mostrar viável para este tipo de decomposição, tendo em vista que matrizes orgânicas complexas, como o mel, que são compostas majoritariamente por açúcares, são difíceis de serem digeridas por métodos convencionais de digestão ácida (PICOLOTO *et al.*, 2018) e a MIC já ter sido utilizada para a decomposição de mel visando a determinação de halogênios (COSTA *et al.*, 2015). A Tabela 2 apresenta os principais métodos de decomposição de mel para a posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb.

Tabela 2 – Métodos de decomposição de mel para posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb (período de 2013 a 2019).

Analitos	Preparo de amostra	Técnica de determinação	Referência
Cd e Pb	SPE: massa: 10 g (dissolvidos em água e acidificado com HNO <sub>3</sub> com volume final de 100 mL) Reagentes: 10 mL de HCl 3 mol L <sup>-1</sup> em Dowex 50Wx8-400 Programa de irradiação: -	FAAS	STECKA, H. <i>et al.</i> (2014)
Cd e Pb	<u>DLLME</u> : massa: 0,5 g Reagentes: 300 µL de acetonitrila (Cd), 900 µL de acetona (Pb) e 140 µL de tetracloreto de carbono Programa de irradiação: -	FAAS	ROSA, F. C. <i>et al.</i> (2015)
Cd e Pb	<u>MAWD</u> : massa: 1 g Reagentes: 6 mL de HNO <sub>3</sub> 14,4 mol L <sup>-1</sup> Programa de irradiação: 250 W por 2 min; 0 W por 2 min; 250W por 6 min; 400 W por 5 min; 550 W por 8 min e 0 W por 8 min.	GF-AAS	SILICI, S. <i>et al.</i> (2013)
As, Cd e Pb	<u>MAWD</u> : massa: 0,5 g Reagentes: 4 mL de HNO <sub>3</sub> 68% e 2 mL de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% Programa de irradiação: 500 W por 1 min e permanência de 4 min; 1000 W com rampa de 5 min e permanência de 5 min e 1400 W com rampa de 5 min e permanência de 10 min; 1000 W por 20 min e 1200 W por 30 min.	GF-AAS	BILANDŽIĆ, N. <i>et al.</i> (2014)
Cd e Pb	<u>MAWD</u> : massa: 0,5 g Reagentes: 6 mL de HNO <sub>3</sub> 14,4 mol L <sup>-1</sup> Programa de irradiação: 200 W com rampa de 10 min e permanência de 5 min; 0 W por 2 min; 1000 W com rampa de 20 min e permanência de 5 min e 0 W por 20 min.	ICP-MS	ROSA, F. C. <i>et al.</i> (2015)

Tabela 2 – Métodos de decomposição de mel para posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb (período de 2013 a 2019).

Analitos	Preparo de amostra	Técnica de determinação	Referência
As, Cd, Hg e Pb	<p><u>MAWD</u>: massa: 1 g            Reagentes: 6 mL de HNO<sub>3</sub> 68% e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%            Programa de irradiação: Potência não informada            120 °C por 15 min com 10 min de permanência; 190 °C por 15 min e 20 min de permanência e 30 min de resfriamento.</p>	ICP-MS	QUINTO, M. <i>et al.</i> (2016)
As, Cd e Pb	<p><u>MAWD</u>: massa: 0,5 g            Reagentes: 3 mL de H<sub>2</sub>O e 2,5 mL de HNO<sub>3</sub> (65%)            Programa de irradiação: 500 W por 2,5 min; 1000 W por 20 min e 1200 W por 30 min.</p>	ICP-MS	BILANDŽIĆ, N. <i>et al.</i> (2017)
As, Cd e Pb	<p><u>MAWD</u>: massa: 0,7 g            Reagentes: 5 mL de HNO<sub>3</sub> (65%)            Programa de irradiação: 700 W por 3,5 min; 1000 W por 15 min e 800 W por 15 min.</p>	ICP-MS	LOVAKOVIC, B. T. <i>et al.</i> (2018)
As, Cd, Hg e Pb	<p><u>MAWD</u>: massa: 0,5 g            Reagentes: 5 mL de HNO<sub>3</sub> 14,4 mol L<sup>-1</sup> e 1,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%            Programa de irradiação: Potencia não informada            180 °C por 15 min com 10 min de permanência e 20 min de resfriamento.</p>	ICP-MS	SPIRIC, D. <i>et al.</i> (2019a)
As, Cd e Pb	<p><u>MAWD</u>: massa: 0,5 g            Reagentes: 5 mL de HNO<sub>3</sub> 14,4 mol L<sup>-1</sup> e 1,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%            Programa de irradiação: Potencia não informada            180 °C por 15 min com 10 min de permanência e 20 min de resfriamento.</p>	ICP-MS	SPIRIC, D. <i>et al.</i> (2019b)

### 2.5.1 Decomposição por via úmida

A decomposição de matrizes por via úmida, em geral, consiste no aquecimento da amostra na presença de ácidos minerais oxidantes concentrados (como o nítrico e sulfúrico), da mistura dos ácidos ou da combinação, juntamente com peróxido de hidrogênio. Com a oxidação da matéria orgânica, os analitos a serem determinados ficam na forma de solução levemente ácida, tornando a amostra compatível a diversas técnicas analíticas (KRUG, 2016).

Esse método pode ser realizado em sistemas abertos ou fechados e, de modo geral, se mostram viáveis para a determinação de elementos em baixas concentrações. A principal vantagem da decomposição por via úmida, quando comparada aos métodos por via seca, são as menores temperaturas empregadas, o que reduz o risco de perdas por volatilização (FLORES, 2014; KRUG, 2016). Entretanto, alguns analitos, como As e Hg, não podem ser determinados por decomposição por via úmida em sistemas abertos, pois há perdas totais ou parciais por volatilização (FLORES *et al.*, 2007; FLORES, 2014). Outra desvantagem, é que a temperatura atingida é limitada pela pressão ambiente. Isso restringe a temperatura de decomposição à fervura da temperatura do ácido utilizado, impondo um limite para o tempo necessário para a decomposição da matriz (FLORES, 2014; KRUG, 2016).

A decomposição por via úmida em sistemas fechados torna-se uma alternativa para superar essas desvantagens. Com isso, tornou-se possível obter decomposições em tempos menores e com temperaturas acima da temperatura de ebulição do ácido utilizado e perdas por volatilização são evitadas. Além disso, o uso do sistema fechado apresenta outras vantagens como a diminuição dos riscos de contaminação, a oxidação de amostras orgânicas pode ser realizada com ácido nítrico puro e a decomposição de amostras inorgânicas é significativamente melhorada (FLORES, 2014).

#### 2.5.1.1 Decomposição por via úmida assistida por micro-ondas

A MAWD é o método de preparo mais utilizado na literatura para a posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb em mel. O uso da radiação micro-ondas para o aquecimento das amostras está sendo uma alternativa ao uso de aquecimento convencional, tendo em vista que as micro-ondas aquecem a solução de forma mais

homogênea e rápida, diminuindo o tempo de decomposição da amostra (FLORES, 2014; KRUG, 2016).

Além disso, outras vantagens podem ser citadas acerca da utilização da radiação micro-ondas como fonte de aquecimento: O aquecimento por ser seletivo (os frascos utilizados nas decomposições devem ser transparentes às micro-ondas), possui baixas perdas de calor para o meio; os equipamentos disponíveis comercialmente é relativamente compacto; a maioria dos fornos de micro-ondas permitem o controle preciso do processo, permitindo o monitoramento de parâmetros como a temperatura e pressão durante a decomposição (FLORES, 2014).

Um trabalho de Oliveira *et al.* (2017) utilizou a MAWD para a decomposição de mel e posterior determinação de As, Cd e Pb. Foi pesado 1,0 g de mel em um frasco de digestão de PTFE e adicionados 7 mL de HNO<sub>3</sub> (65%) e 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) para a decomposição da amostra. O método utilizado levou a baixos LODs em solução, para a quantificação de elementos traços em mel com concentrações de 0,540; 0,033 e 3,10 µg L<sup>-1</sup> para As, Cd e Pb, respectivamente.

Outro estudo apresenta a MAWD como método de preparo de 72 amostras de mel, para a posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb. Cerca de 1 g foi digerido com 6 mL de HNO<sub>3</sub> (65%) e 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Os LODs obtidos foram de 30,0, 10,0, 10,0 e 200 ng g<sup>-1</sup> para As, Cd, Hg e Pb, respectivamente (QUINTO *et al.*, 2016). Além disso, dois estudos de Spiric (2019a e b) também utilizaram a MAWD para a decomposição de 0,5 g de mais de 80 amostras variadas de mel. O método utilizou 5 mL de HNO<sub>3</sub> 14,4 mol L<sup>-1</sup> e 1,5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Os LODs obtidos foram de 1,20, 0,40, 0,30 e 2,0 ng g<sup>-1</sup> para As, Cd, Hg e Pb (SPIRIC *et al.*, 2019a).

Um estudo de Rosa *et al.* (2015) que também utilizou a MAWD como um método de preparo de mel, ainda realizou uma etapa de repouso da amostra em ácido, antes da digestão no forno micro-ondas. Levando esse tempo em consideração (aproximadamente 12 horas), torna-se inviável utilizar métodos morosos para análises de rotina do mel.

Pode-se observar que, a maioria dos estudos que utilizam este método, fazem o uso de um elevado volume de ácidos concentrados para possibilitar a digestão da matriz com eficiência. Isso pode ser uma desvantagem quando se trata de métodos que visam o menor consumo de reagentes e geração de resíduos, proveniente do ácido utilizado como solução de decomposição (FLORES, 2014; KRUG, 2016). Além disso, a MAWD apresenta um maior tempo de preparo de amostra, quando

comparada a outros métodos, como a MIC e a DLLME (COSTA *et al.*, 2015; ROSA *et al.*, 2015). A necessidade de um método de preparo de amostra rápido e que garanta a decomposição completa da matriz é imprescindível no quesito controle de qualidade de alimentos, como o mel (KRUG, 2016).

### 2.5.2 Métodos de extração

A extração é um método de preparo brando quando comparado aos demais métodos que envolvem, por exemplo, a decomposição completa da amostra. Os métodos de extração possibilitam o uso de reagentes variados (solventes orgânicos, água, ácidos diluídos, entre outros), a utilização de quantidades relativamente elevadas de massa de amostra e o uso de temperaturas menores (KRUG, 2016). Dentre os métodos de extração, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) e extração em fase sólida (SPE) destacam-se quanto ao uso para a posterior determinação de Cd e Pb (ROSA *et al.*, 2015; STECKA *et al.*, 2014).

Um trabalho de Rosa *et al.* (2015) utilizou a DLLME para a extração de Cd e Pb em mel. Esse método apresentou vantagens como o uso de pequenas quantidades de solventes orgânicos, rapidez e facilidade de implementação, além de permitir a determinação de baixas concentrações de Cd e Pb em mel. Os limites de detecção (LODs) foram 18,0 e 135 ng g<sup>-1</sup> para Cd e Pb, respectivamente.

Um trabalho de Stecka *et al.* (2014) utilizou a SPE no preparo de 9 amostras de mel em meio ácido no qual utilizou uma resina de troca catiônica fortemente ácida para eluição e posterior determinação de Cd e Pb por FAAS. Uma das principais vantagens que o estudo apresentou foi a simplicidade e rapidez do método, além de apresentar LODs de 5,00 e 73,0 ng g<sup>-1</sup> para Cd e Pb, respectivamente.

### 2.5.3 Combustão

Os métodos de combustão em geral estão baseados na queima da amostra (no qual a matéria orgânica presente é o combustível) na presença de oxigênio (que é o comburente) e uma fonte de calor que propicie a reação, gerando CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O (FLORES *et al.*, 2007; KRUG, 2016). Esse processo pode ser feito manualmente, eletricamente ou até mesmo por radiação infravermelho ou micro-ondas (FLORES *et al.*, 2007).



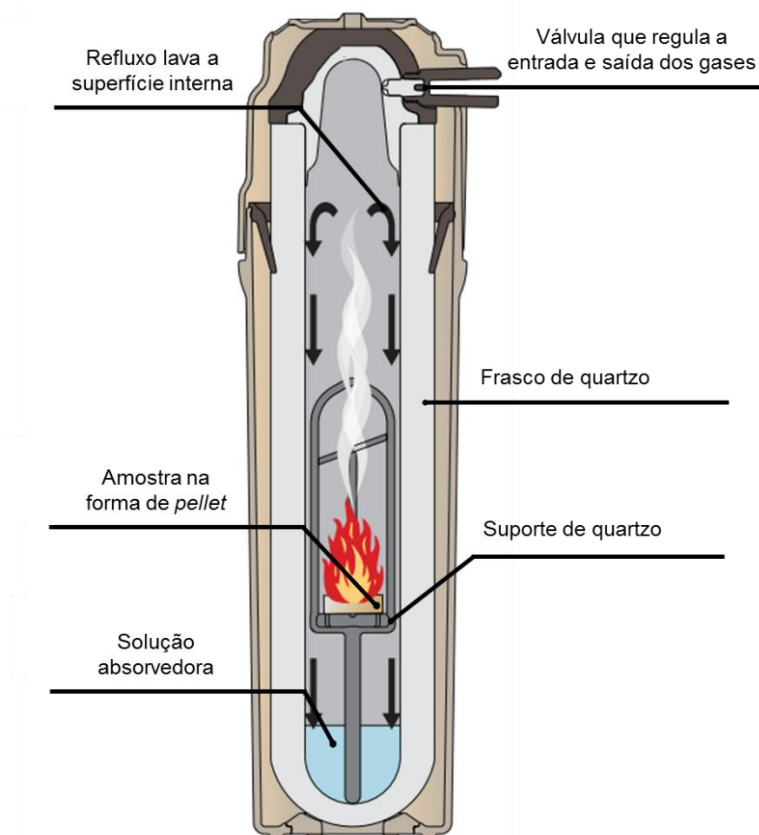
Assim como a digestão por via úmida, os métodos de combustão em sistemas abertos possuem desvantagens quanto a perdas de analitos por volatilização. Logo, dependendo dos analitos que se deseja quantificar, é recomendado o uso de sistemas fechados, como a bomba de combustão e os frascos de Schöniger. Além destes citados, a combustão iniciada por micro-ondas é um dos métodos de combustão mais difundidos na literatura para a determinação de inúmeros analitos em matrizes diversas (FLORES, 2014).

#### 2.5.3.1 Combustão iniciada por micro-ondas

O método da MIC foi desenvolvido por Flores *et al.* (2004), com o intuito de associar vantagens apresentadas pela MAWD (tais como o aquecimento homogêneo, rápido e seletivo das soluções, baixas perdas de calor para o meio, controle do processo, entre outros) e os métodos de combustão em sistemas fechados já existentes na literatura, como a bomba de combustão e frasco de Schöniger (BARIN, 2003; FLORES *et al.*, 2004). Dentre as vantagens que a MIC apresenta, a possibilidade da utilização de materiais inertes e massas de amostra relativamente elevadas (até 1 g) são aspectos importantes para a análise de traço. Além disso, o método permite a posterior determinação de metais e ametais em diferentes matrizes. Tudo isso associado ao uso de sistemas fechados, volumes de reagentes reduzidos, baixo teor de carbono residual e valores de brancos reduzidos, tornam o método viável para a aplicação em análises de rotina (FLORES *et al.*, 2007; KRUG, 2016).

A MIC, de forma geral, envolve a combustão de amostras orgânicas em frascos de quartzo fechados e pressurizados com 20 bar de oxigênio. Nestes frascos, a amostra (na forma de *pellet* ou invólucro) é inserida em um papel filtro presente em um suporte de quartzo, no qual é adicionado uma solução iniciadora de combustão (geralmente, nitrato de amônio  $6 \text{ mol L}^{-1}$ ). A combustão da amostra é feita através de radiação micro-ondas, não havendo a necessidade da utilização de dispositivos de ignição (como eletrodos metálicos ou lâmpadas de infravermelho) (BARIN, 2003; FLORES *et al.*, 2004). Os detalhes do frasco de combustão e do suporte de quartzo são mostrados na Figura 1.

Figura 1 – Frasco e suporte utilizado para a decomposição de amostras por MIC (Adaptado de Anton Paar, 2019).



Após a combustão, os analitos são absorvidos em uma solução adequada e uma etapa de refluxo ainda pode ser aplicada para garantir a recuperação dos analitos (BARIN, 2003; FLORES *et al.*, 2007; KRUG, 2016). Para a quantificação de metais, os analitos são geralmente absorvidos em HNO<sub>3</sub> diluído. Inúmeros trabalhos utilizam a MIC para a posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb (DUARTE *et al.*, 2009; MACIEL *et al.*, 2014; MULLER *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2012).

Quanto ao uso da MIC para a decomposição de mel, um trabalho de Costa *et al.* (2015) utilizou este método para a determinação de halogênios. Neste trabalho, foi possível decompor até 1 g de mel utilizando celulose microcristalina como auxiliar de combustão e solução de nitrato de amônio para ajudar na ignição e uniformidade da queima. Essa mistura foi feita sobre um filme de polietileno (PE) para decompor a amostra na forma de invólucro. Os analitos foram absorvidos em solução de NH<sub>4</sub>OH 50 mmol L<sup>-1</sup> obtendo recuperações entre 99 e 104% para Br e I, respectivamente. Todavia, não há trabalhos que utilizem a MIC como método de preparo para a decomposição do mel, visando a quantificação de As, Cd, Hg e Pb.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

*Neste capítulo serão descritos os equipamentos, os reagentes e as amostras utilizadas no desenvolvimento deste trabalho. Além disso, são descritos os métodos de preparo de amostras utilizados, bem como as otimizações do método de MIC para a posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb em mel por ICP-MS.*

### 3.1 INSTRUMENTAÇÃO

Neste trabalho, para a decomposição de mel por combustão iniciada por micro-ondas (MIC) foi utilizado um forno de micro-ondas (Synthos 3000, Microwave Sample Preparation System, Anton Paar, Áustria) equipado com um rotor de capacidade máxima para 8 frascos de quartzo, com volume interno de 80 mL cada. O sistema possui recomendações de pressão, temperatura e potência máximas de 80 bar, 280 °C e 1400 W, respectivamente. Na MIC, a amostra foi utilizada na forma de invólucro utilizando filmes de polietileno (PE) e inserida na base do suporte de quartzo desenvolvido no Laboratório de Hialotecnica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Mais detalhes do equipamento utilizado podem ser visualizados na Figura 2.

Figura 2 – (A) Forno de micro-ondas Synthos 3000, Anton Paar (B) Rotor equipado com 4 frascos de quartzo, na MIC.



Adicionalmente, foi feita a decomposição por via úmida assistida por radiação micro-ondas em câmara única de reação (MAWD-SRC) (UltraWAVE<sup>®</sup>, Single Reaction Chamber, Milestone, Itália) como método de referência. Para isso, foram utilizados frascos de quartzo com volume interno de 40 mL cada. O frasco reacional de PTFE contido no equipamento foi preenchido com 130 mL de H<sub>2</sub>O e 5 mL de HNO<sub>3</sub> P.A.. A pressão e a temperatura máximas foram estabelecidas como 160 bar e 270 °C, respectivamente.

Para a determinação de As, Cd, Hg e Pb nos digeridos, foi utilizado um espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (modelo NexION 300X<sup>®</sup>, Perkin Elmer, Canadá) equipado com um nebulizador concêntrico (Meinhard

tipo A, Golden, Estados Unidos), câmara de nebulização ciclônica (Glass Expansion, Austrália) e tocha com tubo injetor de quartzo de 2 mm de diâmetro.

Para a determinação de Hg ainda foi utilizado um sistema com geração de vapor a frio e injeção em fluxo, desenvolvido no Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) da UFSM, acoplado a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (FI-CVG-ICP-MS), substituindo-se o sistema de introdução de amostras convencional do ICP-MS.

A concentração de carbono residual nos digeridos foi determinada utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (modelo Spectro Cirus CCD, Spectro Analytical Instruments, Alemanha) equipado com câmara de nebulização duplo passo de vidro (tipo *Scott*) e nebulizador de fluxo cruzado (*cross flow*), tocha e tubo injetor de quartzo. O espectrômetro é configurado com vista axial e possui a ótica selada, permitindo assim a detecção de radiação na faixa do ultravioleta abaixo de 190 nm. As condições operacionais dos equipamentos de ICP-MS e ICP-OES estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Condições operacionais para a determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS, e de C por ICP-OES.

Parâmetro	ICP-MS	ICP-OES
Potência do gerador de radiofrequência (W)	1300	1400
Vazão do gás principal (L min <sup>-1</sup> )	15,0	12,0
Vazão do gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,2	1,0
Vazão do gás de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	1,08	1,00
Câmara de nebulização	Ciclônica	Duplo passo
Nebulizador	Concêntrico	<i>Cross-flow</i>
Vista	-	Axial
Analitos	Isótopos	Linha de emissão, nm
C	-	193,030 (I)
Y	-	371,029 (II)
As	75	-
Cd	114	-
Hg	202	-
Pb	208	-

(I) linha de emissão atômica e (II) linha de emissão iônica

Os procedimentos de pesagem foram realizados em uma balança analítica (modelo AY220, Shimadzu, Japão) com resolução de 0,001 g e carga máxima de 220 g. Os papéis filtros utilizados na MIC foram descontaminados utilizando um banho de ultrassom (P 120 H, Elmasonic, Alemanha) com potência de 300 W e frequência de 37 kHz, bem como uma capela de fluxo laminar (CFLH 12, Veco do Brasil, Brasil) para a secagem do papel filtro. Além disso, uma estufa convencional (modelo 400/2ND, Nova Ética, Brasil) foi utilizada para os procedimentos de secagem da celulose microcristalina descontaminada e uma chapa de aquecimento (modelo ARE, Velp Científica, Brasil) também foi utilizada para procedimentos de descontaminação de materiais de laboratório e celulose microcristalina.

### 3.2 REAGENTES

A água utilizada no preparo das soluções e demais procedimentos passou por um processo de destilação, seguida de deionização em uma coluna de troca iônica (condutividade máxima de  $0,6 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) e, posteriormente, foi purificada em um sistema Milli-Q (modelo Milli-Q<sup>®</sup>, Millepore, Estados Unidos), atingindo resistividade mínima final de  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ . Os ácidos concentrados nítrico (65%, Merck, Alemanha) e clorídrico (37%, Merck, Alemanha) utilizados no trabalho foram destilados em um sistema de sub-ebulição (modelo duoPUR<sup>®</sup> 2.01E, Milestone, Itália).

A solução de nitrato de amônio com concentração de  $6 \text{ mol L}^{-1}$ , utilizada como iniciador de combustão, foi preparada a partir da dissolução de seu respectivo sal ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , Merck, Alemanha) em água purificada. Além disso, discos de papel filtro com baixo teor de cinzas (Black Ribbon Ashless n<sup>o</sup> 5891, Schleicher & Schüll, Alemanha) foram utilizados para auxiliar no processo de combustão.

A avaliação da exatidão do método de preparo de amostra desenvolvido neste trabalho foi realizada por comparação com método de referência e por ensaios de recuperação de As, Cd, Hg e Pb. Para isso, foram utilizadas soluções de referência monoelementares de cada analito, com concentração de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (Merk, Alemanha).

Para a determinação de As, Cd e Pb por ICP-MS, as soluções de referência utilizadas para a calibração foram preparadas a partir da diluição de uma solução de referência multielementar, com concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (SCP33MS, SCP Science, Canadá) de cada analito, em  $\text{HNO}_3$  5% (v/v). Para a determinação de Hg por FI-CVG-

ICP-MS, as soluções de referência foram preparadas a partir da diluição de um padrão estoque ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de Hg, SCP Science) em  $\text{HNO}_3$  5% (v/v).

Para a determinação de carbono por ICP-OES, as soluções de calibração ( $10$  a  $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) foram preparadas a partir de diluições de uma solução de referência de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de C, obtida pela dissolução do ácido cítrico monohidratado de elevada pureza (Vetec, Brasil) em água. Ítrio (Fluka, Estados Unidos) foi utilizado como padrão interno na concentração final de  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . Para eliminar interferências causadas por  $\text{CO}_2$  dissolvido, as amostras foram purgadas por 2 min com argônio.

Argônio de pureza de 99,9998% (White Martins, Brasil) foi usado para a geração do plasma em ICP-OES e ICP-MS, bem como para a purga para a posterior determinação de carbono. Oxigênio de elevada pureza (99,6%, White Martins, Brasil) foi utilizado para a pressurização dos frascos na MIC.

Para a geração e transporte das espécies voláteis de Hg, foram utilizadas soluções de  $\text{HCl}$   $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  através da diluição de  $\text{HCl}$  concentrado destilado e  $\text{NaBH}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (Vetec). A solução de  $\text{NaBH}_4$  foi preparada diariamente pela dissolução do reagente sólido em solução de  $\text{NaOH}$  0,1% (m/v) (Merck).

Materiais, como frascos de quartzo e vidrarias utilizados nos procedimentos de MAWD e MIC, foram descontaminados utilizando ácido nítrico concentrado P.A. (65%, Vetec, Brasil).

### 3.3 AMOSTRAS

Foram utilizadas, ao todo, 9 amostras de mel de diferentes países (Brasil, França, Índia, Inglaterra A, Inglaterra B, Malásia, México e Turquia), as quais foram identificadas no trabalho de acordo com o seu país de origem. A amostra proveniente da Índia foi escolhida arbitrariamente para a otimização do método proposto, enquanto as demais amostras de mel foram utilizadas para a aplicação do método.

Para a otimização do método proposto, foi preparada uma solução estoque a partir da diluição de padrões de referência monoelementares de As, Cd, Hg e Pb. Foi adicionado um volume suficiente desta solução sobre o mel, previamente ao fechamento do invólucro, de forma a se obter uma concentração de  $100 \text{ ng g}^{-1}$  ( $50 \mu\text{L}$  de uma solução estoque de  $1600 \mu\text{g L}^{-1}$ ) nos digeridos finais. Esses analitos foram adicionados à amostra escolhida para a otimização do método, em virtude da baixa concentração presente no mel sem adição de padrão. Vale salientar que esta

concentração foi escolhida levando em consideração que a legislação impõe concentrações na faixa de ppt como limites máximos estabelecidos.

### 3.4 PROCEDIMENTOS DE DESCONTAMINAÇÃO

Todas as vidrarias e materiais comuns de laboratório utilizados foram lavados com água e descontaminados com HNO<sub>3</sub> 10% (v/v) por no mínimo, 24 horas. Após esse procedimento, os materiais foram novamente lavados com água e secos com ar comprimido.

Os frascos de quartzo utilizados na MIC foram descontaminados com 6 mL de HNO<sub>3</sub> P.A., utilizando um programa de irradiação de: *i*) 10 min a 1000 W e *ii*) 20 min de resfriamento a 0 W. Para a MAWD-SRC, os frascos de quartzo foram descontaminados com 6 mL de HNO<sub>3</sub> P.A., utilizando o programa de irradiação de: *i*) rampa de 15 min até 250 °C com 15 min de permanência e *ii*) resfriamento até atingir a temperatura de 50 °C. Os frascos e suportes foram lavados com água e secos com ar comprimido ao fim do procedimento.

A descontaminação dos papéis filtro utilizados na MIC foi feita utilizando-se HNO<sub>3</sub> 20% (v/v) e água. Os papéis foram imersos, primeiramente, em solução de HNO<sub>3</sub> e submetidos a um tratamento em banho de ultrassom por 20 min. Após, os papéis foram imersos em água e submetidos ao mesmo procedimento de banho de ultrassom. Em seguida, o material foi lavado e seco em uma capela de fluxo laminar.

A celulose microcristalina de grau farmacêutico utilizada na confecção dos invólucros de mel foi descontaminada com HNO<sub>3</sub> 20% (v/v) sob fervura durante 5 minutos em chapa de aquecimento. Após, a celulose foi lavada 10 vezes com água e posteriormente seca em estufa a 70 °C.

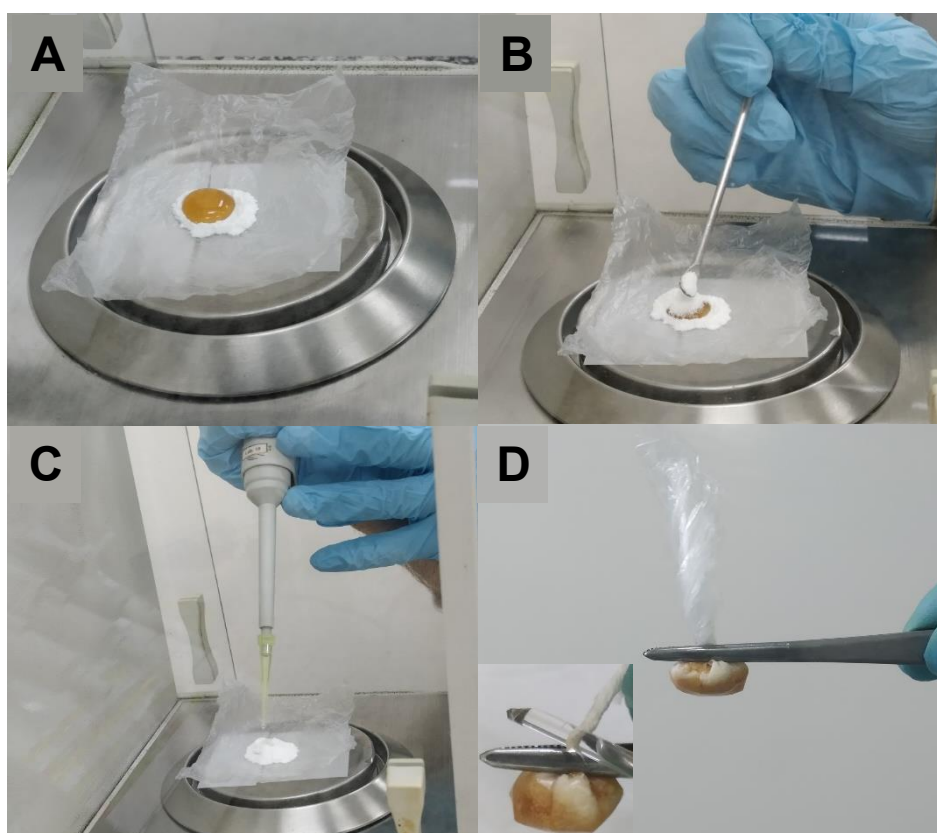
### 3.5 COMBUSTÃO INICIADA POR MICRO-ONDAS

A decomposição de mel por MIC foi baseada no trabalho de Costa *et al.* (2015) que foi previamente utilizado para a posterior determinação de halogênios. Para esse procedimento, foram preparados invólucros de polietileno (PE) contendo entre 0,2 e 1 g de mel, misturados, ou não, com 0,1, 0,2 e 0,4 g de celulose microcristalina, além da adição, ou não, de 100 µL de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 6 mol L<sup>-1</sup> no invólucro. O invólucro de PE foi fechado com o auxílio de uma pinça e selado com um bastão de quartzo aquecido,



para evitar possíveis vazamentos e projeções da amostra durante a queima. Após isso, o excesso de PE foi removido. Vale salientar que a selagem do invólucro foi adaptada (utilizando bastão de quartzo ao invés da solda) para evitar contaminações observadas, principalmente, para o Pb. O procedimento geral de preparo do invólucro pode ser visto na Figura 3.

Figura 3 – Procedimento de confecção dos invólucros de PE (A) Mel foi adicionado sobre metade da massa de celulose microcristalina utilizada; (B) O restante da celulose foi adicionado sobre o mel; (C) 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  foi pipetado sobre a mistura de mel e celulose; (D) O invólucro foi selado para ser posteriormente inserido no suporte de quartzo para a MIC



Após confeccionado, o invólucro de PE com a mistura (amostra + celulose + 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) foi inserido sobre um disco de papel filtro (15 mm de diâmetro, 12 mg) umedecido com 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{L}^{-1}$  na base de um suporte de quartzo. O suporte foi, então, introduzido no frasco de quartzo contendo a solução absorvedora. Em seguida, os frascos foram fechados, posicionados no rotor e pressurizados com 20 bar de oxigênio. O rotor com os frascos foi tampado e colocado dentro da cavidade do forno e submetido à radiação micro-ondas.

Após a combustão e resfriamento dos frascos, a pressão de cada frasco foi liberada lentamente e os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno de 50 mL e diluídos com água até 25 mL para a posterior determinação dos analitos.

Para o desenvolvimento do método proposto, foi avaliada a massa de amostra, a utilização de auxiliares de combustão, a composição e a concentração da solução absorvedora, e o programa de irradiação utilizado na MIC. A exatidão do método foi avaliada por ensaios de recuperação e por comparação com o método de referência (MAWD-SRC).

### 3.5.1 Avaliação da massa de amostra

Para a decomposição de mel por MIC para a posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS, foi avaliada a massa de amostra máxima que poderia ser utilizada, sem o risco de ocorrer um aumento excessivo de pressão no sistema durante a combustão da amostra.

Para isso, massas de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1 g de mel, foram avaliadas utilizando 6 mL de água como solução absorvedora e programa de irradiação convencional utilizado na MIC (item 3.5.3). Essa avaliação foi baseada no trabalho de Costa *et al.*, (2015), em que foi observado que, dependendo da massa utilizada, a combustão completa da amostra não acontecia utilizando somente o mel, sem aditivo. Devido a isso, além da massa de mel, foi avaliado juntamente à amostra, o uso de algum auxiliar de combustão.

#### 3.5.1.1 Auxiliares de combustão: celulose microcristalina e solução de $\text{NH}_4\text{NO}_3$

Foram avaliados 0,1, 0,2 ou 0,4 g de celulose microcristalina como auxiliar de combustão junto ao invólucro contendo o mel. Quando a massa mínima de celulose adicionada no mel não auxiliou a combustão, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{L}^{-1}$  ao invólucro, antes da massa de celulose ser aumentada. Por fim, o uso do invólucro com orifícios também foi avaliado. A melhor condição de massa de amostra foi escolhida com base no aspecto visual do digerido, na concentração de carbono em solução e na taxa de aumento de pressão atingida no momento da combustão, que não pode exceder o limite de 3 bar  $\text{s}^{-1}$ .

### 3.5.2 Avaliação da solução absorvedora

Após a escolha da melhor condição de massa de mel a ser utilizada, foram avaliadas diferentes soluções absorvedoras de modo a se obter recuperações quantitativas de As, Cd, Hg e Pb em mel enriquecido com 50 µL de solução estoque de 1600 µg L<sup>-1</sup> (item 3.3). Para isso, foram avaliadas soluções de HNO<sub>3</sub> com diferentes concentrações (0,5, 1, 3, 5, 7 e 14,4 mol L<sup>-1</sup>), bem como o uso de água como solução absorvedora. O uso de soluções diluídas foi priorizado para a otimização do método, visando o menor consumo de reagentes e geração de resíduos.

### 3.5.3 Avaliação do programa de irradiação

Neste parâmetro, dois programas de irradiação foram avaliados a fim de obter maiores recuperações para As, Cd, Hg e Pb. O primeiro programa, (identificado como Programa A) é utilizado convencionalmente na MIC e foi proposto por trabalhos anteriores (MACIEL *et al.*, 2014; MESKO *et al.*, 2010; MULLER *et al.*, 2013). Esse programa consiste em: *i*) 1400 W por 5 min e *ii*) 0 W por 20 min para a etapa de resfriamento. O segundo programa de irradiação, (identificado como Programa B), foi proposto por Costa *et al.*, (2015), conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4 – Programa de irradiação utilizado para a decomposição de mel por MIC.

Etapa	Potência, W	Rampa, min	Tempo de permanência	Exaustão
1	1400	-	50 s	Fan 1
2	0	-	3 min	Fan 1
3	1400	-	4 min	Fan 1
4	0	-	20 min	Fan 2

Taxa de aumento de pressão: 3 bar s<sup>-1</sup>, temperatura máxima: 280 °C; pressão máxima: 80 bar; Fan 1: ventilação com vazão de ar de 60 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> e Fan 2: circulação forçada com vazão de 125 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup> (resfriamento)

## 3.6 DECOMPOSIÇÃO POR VIA ÚMIDA ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS EM CÂMARA ÚNICA DE REAÇÃO

A decomposição do mel por MAWD-SRC foi utilizada como método de comparação. Para isso, aproximadamente 0,5 g de mel foi adicionado a um frasco de

quartzo contendo 6 mL de  $\text{HNO}_3$  14,4 mol  $\text{L}^{-1}$ . As amostras em ácido foram previamente aquecidas em chapa de aquecimento durante 4 horas como medida de segurança, tendo em vista que o mel reage violentamente com o  $\text{HNO}_3$ .

Após, as amostras foram decompostas utilizando o seguinte programa de irradiação: *i*) 10 min até 130 °C, com 10 min de permanência *ii*) 5 min até 150 °C, com 5 min de permanência e *iii*) 10 min a 250 °C, com 10 min de permanência e *iv*) 30 min para a etapa de resfriamento (até 45 °C). Após a decomposição, os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno e diluídos a 25 mL com água para posterior quantificação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS.

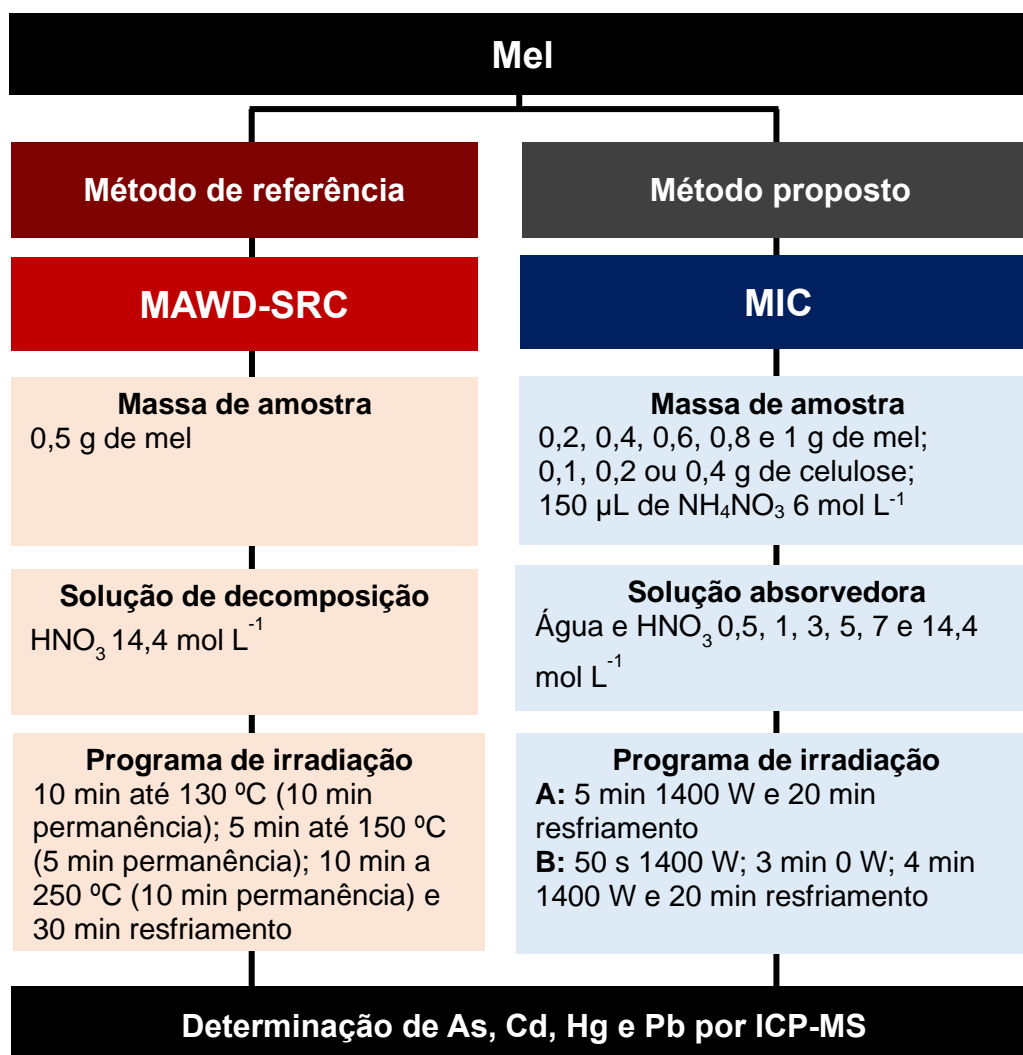
### 3.7 CÁLCULO DO LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Os LODs e LOQs dos métodos de preparo de amostra utilizados nesse trabalho também foram comparados. O cálculo do LOD, em  $\text{ng g}^{-1}$ , foi realizado a partir de 10 leituras dos brancos, sendo o desvio padrão obtido por estas leituras, multiplicado por 3 e somado ao valor da média das concentrações dos brancos. O volume de aferição (25 mL) e a massa de amostra utilizada em cada método também foram considerados. O cálculo do LOQ do método, em  $\text{ng g}^{-1}$ , foi realizado da mesma forma, porém, o desvio foi multiplicado por 10, ao invés de ser multiplicado por 3 (CURIE *et al.*, 1995).

### 3.8 RESUMO DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Neste trabalho, a MIC foi proposta como um método de preparo de amostras para a decomposição de mel, visando a determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS. Parâmetros como a massa de amostra (com ou sem os auxiliares de combustão), concentração da solução absorvedora e programa de irradiação foram estudados. Vale ressaltar que o uso de massa elevada de amostra e o emprego de ácido diluído foram priorizados. O fluxograma da Figura 4 mostra um resumo dos procedimentos avaliados neste estudo.

Figura 4 – Fluxograma dos procedimentos experimentais avaliados neste estudo.



#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

*Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros utilizados na decomposição por MIC visando à determinação de As, Cd, Hg e Pb em mel por ICP-MS. Para isso, foi avaliada a massa de amostra, auxiliares de combustão, a concentração da solução absorvedora e o programa de irradiação utilizado na MIC. Além disso, a MAWD-SRC foi empregada como método de referência, para fins de comparação com o método proposto. As melhores condições foram selecionadas com base nos ensaios de recuperação dos analitos e na concordância com o método de referência, utilizando o teste t de student (com nível de confiança de 95%) ou ANOVA (com nível de confiança de 95%).*

#### 4.1 MAWD PARA POSTERIOR DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Hg E Pb POR ICP-MS

Para a obtenção de valores de referência para As, Cd, Hg e Pb na amostra de mel escolhida (Índia) para a otimização do trabalho, foi feita a decomposição desta, utilizando o método de MAWD-SRC. Assim, 0,5 g de mel foi decomposto utilizando 6 mL de HNO<sub>3</sub> 14,4 mol L<sup>-1</sup>, conforme procedimento descrito no item 3.6 (Materiais e Métodos). Os resultados obtidos para As e Pb por ICP-MS foram de 37,04 e 34,34 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente. Entretanto, os valores de Cd e Hg ficaram abaixo do limite de detecção (LOD) do método (7,70 e 5,70 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente).

A decomposição da amostra enriquecida por MAWD-SRC apresentou recuperações quantitativas para todos os analitos: 93,5% ± 6,3% (As), 90,4% ± 0,2% (Cd), 93,2% ± 3,0% (Hg) e 89,5% ± 3,0% (Pb). Logo, a MAWD-SRC mostrou-se adequada para a posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS.

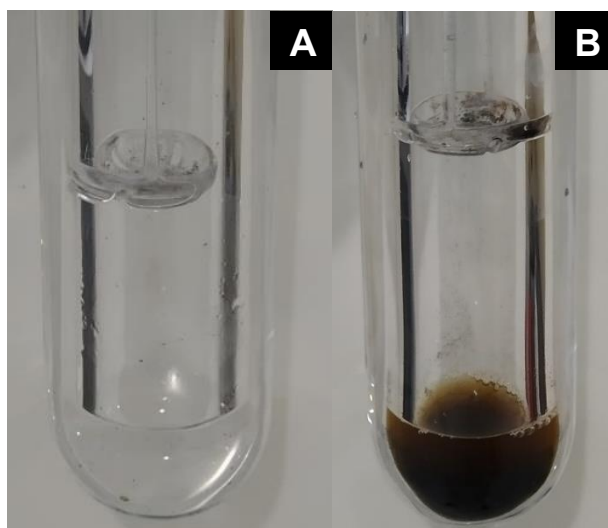
Em virtude das baixas concentrações de Cd e Hg presentes no mel escolhido, foi feita a adição de uma solução padrão desses analitos na amostra, conforme descrito no item 3.3 (Materiais e Métodos), e a recuperação dos analitos adicionados foi calculada considerando o valor real obtido pela quantificação da solução estoque por ICP-MS.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DA MIC PARA A DETERMINAÇÃO DE As, Cd, Hg E Pb POR ICP-MS

##### 4.2.1 Avaliação da massa de amostra

O método proposto por Costa *et al.*, (2015) para a decomposição de mel foi utilizado como base para a avaliação desse parâmetro. Assim, foram avaliadas massas de 0,2 a 1 g de mel sem aditivos, conforme item 3.5.1 (Materiais e Métodos). Entretanto, apenas a massa de 0,2 g apresentou combustão completa, quando não foi adicionado nenhum auxiliar de combustão. Como pode ser observado na Figura 5.

Figura 5 – Aspecto do digerido/solução resultante da MIC de (A) 0,2 g e (B) 0,4 g de mel utilizando 6 mL de água como solução absorvedora e 20 bar de O<sub>2</sub> para a pressurização dos frascos.



Como pode ser visualizado na Figura 5A, a massa de 0,2 g apresentou aspecto transparente e incolor no digerido final após MIC ( $96,7 \pm 54,8 \text{ mg L}^{-1}$  de carbono dissolvido). Entretanto, pode-se observar na Figura 5B, que utilizando 0,4 g de mel, não houve decomposição total da matriz orgânica (carbono dissolvido não quantificado devido ao aspecto da solução). Desta forma, também foi avaliado o uso de auxiliares de combustão.

#### 4.2.1.1 Uso de auxiliares de combustão: celulose microcristalina e solução de $\text{NH}_4\text{NO}_3$

A adição de celulose em massas de amostra superiores a 0,2 g, bem como a adição de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$   $6 \text{ mol L}^{-1}$  ao invólucro, foi feita de acordo com o item 3.5.1.1 (Materiais e Métodos). A Tabela 5 mostra o resultado desta avaliação.



Tabela 5 – Avaliação do aspecto dos digeridos de MIC após adição de celulose microcristalina a diferentes massas de mel. Usou-se 6 mL de água como solução absorvedora e programa de irradiação A. Os frascos foram pressurizados com 20 bar de O<sub>2</sub> em todas as condições.

Massa de amostra (g)	Sem celulose	0,1 g Celulose	0,2 g de celulose	0,4 g de celulose
0,2	✓	n.a	n.a	n.a
0,4	X	✓	n.a	n.a
0,6	X	X•	✓	n.a
0,8	X	X•	X•	✓
1,0	X	X	X	X•

✓ – Combustão completa (aspecto transparente e incolor);

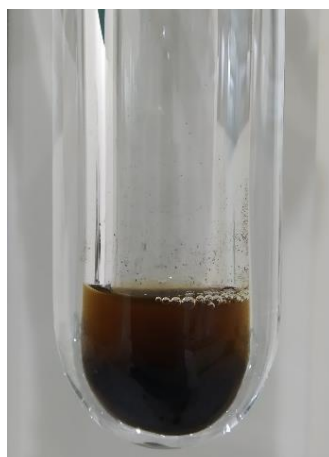
X – Combustão incompleta.

• – Adição de 100 µL de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 6 mol L<sup>-1</sup>

n.a – Não avaliado

Como pode ser observado na Tabela 5, a combustão de 0,4 g de amostra só foi possível com a adição de 0,1 g de celulose ao invólucro de PE, apresentando aspecto transparente no digerido final ( $60,4 \pm 39,3$  mg L<sup>-1</sup> de carbono dissolvido). Entretanto, ao avaliar a mesma massa de celulose (0,1 g) para 0,6 g de mel, não foi observada a combustão completa da matriz. O aspecto desta combustão pode ser visualizado na Figura 6.

Figura 6 – Aspecto do digerido obtido na MIC de 0,6 g de mel com 0,1 g de celulose, utilizando água como solução absorvedora.

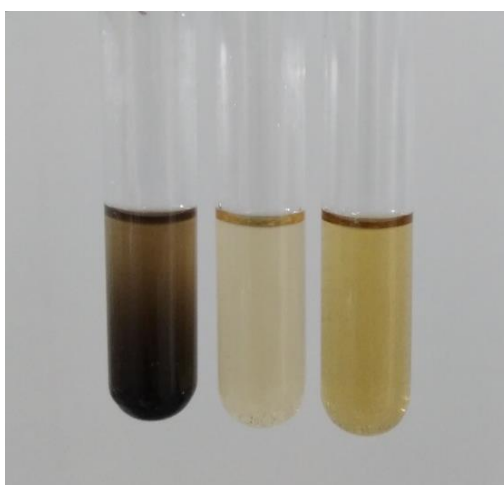


Desta forma, foi avaliada a adição de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{L}^{-1}$  ao invólucro, conforme proposto por Costa *et al.* (2015). Entretanto, não foi observada melhora visual no aspecto dos digeridos. Por este motivo, a massa de celulose adicionada foi aumentada para 0,2 g, sendo observada então a combustão completa da matriz (carbono dissolvido < 25 mg  $\text{L}^{-1}$ ).

Ao aumentar a massa para 0,8 g de mel, foi observado o mesmo comportamento. A queima da amostra não foi completa utilizando 0,2 g de celulose, apesar da adição de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{L}^{-1}$  no invólucro, sendo necessária a adição de 0,4 g de celulose para se obter digeridos de aspecto transparente e incolor (carbono dissolvido < 25 mg  $\text{L}^{-1}$ ). Além do aumento da massa de celulose.

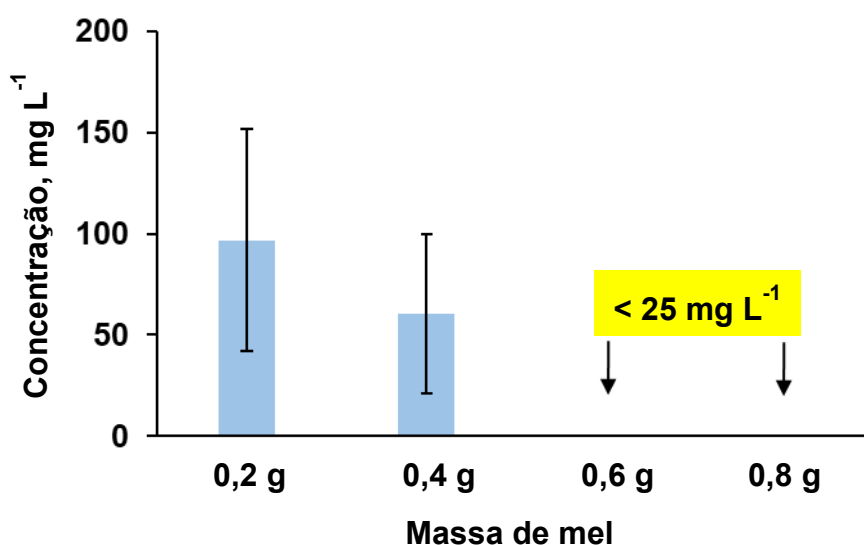
Para a combustão de 1 g de mel, além da adição de 0,4 g de celulose e 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{L}^{-1}$ , foram feitos pequenos orifícios no invólucro de PE a fim de aumentar o contato da amostra com o  $\text{O}_2$ . Apesar disso, não foi observada a combustão completa nessa condição utilizando o programa de irradiação A. Por isso, a fim de verificar a influência do programa de irradiação em 1 g de mel e auxiliares, a mesma condição foi realizada aplicando o programa de irradiação B (item 3.5.3). Entretanto, independente do programa utilizado, nenhuma dessas condições foi eficiente, sendo obtidos digeridos heterogêneos de aspecto turvo e cor escura (Figura 7).

Figura 7 – Aspecto dos digeridos em triplicata após a combustão de 1 g de mel, utilizando 0,4 g de celulose, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6 mol  $\text{L}^{-1}$  e orifícios no invólucro, utilizando o Programa A.



Além do aspecto visual dos digeridos, a eficiência de combustão também foi avaliada nas condições de massa de mel que resultaram no aspecto transparente, a fim de verificar a massa máxima de amostra que pode ser utilizada para posteriores otimizações do método. Na Figura 8 estão apresentadas as relações entre a condição de massa de mel utilizada e o teor de carbono em solução.

Figura 8 – Concentração de carbono em solução para diferentes condições de massa de mel, utilizando 6 mL de água como solução absorvedora.



A Figura 8 mostra que, as condições de 0,2 g de mel sem celulose e 0,4 g de mel (com adição de 0,1 g de celulose) podem não ter sido ideais para a decomposição completa da amostra, apesar do aspecto límpido das soluções. Isso pode ser notado pela elevada concentração de carbono e desvios padrão, quando comparados às demais condições. Apesar disso, essas concentrações de carbono não comprometeriam a determinação de As por ICP-MS, tendo em vista que o acréscimo do sinal para esse analito só é observado acima de 30 g L<sup>-1</sup> (GRINDLAY *et al.*, 2013).

Para as condições de 0,6 g de mel (com adição de 0,2 g de celulose) e 0,8 g de mel (com adição de 0,4 g de celulose), a concentração de carbono em solução mostrou-se abaixo do LOD do método (25 mg L<sup>-1</sup>). Logo, ambas condições mostraram-se viáveis para serem utilizadas em futuras otimizações da MIC.

Quanto ao aumento da pressão na MIC das diferentes massas avaliadas, não foi observada pressão superior a 45 bar durante a combustão, até mesmo utilizando a massa máxima de 1 g de mel com adição de 0,4 g de celulose. Desta forma, todas as condições de massas avaliadas poderiam ser utilizadas com baixo risco

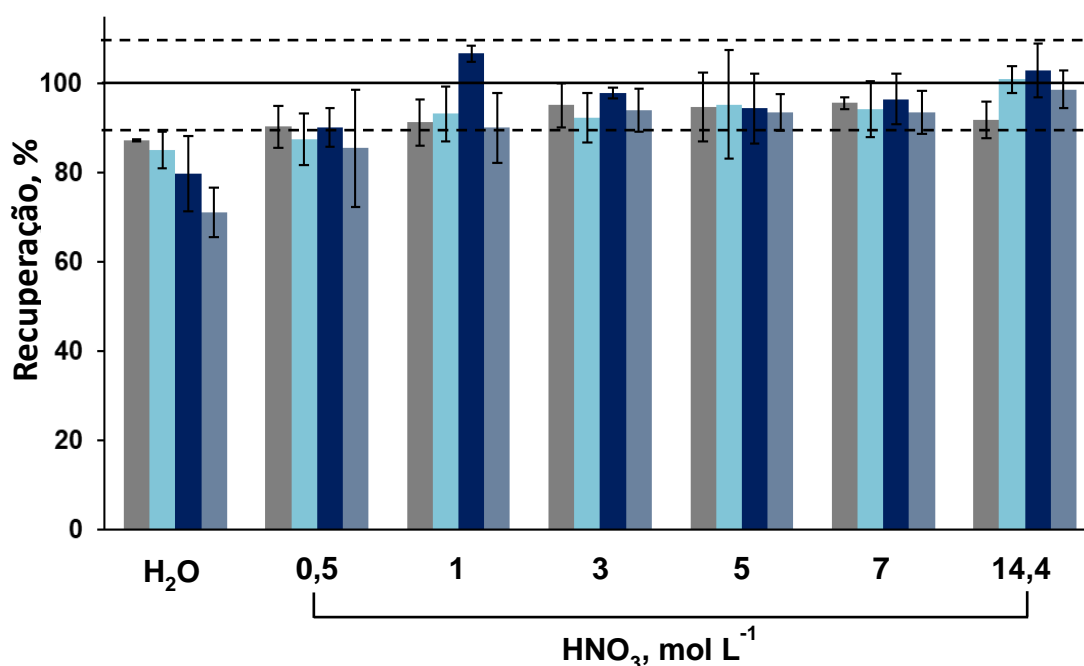
operacional. Entretanto, a máxima condição de massa escolhida sem riscos operacionais e com baixas concentrações de carbono dissolvido foi a de 0,8 g de mel com adição de 0,4 g de celulose microcristalina, tendo em vista que testes realizados com e sem a adição de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  6  $\text{mol L}^{-1}$  mostraram que não houve diferença na concentração de carbono dissolvido.

#### 4.2.2 Avaliação da solução absorvedora

Após a otimização da massa de amostra, foram avaliadas diferentes concentrações de  $\text{HNO}_3$  como solução absorvedora, sendo a melhor condição escolhida com base na recuperação dos analitos. Para isso, foram avaliadas soluções de  $\text{HNO}_3$  com concentração entre 0,5 e 14,4  $\text{mol L}^{-1}$ , além de água, como solução absorvedora, conforme descrito no item 3.5.2 (Materiais e Métodos).

A decomposição da amostra por MIC foi feita utilizando 0,8 g de mel, 0,4 g de celulose microcristalina e 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  em um invólucro de PE, 6 mL de solução absorvedora e o programa de irradiação A. As recuperações obtidas para As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS utilizando diferentes soluções absorvedoras estão apresentadas na Figura 9.

Figura 9 – Recuperação de (■) As, (■) Cd, (■) Hg e (■) Pb após procedimento de MIC usando água e  $\text{HNO}_3$  0,5; 1; 3; 5; 7; 14,4  $\text{mol L}^{-1}$  como solução absorvedora. Invólucro de PE contendo 0,8 g de mel, 0,4 g de celulose e 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , programa de irradiação A.



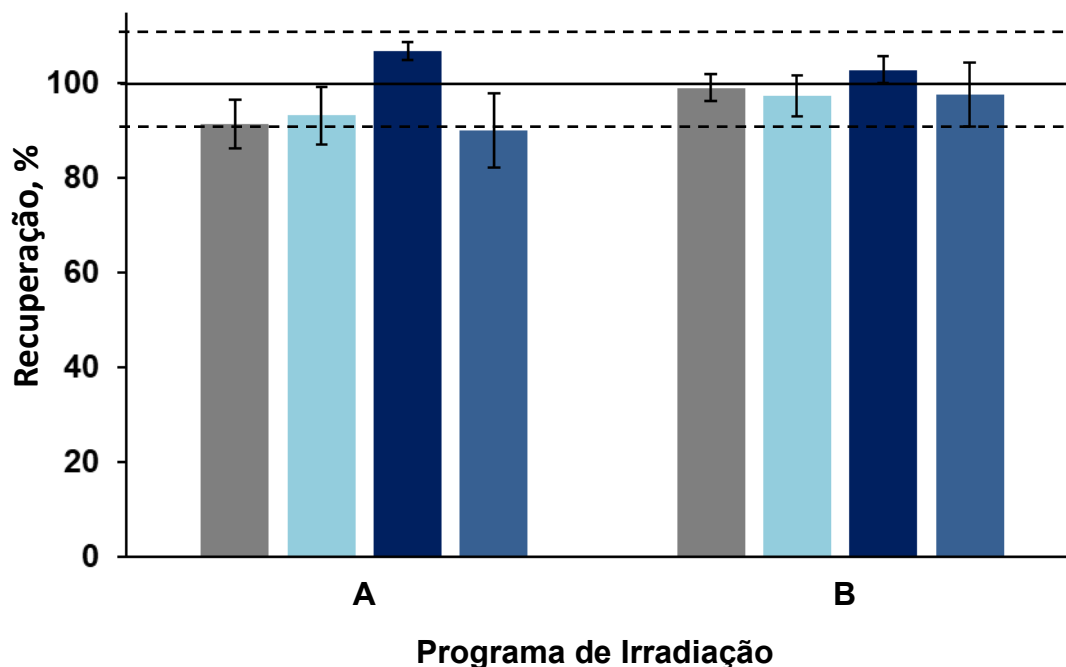
Como pode ser observado na Figura 9, foram obtidas recuperações quantitativas (acima de 90%) sem diferença significativa entre si, para todos os analitos quando soluções de  $\text{HNO}_3$  com concentrações de 1 a  $14,4 \text{ mol L}^{-1}$  foram utilizadas. Já para  $\text{HNO}_3$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e para a água, foram observadas recuperações inferiores para Hg e para Pb, tendo em vista que apresentou diferença significativa em comparação às demais concentrações avaliadas (ANOVA, 95% de confiança). Apesar disto, estas duas condições não apresentaram diferença significativa para as recuperações de As e Cd (ANOVA, 95% de confiança), quando comparados às demais concentrações.

Assim, a solução de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  foi escolhida como solução absorvedora para os demais experimentos. Entretanto, cabe ressaltar que foi observado um desvio elevado nessa condição ao utilizar o Programa A. Em decorrência disso, foi avaliado um segundo programa de irradiação, a fim de verificar se havia melhorias quanto a recuperação e desvio padrão (SD) dos analitos.

#### **4.2.3 Avaliação do programa de irradiação**

Para todos os parâmetros avaliados até então, foi utilizado o Programa de irradiação A (descrito no item 3.5.3). Entretanto, é possível que o elevado SD observado seja devido a um arraste da amostra durante o processo de combustão, tendo em vista que a etapa de refluxo é feita ao mesmo tempo que a etapa de combustão (COSTA *et al.*, 2015). Assim, avaliou-se o Programa B recomendado por Costa *et al.*, (2015), em que é inserida uma etapa intermediária entre a combustão e a etapa de refluxo, de forma a evitar projeções e a garantir a combustão completa da amostra. As recuperações obtidas utilizando os dois programas de irradiação podem ser observadas na Figura 10.

Figura 10 – Recuperação para (■) As, (■) Cd, (■) Hg e (■) Pb após aplicação dos programas de irradiação. Invólucro de PE contendo 0,8 g de mel, 0,4 g de celulose e 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  como solução absorvedora.



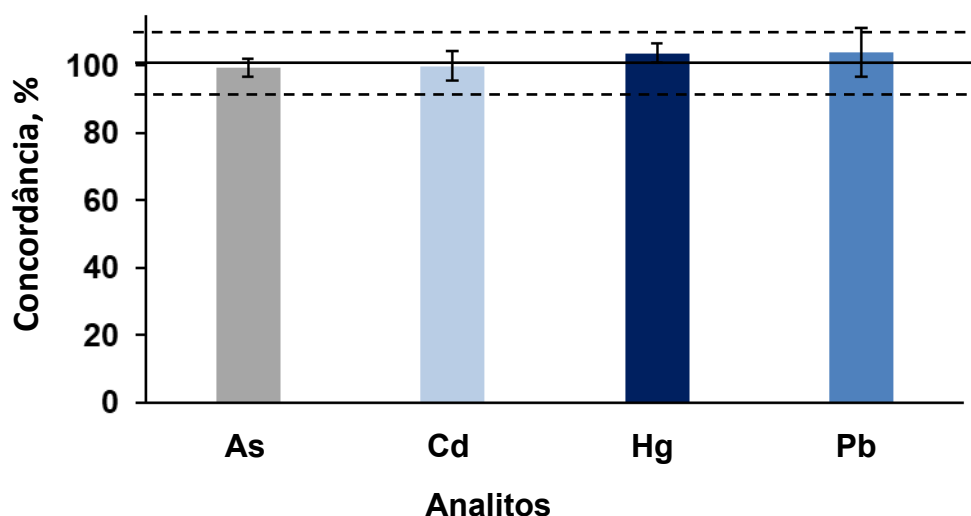
Como pode ser observado na Figura 10, o programa de irradiação B possibilitou uma recuperação superior para As, tendo em vista que apresentou diferença significativa (teste t de *student*, 95% de confiança) quando comparado ao Programa A. Apesar de não haver diferença estatística na recuperação dos demais elementos (teste t de *student*, 95% de confiança), é possível observar uma tendência a menores desvios e recuperações mais próximas de 100%. Esse comportamento também foi observado no trabalho de Costa *et al.*, (2015) e segundo a autora, a aplicação de uma etapa intermediária, entre a combustão e refluxo, garantiria uma combustão completa da amostra, desta forma, o programa de irradiação B foi escolhido para as demais avaliações.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO DA MIC

A melhor condição observada e utilizada no método proposto foi: invólucro de PE contendo 0,8 g de mel + 0,4 g de celulose microcristalina + 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , utilizando 6 mL de  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  com o programa de irradiação B. Esta condição foi comparada com o método de referência (MAWD-SRC), que utilizou  $\text{HNO}_3$

14,4 mol L<sup>-1</sup> como solução de decomposição e programa de irradiação mais longo (40 min) para a decomposição do mel. A concordância entre os métodos pode ser visualizada na Figura 11.

Figura 11 – Concordância entre a recuperação de As, Cd, Hg e Pb utilizando o método de referência e o método proposto (MIC): 0,8 g de mel + 0,4 g de celulose microcristalina + 100 µL de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, utilizando 6 mL de HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> com o programa de irradiação B. A linha representa os valores obtidos pelo método de referência (MAWD, n = 3).



Como pode ser observado na Figura 11, os resultados encontrados para As, Cd, Hg e Pb após a decomposição de 0,8 g de mel por MIC não apresentaram diferença significativa (teste t de *student*, 95% de confiança) quando comparados aos valores obtidos pelo método de referência (MAWD-SRC). A concordância do método foi de 99,3 e 99,7% para As e Cd, respectivamente e de 104% para Hg e Pb. Assim, a decomposição de 0,8 g de mel pelo método proposto, utilizando HNO<sub>3</sub> 1 mol L<sup>-1</sup> como solução absorvedora, mostrou-se adequada para a posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS.

#### 4.3.1 Figuras de mérito

Após a otimização do método proposto (MIC) para a decomposição de mel e posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS, foi feita a avaliação dos parâmetros pertinentes a MIC comparados com o método de referência (MAWD), conforme apresentado na Tabela 6. Vale salientar que os cálculos dos limites de

detecção e quantificação, expressos em  $\text{ng g}^{-1}$ , foram descritos no item 3.7 (Materiais e Métodos).

Tabela 2 – Resumo dos parâmetros dos métodos de decomposição de mel avaliados neste trabalho.

Parâmetros	Método de decomposição	
	MIC	MAWD-SRC
Massa de amostra, g	0,8 (+ 0,4 g de celulose + 150 $\mu\text{L}$ de $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	0,5
Reagentes	$\text{HNO}_3$ 1 mol $\text{L}^{-1}$ + $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 6 mol $\text{L}^{-1}$	$\text{HNO}_3$ 14,4 mol $\text{L}^{-1}$
Tempo total de procedimento, min	28	70
Número de replicatas por ciclo de decomposição	8	4
LOD, $\text{ng g}^{-1}$		
As	1,10	0,80
Cd	1,70	7,70
Hg	2,90	5,70
Pb	4,60	7,70

Como pode ser observado na Tabela 6, o procedimento de MIC proposto apresentou menores LODs quando comparados a MAWD (exceto para As). Isso pode ser justificado pela maior massa de mel utilizada no método proposto, causando a diminuição desse parâmetro. O tempo de decomposição de mel também apresentou-se como uma das principais vantagens do método, tendo em vista que em 28 minutos foram obtidas recuperações quantitativas para todos os analitos. Vale salientar que na MIC, não é necessária a etapa de repouso da amostra (4 horas), pois a matriz entra em combustão nos primeiros segundos do programa de irradiação (FLORES *et al.*, 2007), apresentando maior segurança em relação a MAWD-SRC, em que o mel entra em contato direto com o ácido concentrado. Por fim, o uso de  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  como solução absorvedora também se mostra adequado, ocorrendo um menor consumo de reagentes, quando comparado a MAWD, onde em cada frasco são consumidos 6 mL de  $\text{HNO}_3$  14,4 mol  $\text{L}^{-1}$ .



A MAWD-SRC e o método de MIC proposto no presente trabalho também podem ser comparados aos demais métodos relatados na literatura. Na Tabela 7 podem ser observados os LODs obtidos em diversos trabalhos da literatura, para a determinação de As, Cd, Hg e Pb em mel por diferentes técnicas de detecção e utilizando métodos de preparo de amostras variados.

Tabela 3 – Limites de detecção para a determinação de As, Cd, Hg e Pb em mel em trabalhos da literatura (período de 2013 a 2020). Os valores estão expressos em  $\text{ng g}^{-1}$ .

Preparo de amostras	Técnica de determinação	LOD, $\text{ng g}^{-1}$	Referência
<p><u>SPE</u>: massa: 10 g (dissolvidos em água e acidificado com <math>\text{HNO}_3</math> com volume final de 100 mL)            Reagentes: 10 mL de <math>\text{HCl}</math> 3 mol <math>\text{L}^{-1}</math> em Dowex 50W×8-400            Tempo: 30 min (todo o processo)</p>	FAAS	5,0 (Cd) e 73 (Pb)	STECKA, H. <i>et al.</i> , (2014)
<p><u>DLLME</u>: massa: 0,5 g            Reagentes: 300 <math>\mu\text{L}</math> de acetonitrila (Cd), 900 <math>\mu\text{L}</math> de acetona (Pb) e 140 <math>\mu\text{L}</math> de tetracloreto de carbono            Tempo: cerca de 6 min</p>	FAAS	18 (Cd) e 135 (Pb)	ROSA, F. C. <i>et al.</i> , (2015)
<p><u>MAWD</u>: massa: 1 g            Reagentes: 6 mL de <math>\text{HNO}_3</math> 14,4 mol <math>\text{L}^{-1}</math>            Tempo: 31 min</p>	GF-AAS	150 (Cd) e 170 (Pb)	SILICI, S. <i>et al.</i> , (2013)
<p><u>MAWD</u>: massa: 0,5 g            Reagentes: 3 mL de <math>\text{H}_2\text{O}</math> e 2,5 mL de <math>\text{HNO}_3</math> 65%            Tempo: 53 min</p>	ICP-MS (Quadrupolo)	1,0 (Cd e Pb)	BILANDZIC, N. <i>et al.</i> , (2017)
<p><u>MAWD</u>: massa: 0,5 g            Reagentes: 6 mL de <math>\text{HNO}_3</math> 14,4 mol <math>\text{L}^{-1}</math>            Tempo: 47 min</p>	ICP-MS (Quadrupolo)	9,0 (Cd) e 62 (Pb)	ROSA, F. C. <i>et al.</i> , (2015)

Tabela 7 – Limites de detecção para a determinação de As, Cd, Hg e Pb em mel em trabalhos da literatura (período de 2013 a 2020). Os valores estão expressos em  $\text{ng g}^{-1}$ .

Preparo de amostras	Técnica de determinação	LOD, $\text{ng g}^{-1}$	Referência
<p><u>MAWD</u>: massa: 0,5 g            Reagentes: 5 mL de <math>\text{HNO}_3</math> 14,4 mol <math>\text{L}^{-1}</math> e 1,5 mL de <math>\text{H}_2\text{O}_2</math> 30%            Tempo: 35 min</p>	ICP-MS (Quadrupolo)	1,20 (As), 0,40 (Cd) 0,30 (Hg) e 2,0 (Pb)	SPIRIC, D. <i>et al.</i> , (2019a)
<p><u>MAWD</u>: massa: 0,5 g            Reagentes: 5 mL de <math>\text{HNO}_3</math> 14,4 mol <math>\text{L}^{-1}</math> e 1,5 mL de <math>\text{H}_2\text{O}_2</math> 30%            Tempo: 35 min</p>	ICP-MS (Quadrupolo)	1,0 (As e Cd) e 2,0 (Pb)	SPIRIC, D. <i>et al.</i> , (2019b)
<p><u>MAWD</u>: massa: 1 g            Reagentes: 6 mL de <math>\text{HNO}_3</math> 68% e 2 mL de <math>\text{H}_2\text{O}_2</math> 30%            Tempo: 95 min</p>	ICP-MS (Quadrupolo)	30 (As), 10 (Cd e Hg) e 200 (Pb)	QUINTO, M. <i>et al.</i> , (2016)
<p><u>MAWD</u>: massa: 0,5 g            Reagentes: 6 mL de <math>\text{HNO}_3</math> 14,4 mol <math>\text{L}^{-1}</math>            Tempo: 50 min</p>	ICP-MS (Quadrupolo)	0,80 (As), 7,70 (Cd e Pb), 5,70 (Hg)	Presente estudo (2020)
<p><u>MIC</u>: massa: 0,8 g + 0,4 g de celulose            Reagentes: 6 mL <math>\text{HNO}_3</math> 1 mol <math>\text{L}^{-1}</math> + 150 <math>\mu\text{L}</math> <math>\text{NH}_4\text{NO}_3</math> 6 mol <math>\text{L}^{-1}</math>            Tempo: 28 min</p>	ICP-MS (Quadrupolo)	1,10 (As), 1,70 (Cd) e 2,90 (Hg) e 4,60 (Pb)	Presente estudo (2020)

Como pode ser visto na Tabela 7, ao aplicar o método proposto para a determinação de As, Cd, Hg e Pb, foi possível obter LODs semelhantes ou inferiores aos outros métodos relatados na literatura. Além dos baixos LODs, o método proposto também apresentou vantagens quando comparado aos métodos de extração utilizados na literatura para a determinação desses analitos em mel.

O trabalho de Rosa *et al.*, (2015) apresentou a DLLME como método proposto para a quantificação de Cd e Pb em mel, com LODs superiores ao presente trabalho. Além disso, a DLLME, apesar do volume baixo de solvente empregado, faz uso de solventes orgânicos tóxicos como os organoclorados, em comparação com a MIC proposta, que faz uso de ácido nítrico diluído como solução absorvedora.

Outro método que pode ser comparado com a MIC é a SPE proposta no trabalho de Stecka *et al.*, (2014) no qual os melhores resultados foram obtidos somente quando aplicada uma etapa prévia de preparo do mel, por meio da acidificação com HNO<sub>3</sub>, diluição da solução acidificada ou até mesmo uma etapa com aquecimento. Além disso, o uso de 10 mL de HCl 10 mol L<sup>-1</sup> para a eluição dos analitos nas resinas de troca catiônicas é elevado, quando comparado ao volume de ácido e concentração da solução utilizada no método de MIC proposto neste trabalho.

Essas vantagens como os baixos LODs, menor consumo de reagentes e tempo de preparo de amostra (quando comparadas a outros métodos utilizados na literatura), torna viável a utilização do método de MIC proposto para a posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb em amostras de mel de diferentes origens geográficas.

#### 4.4 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO PARA MEL DE DIFERENTES ORIGENS GEOGRÁFICAS

Após a otimização do método de MIC para a decomposição de mel e posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS, esse foi aplicado para as demais amostras. Na Tabela 8 são apresentadas as concentrações de As, Cd, Hg e Pb em diferentes tipos de mel após decomposição por MIC e determinação por ICP-MS.

Tabela 8 – Determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS em amostras de mel de diferentes origens geográficas após decomposição usando o método proposto. (valores em  $\text{ng g}^{-1}$ , média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 3$ ).

Amostra	Concentração, $\text{ng g}^{-1}$			
	As	Cd	Hg	Pb
Áustria	< 2,20	< 2,10	< 4,80	< 5,70
Brasil	< 2,20	< 2,10	< 4,80	< 5,70
França	< 2,20	< 2,10	< 4,80	< 5,70
Índia	36,30 $\pm$ 5,61	< 2,10	< 4,80	32,98 $\pm$ 4,63
Inglaterra A	9,63 $\pm$ 0,64	< 2,10	< 4,80	3,67 $\pm$ 0,10
Inglaterra B	6,45 $\pm$ 3,38	< 2,10	< 4,80	4,01 $\pm$ 0,04
Malásia	8,26 $\pm$ 0,61	< 2,10	< 4,80	11,0 $\pm$ 0,37
México	3,51 $\pm$ 0,72	19,0 $\pm$ 2,1	< 4,80	< 5,70
Turquia	9,19 $\pm$ 0,49	3,43 $\pm$ 0,33	< 4,80	6,56 $\pm$ 0,14

Valores < LOQ

Como pode ser observado na Tabela 8, a amostra proveniente da Índia apresentou as maiores concentrações de As e Pb entre as amostras aplicadas no presente trabalho. Quanto aos limites estabelecidos no Brasil, nenhuma das amostras ultrapassou a concentração de  $500 \text{ ng g}^{-1}$  para As, Cd e Pb e  $0,01 \text{ ppb}$  para Hg (Brasil, 1965; Brasil, 2000), bem como a legislação internacional mais recente estabelecida pela União Europeia, de  $500 \text{ ng g}^{-1}$  para Cd e Pb e  $1000 \text{ ng g}^{-1}$  para Hg (CE, 1999; CE, 2006).

A amostra proveniente da Turquia também apresentou valores quantificáveis para As, Cd e Pb. Quando comparada a outras amostras do mesmo país, a concentração de  $6,56 \text{ ng g}^{-1}$  para Pb foi superior as concentrações encontradas por Silici *et al.* (2013) em méis da região de Yatagan e Madenler ( $4,43$  e  $4,01 \text{ ng g}^{-1}$ , respectivamente). Entretanto, a concentração de  $6,56 \text{ ng g}^{-1}$  de Pb encontrada no presente estudo, foi inferior quando comparada às amostras de demais origens da Turquia. Isso pode ser explicado pela influência da presença de usina termelétrica na região do estudo por Silici *et al.* (2013), gerando uma maior concentração de Pb no mel.

Essa variação entre a concentração de diferentes méis no mesmo país ocorre de modo geral, para todas as amostras e em diferentes estudos, tendo em vista que essa alternância está associada a origem geográfica, morfológica do mel e, também origem floral. Além disso, a produção do mel e o meio em que a colmeia está inserida, afeta diferentemente na composição e qualidade do mel pois este produto se torna exposto às contaminações decorrentes de atividades antropogênicas (ANDRADE *et al.*, 2014; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A decomposição das amostras foi completa em todos os casos e o método de MIC proposto, mostrou-se prático e de fácil operação. Apesar do tempo de confecção do invólucro, o tempo total de preparo de amostra é desprezível quando comparado à MAWD, em que o mel necessita da etapa de repouso por 12 horas. Assim, a MIC desenvolvida pode ser aplicada para análise de rotina no controle de qualidade do mel.

## 5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, é possível afirmar que o método proposto para a decomposição de mel por MIC é adequado para a posterior determinação de As, Cd, Hg e Pb. Esse método possibilitou a decomposição eficiente (concentração de carbono residual inferior a  $25 \text{ mg L}^{-1}$ ) de uma massa relativamente elevada de mel (0,8 g + auxiliares de combustão) utilizando apenas 6 mL de  $\text{HNO}_3$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  em um procedimento rápido (28 minutos) de decomposição.

O método proposto apresentou concordância de 99,3 e 99,7% para As e Cd, respectivamente e de 104% para Hg e Pb quando comparado ao método de referência (MAWD-SRC) (teste t de *student*, 95% de confiança). A MIC apresentou vantagens como o menor tempo de preparo de amostras e a utilização soluções diluídas. Além disso, o método possibilitou a utilização de maior massa de amostra para a decomposição de mel, aumentando assim, a detectabilidade reduzindo os LODs e LOQs do método.

Cabe destacar, também, que os LOQs para todos os analitos foram adequados para a determinação de As, Cd, Hg e Pb em mel, sendo no mínimo 84 vezes menores que os limites estabelecidos na legislação. O método de MIC proposto mostrou-se adequado e foi aplicado para a decomposição de mel de diferentes origens geográficas.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C. K.; DOS ANJOS, V. E.; FELSNER, M. L.; TORRES, Y. R.; QUINAIA, S. P. Relationship between geographical origin and contents of Pb, Cd, and Cr in honey samples from the state of Parana (Brazil) with chemometric approach. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 21, p. 12372-12381, 2014.
- BANDINI, T. B; SPISSO, B. F. Risco sanitário do mel no Brasil em relação a novas ameaças: resíduos e contaminantes químicos emergentes. **Vigilância Sanitária em Debate**. v. 5, p. 116-126, 2017.
- BARBIER, O.; JACQUILLET, G.; TAUC, M.; COUGNON, M.; POUJEOL, P. Effect of heavy metals on, and handling by, the Kidney. **Nephron Physiol**. v. 99, p 105-110, 2005.
- BARIN, J. S. Determinação de metais e não metais em produtos farmacêuticos após decomposição em sistema fechado por combustão iniciada por micro-ondas. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêutica) - Universidade Federal de Santa Maria, 2003.
- BARBOSA, J. T. P.; SANTOS, C. M. M.; PERALVA, V. N.; FLORES, E. M. M.; KORN, M.; NÓBREGA, J. A.; KORN, M. G. A. Microwave-assisted diluted acid digestion for trace elements analysis of edible soybean products. **Food chemistry**. v. 175, p. 212-217, 2015.
- BEAUCHEMIN, D. Chapter 1 Current status of ICP-MS. **Comprehensive Analytical Chemistry**, p. 1-212, 2000.
- BILANDŽIĆ, N.; GAJGER, I. T.; KOSANOVIĆ, M., ČALOPEK, B.; SEDAK, M.; SOLOMUN KOLANOVIĆ, B.; VARENINA, I.; LUBURIC, D. B.; VARGA, I.; ĐOKIĆ, M. Essential and toxic element concentrations in monofloral honeys from southern Croatia. **Food Chemistry**, v. 234, p. 245–253, 2017.
- BILANDŽIĆ, N.; GACIC, M.; DOKIC, M.; SEDAK, M.; SIPUSIC, D. I.; KONCURAT, A.; GAJGER, I. T. Major and trace elements levels in multifloral and unifloral honeys in Croatia. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 33, n. 2, p. 132-138, 2014.
- BJØRKLUND, G.; DADAR, M.; MUTTER, J.; AASETH, J. The toxicology of mercury: current research and emerging trends. **Environmental Research**. v. 159, p. 545-554, 2017.
- BOSKABADY, M.; MAREFATI, N.; FARKHONDEH, T.; SHAKERI, F.; FARSHBAF, A.; BOSKABADY, M. H. The effect of environmental lead exposure on human health and the contribution of inflammatory mechanisms, a review. **Environment International**. v. 120, p. 404-420, 2018.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 11, de 20 de Outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Brasília, DF, 11 out. 2000.



BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa SDA Nº 11, de 07 de Maio de 2014. Subprograma de monitoramento em carnes (bovina, aves, suína e equina) leite, pescado, mel e ovos referentes ao Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - PNCRC. Brasília, DF, 07 mai. 2014.

BRASIL. VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Decreto no 55871, de 26 de março de 1965. Normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto no 691, de 13 de março de 1962. Brasília, DF, 26 mar 1965.

CAMARGO, R. C. R.; PEREIRA, F. M.; LOPES, M. T. R.; WOLFF, L. F. **Mel: características e propriedades**. 1. ed. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2006. 28 p.

CAO, F.; ZHOU, T.; SIMPSON, D.; ZHOU, Y.; BOYER, J.; CHEN, B.; JIN, T.; CORDEIRO-STONE, M.; KAUFMANN, W. p53-dependent but ATM-independent inhibition of DNA synthesis and G2 arrest in cadmium-treated human fibroblasts. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 218, n. 2. p. 174-185, 2007.

CHUDZINSKA, M.; BARALKIEWICZ, D. Application of ICP-MS method of determination of 15 elements in honey with chemometric approach for the verification of their authenticity. **Food and Chemical Toxicology**. v. 49, n. 11, p. 2741-2749, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2001). Revised codex standard for honey. Codex STAN 12-1981, Rev. 1, 1987, Rev. 2, dez, 2001, Amended in 2019.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS (CE). Decisão da Comissão, de 28 de outubro de 1999, que altera o anexo II da Diretiva 92/118/CEE que estabelece requisitos de saúde animal e de saúde pública que regem o comércio e a importação de produtos e no que se refere aos agentes patogênicos. Jornal Oficial JO L. v. 290, p. 32-40. União Europeia. 28 out, 1999.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS (CE) Nº 1881/2006. Estabelecimento de níveis máximos para certos contaminantes em gêneros alimentícios. p. 20, 2006.

COSTA, V. C.; PICOLATO, R. S.; HARTWIG, C. A.; MELLO, P. A.; FLORES, E. M. M.; MESKO, M. F. Feasibility of ultra-trace determination of bromine and iodine in honey by ICP-MS using high sample mass in microwave-induced combustion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 407, p. 7957-7964, 2015.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. **Pure & Appl. Chem.** v. 67, n. 10, p. 1699-1723, 1995.

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

DÖKER, S. Exploiting aerosol dilution for the determination of ultra-trace elements in honey by collision/reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (CRC-ICP-MS) without thermal digestion. **Analytical Methods**. v. 9, 1710-1717, 2017.

DUARTE, F. A.; PEREIRA, J. S. F.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M.; & KNAPP, G. Seafood digestion by microwave-induced combustion for total arsenic determination by atomic spectrometry techniques with hydride generation. **Journal of Analytical Atomic**. v. 24, n. 2, p. 224-227, 2009.

ĐUKIĆ-ĆOSIĆ, D.; BARALIĆ, K.; JAVORAC, D.; BUHA ĐORĐEVIĆ, A.; BULAT, Z. An overview of molecular mechanisms in cadmium toxicity. **Current Opinion in Toxicology**. v. 19, p. 56-62, 2020.

FARINA M.; ROCHA, J. B.; ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. **Life Sciences**. v. 89, n. 15–16, p. 555-563, 2011.

FLORES, E. M.M.; BARIN, J. S.; PANIZ, J. N. G.; MEDEIROS, J. A.; KNAPP, G. Microwave-Assisted Sample Combustion: A technique for sample preparation in trace element determination. **Analytical Chemistry**. v. 76, p. 3525-3529, 2004.

FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; MESKO, M. F.; KNAPP, G. Sample preparation techniques based on combustion reactions in closed vessels — A brief overview and recent applications. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. v. 62, n. 9, p. 1051-1064, 2007.

FLORES, E. M. M. **Microwave-assisted sample preparation for trace element determination**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2014. 400 p.

FOURNIÈRE, E. M.; LEVYA, A. G.; GAUTIER, E. A.; LITTER, M. I. Treatment of phenylmercury salts by heterogeneous photocatalysis over TiO<sub>2</sub>. **Chemosphere**. v. 69, n. 5, p. 682-688, 2007.

GAO, Y.; LIU, R.; YANG, L. Application of chemical vapor generation in ICP-MS: a review. **Chinese Science Bulletin**. v. 58, p.1980-1991, 2013.

GRINDLAY, G.; MORA, J.; LOOS-VOLLEBREGT, M.; VANHAECKE, F. A systematic study on the influence of carbon on the behavior of hard-to-ionize elements in inductively coupled plasma–mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. v. 86, p. 42-49, 2013.

HARRINGTON C. F.; MERSON, S. A.; D' SILVA, T. M. Method to reduce the memory effect of mercury in the analysis of fish tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. v. 505, n. 2, p. 247-254, 2004.

JAISHANKAR, M.; TSETEN, T, ANBALAGAN, N.; MATHEW, B. B.; BEEREGOWDA, K. N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary Toxicology**. v. 7, n. 2, p. 60-72, 2014.

JARDIM, I. C. S. F.; ANDRADE, J. A.; QUEIROZ, S. C. N. Residues of pesticides in food: a global environmental preoccupation – Focussing on apples. **Química Nova**. v. 32, n. 4, 996-1012, 2009.

JIAN, L.; GOESSLER, W.; IRGOLIC, K. J. Mercury determination with ICP-MS: signal suppression by acids. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**. v. 366, p. 48-53, 2000.

KENDUZLER, E.; ATES, M.; ARSLAN, Z.; MCHENRY, M.; TCHOUNWOU, P. B. Determination of mercury in fish otoliths by cold vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry (CVG-ICP-MS). **Talanta**. v. 93, p. 404-410, 2012.

KRUG, F. J. *et al.* **Métodos de preparo de amostras para análise elementar**. 2. ed. São Paulo: EditSBQ, 2016. 572 p.

LOVAKOVIC, B. T.; LAZARUS, M.; KARACONJI, I. B.; JURICA, K.; SEMREN, T. Z.; LUSIC, D.; BRAJENOVIC, N.; PELAIC, Z.; PIZENT, A. Multi-elemental composition and antioxidant properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey from the coastal region of Croatia: risk-benefit analysis. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 45, p. 85-92, 2018.

MACIEL, J. V.; KNORR, C. L.; FLORES, E. M. M.; MULLER, E. I.; MESKO, M. F.; PRIMEL, E. G.; DUARTE, F. A. Feasibility of microwave-induced combustion for trace element determination in *Engraulis anchoita* by ICP-MS. **Food Chemistry**. v. 145, p. 927-931, 2014.

MAHBUB, K. R.; KRISHNAN, K.; NAIDU, R.; ANDREWS, S.; MEGHARAJ, M. Mercury toxicity to terrestrial biota. **Ecological Indicators**. v. 74, p. 451-462, 2017.

MELI, M. A.; DESIDERI, D.; RESELLI, C.; BENEDETTI, C.; DEFUZI, L. Essential and toxic elements in honey from a region of central Italy. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**. v. 78, n. 10, p. 617-627, 2015.

MESSAOUDI, M.; BEEGA, S. Application of INAA technique for analysis of essential trace and toxic elements in medicinal seeds of *Carum carvi* L. & *Foeniculum vul-gare* Mill. used in Algeria. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**. v. 9, p. 39-45, 2018.

MESKO, M. F.; MELLO, P. A.; BIZZI, C. A.; DRESSLER, V. L.; KNAPP, G.; FLORES, E. M. M. Iodine determination in food by inductively coupled plasma mass spectrometry after digestion by microwave-induced combustion. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 398, p. 1125-1131, 2010.

MIZRAHI, A.; LENSKEY, Y. **Bee products properties, applications, and apitherapy**. Israel: Springer Science+Business Media, LLC, 1996. 261 p.

MONIRUZZAMAN, M.; CHOWDHURY, M. A. Z.; RAHMAN, M. A.; SULAIMAN, S. A. Determination of mineral, trace element and pesticide levels in honey samples originating from different regions of Malaysia compared to manuka honey. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2014, p. 1-10, 2014.

MULLER, A. L. H.; MULLER, C. C.; LYRA, F.; MELLO, P. A.; MESKO, M. F.; MULLER, E. I.; FLORES, E. M. M. Determination of toxic elements in nuts by inductively coupled plasma mass spectrometry after microwave-induced combustion. **Food Analytical Methods**. v. 6, p. 258-264, 2013.

NELMS, S. M. **Inductively coupled plasma mass spectrometry handbook**. Nova Jersey: USA: Blackwell Publishing Ltd, 2005. 485 p.

OLIVEIRA, F. A.; ABREU, A. T.; NASCIMENTO, N. O.; FROES-SILVA, R. E. S.; ANTONINI, Y.; NALINI, H. A.; LENA, J. C. 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.

OLIVEIRA, H. R.; MESKO, M. F.; VALE, M. G. R.; SILVEIRA, C. A. P.; PICOLOTO, R. S.; BECKER, E. M. Development of methods for the determination of cadmium and thallium in oil shale by-products with graphite furnace atomic absorption spectrometry using direct analysis. **Microchemical Journal**. v. 116, p. 55-61, 2014.

ORSO, D.; FLORIANO, L.; RIBEIRO, L. C.; BANDEIRA, N. M. G.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R. Simultaneous determination of multiclass pesticides and antibiotics in honey samples based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Analytical Methods**. v. 9, p. 1638-1653, 2015.

PEREIRA, E. R.; SOARES, B. M.; VIEIRA, J. P.; MAI, A. C. G.; PICOLOTO, R. S.; MULLER, E. I.; FLORES, E. M. M.; DUARTE, F. A. Assesment of inorganic contaminants in golden mussel (*Limnoperna fortunei*) in Southern Brazil. **Journal of The Brazilian Chemical Society**. v. 23, p. 846-853, 2012.

PETTINE, M.; CASENTINI, B.; MASTROIANNI, D.; CAPRI, S. Dissolved inorganic carbon effect in the determination of arsenic and chromium in mineral waters by inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**. v. 599. n. 2. p. 191-198, 2007.

PICOLOTO, R. S.; ENDERS, M. S. P.; DONEDA, M.; IOP, G. D.; DUARTE, F. A.; BARIN, J. S.; KRUF, F. J.; FLORES, E. M. M. An in situ pre-concentration method for fluorine determination based on successive digestions by microwave-induced combustion. **Talanta**. v. 194, n. 1, p. 314-319, 2018.

PLOTKA-WASYLKA, J.; SZCZEPAŃZKA, N.; LA GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 73, p. 19-38, 2015.

POHL, P.; BIELAWSKA-POHL, A.; DZIMITROWICZ, A.; JAMROZ, P.; WELNA, M.; LESNIEWICZ, A.; SZYMCZYCHA-MADEJA, A. Recent achievements in element analysis of bee honeys by atomic and mass spectrometry methods. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 93, p. 67-77, 2017.

QUINTO, M.; MIEDDICO, O.; SPADACCINO, G.; PAGLIA, G.; MANGIACOTTI, M.; LI, D.; CENTONZE, D.; CHIARAVALLE, E. Characterization, chemometric evaluation, and human health-related aspects of essential and toxic elements in Italian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 23, p. 25374-25384, 2016.

RASHED, M. N.; SOLTAN, M. E. Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral bee honeys. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 17, p. 725-735, 2004.

RODRIGUES, C. S.; FERASSO, D. C.; PRESTES, O. D.; ZANELLA, R.; GRANDO, R. C.; TREICHEL, H.; COELHO, G. C.; MOSSI, A. J. Quality of meliponinae honey: pesticides residues, pollen identity, and microbiological profiles. **Wiley Periodicals**. v. 27, p. 39-45, 2018.

ROSA, F. C.; DUARTE, F. A.; PANIZ, J. N. G.; HEIDRICH, G. M.; NUNES, M. A. G.; FLORES, E. M. M.; DRESSLER, V. L. Dispersive liquid-liquid microextraction: an efficient approach for the extraction of Cd and Pb from honey and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**. v. 123, p. 211-217, 2015.

RU, Q.; FENG, Q.; HE, J. Risk assessment of heavy metals in honey consumed in Zhejiang province, southeastern China. **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 256-262, 2013.

SATTAR, A.; XIE, S.; HAFEEZ, M. A.; WANG, X.; HUSSAIN, H. I.; IQBAL, Z.; PAN, Y.; IQBAL, M.; SHABBIR, M. A.; YUAN, Z. Metabolism and toxicity of arsenicals in mammals. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 48, p. 214-224, 2016.

SHARMA V. K.; SOHN, M. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. **Environment International**. v. 35, n. 4, p. 743-759, 2009.

SILICI, S.; ULUOZLU, O. D.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Honeybees and honey as monitors for heavy metal contamination near thermal power plants in Mugla, Turkey. **Toxicology and Industrial Health**. v. 32, p. 507-516, 2013.

SPIRIC, D.; CIRIC, J. DORDEVIC, V.; DORDEVIC, V.; NIKOLIC, D.; JANKOVIC, S.; NIKOLIC, A.; PETROVIC, Z.; KATANIC, N.; TEODOROVIC, V. Toxic and essential element concentrations in different honey types. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**. v. 99, n. 5, p. 474-485, 2019a.

SPIRIC, D.; CIRIC, J.; TEODOROVIC, V.; NIKOLIC, D.; NIKOLIC, A.; RADICEVIC, T.; JANKOVIC, S.; Trace elements and heavy metals in multifloral honeys from Serbia. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. v. 333, p. 1-6, 2019b.

STANKOVSKA, E.; STAFILOV, T.; SAJN, R. Monitoring of trace elements in honey from the Republic of Macedonia by atomic absorption spectrometry. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 142, p. 117-126, 2008.

STECKA, H.; JEDRYCZKO, D.; POHL, P.; WELNA, M. Pre-concentration of traces of cadmium, cobalt, nickel and lead in natural honeys by solid phase extraction followed by their determination using flame atomic absorption spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 25, n. 2, p. 331-339, 2014.

STEWART, I. I.; OLESKI, J. W. Transient acid effects in inductively coupled plasma optical emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**. v. 13, p. 843-854, 1998.

SYVERSEN, T.; KAUR, P. The toxicology of mercury and its compounds. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v. 26, n. 4, p. 215-226, 2012.

SODHI K. K.; KUMAR, M.; AGRAWAL, P. K.; SINGH, D. K. Perspectives on arsenic toxicity, carcinogenicity and its systemic remediation strategies. **Environmental Technology & Innovation**. v. 16, p. 1-16, 2019.

TAYLOR, H. E. **Inductively coupled plasma-mass spectrometry**. Massachusetts: EUA: Academic Press, 2000. 294 p.

TETTE, P. A. S.; GUIRDI, L. R.; GLÓRIA, M. B. A.; FERNANDES, C. Pesticides in honey: a review on chromatographic analytical methods. **Talanta**. v. 149, p. 124-141, 2015.

WANG, J.; KLIKS, M. M.; JUN, S.; LI, Q. X. Residues of organochlorine pesticides in honeys from different geographic regions. **Food Research International**. v. 43, n. 9, p. 2329-2334, 2010.

WOHLMANN, W.; NEVES, V. M.; HEIDRICH, G. M.; SILVA, J. S.; DA COSTA, A. B.; PANIZ, J. N. G.; DRESSLER, V. L. Development of an electrothermal vaporizer for direct mercury determination in soil by inductively-coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**. v. 149, p. 222-228, 2018.

YOUSEFSANI B. S.; POURAHMAD, J.; HOSSEINZADEH, H. The mechanism of protective effect of crocin against liver mitochondrial toxicity caused by arsenic III. **Toxicology Mechanisms and Methods**. v. 28, n. 2, p. 105-114, 2018.

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

ZHANG, H.; REYNOLDS, M. Cadmium exposure in living organisms: A short review. **Science of The Total Environment**. v. 678, p. 761-767, 2019.

ZHOU, J.; SUO, Z.; ZHAO, P.; CHENG, N.; GAO, H.; ZHAO, J.; CAO, W. Jujube honey from China: physicochemical characteristics and mineral contents. **Journal of Food Science**. v. 78, n. 3, p. 387-394, 2013.