

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Heulla Pereira Vieira

**Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de arsênio,
cádmio, cobre, mercúrio e chumbo em mel.**

Belo Horizonte
2012

UFMG/ICEx/DQ.929^a

T.415^a

Heulla Pereira Vieira

**Desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de arsênio,
cádmio, cobre, mercúrio e chumbo em mel.**

Tese apresentada ao
Departamento de Química do
Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial
para a obtenção do grau de
Doutor em Ciências - Química.

Belo Horizonte

2012

Vieira, Heulla Pereira
V658d Desenvolvimento de métodos analíticos para
2012 determinação de arsênio, cádmio, cobre, mercúrio e
T chumbo em mel / Heulla Pereira Vieira. 2012.
xv, 123 f. : il.

Orientadora: Cláudia Carvalhinho Windmöller.
Coorientadora: Clésia Cristina Nascentes.

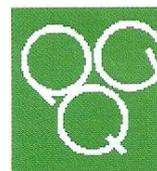
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas
Gerais. Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses 2. Mel - Teses 3.
Espectroscopia de absorção atômica - Teses 4.
Segurança alimentar - Teses 5. Chumbo - Teses I.
Windmöller, Cláudia Carvalhinho, Orientadora II.
Nascentes, Clésia Cristina, Coorientadora III. Título.

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



**"Desenvolvimento de Métodos Analíticos para Determinação de Arsênio,
Cádmio, Cobre, Mercúrio e Chumbo em Mel."**

Heulla Pereira Vieira

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Cláudia Carvalhinho Windmöller - Orientadora
UFMG

Prof. Sérgio Luis Costa Ferreira
Campus da UFBA, Instituto de Química

Profa. Solange Cadore
UNICAMP

Profa. Leticia Malta Costa
UFMG

Prof. Marcelo Martins de Sena
UFMG

Belo Horizonte, 10 de dezembro de 2012.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em especial ao Departamento de Química (DQ), pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) pelo apoio financeiro.

Aos laboratórios parceiros: Grupo de Espectrometria Atômica e Preparo de Amostras (GEAPA) da UFMG, Laboratório de Química Agropecuária do Instituto Mineiro de Agropecuária (LQA/IMA, Contagem, MG) e Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/MAPA, Pedro Leopoldo, MG).

Às professoras Cláudia C. Windmüller e Clésia C. Nascentes, pelo incentivo e orientação, que muito contribuíram para elaboração deste trabalho.

Aos professores do DQ/UFMG, Marcelo Martins de Sena, Letícia Malta Costa e Welington Ferreira Magalhães por aceitarem participar da comissão examinadora do exame de qualificação e pelas valiosas sugestões para melhoria do trabalho.

Ao Amarildo Germano e Paulo C. P. Lara do LANAGRO/MAPA pela colaboração nas análises por ICP-MS que foram fundamentais para validação dos métodos.

Aos funcionários do DQ/UFMG: Anderson, Kátia, Tatiane e Paulete pela atenção e disponibilidade.

A todos os colegas do laboratório do LQA/IMA, em especial: Jairo, Sayonara, Ilka, Lilian, Newton, Paula e estagiários Aline, Ricardo e Mariana pelo alegre convívio e pela inesquecível amizade.

Aos colegas do GEAPA: Leonel, Frank, Silvéria, Patrícia, Luciano, Walter, Renato, Reginaldo, Karina, Fabiana e tantos outros, pela amizade e colaboração.

A todos os meus familiares pelo suporte e compreensão, em especial, Vilmar, Terezinha, Sheilla e Ronald que sempre torceram e pediram a Deus por mim.

Enfim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

Neste trabalho foram desenvolvidos métodos para análise de metais importantes em termos de toxicidade, como Hg, As, Pb, Cu e Cd em mel, de forma que simplificassem alguns métodos em uso atualmente.

Dois métodos analíticos empregando espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CVAAS) e analisador direto de mercúrio (DMA) foram otimizados e validados para determinar Hg em mel. O método empregando CVAAS consistiu no preparo de soluções contendo 5,0% (m/v) de mel, 4,0% (v/v) de H₂O₂ e 6,0% (v/v) de HNO₃. A determinação foi feita utilizando 0,6% (m/v) de NaBH₄ em 0,5% (m/v) de NaOH e 6,0 mol/L de HCl. No método empregando DMA, as medidas foram feitas usando até 100 mg de amostra de mel, sem qualquer preparo. Os tempos de secagem e decomposição e a temperatura de secagem foram otimizados.

No desenvolvimento do usando HGAAS para análise de As em amostras de mel, os fatores estudados foram: concentrações de NaBH₄ e HCl, agente pré-redutor, tipo de diluente e o tempo de contato com a amostra. As condições otimizadas foram 5,0 % (m/v) de amostra, preparada em 1,3 mol/L de HCl e 1,0 % (m/v) de SC(NH₂)₂. As soluções utilizadas durante a geração do hidreto foram 0,85 % (m/v) de NaBH₄ e 2,5 mol/L de HCl.

Após as validações, os métodos foram utilizados para quantificar Hg e As em 35 amostras de mel, coletadas em várias cidades do estado de Minas Gerais, Brasil. Todas as amostras de mel apresentaram concentrações de Hg menores que 1,0 µg/kg e As inferiores a 20 µg/kg. As novas metodologias propostas foram realizadas com amostragem direta, sem prévio tratamento da amostra, sendo consideradas mais eficientes, rápidas, com um baixo consumo de reagentes e sem problemas de perdas por volatilização dos elementos de interesse.

Com o propósito de determinar Cd, Cu e Pb em mel, foi desenvolvido um método de análise utilizando espectrometria de absorção atômica no modo sequencial rápido com forno tubular na chama e aerossol térmico (TS-FF-FS-AAS). Durante o desenvolvimento do método foram estudados os efeitos do comprimento do tubo de níquel e a quantidade de furos, fluxo da amostra e o modo de aquisição de sinal. Em seguida, foram estudados os efeitos dos fatores tempo e temperatura de extração e o uso dos reagentes HNO₃, HCl e H₂O₂, utilizando-se planejamentos fatoriais e composto

central. As condições otimizadas foram: preparo de 50 mL de solução contendo 1,0 g de amostra, digerida em bloco digestor, utilizando 2,0 mL de HNO₃ e 1,0 mL de H₂O₂, até a temperatura de 128 ± 5 °C por 30 minutos. Após a validação, os limites de detecção obtidos foram 0,010 mg/kg (Cd), 1,0 mg/kg (Cu) e 0,10 mg/kg (Pb), confirmando a adequação ao propósito de uso do TS-FF-FS-AAS para determinação de Cd, Cu e Pb em mel em atendimento aos limites máximos regulamentados pela legislação brasileira (1998) e Mercado Comum do Sul (MERCOSUL, 2011). Nas 35 amostras de mel analisadas, foi possível detectar Cu em uma amostra, cuja concentração foi 1,1 mg/kg, e Pb em duas amostras: 0,14 mg/kg e 0,17 mg/kg. Em relação ao Cd, todas as amostras apresentaram concentração menor que 0,010 mg/kg. Cabe destacar que houve um ganho de sensibilidade com o uso do TS-FF-FS-AAS de 67,2; 3,4 e 72,8 vezes para o Cd, Cu e Pb, respectivamente, em relação ao FAAS. A utilização do TS-FF-FS-AAS contribuiu para que houvesse um ganho de tempo de três vezes em relação aos equipamentos que utilizam o TS-FF-AAS de forma monoelementar, reduzindo os custos dessa análise.

Palavras-chave: mel, segurança alimentar, DMA, CVAAS, HGAAS, TS-FF-AAS.

ABSTRACT

In this work, some methods were developed for analysis of metals of significant toxicity, such as mercury, arsenic, lead, copper and cadmium in honey, capable of simplifying some methods currently in use.

Two analytical methods employing Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry (CVAAS) and a Direct Mercury Analyzer (DMA) were optimized and validated to determine the Hg concentration in honey samples. The CVAAS method consisted of preparing solutions containing 5.0% (w/v) honey, 4.0% (v/v) H₂O₂ and 6.0% (v/v) HNO₃. Hg determination was accomplished by treatment with 0.6% (w/v) NaBH₄ in 0.5% (w/v) NaOH and 6.0 mol/L HCl. In the DMA method, measurements were made using up to 100 mg of honey sample without any prior treatment. The drying and decomposition times along with drying temperature were optimized.

In the development of the method for determination of arsenic in samples of honey, the variables studied in the optimization of the method were NaBH₄ concentration, pre-reducing agent, HCl concentration, the diluents' type and contact time with the sample. The optimized conditions were 5.0 % (w/v) of sample prepared in 1.3 mol/L HCl and 1.0 % (w/v) SC(NH₂)₂. The hydride generation solutions were 0.85 % (w/v) NaBH₄ and 2.5 mol/L HCl.

After validation, the methods were used to quantify Hg in 35 honey samples, collected from several cities in Minas Gerais, Brazil. All honey samples showed Hg concentrations below 1.0 µg/kg and As concentrations below 20 µg/kg. The proposed methodologies do not require a pre-treatment of digestion of the sample, so they can be considered more efficient, fast, with low cost reagents and without problems of volatility losses of the elements of interest.

A method using thermospray flame furnace fast sequential atomic absorption spectrometry (TS-FF-FS-AAS) was developed in order to determining Cd, Cu and Pb in honey. During the development of the method, the effects: nickel tube length and quantity of holes, flow of the sample and signal acquisition mode, were studied. Then, the effects of time and temperature of extraction and the reagents HNO₃, HCl and H₂O₂ were studied using factorial and central composite designs. The optimized conditions were: prepare of 50 mL of solution containing 1.0 g of sample, 2.0 mL of HNO₃ and 1.0 mL of H₂O₂, digested in a block with heating until the temperature of 128 ± 5 °C for 30 minutes. After

validation, the limits of detection were 0.010 mg/kg (Cd), 1.0 mg/kg (Cu) and 0.10 mg/kg (Pb), meeting the intended purpose of using TS-FF-FS-AAS for determination of Cd, Cu and Pb in honey in attendance to the maximum limits required by Brazilian legislation (1998) and Common Market of the South (MERCOSUR, 2011). For the 35 studied samples, it was possible to determine above the limits of detection: Cu in one sample, obtaining 1.1 mg/kg, and lead in two samples: 0.14 mg/kg and 0.17 mg/kg. For cadmium, all samples had concentrations below 0.010 mg/kg. It is noteworthy that there was a gain in sensitivity with the use of TS-FF-FS-AAS of 67.2, 3.4 and 72.8 times for the Cd, Cu and Pb, respectively, relative to FAAS. The TS-FF-FS-AAS had contributed to a gain of time of thrice, in relation to mono-element equipment (TS-FF-AAS), reducing the costs of this analysis.

Key words: honey, food safety, DMA, CVAAS, HGAAS, TS-FF-AAS.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 01. Esquema de funcionamento do acessório de geração de hidretos, modelo VGA 77, da Varian (Austrália). | 13 |
| Figura 02. Esquema representando o funcionamento do DMA-80. | 15 |
| Figura 03. Esquema representando o funcionamento do TS-FF-AAS. | 16 |
| Figura 04. Alguns municípios de procedência das amostras de mel estudadas. | 21 |
| Figura 05. Suporte metálico contendo o tubo de níquel e capilar de cerâmica, aquecidos pela chama composta por ar e acetileno (à esquerda). E foto geral do equipamento de absorção atômica com chama (SpectrAA 220, Varian), no qual a amostra é transportada em um tubo de policloreto de vinila com auxílio de um bomba peristáltica do sistema de geração de hidretos (VGA 77, Varian) e analisada de forma sequencial com o auxílio das lâmpadas de catodo oco (LCO) de Cd, Cu e Pb (à direita). | 33 |
| Figura 06. Gráfico de Pareto obtido no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para determinação de Hg em mel por CVAAS. | 48 |
| Figura 07. Superfície de resposta obtida na otimização das concentrações de H_2O_2 e HNO_3 para determinação de Hg em mel por CVAAS, para a concentração de amostra de 5,0 % (m/v). | 53 |
| Figura 08. Curvas de calibração de Hg sem a matriz (a) e com adição de mel (b) e (c). Gráficos dos resíduos da calibração obtidos para o método de determinação Hg sem a matriz (d) e com adição de mel (e) e (f). | 56 |
| Figura 09. Gráficos de probabilidade normal para as três curvas de Hg sem a matriz (a) e com adição de mel (b) e (c). E gráficos de Durbin-Watson das três curvas de Hg sem a matriz (d) e com adição de mel (e) e (f). Onde: e_i = resíduo da regressão, q_i = valor normal esperado. | 58 |
| Figura 10. Gráficos representando a homoscedasticidade das variâncias para as três curvas de Hg sem a matriz (a) e com adição de mel (b) e (c) nos grupos 1 e 2. Onde: Grupo 1 = 2,5; 5,0 e 15,0 $\mu\text{g/L}$ e Grupo 2 = 25,0; 50,0 e 75,0 $\mu\text{g/L}$ | 59 |
| Figura 11. Superfície de resposta obtida na otimização das condições para determinação de Hg por DMA em mel, no qual somente o aumento da temperatura de secagem foi significativo e positivo. | 63 |
| Figura 12. Curvas de calibração de Hg sem a matriz (a) e com adição de mel (b) e (c). Gráficos dos resíduos da calibração obtidos para o método de determinação Hg sem a matriz (d) e com adição de mel (e) e (f) utilizando DMA. | 65 |
| Figura 13. Gráficos de probabilidade normal para as três curvas de Hg sem a matriz (a) e com adição de mel (b) e (c). E gráficos de Durbin-Watson das três curvas de Hg sem a matriz (d) e com adição de mel (e) e (f) utilizando DMA. Onde: e_i = resíduo da regressão, q_i = valor normal esperado. | 67 |

| | |
|--|----|
| Figura 14. Gráficos representando a homoscedasticidade das variâncias para as três curvas de Hg sem a matriz (a) e com adição de mel (b) e (c) nos grupos 1 e 2 utilizando DMA. Onde: Grupo 1 = 2,5; 10,0 e 20,0 µg/kg e Grupo 2 = 30,0; 40,0 e 50,0 µg/kg..... | 68 |
| Figura 15. Gráfico de Pareto obtido no planejamento fatorial completo 2 ⁴ para determinação de As em mel por HGAAS. | 73 |
| Figura 16. Superfície de resposta obtida na otimização das condições para determinação de As em mel por HGAAS, na qual foram avaliadas diferentes concentrações de HCl e SC(NH ₂) ₂ , mantendo a concentração de NaBH ₄ fixa em 0,85 % (m/v)..... | 75 |
| Figura 17. Curvas de calibração de As ⁵⁺ sem a matriz (a) na faixa de 1,0 µg/L a 40,0 µg/L e (b) na faixa de 1,0 µg/L a 20,0 µg/L. Gráficos dos resíduos da calibração (e _i) obtidos para o método de determinação As sem a matriz (c) na faixa de 1,0 µg/L a 40,0 µg/L e (d) na faixa de 1,0 µg/L a 20,0 µg/L..... | 78 |
| Figura 18. (a) Curva de calibração de As ⁵⁺ sem a matriz na faixa de 1,0 µg/L a 40,0 µg/L e gráfico dos resíduos da calibração obtidos para o método de determinação As sem a matriz (c) na faixa de 1,0 µg/L a 40,0 µg/L, utilizando ajuste quadrático. | 79 |
| Figura 19. Gráfico obtido após leitura de soluções contendo Cd, Cu e Pb após leituras por TS-FF-FS-AAS, com fluxos de amostragem de: 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8 mL/min. | 85 |
| Figura 20. Gráfico obtido após leitura de soluções contendo Cd, Pb e Cu, nos modos: altura de pico, integração e área de pico, com aquisição de sinal por 3 s..... | 86 |
| Figura 21. Gráfico de Pareto obtido no planejamento fatorial completo 2 ⁴ para determinação de: (a) Cd, (b) Cu e (c) Pb em mel por TS-FF-FS-AAS. | 89 |
| Figura 22. Superfícies de resposta obtidas na otimização utilizando CCD para determinação de (a) Cd, (b) Cu e (c) Pb em mel por TS-FF-FS-AAS. As figuras foram construídas fixando-se a temperatura no nível +1 (a e b) e o tempo no nível 0 (c). | 93 |
| Figura 23. Curvas de calibração de: (a) Cd, (b) Cu e (c) Pb sem a matriz. Gráficos dos resíduos da calibração obtidos para o método de determinação (d) Cd, (e) Cu e (f) Pb sem a matriz utilizando TS-FF-FS-AAS..... | 98 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 01. Concentrações de As, Cd, Cu, Pb e Hg ($\mu\text{g}/\text{kg}$) determinados em amostras de mel provenientes de diferentes países..... | 8 |
| Tabela 02. Procedência, data de fabricação, florada típica e quantidade de amostras de mel coletadas. | 22 |
| Tabela 03. Programa de aquecimento utilizado para decomposição das amostras de mel em forno de micro-ondas ETHOS. | 26 |
| Tabela 04. Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS. | 27 |
| Tabela 05. Fatores e níveis estudados no planejamento CCD para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS. | 28 |
| Tabela 06. Fatores e níveis estudados no planejamento CCD empregando diluente para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS. | 28 |
| Tabela 07. Fatores e níveis estudados no planejamento CCD para otimização do método de determinação de Hg por DMA. | 30 |
| Tabela 08. Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial para otimização do método de determinação de As por HGAAS. | 31 |
| Tabela 09. Fatores e níveis estudados no planejamento CCD para otimização do método de determinação de As por HGAAS. | 32 |
| Tabela 10. Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial 2^4 para otimização do método de determinação de Cd, Cu e Pb por TS-FF-FS-AAS. | 36 |
| Tabela 11. Fatores e níveis estudados no planejamento CCD para otimização do método de determinação de Cd, Cu e Pb por TS-FF-FS-AAS. | 37 |
| Tabela 12. Programa de aquecimento utilizado para decomposição das amostras de mel em forno de micro-ondas Anton-Paar. | 41 |
| Tabela 13. Concentração \pm desvio padrão de Mg, Ca, Rb, Zn, Mn, Fe, Cu, Sr e Bi em mel produzido em diferentes municípios do estado de Minas Gerais. | 43 |
| Tabela 14. Concentração \pm desvio padrão de Ba, Cr, Mo, Pb, Li, Cd, As, Cs e Co em mel produzido em diferentes municípios do estado de Minas Gerais. | 44 |
| Tabela 15. Porcentagens de recuperação média (%R), resposta instrumental e desvios padrão (s) obtidos nos experimentos do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS. | 47 |
| Tabela 16. Porcentagens de recuperação (%R), desvios padrão (s) e resposta instrumental, obtidos nos ensaios do CCD para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS. ... | 49 |

| | |
|---|----|
| Tabela 17. Porcentagem de recuperação média (\pm estimativa do erro experimental) para os efeitos de cada fator e interações entre os fatores e o valor de p , provenientes dos experimentos do planejamento CCD para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS..... | 50 |
| Tabela 18. Porcentagens de recuperação média (%R), desvios padrão (s) e resposta instrumental (em absorvância), obtidas nos ensaios do CCD para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS..... | 51 |
| Tabela 19. Resposta média (\pm estimativa do erro experimental) para os efeitos de cada fator, interações entre os fatores e o valor da probabilidade (p), provenientes dos experimentos do planejamento CCD para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS..... | 52 |
| Tabela 20. Recuperação \pm desvio padrão em função do tempo de extração e concentração de HCl..... | 54 |
| Tabela 21. Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise de variância da regressão e desvio da linearidade, para as três curvas de calibração do método de determinação Hg sem a matriz e com adição de mel (1) e (2). | 57 |
| Tabela 22. Resumo dos procedimentos recomendados para estimativa do LD e LQ e resultados obtidos para o método de determinação Hg por CVAAS..... | 61 |
| Tabela 23. Porcentagem de recuperação (%R) e DPR de repetibilidade ou precisão intermediária para amostras de mel contaminadas com Hg em três concentrações diferentes e analisadas por CVAAS..... | 62 |
| Tabela 24. Programa de aquecimento otimizado no DMA-80 para amostras de mel. | 64 |
| Tabela 25. Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise de variância da regressão e desvio da linearidade, para as três curvas de calibração do método de determinação Hg sem a matriz e com adição de mel (1) e (2) utilizando DMA..... | 66 |
| Tabela 26. Porcentagens de recuperação média (%R) e DPR (%) obtidos em diferentes níveis de concentração de Hg utilizando DMA. | 69 |
| Tabela 27. Resposta do instrumento e desvios padrão (em absorvância) obtidos nos experimentos do planejamento fatorial 2^4 para amostras de mel adicionadas com As..... | 72 |
| Tabela 28. Respostas do instrumento, em absorvância, obtidas nos ensaios do planejamento CCD para amostras de mel adicionadas com As. | 74 |
| Tabela 29. Resposta média (\pm estimativa do erro experimental), efeitos de cada fator e interações entre os fatores e o valor de p , provenientes dos experimentos do planejamento CCD para amostras de mel adicionadas com As. | 75 |
| Tabela 30. Porcentagem de recuperação (%R) \pm DPR (%) para determinação de 20,0 $\mu\text{g/L}$ de As em soluções contendo diferentes concentrações de amostra de mel..... | 76 |
| Tabela 31. Resposta instrumental \pm desvio padrão (em absorvância) para as curvas preparadas com e sem adição de matriz e As. | 79 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 32. Porcentagem de recuperação (%R) \pm DPR (%) de repetibilidade e precisão intermediária para amostras de mel contaminadas com As ⁵⁺ e As ³⁺ em concentrações diferentes. | 80 |
| Tabela 33. Porcentagem de recuperação (%R) \pm DPR (%) de repetibilidade em diferentes níveis de concentração de As. | 81 |
| Tabela 34. Resultados obtidos (em absorvância \pm desvio padrão) na avaliação do comprimento do tubo de níquel e da quantidade de furos, com furos posicionados para baixo e para cima, após leitura de soluções padrão contendo Cd, Cu e Pb por TS-FF-FS-AAS. | 84 |
| Tabela 35. Resultados obtidos (em absorvância) e DPR para as curvas de calibração contendo Cd, Cu e Pb, após as leituras feitas por TS-FF-FS-AAS utilizando integração de área por 3 s. ... | 87 |
| Tabela 36. Porcentagem de recuperação (%R) e desvios padrão (s) obtidos nos experimentos do planejamento fatorial 2 ⁴ para amostras de mel com Cd, Cu e Pb. | 90 |
| Tabela 37. Porcentagens de recuperação (%R) e desvios padrão (s) obtidos nos ensaios do planejamento CCD para amostras de mel contaminadas com Cd, Cu e Pb. | 91 |
| Tabela 38. Porcentagem de recuperação média (\pm estimativa do erro experimental) para os efeitos de cada fator e interações entre os fatores, provenientes dos experimentos do planejamento CCD para amostras de mel contaminadas com Cd, Cu e Pb. | 92 |
| Tabela 39. Valores críticos obtidos nos experimentos do planejamento CCD para amostras de mel contaminadas com Cd, Cu e Pb. | 94 |
| Tabela 40. Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise de variância da regressão e desvio da linearidade, para as três curvas de calibração do método de determinação Cd sem e com adição de mel (1) e (2). | 95 |
| Tabela 41. Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise de variância da regressão e desvio da linearidade, para as três curvas de calibração do método de determinação Cu sem e com adição de mel (1) e (2). | 96 |
| Tabela 42. Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise de variância da regressão e desvio da linearidade, para as três curvas de calibração do método de determinação Pb sem e com adição de mel (1) e (2). | 97 |
| Tabela 43. Porcentagem de recuperação (%) e DPR (%) de repetibilidade ou precisão intermediária em diferentes níveis de concentração de Cd, Cu e Pb. | 99 |
| Tabela 44. Comparação entre o desempenho do TS-FF-FS-AAS e FS-FAAS para determinação de Cd, Cu e Pb. | 101 |
| Tabela 45. Comparação entre os resultados obtidos na determinação de Cu e Pb em mel por TS-FF-FS-AAS e ICP-MS. | 101 |

LISTA DE ACRÔNIMOS

| | |
|----------|--|
| α | Intercepto |
| β | Inclinação da curva de calibração |
| ABNT | Associação Brasileira de Normas Técnicas |
| CCD | Planejamento Composto Central (<i>Central Composite Design</i>) |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| CV | Coefficiente de variação |
| CVAAS | Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Vapor Frio (<i>Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry</i>) |
| d | Estatística de Durbin-Watson |
| DMA | Analisador Direto de Mercúrio (<i>Direct Mercury Analyzer</i>) |
| DPR | Desvio padrão relativo |
| DQ | Departamento de Química da UFMG |
| e_i | Resíduo da regressão |
| EC | Comissão Europeia (<i>European Commission</i>) |
| F | Estatística F de Snedecor |
| FAAS | Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (<i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>) |
| FS-FAAS | Espectrometria de Absorção Atômica com Chama no modo sequencial rápido (<i>Fast Sequential Atomic Absorption Spectrometry</i>) |
| GEAPA | Grupo de Espectrometria Atômica e Preparo de Amostras |
| GFAAS | Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (<i>Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>) |
| HGAAS | Espectrometria de Absorção Atômica com Geração de Hidretos (<i>Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry</i>) |
| ICP-MS | Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>) |
| ICP-OES | Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>) |
| IEC | <i>International Electrotechnical Commission</i> |
| IMA | Instituto Mineiro de Agropecuária |
| INMETRO | Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial |
| ISO | <i>International Organization for Standardization</i> |

| | |
|--------------|--|
| LANAGRO | Laboratório Nacional Agropecuário |
| J_{ei} | Resíduo padronizado de Jacknife |
| LCO | Lâmpada de Catodo Oco |
| LD | Limite de detecção |
| LQ | Limite de quantificação |
| LQA | Laboratório de Química Agropecuária |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MERCOSUL | Mercado Comum do Sul |
| MG | Minas Gerais |
| MMQO | Método dos Mínimos Quadrados Ordinários |
| n | Número de replicatas |
| NBR | Norma Brasileira |
| p | Probabilidade |
| q | Valor normal esperado |
| s | Desvio padrão |
| R | Coefficiente de correlação de Ryan-Joiner |
| R^2 | Coefficiente de determinação |
| %R | Porcentagens de recuperação |
| t | Abscissa da distribuição de <i>Student</i> |
| t_L | Estatística t de Levene |
| TS-FF-AAS | Espectrometria de Absorção Atômica com Forno tubular na Chama e Aerossol Térmico (<i>Thermospray Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>) |
| TS-FF-FS-AAS | Espectrometria de Absorção Atômica no modo sequencial rápido com Forno tubular na Chama e Aerossol Térmico (<i>Thermospray Flame Furnace Fast Sequential Atomic Absorption Spectrometry</i>) |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| x | Média |
| X | Concentração |
| Y | Resposta instrumental |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 | OBJETIVOS | 4 |
| 2.1 | Objetivo geral..... | 4 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 4 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 3.1 | Ocorrência de contaminantes inorgânicos no estado de Minas Gerais | 5 |
| 3.2 | Contaminantes inorgânicos em alimentos | 6 |
| 3.3 | Métodos de preparo da amostra e quantificação de contaminantes inorgânicos em alimentos.. | 10 |
| 3.4 | Validação | 17 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 21 |
| 4.1 | Amostras..... | 21 |
| 4.2 | Reagentes e materiais | 23 |
| 4.3 | Equipamentos utilizados | 24 |
| 4.4 | Preparo de soluções padrão de As, Cd, Cu, Hg e Pb..... | 25 |
| 4.5 | Preparo de solução de trabalho contendo Mg, Ca, Rb, Zn, Mn, Fe, Cu, Sr, Bi, Ba, Cr, Mo, Pb, Li, Hg, As, Cs, Co, Na, Al, V, Ni, Be, Ga, Ag, Cd, In, Ti e K para uso em ICP-MS..... | 25 |
| 4.6 | Avaliação da composição das amostras utilizando um método de referência | 25 |
| 4.7 | Otimização do método analítico para determinação direta de Hg em mel empregando a CVAAS..... | 26 |
| 4.7.1 | Planejamento fatorial fracionário | 27 |
| 4.7.2 | Planejamento composto central | 27 |
| 4.7.3 | Planejamento composto central empregando diluente | 28 |
| 4.7.4 | Otimização do tempo de contato e concentração de HCl | 29 |
| 4.8 | Otimização do método de determinação de Hg em mel utilizando DMA..... | 29 |
| 4.9 | Otimização de método analítico para determinação direta de As total em mel empregando HGAAS..... | 31 |
| 4.9.1 | Planejamento fatorial..... | 31 |

| | | |
|---------|---|----|
| 4.9.2 | Planejamento composto central | 32 |
| 4.9.3 | Otimização da proporção de amostra e tempo de contato..... | 32 |
| 4.10 | Otimização de método analítico para determinação Cd, Cu e Pb em mel empregando TS-FF-FS-AAS | 33 |
| 4.10.1 | Avaliação do comprimento do tubo de níquel e da quantidade de furos na resposta instrumental..... | 34 |
| 4.10.2 | Avaliação do fluxo de amostragem na resposta instrumental | 35 |
| 4.10.3 | Avaliação do modo de aquisição de sinal..... | 35 |
| 4.10.4 | Estimativa do LD para utilização do TS-FF-FS-AAS nas determinações de Cd, Cu e Pb em mel..... | 35 |
| 4.10.5 | Planejamento fatorial..... | 35 |
| 4.10.6 | Planejamento composto central | 36 |
| 4.11 | Validação dos métodos analíticos..... | 37 |
| 4.11.1 | Seletividade e linearidade | 38 |
| 4.11.2 | Limite de detecção e limite de quantificação | 39 |
| 4.11.3 | Veracidade e precisão..... | 39 |
| 4.12 | Determinação de As, Cd, Cu, Hg e Pb nas amostras de mel..... | 41 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 42 |
| 5.1 | Avaliação da composição das amostras utilizando um método de referência | 42 |
| 5.2 | Otimização de método analítico para determinação direta de Hg em mel empregando CVAAS..... | 46 |
| 5.2.1 | Planejamento fatorial fracionário | 47 |
| 5.2.2 | Planejamento composto central | 49 |
| 5.2.3 | Planejamento composto central empregando diluente | 51 |
| 5.2.4 | Otimização do tempo de extração e concentração de HCl | 53 |
| 5.2.5 | Método otimizado | 54 |
| 5.2.6 | Validação do método analítico..... | 54 |
| 5.2.6.1 | Seletividade e linearidade | 55 |
| 5.2.6.2 | Limite de detecção e limite de quantificação | 60 |
| 5.2.6.3 | Veracidade e precisão..... | 61 |
| 5.3 | Otimização do método de determinação de Hg em mel utilizando DMA..... | 63 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 5.3.1 | Validação do método analítico..... | 64 |
| 5.3.2 | Determinação de Hg nas amostras de mel..... | 70 |
| 5.4 | Otimização do método analítico para determinação direta de As total em mel empregando HGAAS..... | 71 |
| 5.4.1 | Planejamento fatorial..... | 71 |
| 5.4.2 | Planejamento composto central | 73 |
| 5.4.3 | Otimização da proporção de amostra e tempo de contato..... | 76 |
| 5.4.4 | Método otimizado | 77 |
| 5.4.5 | Validação do método analítico..... | 77 |
| 5.4.6 | Determinação de As nas amostras de mel | 81 |
| 5.5 | Otimização de método analítico para determinação Cd, Cu e Pb em mel empregando TS-FF-FS-AAS..... | 83 |
| 5.5.1 | Avaliação do comprimento do tubo de níquel e da quantidade de furos na resposta instrumental..... | 83 |
| 5.5.2 | Avaliação do fluxo de amostragem na resposta instrumental | 85 |
| 5.5.3 | Avaliação do modo de aquisição de sinal | 85 |
| 5.5.4 | Estimativa do LD para utilização do TS-FF-FS-AAS nas análises de Cd, Cu e Pb em mel..... | 86 |
| 5.5.5 | Planejamento fatorial..... | 87 |
| 5.5.6 | Planejamento composto central | 90 |
| 5.5.7 | Método otimizado | 94 |
| 5.5.8 | Validação do método analítico..... | 94 |
| 5.5.9 | Determinação de Cd, Cu e Pb nas amostras de mel | 101 |
| 6 | CONCLUSÃO..... | 103 |
| 7 | REFERÊNCIAS | 105 |
| | APÊNDICE | 116 |
| | ANEXO 1 – ARTIGO PUBLICADO | 118 |

1 INTRODUÇÃO

Contaminantes inorgânicos como o arsênio (As), cádmio (Cd), cobre (Cu), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) são perigosos quando em contato com o organismo humano, seja por ingestão, absorção cutânea ou por via aérea, e os efeitos provenientes dessas intoxicações são proporcionais à sua exposição. Vale ressaltar que Hg e As são os contaminantes inorgânicos mais tóxicos que podem ser encontrados nos alimentos e são, portanto, alvo de atenção.

O contato com Hg pode levar ao seu acúmulo nos organismos e intoxicações leves caracterizam-se por causar anemia, depressão, dermatite, dores de cabeça, hipertensão, insônia, irritabilidade, problemas de audição e visão. Intoxicações mais severas podem levar a inúmeros problemas neurológicos e permanentes [1, 2].

O As também é muito perigoso quando em contato com o corpo humano e a toxicidade deste metalóide está diretamente relacionada com suas espécies químicas, sendo que o As inorgânico é mais tóxico do que o orgânico. Além disso, entre as espécies inorgânicas, os compostos trivalentes são mais tóxicos do que os pentavalentes. A exposição por longo prazo pode levar a manifestações sistêmicas, carcinogênicas ou não. A pele é o órgão mais atingido, podendo apresentar múltiplas lesões, como hiperpigmentação. O As pode também causar neuropatias, doenças cardiovasculares, anemia e diabetes [3]. Dessa forma, a presença do As e de outros contaminantes inorgânicos em alimentos deve ser monitorada.

O mel é um alimento sujeito ao acúmulo de contaminantes inorgânicos porque as abelhas costumam percorrer grandes áreas em busca de néctar, ficando continuamente expostas a várias substâncias, incluindo contaminantes, presentes em uma área de aproximadamente 7 km² em torno do apiário [4]. Devido ao seu valor nutritivo, propriedades medicinais e adoçantes, o consumo do mel tem aumentado mundialmente [5]. Assim, o controle de contaminantes inorgânicos, tais como As, Cd, Cu, Hg e Pb em mel tornou-se necessário para garantir a saúde dos consumidores desses produtos.

Nessa conjuntura, uma das ações tomadas pelas agências reguladoras de diversos países foi o estabelecimento de limites máximos permitidos para contaminantes inorgânicos e outros contaminantes químicos em alimentos. No Brasil, em 1998, foi publicada pelo Ministério da Saúde a portaria nº 685, que aprovou o regulamento

técnico: "Princípios gerais para o estabelecimento de níveis máximos de contaminantes químicos em alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos" [6]. Nessa portaria foram publicados os limites máximos permitidos para As, Cd, Cu, Sn, Hg e Pb em diferentes alimentos. No mel, foram estabelecidos os limites máximos de 1,0 mg/kg de As e 10,0 mg/kg de Cu.

Os limites máximos permitidos são estabelecidos com base em estudos que levam em consideração fatores como a toxicidade do contaminante, metabolismo e experiência de especialistas em toxicologia a respeito dos níveis de ingestão e grupos populacionais mais vulneráveis, entre outros [7]. À medida que estes estudos evoluíram, foram definidos novos limites máximos para outros contaminantes em mel, como estabelecido na instrução normativa nº 8 de 2010, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) [8]. Essa instrução normativa aprovou os programas de controle de resíduos e contaminantes em carnes (bovina, aves, suína e equina), leite, mel, ovos e pescado para o exercício de 2010, no caso do mel, foram instituídos os limites máximos permitidos para As, Cd, Pb e Hg de 0,50 mg/kg. Em 2011, o MERCOSUL adotou limites de até 0,30 mg/kg para As e Pb e 0,10 mg/kg para Cd em mel [9]. Este valor tornou-se também vigente no Brasil, país membro do MERCOSUL.

Para o monitoramento de contaminantes inorgânicos em alimentos, os órgãos de fiscalização dos governos estaduais e federal contam com laboratórios equipados e pessoas treinadas para realizar a análise desses contaminantes, em diversos tipos de produtos. Essas análises são sofisticadas, envolvendo várias etapas e equipamentos de alto custo. Adicionalmente, nos últimos anos tem crescido o uso de técnicas de determinação de vários contaminantes inorgânicos com aquisição de sinal de forma sequencial ou simultânea, pois elas possibilitam análises multielementares e uma maior frequência analítica. Em relação aos métodos de determinação dos contaminantes Hg e As em alimentos, as metodologias tradicionalmente utilizadas nos laboratórios de rotina consistem na decomposição da amostra para posterior determinação por geração de vapor frio ou de hidretos voláteis acoplada à espectrometria de absorção ou emissão atômica. A principal vantagem desse método é a sua capacidade de separar o analito da matriz, pois poucos elementos são capazes de formar hidretos voláteis sob circunstâncias normais [10]. Entretanto, o procedimento de solubilização da amostra utilizando decomposição pode causar erros sistemáticos devido à possibilidade de perdas por volatilização dos elementos de interesse. Portanto, o desenvolvimento de

novas metodologias que não requerem um pré-tratamento de digestão da amostra reflete em uma inovação em termos de controle de qualidade nestes laboratórios.

Dentro deste contexto, o objetivo deste trabalho foi de desenvolver métodos de determinação de metais importantes em termos de toxicidade, como As, Cd, Cu, Hg e Pb em mel, de forma que simplificassem alguns métodos em uso atualmente. Dessa forma, essas análises podem ser feitas de forma mais rápida e com menor custo, o que viabilizará uma melhora na capacidade de avaliação da qualidade pelos órgãos competentes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver métodos analíticos rápidos, simples e de baixo custo que possam ser implementados em laboratórios de controle de qualidade de alimentos e utilizá-los na quantificação dos contaminantes As, Cd, Cu, Hg e Pb em mel.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver métodos analíticos para determinação de As, Hg, Cd, Pb e Cu em mel empregando amostragem direta na forma de suspensão seguida de determinação por CVAAS, HGAAS e TS-FF-FS-AAS e análise direta de Hg utilizando DMA.

- Otimizar um procedimento de decomposição para mel quando não for possível a determinação usando suspensão.

- Validar os métodos desenvolvidos usando os guias atuais.

- Aplicar os métodos desenvolvidos e validados para análise de amostras coletadas em áreas impactadas por atividades antrópicas e áreas não impactadas do estado de Minas Gerais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ocorrência de contaminantes inorgânicos no estado de Minas Gerais

O estado de Minas Gerais apresenta grandes riquezas minerais, principalmente na região do Quadrilátero Ferrífero, cujos vértices são os municípios de Belo Horizonte, Santa Bárbara, Mariana e Congonhas do Campo. Essa região é responsável pela maior produção de minério de ferro no Brasil e também são exploradas jazidas de minérios de manganês e outros metais, como ouro, alumínio, antimônio e cobre [11]. Essa já histórica e intensa atividade mineradora, embora responsável pela importante representação do estado na economia nacional e mundial, pode causar problemas ambientais expressivos, visto que, além de promover uma extensa degradação física, libera metais e outros compostos químicos utilizados durante o seu beneficiamento para o ambiente, podendo representar um prejuízo à saúde humana e de outros seres vivos.

O Quadrilátero Ferrífero também já foi a mais famosa província aurífera do Brasil, abrigando minas de ouro em funcionamento desde o século XVII e que contaminam até hoje os sedimentos dos rios e a atmosfera com Hg. O As também tem sido detectado em alguns depósitos auríferos explorados do Quadrilátero Ferrífero desde o início do século XVIII. De 1950 a 1983, estima-se que 2.300.000 toneladas de rejeitos oriundos das minerações de ouro com concentração média de As de 14,5 g/kg foram lançados diretamente nos cursos d'água. Outra parte desses rejeitos foi acumulada em depósitos construídos em vales que margeiam o Ribeirão Cardoso, na região de Nova Lima [12]. Além da atividade de mineração, no passado havia uma fábrica de óxido de As que contribuiu para a contaminação dos solos nos municípios de Ouro Preto e Mariana [13, 14]. Em águas coletadas em algumas minas auríferas subterrâneas e nascentes dessa região, foram encontradas concentrações de As total variando de 2 a 2980 µg/L e de As³⁺ de 1 até 86 µg/L [15]. A contaminação por As, observada em Ouro Preto e Mariana, pode se repetir em outros locais do estado de Minas Gerais que apresentem contexto geológico semelhante, ou seja, rochas contendo mineralizações auríferas ou a presença de sulfetos em rochas, solos e sedimentos [14].

Alguns estudos já foram realizados sobre a presença, a distribuição geoquímica e a disponibilidade do Hg e do As em solos e sedimentos da região do Quadrilátero

Ferrífero e a transferência desses elementos para plantas e peixes. Os resultados mostraram que os dois contaminantes, liberados ou naturalmente presentes no ambiente, tornam-se biodisponíveis e são acumulados por algumas espécies de peixe, no caso do Hg, e por algumas espécies de samambaia, no caso do As [14]. Outro estudo em área de mineração de ouro do Quadrilátero Ferrífero mostrou, por informações de especiação de Hg, a ocorrência de liberação natural desse metal presente na região [16].

Outros estudos foram conduzidos com o objetivo de investigar a presença de As em vários compartimentos ambientais (solo superficial, plantas, legumes, vegetais, água, sedimentos e urina humana) nos municípios de Santa Bárbara e Nova Lima [13]. O solo superficial foi o compartimento que apresentou maiores valores médios de As (61 mg/kg em Santa Bárbara e 145 mg/kg em Nova Lima). Observou-se ainda que as plantas cultivadas em solos contaminados com As apresentaram um aumento no teor desse elemento [12].

A contaminação humana por As na região do Quadrilátero Ferrífero foi evidenciada no estudo realizado no período de 1998 a 2006. Foram coletadas 1400 amostras de urina para determinação de As, na população das cidades de Mariana, Nova Lima e Santa Bárbara, municípios do Quadrilátero Ferrífero. Os resultados mostraram anomalias positivas ($> 15 \mu\text{g/L}$), com exceção da cidade de Mariana, em cerca de 43% das pessoas amostradas, sendo 3% com concentração de $50 \mu\text{g/L}$. Este estudo também foi realizado em crianças de 7 a 12 anos. Entre a população infantil avaliada foram encontradas concentrações de As entre 2 e $106 \mu\text{g/L}$ nas amostras de urina, sendo que 22% das crianças apresentaram concentrações superiores a $40 \mu\text{g/L}$, para as quais efeitos adversos não podem ser excluídos [13]. Esse trabalho comprovou o acesso do As ao ser humano, sendo que as principais vias de exposição foram: inalação de poeira, ingestão de água não tratada e ingestão de alimentos cultivados em solos contaminados.

3.2 Contaminantes inorgânicos em alimentos

A presença de contaminantes inorgânicos no solo está relacionada às atividades humanas e aos fatores naturais, como a localização geográfica do estado de Minas Gerais, tipo de solo, seu pH, sua capacidade de troca de cátions, entre outros [17]. Entre as atividades humanas, além da exploração mineral, cabe destacar as atividades

agrícolas e os processos industriais, que representam uma contribuição importante na distribuição e possível contaminação por metais tóxicos em todo o estado.

A acumulação destes metais nos solos tem sido motivo de preocupação, principalmente quando o solo é utilizado para o cultivo de alimentos. Cada planta possui capacidade diferente de absorção e acumulação para cada elemento, que pode ou não depender da concentração desses elementos no meio. A capacidade de absorção de cada metal para a planta vai depender do tipo de planta, idade, época do ano, tipo de solo, temperatura e aeração [18].

Em geral, as plantas toleram mais o excesso de um nutriente do que a sua falta. Plantas como musgos e líquens são extremamente resistentes a altas concentrações de elementos tóxicos [19]. Embora as demais plantas sejam menos resistentes, algumas também têm acumulado esses elementos e sobrevivido em solos contaminados [18]. Um exemplo deste fato foi o cultivo de cana-de-açúcar em locais próximos a aterros sanitários, que foi capaz de favorecer o acúmulo dos metais Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb e Zn, principalmente no caule e nas raízes [17]. Outros estudos avaliaram o cultivo de milho em solos onde foram aplicados lodos provenientes de tratamento de esgotos. A aplicação de lodo aumentou os teores de Fe, Mn, Zn e Cu no solo e nas plantas [20, 21]. Em estudos realizados em Nova Lima, plantas como alface, couve, mostarda, cenoura e inhame, provenientes de hortas, apresentaram aumento na concentração de As quando cultivadas nos solos enriquecidos com esse elemento, sem apresentar anomalias no crescimento [12].

Existem poucos estudos sobre a composição mineral e a contaminação dos alimentos brasileiros. As verduras, por exemplo, estão presentes na mesa de todas as classes sociais do país e representam uma fonte importante de minerais para a população de baixa renda [22]. O cultivo de verduras como alface e couve nas hortas familiares permite a aquisição destes alimentos a baixos custos, pois na maioria dos casos não há adição de fertilizantes inorgânicos. Portanto, quando cultivadas em regiões contaminadas com metais, as possíveis fontes de metais serão o solo, o ar e a água da região utilizada para irrigação destes alimentos.

Outro alimento suscetível à acumulação de metais é o mel. Estima-se que as abelhas podem percorrer uma área de mais de 7 km² em torno da colméia, interagindo com o ar, a água e o solo [23]. As abelhas voam de flor em flor, tocam as folhas, bebem água e seus corpos coletam partículas do ar. Dessa forma, esse alimento tem sido reconhecido como um indicador ambiental desde 1984, quando foi publicado um trabalho

avaliando o índice dos metais no mel coletado próximo de uma rodovia [24]. Portanto, o conhecimento do conteúdo de contaminantes no mel é de interesse não somente para o seu controle de qualidade, mas também como um indicador ambiental, pois a presença de contaminantes inorgânicos pode estar relacionada com a contaminação do solo, ar e água na região estudada [23].

O monitoramento de contaminantes inorgânicos em mel começou a ser feito recentemente. As concentrações de As, Cd, Cu, Pb e Hg têm sido determinadas em mel em diversos países, como por exemplo: Bangladesh [25], Brasil [26, 27, 28], Croácia [29], Espanha [30], França [31], Hungria [32], Índia [23], Itália [33], Malásia [34], Polônia [35] e Turquia [36], como resumido na Tabela 01. As concentrações descritas nesses trabalhos apresentaram uma diversidade relativamente grande, em geral, as concentrações destes elementos em mel decrescem na seguinte ordem: Cu > Pb > As > Cd > Hg.

Tabela 01. Concentrações de As, Cd, Cu, Pb e Hg ($\mu\text{g}/\text{kg}$) determinados em amostras de mel provenientes de diferentes países.

| | As | Cd | Cu | Pb | Hg |
|-----------------|---------|---------|-----------|----------|-------|
| Bangladesh [25] | 17-20 | - | - | - | - |
| Brasil [26] | - | - | - | - | <2,2 |
| Brasil [27] | - | <6 | 20-170 | - | - |
| Brasil [28] | 0,5-20 | <1 | 10-700 | 1-31 | - |
| Croácia [29] | 4-105 | 1-24 | 36-41217 | 10-841 | 1-315 |
| Espanha [30] | 140-260 | <10 | 340-5810 | 40-260 | - |
| França [31] | <27 | <22 | - | <17 | <12 |
| Hungria [32] | 4-13 | 0,8-3,3 | 5-445 | 12-163 | - |
| Índia [23] | - | <50 | 1065-2800 | 50-710 | - |
| Itália [33] | 2-20 | 1-15 | 170-5900 | 28-304 | <2 |
| Malásia [34] | <2 | 0,2-4 | 46-236 | <5 | - |
| Polônia [35] | 26-344 | 19-121 | 450-2430 | 170-1900 | - |
| Turquia [36] | - | 16-69 | 691-9524 | 151-729 | - |

Nos estudos realizados na Croácia, destacam-se os elevados valores obtidos para Hg, Cu e Pb, segundo os autores as maiores concentrações foram obtidas nas propriedades próximas de locais reconhecidamente poluídos, como rodovias e ferrovias [29]. Em relação ao As, apenas as amostras de mel produzidas na Polônia excederam os

limites máximos para As nesse país de 200 µg/kg [35]. Cabe ressaltar que em Bangladesh há contaminação da água subterrânea com As devido à geologia da região, mas as concentrações de As foram obtidas em amostras de mel importadas pelo Reino Unido [25]. No caso do Hg, poucos estudos determinaram esse contaminante no mel.

Níveis elevados de contaminantes inorgânicos, como As, Hg, Cd, Cu e Pb em alimentos são indesejáveis devido à sua toxicidade. Por isso, as agências reguladoras de diversos países têm estabelecimento limites máximos permitidos para contaminantes inorgânicos e outros contaminantes químicos em alimentos como o mel. Em 1998, os limites máximos permitidos de 1,0 mg/kg de As e 10 mg/kg de Cu em mel foram estabelecidos no Brasil [6]. Em 2010, o programa de controle de resíduos e contaminantes do MAPA aprovou os limites máximos permitidos para As, Cd, Pb e Hg de 0,50 mg/kg em mel [8]. Em 2011, os limites de até 0,30 mg/kg para As e Pb e 0,10 mg/kg para Cd em mel foram adotados pelo MERCOSUL e tornaram-se vigentes no Brasil [9].

A Organização Mundial de Saúde através da comissão Codex Alimentarius [7] tem estabelecido limites máximos para As em diversos alimentos como água, óleo e sal de 0,01 mg/kg, 0,10 mg/kg e 0,50 mg/kg, respectivamente. Para o Cd, os limites variam desde 0,003 mg/kg em água até 0,50 mg/kg no sal, sendo também estabelecidos os limites entre 0,05-0,10 mg/kg para algumas frutas e vegetais. Para o Pb, os limites máximos variam de 0,01 mg/kg em água até 2,00 mg/kg em sal, para frutas e vegetais frescos, os limites variam entre 0,10-0,30 mg/kg e os enlatados podem conter até 1,00 mg/kg. Em relação ao Hg total, os limites máximos variam de 0,001 mg/kg em água até 0,10 mg/kg em sal. No entanto, não foram estabelecidos limites máximos para esses contaminantes em mel.

A presença de alguns constituintes inorgânicos em mel e demais alimentos pode causar sérios danos à saúde, dependendo de suas concentrações. Por exemplo, Fe, Zn, Cu, Cr, Co, e Mn são essenciais em baixas concentrações. Elementos como As, Cd, Pb, Hg e Ni têm amplo espectro de toxicidade, que inclui efeitos neurotóxicos, hepatóxicos, teratogênicos e mutagênicos, entre outros. Além disso, Cd e As também são considerados carcinogênicos [37].

A exposição ao As, além dos efeitos carcinogênicos, também pode provocar patologias cutâneas (hiperpigmentação, hiperqueratose), gastrintestinais (diarréias, com ou sem hemorragia), cardiovasculares (arritmia, gangrena), aborto, anemia, dor de cabeça, confusão mental e coma [3]. Os contaminantes Hg e Pb são muito perigosos quando em contato com o organismo humano, seja por ingestão, absorção cutânea ou

por via aérea. As intoxicações por Hg apresentam efeitos proporcionais à sua acumulação. Intoxicações leves caracterizam-se por causar anemia, anorexia, fraqueza, depressão, dermatite, dores de cabeça, fadiga, hipertensão, insônia, irritabilidade, problemas de audição e visão. Intoxicações mais severas podem levar a inúmeros problemas neurológicos e permanentes. O Pb acumula-se nos rins, no fígado, no cérebro e principalmente nos ossos. Disfunção renal, anemia, problemas pulmonares e paralisia são alguns dos efeitos que este elemento pode causar ao homem, mesmo em pequenas quantidades [1, 2, 38].

Em razão da possibilidade de acumulação de metais em solos, no ar e na água em regiões com alta concentração dos mesmos, é provável que ocorra a contaminação de alimentos produzidos nessas regiões. Assim, a demanda pela avaliação da presença e concentração de contaminantes inorgânicos em alimentos tem aumentado significativamente. Em relação ao mel, a produção do estado de Minas Gerais foi de 5,5 mil toneladas em 2011, enquanto foram produzidas cerca de 40 mil toneladas em todo Brasil. Os Estados Unidos e os países da União Européia absorvem quase 90% do mel exportado pelo Brasil, tornando-se mais exigentes a cada dia com relação à segurança desse alimento [39]. Em março de 2006, uma das medidas adotadas pela União Européia foi o embargo às exportações de mel provenientes do Brasil, pois o governo brasileiro não possuía um plano de controle de resíduos. Em 2008, o comércio foi restabelecido após a comprovação da qualidade do produto. Nesse contexto, é necessário o desenvolvimento e otimização de métodos analíticos de preparo, determinação e quantificação, que sejam eficientes, seletivos e com sensibilidade adequada para atender a legislação brasileira e também os limites estabelecidos em outros países.

3.3 Métodos de preparo da amostra e quantificação de contaminantes inorgânicos em alimentos

A determinação de metais em alimentos geralmente requer a conversão da amostra em solução, que pode ser feita por um procedimento de decomposição térmica. Esse procedimento pode ser realizado por via seca (carbonização em bico de Bunsen, seguida de calcinação em mufla com temperatura variando de 400°C a 600°C, dependendo do elemento), ou por via úmida, utilizando-se misturas com ácidos e outros reagentes oxidantes em temperaturas em torno de 100°C. O tratamento da amostra por

via úmida pode ser realizado empregando-se como fonte de aquecimento chapa aquecedora ou bloco digestor, mas pode-se também utilizar, entre outros, um sistema de micro-ondas com frascos fechados, que reduzem a perda por volatilização de alguns metais, como Hg, As, Cd e Pb [40].

Nos procedimentos para determinação de constituintes minerais em mel podem ser empregados diferentes métodos de preparo das amostras, como: calcinação seguida da dissolução em ácidos [41-43]; via úmida em sistemas abertos, em frascos de vidro ou teflon [31, 44-46], banho maria [47]; via úmida em sistemas fechados, como forno de micro-ondas [5, 32, 33, 48], extração ácida assistida por radiação ultrassônica [27, 49, 50], decomposição assistida por radiação ultravioleta [23]; e análise direta na forma de suspensões [32, 51, 52].

A principal vantagem da via seca é a possibilidade de digerir maior quantidade de amostra em relação à via úmida, permitindo a análise de contaminantes inorgânicos em alimentos por técnicas menos sensíveis como a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) [41]. Entretanto, a utilização de altas temperaturas pode levar à perda de analitos mais voláteis, como Hg e As [53].

Os métodos de decomposição que utilizam bloco digestor ou chapa aquecedora possibilitam a destruição da matriz orgânica, mas podem causar erros sistemáticos devido à contaminação e/ou perdas por volatilização dos elementos de interesse. A utilização do forno de micro-ondas minimiza as perdas por volatilização, uma vez que os constituintes de interesse na amostra são solubilizados em sistema fechado. Entretanto, o uso do forno de micro-ondas ainda não está acessível em todos os laboratórios.

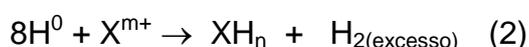
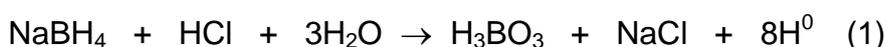
Outra característica do forno de micro-ondas é a sua limitação quanto à quantidade de amostra utilizada. Por esse motivo, essa estratégia tem sido mais utilizada na determinação de contaminantes inorgânicos em alimentos por técnicas mais sensíveis como a espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) [25, 32] e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) [5, 28, 31, 33], sendo comum a utilização de etapas de pré-concentração como a extração por ponto nuvem [26]. Apesar das espectrometrias de absorção e emissão serem as técnicas mais utilizadas nos laboratórios de controle de qualidade de alimentos, é possível encontrar na literatura trabalhos utilizando outras técnicas, como a ativação neutrônica [43], voltametria [23] e espectrometria de fluorescência atômica de raios X [54] para determinação de metais em mel.

A análise direta na forma de suspensões é uma alternativa simples, rápida e mais econômica que os processos tradicionais. Além de reduzir a contaminação das soluções pelo menor consumo de ácidos, o preparo de suspensões também reduz o tempo de preparo da amostra e pode ser realizado à temperatura ambiente, evitando-se a perda de analitos por volatilização [55]. Neste método, as matrizes que são solúveis ou miscíveis em água são dissolvidas ou diluídas e as amostras sólidas são finamente moídas para preparo da suspensão. A suspensão ou solução estabilizada é analisada após um preparo mínimo da amostra.

Dependendo do alimento, pode ser mais difícil manter a estabilidade da suspensão durante o tempo requerido para sua introdução na etapa de determinação. Para contornar essa limitação podem ser utilizados agentes estabilizadores ou agitação da suspensão. Em alguns casos, o tamanho de partícula da amostra também pode afetar os resultados, devendo ser otimizado durante o desenvolvimento do método.

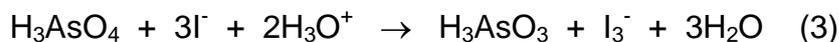
Na determinação de metais em mel, essa estratégia vem apresentando bons resultados, pois é feita uma simples diluição da amostra, sendo utilizada principalmente com as técnicas de GFAAS [32, 51, 56] e espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) [52]. Nestes estudos, além da vantagem de diminuir a contaminação da amostra devido ao menor consumo de ácidos concentrados, a análise direta de suspensões também reduziu o tempo de preparo da amostra e, por ser um procedimento realizado à temperatura ambiente, diminuiu as chances de perdas dos analitos por volatilização e aumentou a sensibilidade das técnicas. No entanto, a determinação de As em alimentos por HGAAS geralmente apresenta melhores resultados [57].

Dentre as técnicas espectroanalíticas, a mais utilizada nas determinações de As em alimentos é a espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (HGAAS). Nessa técnica, o hidreto é formado através da reação de decomposição do borohidreto de sódio (NaBH_4 , estabilizado com hidróxido de sódio ou potássio) em meio ácido, segundo a equação (1). Em seguida, o hidrogênio liberado reage com o analito para formação do hidreto do metal, conforme a equação (2):



Onde m pode ser ou não igual a n e X é o analito de interesse [58].

Na determinação de As total, o As^{5+} deve ser convertido em As^{3+} , pois esse possui uma cinética de geração de hidreto mais lenta, através da adição de um pré-reduzidor, como KI ou $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$, antes da etapa de geração do hidreto, conforme a equação (3) [10]:



O hidreto gerado, a arsina (AsH_3), é volátil e então é arrastado por um gás inerte (argônio) até uma cela de atomização onde ocorre sua decomposição (equações 4 e 5):



Para determinar As a cela é posicionada no caminho óptico da lâmpada de As, como mostra a Figura 01 [59] e então é aquecida externamente com auxílio de uma chama de ar/acetileno ou através de uma manta aquecedora para promover a decomposição térmica do hidreto.

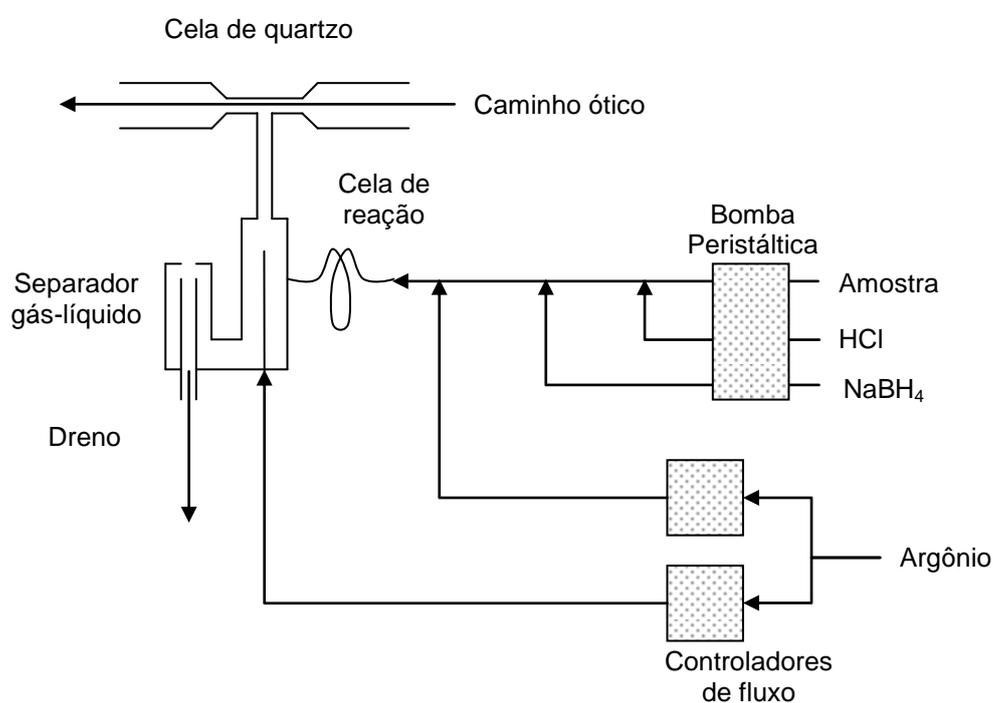


Figura 01. Esquema de funcionamento do acessório de geração de hidretos, modelo VGA 77, da Varian (Austrália).

Já no caso específico do Hg, não há necessidade de aquecimento da cela, pois ele é o único elemento metálico que existe na forma atômica à temperatura ambiente, por isso sua determinação por absorção atômica também pode ser conduzida com a adição de cloreto estânico (SnCl_2), que permite a sua redução a Hg^0 . Nesse caso, a técnica é chamada de espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio (CVAAS).

Dentre as principais vantagens dessa técnica cabe destacar a separação do analito da matriz, pois geralmente poucos elementos são capazes de formar hidretos voláteis, que são transferidos para a cela e atomizados em um ambiente mais livre de concomitantes, evitando possíveis interferências. Além disso, o gerador de hidretos é um sistema de introdução da amostra mais eficiente do que aqueles baseados na nebulização pneumática convencional, apresentando limites de quantificação ao nível de $\mu\text{g/L}$. Por outro lado, alguns fatores relacionados à reação de hidretos, como o pH, a concentração dos reagentes e os estados de oxidação do analito são críticos. Entre suas limitações podem-se ainda incluir a suscetibilidade aos interferentes na solução de leitura, os quais podem afetar a geração do vapor e sua purga da solução [58].

Uma técnica específica para a determinação de Hg é o analisador direto de mercúrio (DMA). No DMA, as amostras são pesadas diretamente em pequenos recipientes de níquel ou quartzo. Esse recipiente é transportado para um forno onde a amostra é primeiramente seca, e em seguida decomposta em um fluxo contínuo de oxigênio. Outros constituintes da amostra como óxidos de enxofre, nitrogênio e compostos de halogênios são decompostos e/ou aprisionados no catalisador e os vapores de Hg são coletados no amalgamador de ouro (Figura 02). Ao final, o amalgamador é rapidamente aquecido e o Hg é desorvido e carreado pelo oxigênio para as celas posicionadas no caminho ótico da lâmpada de Hg. O Hg é então quantificado utilizando espectrometria de absorção atômica em 253,7 nm, como mostrado na Figura 02 [60]. O instrumento determina o conteúdo de Hg e calcula a concentração final na amostra.

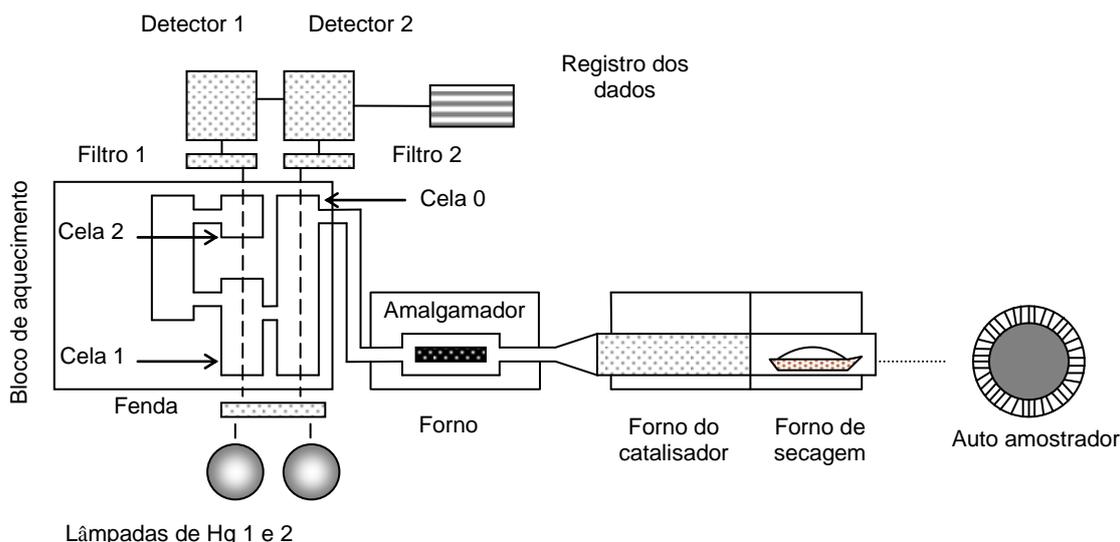


Figura 02. Esquema representando o funcionamento do DMA-80.

Esta técnica permite introduzir amostras líquidas ou sólidas sem qualquer etapa de diluição ou dissolução e, dessa forma o limite de detecção pode ser até cem vezes melhor que nas técnicas convencionais, sendo dependente diretamente da quantidade de amostra utilizada. Em amostras que possuem altos teores de material orgânico, como mel, a massa utilizada não devem ultrapassar 100 mg, pois pode ocorrer a geração de uma quantidade muito grande de gases e aumentar a pressão rápido demais dentro do forno.

O DMA apresenta uma faixa não linear de trabalho, de 0,1 ng até 500 ng de Hg, obtida pela passagem do Hg por três celas de absorção posicionadas no caminho ótico de duas lâmpadas de Hg. Uma desvantagem dessa técnica é o longo tempo requerido para calibração do instrumento, em torno de oito horas. Após a calibração, o DMA pode ser utilizado por vários dias sem a necessidade de nova calibração, que geralmente deve ser feita somente após a substituição de algum componente, como o catalisador, por exemplo.

Para extrair Hg de alimentos deve-se ter cuidado para não ocorrer perdas por volatilização de componentes da amostra durante as etapas de preparo e extração. Portanto, o DMA foi escolhido para comparação com a técnica de CVAAS para determinar Hg em mel e também por apresentar boa sensibilidade.

Para determinação de nutrientes como cálcio, magnésio, ferro e zinco em laboratórios de controle de qualidade e segurança alimentar, a técnica mais utilizada é a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS), devido à sua simplicidade, baixo custo de operação, robustez e boa seletividade. Contudo, para determinação de

baixas concentrações de contaminantes inorgânicos, essa técnica não é adequada devido à sua sensibilidade relativamente baixa. Isto é principalmente causado pela baixa eficiência do nebulizador pneumático convencional e o curto tempo de permanência da amostra na chama. Apesar disso, os limites de detecção obtidos na FAAS podem ser melhorados aumentando a eficiência do transporte, da geração do aerossol e prolongando o tempo de residência dos átomos livres do analito [61]. A utilização de tubos de quartzo sobre a chama foi um avanço nesse sentido para determinação de elementos voláteis como o Hg ou capazes de formar hidretos voláteis, como o As.

Outra alternativa para estender a aplicação da FAAS para determinação de elementos traço é a técnica de absorção atômica com forno na chama (TS-FF-AAS), proposta por GÁSPÁR e BERNDT em 2000 [62]. Esta técnica consiste na introdução direta da amostra na chama sem nebulização, que pode ser feita utilizando-se uma bomba peristáltica, um capilar de cerâmica e um atomizador metálico, posicionado diretamente sobre o queimador do FAAS (Figura 03) [63]. Isto torna possível a introdução completa da amostra e também aumenta o tempo de permanência da amostra na chama, melhorando assim a sensibilidade e os limites de detecção, com um acessório de baixo custo de aquisição e manutenção.

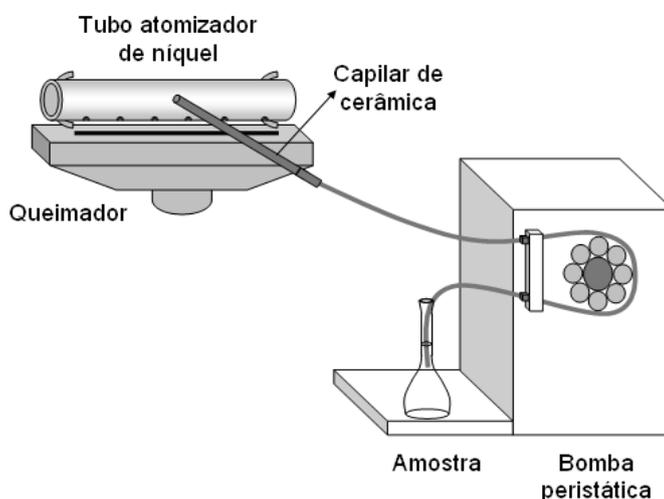


Figura 03. Esquema representando o funcionamento do TS-FF-AAS.

O atomizador metálico mais utilizado em TS-FF-AAS é o tubo de níquel, encaixado diretamente sobre a chama do queimador padrão de um espectrômetro de FAAS (Figura 03). Tubos de quartzo, titânio, cerâmica e algumas ligas também são utilizados [64]. A amostra é introduzida no tubo por meio de um capilar de cerâmica, que é aquecido pela chama. A extremidade do capilar em contato com o centro do tubo de

níquel atinge cerca de 900 °C, o que resulta em um aumento de sensibilidade para os elementos mais voláteis de até uma ordem de grandeza [65]. Dessa forma, o TS-FF-AAS já foi proposto com sucesso para determinação de 17 elementos (Ag, As, Au, Bi, Cd, Cu, Hg, In, K, Pb, Pd, Rb, Sb, Se, Te, Tl e Zn) [66].

O TS-FF-AAS tem sido aplicado na determinação de contaminantes em amostras biológicas, ambientais, alimentos e medicamentos [64]. Em estudos de avaliação de contaminantes em alimentos, foram estudados principalmente os elementos, Cd, Cu, Pb, Zn e Mn em alimentos como: cerveja [65], refrigerantes [67], sucos de frutas [61, 68], vinho [68], leite [61, 69], entre outros. Em alguns casos, não foi necessário realizar a digestão da amostra, sendo possível obter resultados satisfatórios utilizando-se apenas uma diluição com ácidos [65, 68, 69]. Para garantia de menores limites de detecção, algumas condições precisam ser otimizadas durante o desenvolvimento dos métodos, tais como fluxo e volume de amostra, diferentes soluções de transporte, tipo de tubo, comprimento e quantidade de furos e altura em relação ao queimador, entre outros.

Mesmo após a obtenção das condições otimizadas, algumas fontes de erros podem existir num procedimento analítico desenvolvido. Portanto, para assegurar a confiabilidade de novos métodos analíticos e garantir sua adequação ao propósito de uso, um novo método deve ser submetido a um processo de validação [70].

3.4 Validação

A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) estabelece através da NBR ISO/IEC 17025:2005 [71] que métodos normalizados utilizados fora dos escopos para os quais foram concebidos, ampliados ou modificados, métodos não normalizados, e métodos criados ou desenvolvidos pelos laboratórios devem ser validados. Diante da importância da validação de um procedimento analítico, foram publicados nos últimos anos diversos guias, protocolos e artigos científicos com recomendações e procedimentos para estimativa dos diferentes parâmetros de desempenho da validação, também chamados de figuras de mérito.

O principal guia para validação de métodos de ensaios químicos, em geral, utilizado no Brasil é DOQ-CGCRE-008, publicado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) [70].

No caso específico da análise de resíduos e contaminantes em alimentos, foi publicado em 2009, pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o

guia para validação do Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes, padronizando os procedimentos de validação de métodos analíticos e controle de qualidade interna das análises [72]. Em 2011, um novo manual de garantia da qualidade analítica foi publicado pelo MAPA [73].

Os parâmetros mínimos de desempenho analítico requeridos como evidência objetiva da validação são: linearidade, seletividade, recuperação, veracidade, precisão e limites de detecção e quantificação [70].

Linearidade é a capacidade do método de demonstrar que a resposta instrumental obtida é proporcional à concentração do analito, dentro de uma faixa de concentração especificada [70]. No estudo da linearidade são recomendados testes de premissas para uso apropriado do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), como, normalidade, homoscedasticidade, independência, significância da regressão e do desvio da linearidade [72]. Os testes estatísticos aplicáveis às premissas de normalidade, e às análises de dados dos demais parâmetros foram definidos no trabalho desenvolvido por SOUZA e colaboradores [74, 75]. Este trabalho propôs um procedimento detalhado para validação intralaboratorial de métodos quantitativos e qualitativos aplicados em análises de alimentos. Neste procedimento, foram definidos os parâmetros de desempenho e o delineamento experimental para cada parâmetro da validação, com determinação dos níveis de concentração dos analitos a serem estudados, número de níveis e mínimo de repetições por nível, complementando dessa forma, o guia para validação do Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes [72].

A seletividade é a capacidade do método em distinguir o analito de interesse na presença de componentes da matriz, que podem interferir na sua determinação, reduzindo ou aumentando o sinal do analito e conseqüentemente alterando o intercepto (α) e a inclinação (β) da curva de calibração: $Y_i = \beta X_i + \alpha$ [72, 74]. Uma das formas de se avaliar a seletividade é através do estudo do efeito de matriz, que consiste na comparação entre α e β de curvas de calibração preparadas com e sem adição da amostra. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a veracidade e a precisão estarão seriamente comprometidas [70].

A veracidade é a concordância entre a média de um número suficientemente grande de resultados de um ensaio e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro, sendo expressa em porcentagem. A determinação da veracidade deve ser feita por intermédio de ensaios de recuperação utilizando-se material de referência certificado. Caso este material não esteja disponível, a determinação da recuperação

deve ser feita por intermédio de matriz branca fortificada. Na falta de uma matriz branca pode-se usar uma amostra de ensaio com baixa concentração do analito [73]. A veracidade é sempre expressa dentro de limites, que são associados a valores de precisão.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra sob condições definidas, sendo geralmente representada pelo desvio padrão (s) ou desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV) [72]. As três maneiras de expressá-la são por meio de condições de repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Sendo que a reprodutibilidade de um procedimento analítico somente pode ser estimada mediante a participação de um ensaio interlaboratorial [73]. A repetibilidade é avaliada num conjunto de condições, as quais incluem medições repetidas do mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, num curto período de tempo [76]. O número de replicatas de medição deve expressar a rotina do laboratório [70]. Já na precisão intermediária as medições do mesmo procedimento são repetidas no mesmo local ao longo dum período extenso de tempo, mas pode incluir outras mudanças, como novas calibrações operadores e sistemas de medição [76].

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) também são parâmetros de desempenho requeridos durante a validação de métodos analíticos. De uma maneira geral, o LD é a menor concentração do analito que pode ser distinguida do branco da matriz, enquanto o LQ é a menor concentração do analito que pode ser quantificada com precisão e veracidade aceitáveis [77, 78]. Diversos guias, protocolos e artigos científicos fornecem recomendações e procedimentos para estimativa desses parâmetros. Nos procedimentos mais empregados são preparadas n replicatas independentes de amostras brancas. A média (\bar{x}) e o desvio padrão (s) são calculados e o LD e LQ são expressos como a concentração do analito correspondente ao valor médio do branco mais t_s . O valor de t da distribuição de *Student* é dependente do número de replicatas e os valores de n e t variam de acordo com o autor [70, 79]. Outro procedimento de estimativa do LD e LQ recomenda a utilização dos parâmetros da curva analítica e o intervalo de confiança da regressão [77]. O LQ neste caso é definido como a concentração mínima de uma substância que pode ser medida e informada com 99 % ou 95 % de confiança. Esse procedimento tem sido menos utilizado devido à complexidade dos cálculos, mas recentemente foi publicada uma planilha que facilita a sua utilização

[80]. Finalmente, os limites também podem ser obtidos pelo método visual [74] ou ainda, pela razão entre o intercepto (α) e a inclinação (β) da curva de calibração [81]. Diante da variabilidade de formas para o cálculo do LD e LQ, neste trabalho os diferentes procedimentos para cálculo de LD e LQ foram aplicados e os resultados foram analisados criticamente, relacionando-os com a veracidade e precisão do método de determinação de Hg por CVAAS.

Diante do exposto, para garantir a confiabilidade dos novos procedimentos de determinação de As, Cd, Cu, Hg e Pb em mel foi realizada a validação baseando-se principalmente nas recomendações do INMETRO [70], com complementações utilizando-se os guias do MAPA [72, 73] e o trabalho de doutorado desenvolvido por SOUZA e colaboradores [74, 75].

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

As amostras de mel, no total de 35 (Tabela 02), foram compradas em supermercados e feiras de agricultores em várias cidades do estado de Minas Gerais, sendo algumas amostras doadas pelo Laboratório de Análise Físico-Química de Alimentos, do Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA, de forma que se obtivessem informações seguras da região de procedência. As cidades de procedência das amostras podem ser visualizadas no mapa do estado de Minas Gerais, apresentado na Figura 04.

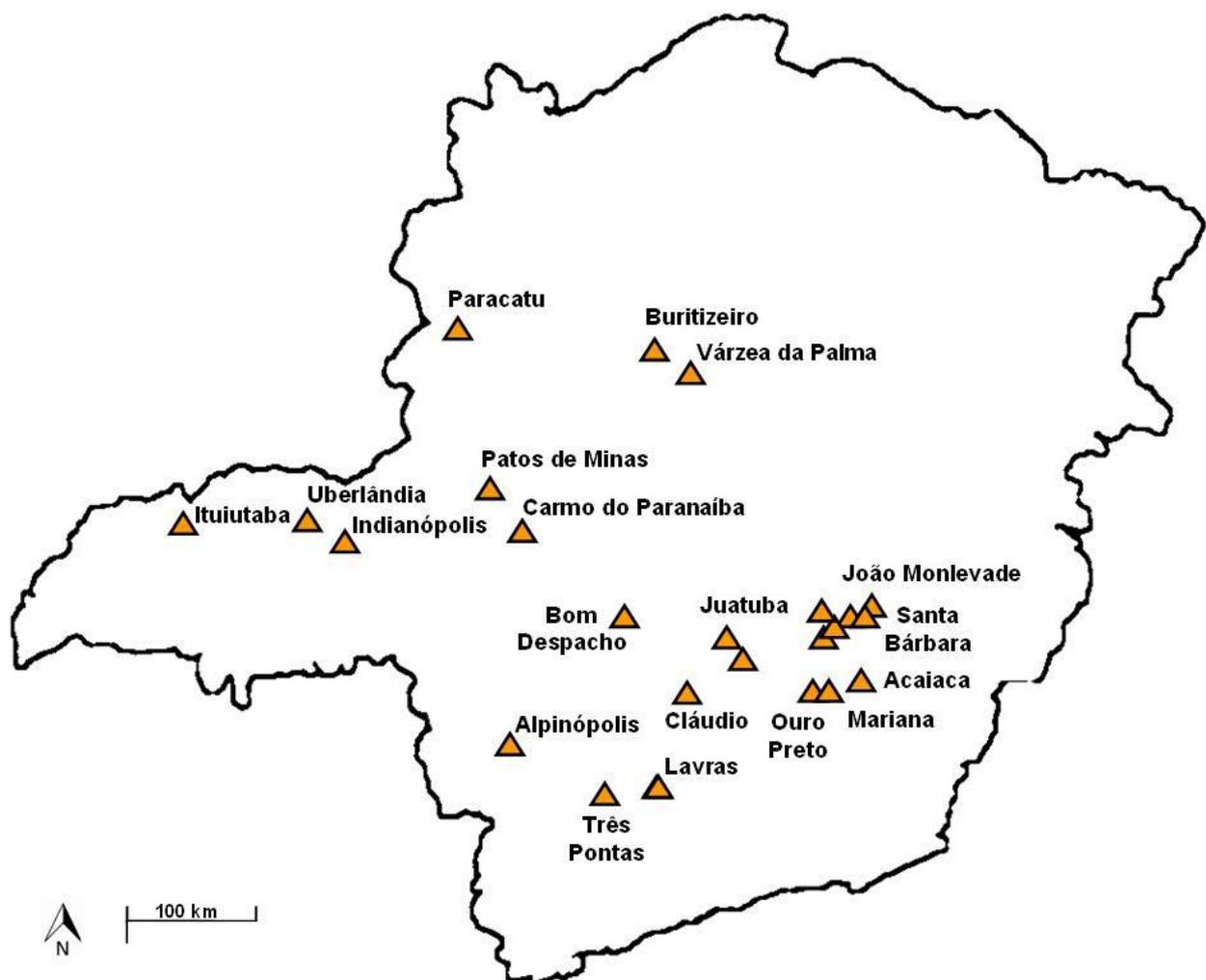


Figura 04. Alguns municípios de procedência das amostras de mel estudadas.

Tabela 02. Procedência, data de fabricação, florada típica e quantidade de amostras de mel coletadas.

| Quantidade | Procedência | Fabricação | Florada |
|------------|---------------------------|------------|----------------------|
| 1 | Acaiaca | 10 / 2009 | Flores silvestres |
| 1 | Alpinópolis | 05 / 2009 | Flores silvestres |
| 1 | Bela Vista de Minas | 05 / 2009 | Flores silvestres |
| 1 | Bom Despacho | 01 / 2005 | Flores silvestres |
| 1 | Bom Jesus do Amparo | 07 / 2009 | Flores silvestres |
| 1 | Brumadinho | 07 / 2008 | Flores silvestres |
| 2 | Buritzeiro | 02 / 2008 | Flores silvestres |
| 1 | Carmo do Paranaíba | 10 / 2007 | Flores silvestres |
| 2 | Cláudio | 12 / 2009 | Flores silvestres |
| 1 | Indianópolis | 08 / 2008 | Flores silvestres |
| 1 | Ituiutaba | 11 / 2009 | Flores silvestres |
| 1 | João Monlevade | 01 / 2008 | Flores silvestres |
| 1 | Juatuba | 06 / 2008 | Flores da estação |
| 1 | Lavras | 04 / 2009 | Flores silvestres |
| 1 | Mariana | 07 / 2009 | Flores silvestres |
| 1 | Ouro Preto | 10 / 2009 | Flores silvestres |
| 5 | Paracatu | 12 / 2009 | Flores silvestres |
| 2 | Patos de Minas | 09 / 2009 | Flores silvestres |
| 2 | Santa Bárbara | 09 / 2007 | Flores silvestres |
| 1 | São Gonçalo do Rio Abaixo | 04 / 2010 | Flores silvestres |
| 2 | Três Pontas | 08 / 2010 | Flores silvestres |
| 1 | Uberlândia | 06 / 2007 | Flores de eucalipto |
| 1 | Uberlândia | 11 / 2007 | Flores de laranjeira |
| 1 | Várzea da Palma | 07 / 2009 | Flores de eucalipto |
| 2 | * | - | - |

*Amostras de procedência desconhecida.

Algumas amostras de mel são industrializadas e outras são artesanais. As amostras foram armazenadas à temperatura ambiente e mantidas ao abrigo de luz. Não houve etapa de secagem ou moagem das amostras. A Tabela 02 apresenta uma

descrição detalhada do tipo e procedência das amostras de mel estudadas. Em algumas cidades foram adquiridas mais de uma amostra de fabricantes diferentes. Além das amostras detalhadas nesta tabela, foram recebidas duas amostras de mel apreendidas e que não possuíam registro no IMA nem no MAPA e, portanto, no rótulo não foi informada a procedência, florada típica e data de fabricação dos produtos.

Inicialmente, 16 amostras de mel foram analisadas por ICP-MS (item 4.6), a fim de se verificar, independentemente da etapa de desenvolvimento dos métodos, se nelas haviam As, Cd, Cu, Hg e Pb detectáveis. Todas as amostras apresentaram concentração de As, Cd e Hg abaixo do limite de quantificação (LQ) do ICP-MS (As - 23 µg/kg e Cd - 10 µg/kg) e foi possível quantificar Pb, e Cu, sendo obtido até 0,16 mg/kg de Pb e 1,18 mg/kg de Cu. Entretanto, nos testes iniciais de otimização do método utilizando TS-FF-FS-AAS as concentrações de Cu e Pb obtidas nas amostras não foram suficientes para fornecer um sinal analítico com precisão adequada, e portanto, uma das amostras foi escolhida como branco e contaminada com concentrações adequadas de As, Cd, Cu, Hg e Pb, para o desenvolvimento das metodologias propostas.

4.2 Reagentes e materiais

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas utilizando água ultra pura (resistividade de 18,2 MΩ cm), obtidas com o uso do sistema de purificação (Milli-Q, Alemanha). Foram utilizados os reagentes HCl, HNO₃, H₂O₂, NaBH₄, SnCl₂, NaOH, KI e SC(NH₂)₂ (Merck, Alemanha e F. Maia gold, Brasil). Nas análises por ICP-MS, o HNO₃ foi destilado utilizando-se um destilador de ácidos (Milestone Srl, Itália). Todos os materiais (tubos de centrífuga, balões volumétricos e vidrarias) utilizados foram descontaminados antes do uso, através de lavagem utilizando detergente neutro (Extran, Merck, Alemanha), enxágue com água de torneira, seguido de água destilada (destilador Biopar, Brasil) e deionizada (deionizador Permutation, Brasil). Os materiais foram deixados em um banho contendo HNO₃ 10% (v/v) por no mínimo 16 horas. Posteriormente, eles foram enxaguados com água destilada e deionizada. Nas análises por ICP-MS utilizou-se um enxágue adicional com água ultra pura obtida pelo sistema Milli-Q. Os materiais foram secos à temperatura ambiente em bancada limpa e protegida de poeiras.

Foram utilizados os materiais de referência certificados: SRM-8415 (ovo em pó integral, *National Institute of Standards and Technology*), IAEA-336 (líquen, *International*

Atomic Energy Agency) e GBW-08301 (sedimento de rio, *Institute of Environmental Chemistry Academia Sinica*) com concentrações de Hg de $4,0 \pm 3,0 \mu\text{g}/\text{kg}$, $200 \pm 40 \mu\text{g}/\text{kg}$ e $220 \pm 40 \mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, durante a validação do método empregando DMA.

4.3 Equipamentos utilizados

Durante o preparo das soluções foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Forno de micro-ondas de alta pressão, modelo ETHOS da Milestone Srl (Itália), localizado no Laboratório 157 do Departamento de Química da UFMG;
- Forno de micro-ondas de alta pressão, modelo Multiwave 300 da Anton-Paar (Áustria), localizado no Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO, Pedro Leopoldo – MG).
- Destilador de ácidos, modelo MLS da Milestone Srl (Itália), localizado no Laboratório 157 do Departamento de Química da UFMG;
- Bloco digestor, modelo MA-4025 da Marconi (Brasil), localizado no Laboratório de Química Agropecuária do IMA (Contagem – MG);
- Micropipetas reguláveis de 100 a 1000 μL e 1000 a 5000 μL da HTL (Polônia) e Gilson (França) foram empregadas no preparo de soluções.
- Balanças analíticas das marcas Sartorius (Alemanha) e Mettler (Suíça).

Nas etapas de quantificação foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Analisador direto de mercúrio, modelo DMA-80, da Milestone Srl (Itália), localizado no Laboratório 249 do Departamento de Química da UFMG;
- Espectrômetro de absorção atômica, modelo AAnalyst™ 400, equipado com sistema de geração de hidretos, modelo FIAS 100, da PerkinElmer (EUA), localizado no Laboratório 157 do Departamento de Química da UFMG;
- Espectrômetro de absorção atômica com chama, modelo SpectrAA 220 e sistema de geração de hidretos, modelo VGA 77, da Varian (Austrália), localizado no Laboratório de Química Agropecuária do IMA (Contagem – MG);
- Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado, modelo 820 MS, da Varian (Austrália), localizado no LANAGRO (Pedro Leopoldo – MG).

4.4 Preparo de soluções padrão de As, Cd, Cu, Hg e Pb

As soluções estoque de 1000 mg/L foram preparadas a partir da diluição de padrões de Hg (Titrisol, Merck, Alemanha), As⁵⁺ (Titrisol, Merck, Alemanha), As³⁺ (SCP Science, Canadá), Cu, Cd, Pb (Fixanal, Sigma-AldrichTM, Alemanha), em solução de HNO₃ (65% v/v, Merck, Alemanha) 1,0 % (v/v). Soluções contendo 1000 µg/L de Hg, As, Cd, Cu e Pb foram preparadas a partir das soluções anteriores e foram utilizadas no preparo das demais soluções de trabalho. Estas soluções foram armazenadas em refrigerador até o momento da análise.

4.5 Preparo de solução de trabalho contendo Mg, Ca, Rb, Zn, Mn, Fe, Cu, Sr, Bi, Ba, Cr, Mo, Pb, Li, Hg, As, Cs, Co, Na, Al, V, Ni, Be, Ga, Ag, Cd, In, Ti e K para uso em ICP-MS

Uma solução de trabalho contendo 1000 µg/L Ca, Fe, K e Na e 100,0 µg/L de Mg, Rb, Zn, Mn, Cu, Sr, Bi, Ba, Cr, Mo, Pb, Li, Cs, Co, Al, V, Ni, Be, Ga, Ag, Cd, In, Ti, Hg e As em solução de HNO₃ (Merck) 1,0 % (v/v) foi preparada a partir da diluição de solução estoque contendo estes elementos nas concentrações de 10 mg/L para Ca, Fe, K e Na; 1,0 mg/L de Mg, Rb, Zn, Mn, Cu, Sr, Bi, Ba, Cr, Mo, Pb, Li, Cs, Co, Al, V, Ni, Be, Ga, Ag, Cd, In e Ti (Titrisol, Merck, Alemanha) e 1000 µg/L de As e Hg, preparada conforme descrito no item 4.4. Esta solução foi armazenada em refrigerador até o momento da análise.

4.6 Avaliação da composição das amostras utilizando um método de referência

Com o propósito de se conhecer a composição mineral do mel, foram determinados os teores de 32 elementos químicos em 16 amostras, provenientes de diferentes regiões do estado de Minas Gerais. Esse estudo foi feito para se definir melhor quais metais são mais relevantes de serem estudados nessa matriz, além dos metais considerados mais tóxicos, como As e Hg. Outro objetivo foi caracterizar melhor a matriz e buscar correlações entre os metais presentes.

O procedimento de decomposição das amostras foi realizado em um forno de micro-ondas de alta pressão, modelo ETHOS da Milestone Srl (Itália). Cerca de 0,25 g de cada amostra foram digeridos utilizando 4,00 mL de HNO₃ 65 % (v/v), 2,00 mL de

H₂O₂ 30 % (m/v) e 2,00 mL de água deionizada, conforme o procedimento proposto por MENDES e colaboradores [49], com algumas modificações para atender as especificações do fabricante do forno de micro-ondas. O programa de aquecimento utilizado na decomposição das amostras de mel é apresentado na Tabela 03. Foram feitas três repetições para cada amostra. Após a decomposição, o digerido foi transferido para tubos de polipropileno de 50 mL de capacidade e completou-se o volume com água ultra pura até 25 mL. Estas soluções foram armazenadas em refrigerador até o momento da análise.

Tabela 03. Programa de aquecimento utilizado para decomposição das amostras de mel em forno de micro-ondas ETHOS.

| Etapa | Temperatura (°C) | Rampa (min) | Patamar (min) |
|-------|------------------|-------------|---------------|
| 1 | 80 | 5 | 1 |
| 2 | 150 | 3 | 10 |
| 3 | 180 | 2 | 14 |
| 4 | Resfriamento | - | 30 |

A quantificação dos elementos foi feita utilizando o espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado modelo 820 MS, da Varian (Austrália), localizado no Laboratório de Elementos Inorgânicos do LANAGRO, em Pedro Leopoldo – MG. As condições operacionais foram: potência do plasma: 1,50 kW; fluxo do gás do plasma: 17,00 L/min; fluxo do gás auxiliar: 1,70 L/min; fluxo de nebulização: 1,00 L/min.

4.7 Otimização do método analítico para determinação direta de Hg em mel empregando a CVAAS

Os planejamentos fatoriais e composto central, entre outros, são ferramentas eficientes e que permitem avaliar a influência de vários fatores nas respostas estudadas utilizando-se poucos ensaios. Dessa maneira, eles foram utilizados nas etapas seguintes de otimização dos métodos.

4.7.1 Planejamento fatorial fracionário

Para otimizar a determinação de Hg em mel utilizando a CVAAS sem decomposição prévia da amostra foi empregado um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} . Nesse planejamento foram avaliados os comportamentos simultâneos de quatro fatores: agente redutor (F1), concentração de ácido (F2), concentração de amostra (F3) e diluente (F4), todos em dois níveis, de acordo com a Tabela 04. Como as amostras de mel disponíveis não apresentaram contaminação com Hg, elas foram contaminadas com Hg numa concentração de 50 $\mu\text{g/L}$ na otimização do método.

Tabela 04. Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS.

| Fatores | | Nível baixo (-1) | Nível alto (+1) |
|---------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| F(1) | Redutor | NaBH_4 0,2 % (m/v) | SnCl_2 1,0 % (m/v) |
| F(2) | HCl | 3,0 % (v/v) | 10,0 % (v/v) |
| F(3) | Concentração de amostra | 1,0 % (m/v) | 5,0 % (m/v) |
| F(4) | Diluente | H_2O | HCl 1,0 % (v/v) |

Como o experimento envolve quatro fatores com dois níveis cada, ele é do tipo 2^{4-1} e requer oito ensaios. Em cada ensaio foram feitas duas repetições, totalizando 16 ensaios, que foram conduzidos em ordem aleatória.

Estes ensaios e os ensaios do item 4.7.2 foram feitos utilizando o espectrômetro de absorção atômica, modelo AAnalyst™ 400, equipado com sistema de geração de hidretos, modelo FIAS 100, da PerkinElmer (EUA). Foi utilizada lâmpada EDL da PerkinElmer para Hg operando em condições recomendadas. Foram utilizados 500 μL de solução por análise. Argônio (White Martins, Brasil) foi usado como gás inerte de transporte.

4.7.2 Planejamento composto central

A partir dos resultados obtidos no planejamento fracionário foi feito o planejamento composto central (CCD) para se obter a concentração ótima dos fatores: concentração do agente redutor F(1), concentração do ácido F(2) e concentração de

amostra F(3), em amostras de mel contaminadas com Hg numa concentração de 50 µg/L, de acordo com a Tabela 05.

Tabela 05. Fatores e níveis estudados no planejamento CCD para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS.

| Fatores | - 1,68 | - | 0 | + | + 1,68 |
|--------------------------------------|--------|------|------|------|--------|
| F(1) NaBH ₄ % (m/v) | 0,06 | 0,20 | 0,40 | 0,60 | 0,74 |
| F(2) HCl % (v/v) | 1,32 | 2,00 | 3,00 | 4,00 | 4,68 |
| F(3) Concentração de amostra % (m/v) | 1,32 | 2,00 | 3,00 | 4,00 | 4,68 |

O ensaio correspondente ao nível 0 para os três fatores foi realizado em quintuplicada, totalizando 19 ensaios.

4.7.3 Planejamento composto central empregando diluente

Com o objetivo de aumentar a massa de amostra utilizada na determinação de Hg em mel, foi empregado um planejamento CCD para otimizar uma nova composição de diluentes combinados a diferentes concentrações de amostra. Os fatores estudados foram: a concentração de peróxido de hidrogênio F(1), concentração de ácido nítrico F(2) e a concentração de amostra F(3), em amostras de mel contaminadas com Hg numa concentração de 10 µg/L, de acordo com a Tabela 06.

Tabela 06. Fatores e níveis estudados no planejamento CCD empregando diluente para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS.

| Fatores | - 1,68 | - | 0 | + | + 1,68 |
|--|--------|------|------|------|--------|
| F(1) H ₂ O ₂ % (v/v) | 0,64 | 2,00 | 4,00 | 6,00 | 7,36 |
| F(2) HNO ₃ % (v/v) | 0,64 | 2,00 | 4,00 | 6,00 | 7,36 |
| F(3) Concentração de amostra % (m/v) | 2,64 | 4,00 | 6,00 | 8,00 | 9,36 |

O ensaio correspondente ao nível 0 para os três fatores foi realizado em quintuplicada, totalizando 19 ensaios.

As análises foram feitas aproximadamente duas horas após o preparo dessas soluções, utilizando o espectrômetro de absorção atômica, modelo SpectrAA 220 e sistema de geração de hidretos, modelo VGA 77, da Varian (Austrália) com lâmpada de

Hg de catodo oco da Varian, operando nas condições recomendadas. Foi utilizado NaBH_4 0,6 % (m/v) em NaOH 0,5 % (m/v) como redutor e HCl 6,0 mol/L, com fluxos de 1,3 mL/min. O fluxo da amostra foi de 8,0 mL/min. Argônio (White Martins, Brasil) foi usado como gás inerte de transporte. Os ensaios do item 4.7.4 e a validação do método (item 4.11) foram conduzidos utilizando estes equipamentos.

A troca do equipamento de geração do vapor frio foi necessária para trabalhar com concentrações maiores de amostra, possibilitando a obtenção de melhores limites de detecção. O VGA 77 (Varian, Austrália) utiliza um sistema que possui separador gás-líquido de vidro, ao invés de membrana, utilizada no FIAS 100 (PerkinElmer, EUA). Nas concentrações acima de 2,0% de amostra houve a formação de bolhas ou espumas, que molhavam a membrana, entupiam o sistema e podem ter causado erros nas análises.

4.7.4 Otimização do tempo de contato e concentração de HCl

Nesse estudo, optou-se por realizar um planejamento para conhecer melhor o desempenho do método frente a alterações no tempo de preparo e na concentração de HCl , utilizado durante a etapa geração do vapor frio. Foram preparadas soluções contendo 5,0 % (m/v) de mel, adicionadas com 10,0 $\mu\text{g/L}$ de Hg. Adicionou-se H_2O_2 e HNO_3 de forma a obter uma concentração de 4,0 % (v/v) e 6,0 % (v/v), respectivamente. As soluções foram deixadas em repouso durante 2 ou 18 horas, e as medidas de Hg foram feitas utilizando NaBH_4 0,6 % (m/v) em NaOH 0,5 % (m/v) e HCl em diferentes concentrações: 2,5; 3,3 e 5,0 mol/L.

Após as otimizações do método de determinação de Hg em mel por CVAAS, foi feita uma validação do método de forma a se conhecer a seletividade, linearidade, veracidade, precisão, limites de detecção e de quantificação, conforme descrito no item 4.11.

4.8 Otimização do método de determinação de Hg em mel utilizando DMA

A Figura 02 mostrou um desenho esquemático do DMA-80, Milestone Srl (Itália). O princípio de funcionamento do equipamento é a queima total da amostra e retenção do Hg liberado em um *trap* de ouro. Este é posteriormente aquecido e o Hg liberado, sendo medida a absorção atômica do Hg, utilizando uma lâmpada de Hg (253,7 nm) como fonte de radiação.

Previamente às análises das amostras, foi realizada uma otimização do procedimento para comprovar o desempenho analítico do DMA visando à obtenção de um menor tempo de análise, para aumentar o tempo de vida do catalisador. As condições operacionais avaliadas foram: tempo de secagem F(1), tempo de queima F(2) e temperatura de secagem F(3), empregando o planejamento CCD mostrado na Tabela 07. Para atingir a temperatura de secagem e de queima foram utilizadas rampas de aquecimento de 60 s e 90 s, respectivamente, esses valores foram obtidos após avaliações dos gráficos de aquecimento do equipamento e foram adequados para assegurar que o equipamento conseguisse acompanhar o gráfico do programa de aquecimento de forma estável. Após cada rampa de aquecimento, os tempos de permanência em cada temperatura foram avaliados conforme a Tabela 07. A temperatura de queima foi mantida fixa em 650 °C, esse valor foi obtido após avaliações visuais dos recipientes de níquel após a queima em temperaturas de 400 °C a 700 °C (limite do equipamento) e possibilitou a obtenção de cinzas claras residuais nos recipientes, garantindo que houvesse a queima total da amostra. A calibração do DMA foi feita seguindo o método US EPA 7473 [82]. Oxigênio (Air Products, Brasil) foi usado como gás de transporte.

Tabela 07. Fatores e níveis estudados no planejamento CCD para otimização do método de determinação de Hg por DMA.

| Fatores | - 1,68 | - | 0 | + | + 1,68 |
|----------------------------------|--------|-----|-----|-----|--------|
| F(1) Tempo de secagem (s) | 10 | 30 | 60 | 90 | 110 |
| F(2) Tempo de queima (s) | 10 | 30 | 60 | 90 | 110 |
| F(3) Temperatura de secagem (°C) | 150 | 190 | 250 | 310 | 350 |

Previamente às análises das amostras, foi feita uma validação do método de forma a se conhecer a seletividade, linearidade, veracidade, precisão, limites de detecção e de quantificação, conforme descrito no item 4.11.

4.9 Otimização de método analítico para determinação direta de As total em mel empregando HGAAS

4.9.1 Planejamento fatorial

A determinação de As em mel foi otimizada utilizando HGAAS, sem etapa de decomposição à quente da amostra e empregando-se, inicialmente, um planejamento fatorial completo 2^4 para triagem dos fatores. Foram estudados os comportamentos simultâneos de quatro fatores: concentração do agente redutor NaBH_4 F(1), concentração de ácido HCl F(2), concentração de ácido na amostra F(3) e uso de diferentes redutores, iodeto de potássio ou tiouréia F(4) de acordo com a Tabela 08. Para se obter um sinal adequado no sistema HGAAS, adicionou-se As^{5+} na amostra de mel utilizada na otimização numa concentração de 0,50 mg/kg.

Tabela 08. Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial para otimização do método de determinação de As por HGAAS.

| Fatores | Nível baixo (-1) | Nível alto (+1) |
|-------------------------------|------------------|--|
| F(1) NaBH_4 | 0,5 % (m/v) | 1,0 % (m/v) |
| F(2) HCl | 2,5 mol/L | 5,0 mol/L |
| F(3) HCl (diluyente) | 0 | 1,0 mol/L |
| F(4) Redutor | KI 1,0 % (v/v) | $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ 1,0 % (m/v) |

Este experimento envolveu quatro fatores com dois níveis cada, e como é um planejamento fatorial completo requer dezesseis ensaios. Em cada ensaio foram feitas duas repetições, totalizando 32 ensaios. As amostras foram preparadas a partir da diluição de 5 g para 100 mL do diluyente (5,0 % m/v).

As leituras foram feitas aproximadamente duas horas após o preparo dessas soluções. Estes ensaios e os demais ensaios do item 4.9 foram feitos utilizando o espectrômetro de absorção atômica, modelo SpectrAA 220 e sistema de geração de hidretos, modelo VGA 77, da Varian (Austrália). Como fonte de radiação foi utilizada lâmpada de As de catodo oco da Varian, operando nas condições recomendadas pelo fabricante. O redutor e o ácido foram inseridos no sistema com fluxos de 1,3 mL/min. O fluxo da amostra foi de 8,0 mL/min. Argônio (White Martins, Brasil) foi usado como gás inerte de transporte.

4.9.2 Planejamento composto central

Nesta etapa foi feito o planejamento CCD (Tabela 09) para otimização da concentração dos fatores: concentração de ácido na amostra F(1), concentração do pré-reduzidor F(2) e concentração do agente redutor NaBH_4 F(3), selecionados após o planejamento fatorial (item 4.9.1). Amostra de mel contaminada com uma concentração de 0,50 mg/kg de As^{5+} também foi utilizada neste estudo. O ensaio correspondente ao nível 0 para os três fatores foi realizado em quintuplicada, requerendo 19 ensaios no total. As amostras foram preparadas a partir da diluição de 5 g para 100 mL do diluente (5,0 % m/v).

Tabela 09. Fatores e níveis estudados no planejamento CCD para otimização do método de determinação de As por HGAAS.

| Fatores | - 1,68 | - | 0 | + | + 1,68 |
|---|--------|------|------|------|--------|
| F(1) HCl (diluente) mol/L | 0,16 | 0,50 | 1,00 | 1,50 | 1,84 |
| F(2) $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ % (m/v) | 0,20 | 0,40 | 0,70 | 1,00 | 1,20 |
| F(3) NaBH_4 % (m/v) | 0,20 | 0,40 | 0,70 | 1,00 | 1,20 |

4.9.3 Otimização da proporção de amostra e tempo de contato

Soluções contendo 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 % (m/v) de mel foram contaminadas com 20,0 $\mu\text{g/L}$ de As^{5+} . Adicionou-se HCl de forma a se obter uma solução com concentração final de 1,3 mol/L e $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ 1,0 % (m/v). Após duas horas, as soluções foram analisadas utilizando HGAAS. As medidas foram feitas utilizando como redutor, NaBH_4 0,85 % (m/v) em NaOH 0,5 % (m/v) e HCl 2,5 mol/L. A solução contendo 2,0 % (m/v) de mel foi analisada nas mesmas condições, após quatro horas de repouso. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

Previamente às análises das amostras, foi feita uma validação do método de análise direta de As, de forma a se conhecer a seletividade, linearidade, veracidade, precisão, limites de detecção e de quantificação, conforme descrito no item 4.11.

4.10 Otimização de método analítico para determinação Cd, Cu e Pb em mel empregando TS-FF-FS-AAS

Para otimização dos métodos de determinação de Cd, Cu e Pb em amostras de mel, foram estudados inicialmente os efeitos do comprimento do tubo de níquel e a quantidade de furos, fluxo da amostra e o modo de aquisição de sinal. Em seguida, foram estudados os efeitos dos fatores tempo e temperatura de extração e o uso dos reagentes ácido nítrico, ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio, utilizando-se planejamentos fatoriais e CCD, descritos no item 4.10.5.

A otimização e a validação foram feitas utilizando o espectrômetro de absorção atômica com chama, modelo SpectrAA 220 (Varian, Austrália) mostrado na Figura 05, que permite a aquisição de sinal dos elementos Cd, Cu e Pb de maneira sequencial rápida, o que é vantajoso em termos de menor tempo de análise e conseqüentemente um menor consumo do gás acetileno em relação aos demais equipamentos, que realizam a leitura de cada elemento separadamente.

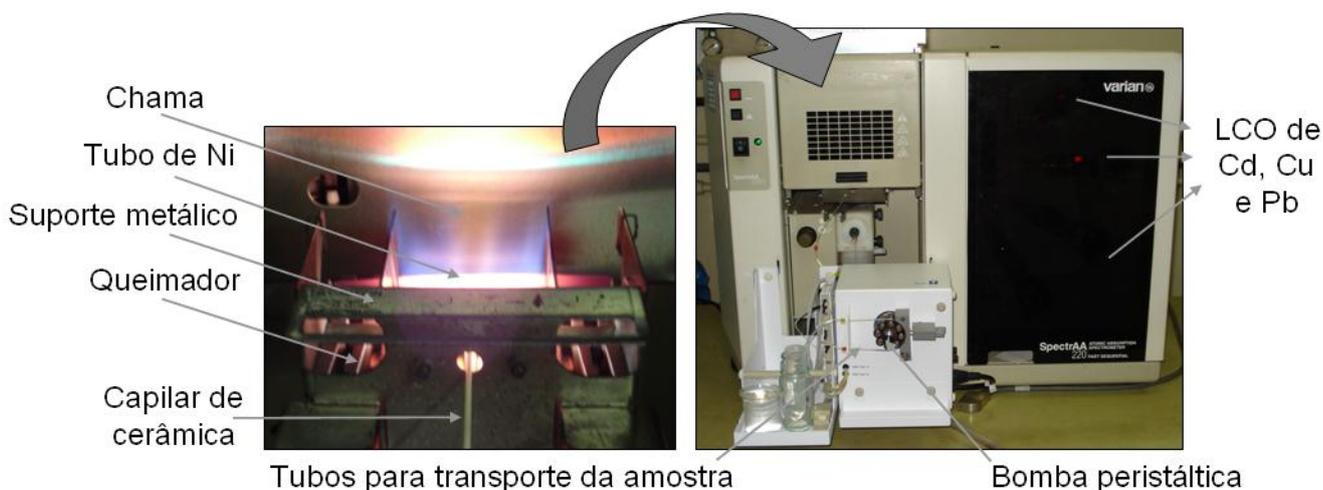


Figura 05. Suporte metálico contendo o tubo de níquel e capilar de cerâmica, aquecidos pela chama composta por ar e acetileno (à esquerda). E foto geral do equipamento de absorção atômica com chama (SpectrAA 220, Varian), no qual a amostra é transportada em um tubo de policloreto de vinila com auxílio de um bomba peristáltica do sistema de geração de hidretos (VGA 77, Varian) e analisada de forma sequencial com o auxílio das lâmpadas de catodo oco (LCO) de Cd, Cu e Pb (à direita).

Os tubos de níquel foram posicionados a 0,5 cm de altura em relação à chama do queimador com o auxílio do mesmo suporte metálico utilizado para apoio das celas de quartzo nas análises por HGAAS, após adaptação (Figura 05). O tubo de níquel foi posicionado na chama somente após o acendimento da mesma, para evitar explosões que podem ocorrer conforme descrito na literatura [63]. As soluções foram transportadas até o tubo de níquel com auxílio da bomba peristáltica do sistema de geração de hidretos, modelo VGA 77 (Varian). As soluções foram conduzidas através de tubos flexíveis de cloreto de polivinila com travas amarelo/laranja de diâmetro interno de 0,5 mm, acoplado em um capilar de cerâmica de 10 cm de comprimento, de 0,5 mm de diâmetro interno e 2,0 mm de diâmetro externo. O final do capilar de cerâmica foi cuidadosamente inserido no tubo de níquel após o acendimento da chama. Foram utilizadas lâmpadas de catodo oco de Cd, Cu e Pb operando nas condições recomendadas pelo fabricante. Foi utilizada chama composta por ar e acetileno, com fluxos de 12,0 L/min e de 2,2 mL/min.

4.10.1 Avaliação do comprimento do tubo de níquel e da quantidade de furos na resposta instrumental

Neste estudo, brancos e soluções contendo Cd (10,0 µg/L), Pb (100 µg/L) e Cu (100 µg/L), foram preparadas em meio ácido, com HNO₃ (10⁻³ mol/L), em triplicata, e foram utilizados para avaliar a resposta instrumental obtida por tubos de níquel com as seguintes especificações:

- 10 cm de comprimento com 6 furos,
- 10 cm de comprimento com 10 furos,
- 10 cm de comprimento e chanfrado,
- 6 cm de comprimento com 6 furos.

A aquisição de sinal foi feita de forma sequencial no modo integração, utilizando um tempo de leitura por elemento de 1 s e fluxo das soluções padrão de 0,6 mL/min. As leituras por TS-FF-FS-AAS foram feitas utilizando-se os tubos de níquel com os furos posicionados para baixo, de forma que a chama penetrasse dentro do tubo. Em seguida, os tubos foram invertidos, ou seja, os furos foram posicionados para cima, com a chama envolvendo o tubo na parte exterior sem penetrar internamente.

4.10.2 Avaliação do fluxo de amostragem na resposta instrumental

Para avaliar o efeito do fluxo na resposta instrumental foram preparadas soluções contendo Cd (10,0 µg/L), Pb (100 µg/L) e Cu (100 µg/L). Foram avaliados os fluxos de: 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8 mL/min. As leituras foram feitas no TS-FF-FS-AAS utilizando-se os tubos de níquel de 10 cm de comprimento com 6 furos posicionados para baixo, utilizando um tempo de leitura por elemento de 1 s e triplicata de leitura.

4.10.3 Avaliação do modo de aquisição de sinal

Soluções padrão contendo Cd (10,0 µg/L), Pb (100 µg/L) e Cu (100 µg/L), preparadas com HNO₃ (10⁻³ mol/L) foram lidas utilizando um tubo de níquel com 10 cm de comprimento e 6 furos, nos modos: altura de pico, integração e área de pico, com aquisição de sinal por 3 s.

4.10.4 Estimativa do LD para utilização do TS-FF-FS-AAS nas determinações de Cd, Cu e Pb em mel

Nesta etapa, foi preparada uma curva de calibração (em triplicata) contendo HNO₃ (10⁻³ mol/L), Cd nas concentrações de: 0,05; 0,10; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µg/L, Cu e Pb nas concentrações de: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 µg/L, com o propósito de estimar o limite de detecção e verificar a adequação do uso da técnica TS-FF-FS-AAS em atendimento aos limites estabelecidos pelas legislações vigentes [6, 9] para Cd, Cu e Pb em mel. As leituras das curvas de calibração foram feitas utilizando a integração de área por 3 s.

4.10.5 Planejamento fatorial

Inicialmente, para otimização do procedimento de abertura da amostra para determinação sequencial de Cd, Cu e Pb em mel, foi utilizado um planejamento fatorial 2⁴ para triagem dos fatores: tempo e temperatura de extração e o uso dos reagentes ácido nítrico, ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio. Em seguida, foi realizado um planejamento CCD para obtenção das condições ótimas de análise (item 4.10.6).

O planejamento fatorial 2^4 foi conduzido para estudar o efeito de quatro fatores: F(1) ácidos (HNO_3 e HCl), F(2) volume de H_2O_2 , F(3) tempo e F(4) temperatura de extração, de acordo com a Tabela 10. Pesou-se 1,00 g de amostra de mel contaminada com 10,0 mg/kg de Cu, 0,10 mg/kg de Cd e 0,30 mg/kg de Pb para tubos de vidro com dimensões de 25 mm de diâmetro por 250 mm de comprimento. Adicionou-se 2,0 mL de HNO_3 ou 1,5 mL de HNO_3 mais 0,5 mL de HCl , conforme a Tabela 10. Ajustou-se a temperatura do bloco para 70 °C. Ao atingir essa temperatura os tubos foram mantidos em aquecimento por cerca de 5 minutos e com agitação manual para solubilizar a amostra nos ácidos, evitando-se reações violentas que podem ocorrer com um aumento rápido de temperatura. Em seguida, as soluções foram aquecidas a 80 °C ou 130 °C, durante 10 ou 30 minutos, utilizando-se um bloco digestor modelo MA 4025, Marconi (Brasil). Após a metade deste tempo, foi feita a adição ou não de 1,00 mL de H_2O_2 , conforme a Tabela 10. Ao final, os tubos foram esfriados até atingir a temperatura do ambiente e os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno de 50 mL de capacidade. Completou-se o volume com água ultra pura até 50 mL. Estas soluções foram armazenadas em refrigerador até o momento da análise.

As análises foram feitas por TS-FF-FS-AAS utilizando-se tubo de níquel com 6 furos. A aquisição de sinal foi feita utilizando a integração de área de pico durante 3 s para Cd e Cu e 6 s para o Pb e fluxo das soluções de 0,6 mL/min.

Tabela 10. Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial 2^4 para otimização do método de determinação de Cd, Cu e Pb por TS-FF-FS-AAS.

| Fatores | Nível baixo (-) | Nível alto (+) |
|--|-------------------------|---|
| F(1) Ácido (mL) | HNO_3 (2,0 mL) | HNO_3 (1,5 mL) + HCl (0,5 mL) |
| F(2) Volume de H_2O_2 (mL) | 0 | 1 |
| F(3) Tempo (min) | 10 | 30 |
| F(4) Temperatura (°C) | 80 | 130 |

4.10.6 Planejamento composto central

Neste estudo foi realizado um planejamento CCD para otimizar a proporção entre os reagentes ácido nítrico e peróxido de hidrogênio F(1), utilizados em diferentes tempos F(2) e temperaturas F(3) de extração, como apresentado na Tabela 11. A amostra de mel contaminada com 10,0 mg/kg de Cu, 0,10 mg/kg de Cd e 0,30 mg/kg de Pb também

foi utilizada neste estudo. Os ensaios foram conduzidos utilizando o procedimento descrito no item 4.10.5, mantendo uma diluição final de 1,00 g de amostra para 50,0 mL do diluente (2,0 % m/v). O ensaio correspondente ao nível 0 para os três fatores foi realizado em quintuplicada, requerendo 19 ensaios no total.

Tabela 11. Fatores e níveis estudados no planejamento CCD para otimização do método de determinação de Cd, Cu e Pb por TS-FF-FS-AAS.

| Fatores | -1,68 | -1 | 0 | +1 | +1,68 |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| F(1) HNO ₃ + H ₂ O ₂ (mL) | 2,0 + 0,0 | 2,0 + 0,5 | 2,0 + 1,0 | 2,0 + 1,5 | 2,0 + 1,8 |
| F(2) Tempo (min) | 5 | 15 | 30 | 45 | 55 |
| F(3) Temperatura (°C) | 76,5 | 90 | 110 | 130 | 143,5 |

4.11 Validação dos métodos analíticos

As validações dos métodos foram feitas baseando-se nas recomendações do INMETRO [70], MAPA [72, 73] e trabalhos científicos recentes de SOUZA e colaboradores [74, 75]. Os parâmetros de desempenho analítico estudados foram: linearidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e veracidade. O processo de validação foi conduzido através de ensaios com soluções padrão, materiais de referência certificados, amostras de mel brancas e adicionadas de padrão.

Para a determinação de Hg em mel utilizando a técnica de CVAAS, descrita no item 4.7, validou-se o método otimizado: preparo de solução contendo 5,0 % (m/v) de mel, 4,0 % (v/v) de H₂O₂ e 6,0 % (v/v) de HNO₃. As soluções podem ser deixadas em repouso por até 18 horas, e as medidas de Hg devem ser feitas utilizando como redutor, NaBH₄ 0,6 % (m/v) em NaOH 0,5 % (m/v) e HCl 6,0 mol/L. O método de determinação de Hg em mel empregando DMA descrito no item 4.8 e resumido na Tabela 24 (pág. 63) também foi validado.

Para a determinação de As em mel utilizando a técnica de HGAAS, descrita no item 4.9, o método otimizado e validado foi: preparo de solução contendo 5,0 % (m/v) de mel, 1,3 mol/L de HCl e 1,0 % (m/v) de SC(NH₂)₂. As soluções podem ser deixadas em repouso por até 4 horas após o preparo, e as medidas de As devem ser feitas utilizando como redutor, NaBH₄ 0,85 % (m/v) em NaOH 0,5 % (m/v) e HCl 2,5 mol/L.

Para a determinação de Cd, Cu e Pb em amostras de mel por TS-FF-AAS, cujo desenvolvimento foi descrito no item 4.10, o método otimizado foi: pesar 1,00 g de amostra diretamente para tubos de vidro, adicionar 2,0 mL de HNO₃ e levar ao aquecimento utilizando-se um bloco digestor modelo MA 4025 da Marconi (Brasil). Os tubos devem ser colocados no bloco digestor, que deve estar à temperatura ambiente. Ajustar a temperatura do bloco para 70 °C. Ao atingir essa temperatura, manter os tubos em aquecimento por 5 minutos e com agitação manual. Em seguida, elevar a temperatura a 128 ± 5 °C e manter o aquecimento durante 15 minutos. Adicionar 1,0 mL de H₂O₂ e continuar a digestão da amostra por mais 15 minutos, mantendo-se a temperatura em 128 ± 5 °C. Ao final, os tubos devem ser esfriados até atingir a temperatura do ambiente e os digeridos transferidos para frascos de polipropileno de 50 mL de capacidade, utilizando-se água ultra pura para completar o volume. As análises devem ser feitas por TS-FF-FS-AAS utilizando-se tubo de níquel com 6 furos e 10 cm de comprimento. A aquisição de sinal deve ser feita utilizando a integração de área de pico durante 3 s para Cd e Cu e 6 s para o Pb e fluxo das soluções de 0,6 mL/min.

4.11.1 Seletividade e linearidade

A seletividade foi avaliada em termos de efeito de matriz, através do preparo de três curvas de calibração: uma curva contendo apenas o analito e os reagentes, e duas curvas contendo amostra de mel com adição do analito e reagentes adequados. As amostras de mel utilizadas neste estudo eram provenientes de cidades diferentes e com características visuais bem distintas. As três curvas foram preparadas em triplicatas independentes. A linearidade de resposta do detector foi determinada nas três curvas de calibração, utilizando-se o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO).

As soluções foram preparadas e medidas de acordo com os procedimentos otimizados, descritos no item 4.11 e contendo separadamente de 0,0 µg/L a 100,0 µg/L de Hg e de 0,0 µg/L a 40,0 µg/L de As⁵⁺, utilizando a técnica HGAAS. Na determinação de Hg empregando o DMA foram preparadas curvas contendo de 0,0 µg/kg a 50,0 µg/kg de amostra. Para determinação de Cd, Cu e Pb em mel utilizando TS-FF-FS-AAS foram preparadas curvas contendo Cd, Cu e Pb em concentrações de 0,0 µg/L a 5,0 µg/L; 0,0 µg/L a 230,0 µg/L e 0,0 µg/L a 30,0 µg/L, respectivamente.

Após as medidas, as curvas analíticas foram construídas e o tratamento estatístico dos dados foi feito utilizando as planilhas do programa Excel da Microsoft Office (2003).

4.11.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Existem diferentes protocolos para estimar o LD e LQ, mas nem sempre os mesmos resultados são obtidos. Diante dessa variabilidade de formas, os diferentes procedimentos para cálculo de LD e LQ, descritos no item 3.4, foram aplicados ao método de determinação de Hg em mel por CVAAS e os resultados foram analisados criticamente, relacionando-os com a veracidade e precisão do método, permitindo selecionar o procedimento de estimativa desses limites que fosse mais adequado. Após a avaliação das metodologias de estimativa do LD e LQ, discutidas no item 5.2.6.2, optou-se por realizar uma estimativa inicial dos limites pelos procedimentos propostos pelo INMETRO [70] e/ou RIBEIRO [80], seguida da avaliação da porcentagem de recuperação e desvio padrão conforme o procedimento proposto por SOUZA [74]. Foram preparados dez brancos de amostras e três curvas analíticas para cada método, em concentrações de: 2,5 µg/L a 75,0 µg/L de Hg (CVAAS), de 1,0 µg/kg a 50,0 µg/kg de Hg para determinação de Hg empregando o DMA, de 1,0 µg/L a 40,0 µg/L de As⁵⁺, de 0,010 mg/kg a 0,250 mg/kg para Cd, 4,00 mg/kg a 11,50 mg/kg para Cu e 0,25 mg/kg e 1,50 mg/kg para Pb. Foram comparadas a veracidade e a precisão obtidas em ensaios de adição e recuperação nos diferentes níveis de concentração: 30 e 60 µg/kg de Hg (CVAAS), 1,0 e 2,5 µg/kg de Hg (DMA), 20 e 40 µg/kg de As⁵⁺ e 20 e 40 µg/kg de As³⁺ (HGAAS), 0,010 e 0,025 mg/kg de Cd, 1,0 e 4,0 mg/kg de Cu, 0,10 e 0,25 mg/kg de Pb (TS-FF-AAS). As medidas foram realizadas utilizando as condições descritas no item 4.11.

4.11.3 Veracidade e precisão

A veracidade e a precisão dos métodos de determinação de Hg e As em mel utilizando a CVAAS e HGAAS, respectivamente, foram determinadas preparando-se soluções contendo 5,0 % (m/v) de mel adicionadas de Hg (0,50 e 1,00 mg/kg) e 5,0 % (m/v) de mel adicionadas de As³⁺ e As⁵⁺ (0,30 e 0,50 mg/kg), num total de seis repetições. Em outro dia, as soluções contendo Hg (1,00 mg/kg), As³⁺ e As⁵⁺ (0,30 e 0,50 mg/kg) foram preparadas novamente para avaliação da precisão intermediária. O Hg e o As foram determinados seguindo o método otimizado, descrito no item 4.11.

A veracidade da determinação de Hg em mel empregando DMA foi avaliada através da análise de materiais de referência certificados SRM-8415 (ovo em pó integral,

National Institute of Standards and Technology), IAEA-336 (líquen, *International Atomic Energy Agency*) e GBW-08301 (sedimento de rio, *Institute of Environmental Chemistry Academia Sinica*). Adicionalmente, a veracidade e a precisão, sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, foram avaliadas através da análise de Hg em amostras de mel após a adição de 10 e 50 µg/kg de Hg.

A veracidade e a precisão do método de determinação de Cd, Cu e Pb em mel utilizando TS-FF-FS-AAS foram determinadas preparando-se soluções contendo 2,0 % (m/v) de mel e adição de Cd, Cu e Pb nas concentrações de 0,010 mg/kg a 0,250 mg/kg para Cd, 1,00 mg/kg a 11,50 mg/kg para Cu e 0,10 mg/kg e 1,50 mg/kg para Pb e submetidas aos procedimento de preparo descrito no item 4.11, num total de seis repetições. Em outro dia, soluções contendo 0,10 mg/kg de Cd, 10,0 mg/kg de Cu e 0,50 mg/kg de Pb foram preparadas novamente para avaliação da precisão intermediária.

Além da avaliação da veracidade através de ensaios de adição e recuperação, foi realizada a determinação de As, Cd, Cu e Pb nas amostras de mel estudadas (Tabela 02), como descrito no item 4.11. Os resultados obtidos com os novos métodos foram comparados com os resultados obtidos através da análise utilizando um método de referência.

A análise utilizando um método de referência foi dividida em duas etapas. A primeira etapa foi descrita no item 4.6 e também foi conduzida para verificar se alguma das 16 amostras inicialmente coletadas possuíam As, Cd, Cu, Hg ou Pb. Na segunda etapa, as demais amostras foram analisadas utilizando o procedimento validado pelo Laboratório de Elementos Inorgânicos do LANAGRO (Pedro Leopoldo - MG), que consistiu em: pesar cerca de 0,30 g de amostra, que foram digeridos com 6,0 mL de HNO₃ (150 mL/L) utilizando um forno de micro-ondas (Multiwave 300, Anton-Paar, Áustria), equipado com frascos de quartzo e sensor de temperatura. O programa de aquecimento utilizado na decomposição das amostras de mel é apresentado na Tabela 12. Em seguida, os digeridos foram transferidos para frascos de polipropileno e diluídos até completar 15,0 mL com água ultra pura. A quantificação dos elementos foi feita utilizando o espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado, modelo 820 MS (Varian, Austrália). As condições operacionais foram: potência do plasma: 1,50 kW, fluxo do gás do plasma: 17,00 L/min, fluxo do gás auxiliar: 1,70 L/min, fluxo de nebulização: 1,00 L/min e ítrio como padrão interno.

Tabela 12. Programa de aquecimento utilizado para decomposição das amostras de mel em forno de micro-ondas Anton-Paar.

| Etapa | Potência (W) | Rampa (min) | Patamar (min) |
|-------|--------------|-------------|---------------|
| 1 | 1000 | 10 | 5 |
| 2 | 900 | 15 | - |
| 3 | 700 | 15 | - |
| 4 | Resfriamento | 15 | - |

4.12 Determinação de As, Cd, Cu, Hg e Pb nas amostras de mel

Os contaminantes As, Cd, Cu, Hg e Pb foram determinados em todas as amostras de mel descritas no item 4.1 (Tabela 02). O Hg e As foram determinados utilizando os métodos otimizados por CVAAS e HGAAS, respectivamente, descritos no item 4.11. O Hg também foi determinado utilizando o DMA e as medidas foram feitas utilizando até 100 mg de amostra. No DMA, o Hg foi determinado empregando o programa de aquecimento otimizado descrito na Tabela 24 (pág. 63). Os contaminantes, Cd, Cu e Pb foram determinados utilizando os métodos otimizados por TS-FF-FS-AAS, descritos no item 4.11. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da composição das amostras utilizando um método de referência

Trinta e dois elementos (Mg, Ca, Rb, Zn, Mn, Fe, Cu, Sr, Bi, Ba, Cr, Mo, Pb, Li, Hg, As, Cs, Co, Se, Sn, Sb, Na, Al, V, Ni, Be, Ga, Ag, Cd, In, Ti e K) foram determinados em 16 amostras de mel, coletadas em diversas regiões do estado de Minas Gerais, no período de janeiro de 2005 a julho de 2009 (Tabelas 13 e 14). Este estudo foi conduzido com o propósito de se conhecer a composição mineral do mel e também verificar a presença e a concentração dos possíveis elementos tóxicos que predominam na região estudada. Além disso, esse estudo permitiu correlacionar a presença e concentração de um determinado elemento com a possibilidade de atuar como interferente nas próximas etapas do processo de desenvolvimento dos diferentes métodos analíticos.

Foi utilizado o procedimento de decomposição por via úmida empregando como oxidantes o ácido nítrico e o peróxido de hidrogênio em um forno de micro-ondas com cavidade, conforme o procedimento descrito no item 4.6. Esse procedimento foi escolhido por ser realizado em frasco fechado, garantindo que não houvesse perdas por volatilização dos elementos estudados. A técnica de ICP-MS foi selecionada por apresentar baixos limites de detecção e possibilitar a determinação simultânea e rápida dos elementos estudados.

As determinações de Se, Sn e Sb foram feitas no modo semi quantitativo, ou seja, utilizando a calibração de fábrica do instrumento. Para o Se, as leituras das amostras, em contagens por segundo, não diferiram das leituras do branco, com 95 % de confiança, pelo teste t de *Student*. Apesar das leituras do Sn e Sb terem sido superiores às leituras dos brancos, os resultados não foram conclusivos em função da grande variação dos resultados médios para cada amostra e elevados desvios padrão. As demais determinações foram feitas utilizando calibração externa. Para Ca, Fe, K e Na foram preparadas curvas de calibração nas concentrações de 0,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 $\mu\text{g/L}$ que correspondem a 0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 mg/kg destes elementos na amostra. Para Mg, Rb, Zn, Mn, Cu, Sr, Bi, Ba, Cr, Mo, Pb, Li, Hg, As, Cs, Co, Al, V, Ni, Be, Ga, Ag, Cd, In e Ti foram preparadas curvas de calibração nas concentrações de 0,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 $\mu\text{g/L}$, correspondendo a 0,0; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg/kg de mel.

Tabela 13. Concentração \pm desvio padrão de Mg, Ca, Rb, Zn, Mn, Fe, Cu, Sr e Bi em mel produzido em diferentes municípios do estado de Minas Gerais.

| Amostras de mel | Mg | Ca | Rb | Zn | Mn | Fe | Cu | Sr | Bi |
|------------------------|------------------|----------------|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| | mg/kg | mg/kg | mg/kg | $\mu\text{g/kg}$ | $\mu\text{g/kg}$ | $\mu\text{g/kg}$ | $\mu\text{g/kg}$ | $\mu\text{g/kg}$ | $\mu\text{g/kg}$ |
| 1. Bela Vista de Minas | 107,9 \pm 1,8 | 22,8 \pm 0,3 | >2800 | 3811,6 \pm 291,0 | > 5900,0 | 642,1 \pm 26,1 | 423,3 \pm 35,4 | 588,5 \pm 18,9 | 269,5 \pm 4,4 |
| 2. João Monlevade | 77,3 \pm 2,2 | 17,9 \pm 1,4 | 2170,9 \pm 95,8 | 7287,7 \pm 1509,1 | > 5900,0 | 255,5 \pm 53,6 | 1184,6 \pm 50,3 | 620,5 \pm 64,5 | 351,9 \pm 46,4 |
| 3. Santa Bárbara | 9,8 \pm 0,2 | 4,0 \pm 0,5 | 775,2 \pm 10,3 | 5479,0 \pm 1861,4 | 787,9 \pm 24,0 | 268,1 \pm 14,7 | 202,4 \pm 69,4 | 73,2 \pm 10,2 | 384,4 \pm 49,5 |
| 4. Brumadinho | 34,0 \pm 0,6 | 18,4 \pm 6,7 | 1328,3 \pm 506,9 | 5010,6 \pm 7053,3 | 3095,9 \pm 52,0 | 470,6 \pm 4,2 | 490,7 \pm 110,4 | 402,8 \pm 78,1 | 998,7 \pm 112,7 |
| 5. Juatuba | 103,3 \pm 0,9 | 19,5 \pm 1,2 | 1360,2 \pm 4,7 | 1374,1 \pm 194,6 | 4076,5 \pm 84,8 | 889,6 \pm 371,9 | 467,3 \pm 21,9 | 779,0 \pm 58,1 | 239,7 \pm 2,8 |
| 6. Bom Despacho | 77,3 \pm 0,8 | 24,7 \pm 1,2 | 2768,3 \pm 84,7 | 7823,5 \pm 2093,0 | 5671,4 \pm 98,3 | 1535,5 \pm 39,5 | 152,8 \pm 15,0 | 450,2 \pm 48,8 | 501,1 \pm 62,8 |
| 7. Lavras | 27,2 \pm 0,3 | 15,8 \pm 0,5 | 1238,5 \pm 24,9 | 5160,8 \pm 1208,6 | 4099,3 \pm 37,8 | 388,39 \pm 53,03 | 195,6 \pm 4,2 | 422,6 \pm 50,0 | 415,8 \pm 29,1 |
| 8. Alpinópolis | 16,8 \pm 0,9 | 11,2 \pm 4,6 | 225,5 \pm 6,4 | 2077,5 \pm 458,5 | 386,0 \pm 29,5 | 158,5 \pm 7,0 | 221,9 \pm 1,5 | 189,8 \pm 13,1 | 775,1 \pm 51,5 |
| 9. Uberlândia | 50,9 \pm 1,3 | 13,2 \pm 0,5 | 1577,8 \pm 20,8 | 4282,3 \pm 533,0 | 3945,7 \pm 130,2 | 306,3 \pm 9,0 | 179,3 \pm 19,6 | 406,8 \pm 7,7 | 368,5 \pm 35,4 |
| 10. Uberlândia | 11,8 \pm 0,8 | 9,6 \pm 2,3 | 150,8 \pm 5,0 | 6160,5 \pm 1661,6 | 724,4 \pm 42,3 | 203,3 \pm 10,5 | 120,4 \pm 4,4 | 241,1 \pm 33,9 | 445,2 \pm 119,0 |
| 11. Indianópolis | 55,6 \pm 0,3 | 20,0 \pm 0,2 | 1179,2 \pm 24,9 | 8879,7 \pm 1484,1 | 5894,5 \pm 10,9 | 514,7 \pm 53,1 | 132,3 \pm 6,1 | 683,7 \pm 55,6 | 1087,6 \pm 145,6 |
| 12. Carmo do Paranaíba | 34,3 \pm 0,2 | 10,4 \pm 2,0 | 994,8 \pm 505,4 | 7144,7 \pm 5271,1 | 1866,4 \pm 40,9 | 256,5 \pm 49,7 | 142,7 \pm 25,3 | 348,6 \pm 60,6 | 464,8 \pm 26,3 |
| 13. Patos de Minas | 20,7 \pm 0,3 | 7,2 \pm 0,6 | 953,3 \pm 25,1 | 2690,0 \pm 127,5 | 2732,5 \pm 130,1 | 227,3 \pm 23,4 | 163,5 \pm 25,5 | 154,2 \pm 12,5 | 389,9 \pm 57,0 |
| 14. Patos de Minas | 21,8 \pm 0,1 | 4,9 \pm 0,6 | 703,1 \pm 11,8 | 2481,7 \pm 245,1 | 943,4 \pm 11,8 | 551,4 \pm 195,8 | 112,0 \pm 7,6 | 213,3 \pm 21,6 | 298,2 \pm 61,2 |
| 15. Buritizeiro | 130,8 \pm 3,9 | 16,1 \pm 1,2 | 1012,3 \pm 25,7 | 959,1 \pm 320,9 | > 5900,0 | 535,8 \pm 20,9 | 156,0 \pm 18,4 | 659,3 \pm 24,9 | 420,6 \pm 35,8 |
| 16. Várzea da Palma | 131,3 \pm 20,2 | 17,9 \pm 2,5 | 737,6 \pm 118,6 | 2811,4 \pm 999,3 | 2633,6 \pm 392,6 | 252,4 \pm 45,3 | 341,0 \pm 7,5 | 329,5 \pm 43,8 | 681,9 \pm 396,1 |

Tabela 14. Concentração ± desvio padrão de Ba, Cr, Mo, Pb, Li, Cd, As, Cs e Co em mel produzido em diferentes municípios do estado de Minas Gerais.

| Amostras de mel | Ba | Cr | Mo | Pb | Li | Cd | As | Cs | Co |
|------------------------|--------------|---------------|-------------|-------------|------------|-------|-------|------------|------------|
| | µg/kg | µg/kg | µg/kg | µg/kg | µg/kg | µg/kg | µg/kg | µg/kg | µg/kg |
| 1. Bela Vista de Minas | 684,4 ± 5,6 | 184,6 ± 36,6 | 69,0 ± 9,3 | < 68 | 39,7 ± 2,4 | < 10 | < 23 | 25,0 ± 1,2 | 7,9 ± 0,4 |
| 2. João Monlevade | 488,1 ± 25,3 | 220,6 ± 8,1 | 65,5 ± 2,0 | < 68 | 35,9 ± 5,8 | < 10 | < 23 | 21,3 ± 1,5 | 9,7 ± 0,6 |
| 3. Santa Bárbara | 75,0 ± 3,9 | 266,3 ± 27,5 | 52,3 ± 6,8 | < 68 | 36,7 ± 8,0 | < 10 | < 23 | 15,3 ± 1,9 | 9,4 ± 1,1 |
| 4. Brumadinho | 531,2 ± 68,6 | 649,1 ± 92,5 | 61,4 ± 10,7 | 164,3 ± 6,8 | 32,1 ± 0,7 | < 10 | < 23 | 17,2 ± 0,6 | 8,0 ± 0,6 |
| 5. Juatuba | 891,8 ± 12,2 | 145,2 ± 3,8 | 53,8 ± 5,2 | < 68 | 31,6 ± 2,3 | < 10 | < 23 | 33,3 ± 0,3 | 6,4 ± 0,8 |
| 6. Bom Despacho | 630,0 ± 76,1 | 334,0 ± 43,2 | 76,4 ± 3,7 | 71,7 ± 17,6 | 42,1 ± 5,3 | < 10 | < 23 | 34,1 ± 2,0 | 10,7 ± 1,3 |
| 7. Lavras | 553,8 ± 50,7 | 290,7 ± 8,3 | 88,7 ± 17,7 | < 68 | 35,2 ± 9,0 | < 10 | < 23 | 20,5 ± 2,6 | 9,7 ± 1,7 |
| 8. Alpinópolis | 236,7 ± 13,2 | 615,4 ± 58,1 | 56,0 ± 9,0 | < 68 | 36,4 ± 6,5 | < 10 | < 23 | 12,2 ± 1,7 | 9,8 ± 0,4 |
| 9. Uberlândia | 283,2 ± 11,4 | 252,6 ± 31,4 | 87,2 ± 7,8 | < 68 | 37,2 ± 1,0 | < 10 | < 23 | 42,7 ± 0,2 | 8,4 ± 0,1 |
| 10. Uberlândia | 158,5 ± 4,1 | 278,1 ± 35,3 | 62,8 ± 22,7 | < 68 | 29,3 ± 2,4 | < 10 | < 23 | 10,0 ± 0,5 | 6,8 ± 1,7 |
| 11. Indianópolis | 674,6 ± 57,8 | 716,0 ± 124,3 | 85,6 ± 3,9 | 78,6 ± 4,4 | 35,2 ± 2,5 | < 10 | < 23 | 24,3 ± 0,6 | 8,7 ± 0,4 |
| 12. Carmo do Paranaíba | 646,5 ± 49,2 | 344,5 ± 33,0 | 67,2 ± 19,8 | < 68 | 51,7 ± 5,9 | < 10 | < 23 | 16,1 ± 0,6 | 10,0 ± 1,3 |
| 13. Patos de Minas | 179,3 ± 15,7 | 285,6 ± 51,3 | 49,5 ± 3,0 | < 68 | 29,3 ± 1,5 | < 10 | < 23 | 29,1 ± 0,8 | 9,2 ± 1,2 |
| 14. Patos de Minas | 300,9 ± 8,3 | 163,6 ± 19,8 | 60,2 ± 12,9 | < 68 | 36,3 ± 4,5 | < 10 | < 23 | 19,4 ± 1,1 | 10,0 ± 1,0 |
| 15. Buritizinho | 818,5 ± 44,5 | 309,6 ± 26,2 | 49,4 ± 0,5 | < 68 | 85,4 ± 3,0 | < 10 | < 23 | 21,9 ± 1,5 | 9,1 ± 0,2 |
| 16. Várzea da Palma | 312,6 ± 52,0 | 538,1 ± 358,1 | 46,5 ± 0,3 | < 68 | 72,5 ± 4,3 | < 10 | < 23 | 28,5 ± 1,5 | 9,0 ± 0,2 |

As tabelas 13 e 14 mostram os resultados obtidos nas determinações de Mg, Ca, Rb, Zn, Mn, Fe, Cu, Sr e Bi (Tabela 13) e Ba, Cr, Mo, Pb, Li, Cd, As, Cs e Co (Tabela 14). Os ensaios foram conduzidos em triplicata, permitindo estimar o desvio padrão em cada amostra. A quantificação dos elementos Al, Hg, V e Ni foi feita, entretanto, os resultados não foram conclusivos devido ao elevado desvio padrão entre as replicatas de cada amostra. Para Na e K as leituras das amostras foram superiores a faixa de trabalho do equipamento e para Be, Ga, Ag, In e Ti, as leituras de cada amostra não diferiram das leituras do branco, com 95 % de confiança, pelo teste t.

Além do Na e K, os minerais encontrados em maiores concentrações foram Ca, Mg e Rb (Tabela 13), com teores variando de 4,0 a 24,7 mg/kg, para o Ca; de 9,8 a 131,3 mg/kg para o Mg e 150,8 a 2768,3 mg/kg para o Rb. Os resultados obtidos para o Ca são semelhantes aos valores obtidos por BARONI e colaboradores [41], enquanto os valores obtidos para o Mg foram até dez vezes maiores. Os valores encontrados para o Rb são próximos aos valores encontrados por HERNANDEZ e colaboradores [83].

Zinco, Mn, Fe, Cu, Sr e Bi (Tabela 13) e Ba, Cr e Pb (Tabela 14) foram encontrados em concentrações intermediárias, variando de 959,1 a 8879,1 µg/kg para o Zn; 386,0 a 5900,0 µg/kg para o Mn; 158,5 a 1535,5 µg/kg para o Fe; 112,0 a 1184,6 µg/kg para o Cu; 73,2 a 779,0 µg/kg para o Sr; 239,7 a 1087,6 µg/kg para o Bi; 75,0 a 891,8 µg/kg para o Ba; 145,2 a 716,0 µg/kg para o Cr e até 164,3 µg/kg para o Pb. Os resultados obtidos para Zn, Mn, Cu, Sr e Ba são semelhantes aos valores obtidos por FERNANDES-TORRES e colaboradores [46] em mel produzido na Espanha. Os níveis de Fe e Cu são similares aos valores obtidos por MADEJCZYK & BARALKIEWICZ [4], os quais observaram que em amostras de coloração escura foram encontrados os maiores teores de Cu. Esta observação não se aplicou às amostras estudadas neste trabalho.

Em todas as amostras, as concentrações de Mo, Li, As, Cd, Cs e Co foram inferiores a 100,0 µg/kg, variando de 46,5 a 88,7 µg/kg para Mo; 29,3 a 85,5 µg/kg para Li; < 10 µg/kg para Cd; < 23 µg/kg para As; 10,0 a 42,7 µg/kg para Cs e 6,4 a 10,7 µg/kg para Co.

Todas as amostras estudadas apresentaram concentração de As e Cu abaixo dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, de 1,0 mg/kg e 10,0 mg/kg, respectivamente [6]. Em 2009, quando este estudo foi desenvolvido, apesar do Brasil não ter estabelecido limites para os metais Hg e Pb em mel, a presença destes contaminantes em algumas amostras estudadas sugeriu a necessidade de um estudo maior contemplando também estes elementos. Portanto, optou-se por desenvolver

métodos analíticos para extração e quantificação de contaminantes em mel que já possuem um limite estabelecido (As e Cu), e para Hg e Pb, que apresentam alta toxicidade e concentrações significativas, segundo as análises realizadas por ICP-MS.

Em 2011, o MERCOSUL adotou um limite de até 0,30 mg/kg para As e Pb e também de até 0,10 mg/kg para Cd em mel [9]. Estes valores também estão vigentes no Brasil, país membro do MERCOSUL. Dessa forma, tornou-se necessário o desenvolvimento de métodos para determinar também o Cd em mel.

5.2 Otimização de método analítico para determinação direta de Hg em mel empregando CVAAS

A técnica CVAAS foi escolhida por apresentar bom desempenho, baixo custo e simplicidade de uso. Entretanto, para análise direta de amostras, as condições experimentais, como a concentração de HCl e a escolha do redutor e sua concentração devem ser avaliados para se chegar à máxima sensibilidade e adequadas veracidade e precisão. Os redutores NaBH_4 e SnCl_2 foram escolhidos por serem tradicionalmente usados com sucesso nas várias aplicações de determinação de Hg em diversas amostras, e as concentrações escolhidas, 0,2 % (m/v) e 1,0 % (m/v), respectivamente, são as recomendadas pelo fabricante do VGA 77 (Varian). A concentração do ácido clorídrico utilizado como nível alto no planejamento (10 % v/v) também foi a recomendada pelo fabricante e o valor de 3 % (v/v) (nível baixo) foi escolhido neste estudo numa tentativa de se obter respostas satisfatórias com um consumo menor deste reagente.

Outro fator crítico é o preparo da solução contendo a amostra, no qual podem surgir algumas dificuldades de geração do vapor frio, relacionadas à concentração da amostra, ao pH e à viscosidade, que podem levar à formação de espumas. Portanto, no desenvolvimento do método analítico estes fatores precisam ser avaliados, de forma a garantir que o novo método seja robusto, exato, preciso e adequado ao propósito de uso. Os planejamentos fatoriais e composto central foram escolhidos por permitir com poucos ensaios, avaliar quantitativamente a influência desses fatores sobre a porcentagem de recuperação do Hg e sobre a resposta instrumental e ainda suas possíveis interações.

A análise quantitativa foi realizada após a construção de curvas de calibração em unidades de absorvância versus a concentração de Hg. As equações das curvas foram estimadas pelo MMQO e utilizadas para cálculo da concentração de Hg nas amostras.

5.2.1 Planejamento fatorial fracionário

O planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} consistiu na realização dos ensaios e registro das respostas observadas de acordo com o procedimento descrito no item 4.7.1. Foram estudados os comportamentos simultâneos de quatro fatores: agente redutor F(1), concentração de ácido F(2), concentração de amostra F(3) e diluente F(4) em amostras de mel, adicionadas com Hg numa concentração de 50 µg/L.

Os ensaios foram realizados em duplicata, produzindo 16 respostas no total, permitindo estimar o erro associado a cada resposta. Os níveis estudados em cada fator foram listados na Tabela 04. Os resultados de recuperação (%) e resposta do instrumento em cada ensaio são mostrados na Tabela 15. Após os cálculos das recuperações médias, os efeitos relacionados a cada fator e as interações entre os fatores foram estimados e o gráfico de Pareto foi construído (Figura 06).

Tabela 15. Porcentagens de recuperação média (%R), resposta instrumental e desvios padrão (s) obtidos nos experimentos do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS.

| Ensaio | Fatores codificados | | | | %R ± s | Resposta instrumental ± s (u.a.*) |
|---------|---------------------|------|------|------|-------------|--------------------------------------|
| | F(1) | F(2) | F(3) | F(4) | | |
| 1 e 2 | -1 | -1 | -1 | -1 | 100,4 ± 3,2 | 4,60 ± 0,15 |
| 3 e 4 | 1 | -1 | -1 | 1 | 57,3 ± 1,3 | 3,46 ± 0,04 |
| 5 e 6 | -1 | 1 | -1 | 1 | 80,6 ± 2,6 | 4,04 ± 0,13 |
| 7 e 8 | 1 | 1 | -1 | -1 | 97,4 ± 6,2 | 3,95 ± 0,07 |
| 9 e 10 | -1 | -1 | 1 | 1 | 75,6 ± 0,8 | 4,26 ± 0,27 |
| 11 e 12 | 1 | -1 | 1 | -1 | 72,1 ± 1,4 | 1,95 ± 0,09 |
| 13 e 14 | -1 | 1 | 1 | -1 | 79,0 ± 1,4 | 2,96 ± 0,07 |
| 15 e 16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 44,6 ± 2,1 | 3,73 ± 0,07 |

* u.a. (unidade de área).

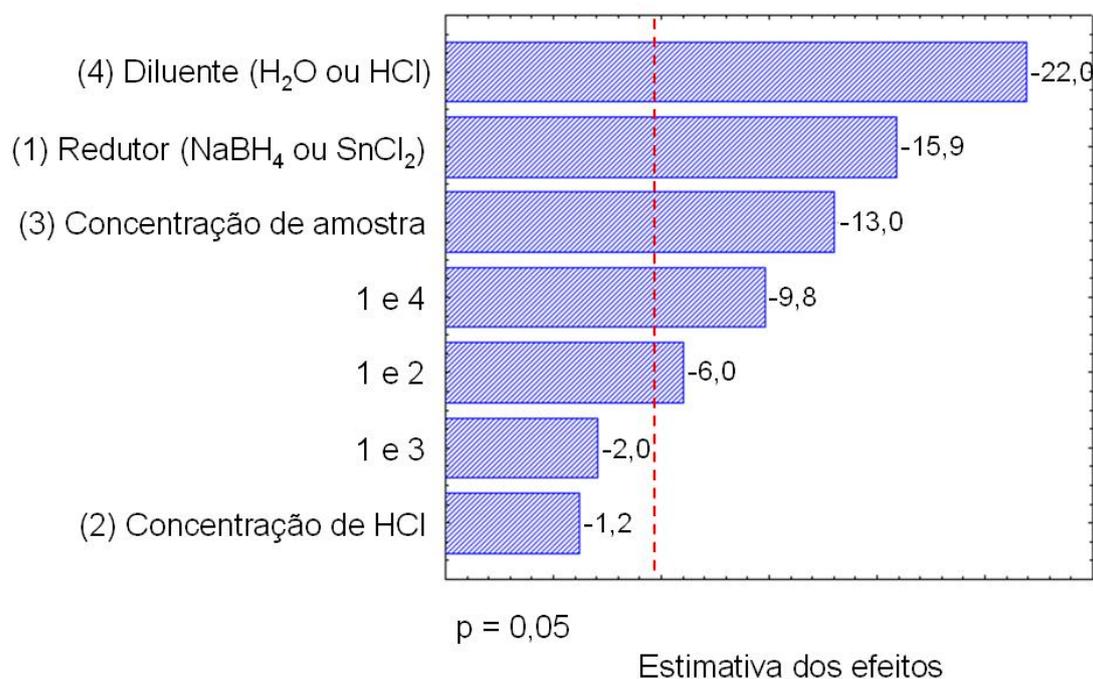


Figura 06. Gráfico de Pareto obtido no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para determinação de Hg em mel por CVAAS.

Na Figura 06, os fatores (1), (3) e (4) e as interações entre F(1 e 2) e F(1 e 4) são significativos ao nível de 95 % de confiança. Isoladamente, verificou-se que a utilização de NaBH₄ apresentou recuperação cerca de 15,9 % maior do que quando usado o SnCl₂, e por isso ele foi escolhido como redutor e sua concentração foi otimizada nos próximos estudos. O aumento na concentração de amostra apresentou efeito negativo significativo na resposta instrumental. Optou-se por estudar melhor a região entre 1 e 5 % (m/v) no CCD (item 5.5.2), já que a realização do planejamento fracionário não permitiu a avaliação de todas as interações entre os fatores, como entre F(2 e 3). Além disso, para se garantir um método adequado à quantificação de baixas concentrações é necessário trabalhar com uma concentração maior de amostra. A variação na concentração de HCl de 3,0 % (v/v) para 10,0 % (v/v) apresentou uma interação negativa, junto ao uso dos redutores, ou seja, ao utilizar NaBH₄ e HCl 3,0 % (v/v) obtem-se melhor recuperação. A utilização de diluente apresentou efeito negativo isolado e também interação negativa significativa vinculada ao uso dos redutores, ou seja, o uso de diluente junto ao NaBH₄ reduziu a eficácia de formação do hidreto e, portanto, ele não foi utilizado na etapa seguinte de otimização.

5.2.2 Planejamento composto central

Depois de realizada a triagem dos fatores que afetam a determinação de Hg em mel por CVAAS, é preciso encontrar os valores desses fatores que irão produzir a melhor resposta instrumental em conjunto com uma porcentagem de recuperação adequada, ou seja, encontrar a região ótima numa superfície de resposta, definida pelos fatores: agente redutor (NaBH_4) F(1), concentração de HCl F(2) e concentração de amostra F(3) (Tabela 16), de acordo com o item 4.7.2.

Nesta etapa foi feito o planejamento CCD que utiliza a metodologia de superfície de resposta, baseando-se na construção de modelos matemáticos empíricos, que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, fornecem condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização [84]. A Tabela 16 mostra os resultados de recuperação (%) e resposta do instrumento em cada ensaio do planejamento CCD.

Tabela 16. Porcentagens de recuperação (%R), desvios padrão (s) e resposta instrumental, obtidos nos ensaios do CCD para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS.

| Ensaio | Fatores codificados | | | %R \pm s | Resposta instrumental \pm s (u.a.*) |
|--------|---------------------|-------|-------|----------------|--|
| | F(1) | F(2) | F(3) | | |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 69,6 | 3,805 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 74,2 | 2,446 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 83,2 | 3,450 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 81,1 | 3,744 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 62,1 | 3,123 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 75,2 | 2,429 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | 86,2 | 3,434 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 70,8 | 2,715 |
| 9 | -1,68 | 0 | 0 | 86,4 | 3,124 |
| 10 | 1,68 | 0 | 0 | 83,0 | 2,394 |
| 11 | 0 | -1,68 | 0 | 91,4 | 3,478 |
| 12 | 0 | 1,68 | 0 | 79,3 | 2,977 |
| 13 | 0 | 0 | -1,68 | 105,8 | 3,720 |
| 14 | 0 | 0 | 1,68 | 84,0 | 2,426 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 80,9 \pm 3,9 | 2,88 \pm 0,43 |

* u.a. (unidade de área).

Os níveis estudados em cada fator foram listados na Tabela 05. Apenas o ensaio 15 (ponto central) foi realizado em quintuplicada e por isso somente o desvio padrão referente a esse ensaio foi apresentado na Tabela 16. Com os 19 resultados de porcentagem de recuperação foi possível calcular a recuperação média, os efeitos relacionados a cada fator e as interações entre os fatores na determinação de Hg em mel (Tabela 17).

Tabela 17. Porcentagem de recuperação média (\pm estimativa do erro experimental) para os efeitos de cada fator e interações entre os fatores e o valor de p , provenientes dos experimentos do planejamento CCD para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS.

| | Efeito \pm erro | p |
|------------------------------|-------------------|------------------------|
| Recuperação média | 81,4 \pm 1,7* | 1,3 x 10 ⁻⁶ |
| F(1) NaBH ₄ | -0,4 \pm 1,1 | 7,3 x 10 ⁻¹ |
| F(2) HCl | -1,4 \pm 1,1 | 2,4 x 10 ⁻¹ |
| F(3) Concentração de amostra | -3,7 \pm 1,1* | 2,5 x 10 ⁻² |
| F(1 e 2) | -4,4 \pm 1,1* | 3,4 x 10 ⁻² |
| F(1 e 3) | -0,6 \pm 1,1 | 6,9 x 10 ⁻¹ |
| F(2 e 3) | -0,1 \pm 1,1 | 9,5 x 10 ⁻¹ |

*Efeito estatisticamente significativo ao nível de significância α de 0,05, pelo teste t de *Student*.

Na Tabela 17, observou-se que a concentração de amostra F(3) e a interação F(1 e 2) entre as concentrações de HCl e NaBH₄ apresentaram efeito significativo e negativo ao nível de 95 % de confiança. O efeito negativo observado pode ter ocorrido em função da formação de espumas com o aumento da concentração de amostra, o que provocou entupimento e umidade na membrana do sistema, por isso o ensaio 13 (Tabela 16), que utiliza a menor concentração de amostra apresentou melhor porcentagem de recuperação de Hg, em relação aos demais, sendo possível determinar Hg com um limite de detecção de 150 μ g/kg. A metodologia de amostragem em suspensão mostrou-se promissora para analisar Hg em mel, e os estudos apresentados nos itens 5.2.3 e 5.2.4 foram realizados com o objetivo de aprimorar o LD do método. Além disso, a troca do acessório de geração de vapor frio por um sistema que possui separador gás-líquido de vidro, ao invés de membrana, pode evitar que bolhas formadas causassem erros na determinação de Hg.

5.2.3 Planejamento composto central empregando diluente

Este planejamento foi executado com a finalidade de ampliar o LD do método de determinação de Hg em mel utilizando CVAAS, aumentando a concentração de amostra e utilizando um novo diluente na emulsão preparada. Portanto, diferentes concentrações de amostra F(3), preparadas em diversas concentrações de H₂O₂ F(1) e HNO₃ F(2) foram estudadas neste CCD, conforme a Tabela 06. A amostra foi contaminada com Hg numa concentração de 10 µg/L, de acordo com o item 4.7.3.

A análise deste CCD foi feita de forma semelhante ao item 5.2.2. A Tabela 18 mostra os resultados da porcentagem de recuperação e resposta do instrumento para cada ensaio do planejamento CCD. O ensaio 15 (ponto central) foi realizado em quintuplicada e por isso somente o desvio padrão referente a esse ensaio foi apresentado.

Tabela 18. Porcentagens de recuperação média (%R), desvios padrão (s) e resposta instrumental (em absorvância), obtidas nos ensaios do CCD para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS.

| Ensaio | Fatores codificados | | | %R ± s | Resposta instrumental ± s (Absorvância) |
|--------|---------------------|-------|-------|------------|--|
| | F(1) | F(2) | F(3) | | |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 64,6 | 0,0493 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 82,4 | 0,0629 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 88,3 | 0,0674 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 104,3 | 0,0796 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 66,5 | 0,0507 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 58,7 | 0,0448 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | 62,1 | 0,0474 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 76,8 | 0,0586 |
| 9 | -1,68 | 0 | 0 | 65,0 | 0,0496 |
| 10 | 1,68 | 0 | 0 | 103,7 | 0,0792 |
| 11 | 0 | -1,68 | 0 | 72,7 | 0,0555 |
| 12 | 0 | 1,68 | 0 | 114,7 | 0,0876 |
| 13 | 0 | 0 | -1,68 | 95,6 | 0,0729 |
| 14 | 0 | 0 | 1,68 | 101,4 | 0,0774 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 95,2 ± 2,5 | 0,0726 ± 0,0019 |

Com os resultados de resposta instrumental foi possível calcular os efeitos relacionados a cada fator e as interações entre os fatores na determinação de Hg em mel (Tabela 19).

Tabela 19. Resposta média (\pm estimativa do erro experimental) para os efeitos de cada fator, interações entre os fatores e o valor da probabilidade (p), provenientes dos experimentos do planejamento CCD para otimização do método de determinação de Hg por CVAAS

| Fatores | Efeito \pm erro | p |
|------------------------------------|-----------------------|------------------------|
| Resposta média | 0,0731 \pm 0,0009* | 1,2 x 10 ⁻⁷ |
| F(1) H ₂ O ₂ | 0,0059 \pm 0,0005* | 3,6 x 10 ⁻⁴ |
| F(2) HNO ₃ | 0,0073 \pm 0,0005* | 1,6 x 10 ⁻⁴ |
| F(3) Concentração de amostra | -0,0037 \pm 0,0005* | 2,2 x 10 ⁻³ |
| F(1 e 2) | 0,0020 \pm 0,0007* | 4,7 x 10 ⁻² |
| F(1 e 3) | -0,0026 \pm 0,0007* | 2,1 x 10 ⁻² |
| F(2 e 3) | -0,0030 \pm 0,0007* | 1,2 x 10 ⁻² |

*Efeito estatisticamente significativo ao nível de significância α de 0,05, pelo teste t de *Student*.

Pode-se notar na Tabela 19 que todos os fatores apresentaram efeitos significativos, ao nível de 95 % de confiança. Um aumento na concentração de HNO₃ e de H₂O₂ proporcionou um aumento de 0,0073 e 0,0059, respectivamente, na resposta do equipamento. Enquanto o acréscimo na concentração de amostra provocou um efeito negativo. Estes efeitos também podem ser confirmados pela avaliação das interações entre os fatores, ou seja, entre F(1 e 2) houve interação positiva e entre F(1 e 3) e F(2 e 3) interação negativa.

Apesar do efeito negativo observado com o aumento da concentração de amostra ter se repetido, a troca do equipamento de geração de vapor frio foi eficaz. O sistema que possui separador gás-líquido de vidro preveniu que bolhas formadas juntamente com o hidreto obstruíssem a passagem do mesmo para o tubo que o transporta até a cela de quartzo. Este fato possibilitou que algumas condições, com maiores concentrações de amostra, apresentassem porcentagem de recuperação próxima de 100 %, como foi o caso dos ensaios 10 e 12 (Tabela 18).

Dessa forma, utilizou-se da construção de uma superfície de resposta (Figura 7) para obtenção da região ótima das concentrações de HNO₃ e H₂O₂ para uma concentração de amostra de 5,0 % (m/v). Pela análise da Figura 07 pode-se concluir que o ponto de maior resposta foi obtido nas concentrações de 6,0 % (v/v) de HNO₃ e 4,0 % (v/v) de H₂O₂ e proporcionou uma absorvância acima de 0,07.

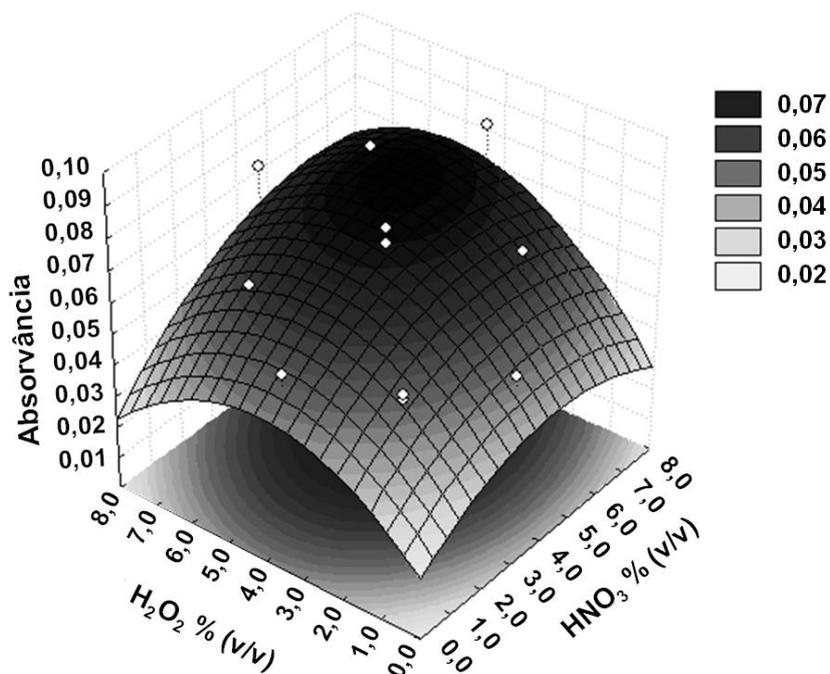


Figura 07. Superfície de resposta obtida na otimização das concentrações de H_2O_2 e HNO_3 para determinação de Hg em mel por CVAAS, para a concentração de amostra de 5,0 % (m/v).

Portanto, pelos resultados obtidos (Tabelas 18 e 19) e pela análise da superfície de resposta (Figura 07) as concentrações de 6,0 % (v/v) de HNO_3 e 4,0 % (v/v) de H_2O_2 apresentaram resultados adequados para uma concentração de amostra de 5,0 % (m/v). Na próxima etapa, foram avaliadas outras concentrações de HCl e diferentes tempos de extração, mantendo-se constante as concentrações já otimizadas pelo CCD.

5.2.4 Otimização do tempo de extração e concentração de HCl

Nesse estudo, procurou-se conhecer melhor o desempenho do método frente a alterações no tempo de preparo e na concentração de HCl, utilizado durante a etapa geração de vapor. Com esse propósito, soluções preparadas de acordo com o procedimento descrito no item 4.7.4 foram deixadas em repouso durante 2 ou 18 horas, ou seja, preparadas no dia anterior no final da tarde e leituras feitas no dia seguinte, e preparadas e medidas no mesmo dia. As medidas de Hg foram feitas utilizando NaBH_4 0,6 % (m/v) em NaOH 0,5 % (m/v) e HCl em diferentes concentrações: 2,5; 3,3 e 5,0 mol/L.

Verificou-se que não houve diferença significativa na porcentagem de recuperação de Hg em mel por CVAAS, ao variar o tempo de extração e a concentração de HCl (Tabela 20) com 95 % de confiança, pelo teste t. Entretanto, com a diminuição da concentração de HCl houve uma redução da resposta instrumental. A condição de extração de 18 horas mostra-se interessante pela possibilidade de preparo das amostras no dia anterior à leitura.

Tabela 20. Recuperação \pm desvio padrão em função do tempo de extração e concentração de HCl.

| HCl (mol/L) | Recuperação \pm desvio padrão (%) | |
|----------------|-------------------------------------|-----------------|
| | 18 horas | 2 horas |
| 5,0 | 102,2 \pm 1,7 | 104,9 \pm 3,6 |
| 3,3 | 102,5 \pm 2,2 | 105,3 \pm 3,2 |
| 2,5 | 99,2 \pm 7,6 | 101,3 \pm 0,6 |

5.2.5 Método otimizado

Os experimentos realizados permitiram propor o seguinte método otimizado para a determinação de Hg em mel utilizando CVAAS: preparo de solução contendo 5,0 % (m/v) de mel, 4,0 % (v/v) de H₂O₂ e 6,0 % (v/v) de HNO₃. As soluções podem ser deixadas em repouso por até 18 horas, e as medidas de Hg devem ser feitas utilizando como redutor, NaBH₄ 0,6 % (m/v) em NaOH 0,5 % (m/v) e HCl 6,0 mol/L. Optou-se pela utilização de 5 g de mel para um volume final de 100 mL de solução para garantir uma boa representatividade da amostra e limites de detecção adequados.

Esta metodologia foi validada conforme o procedimento descrito no item 5.2.6 e foi usada nas etapas seguintes de determinação de Hg em mel nas amostras coletadas no estado de Minas Gerais.

5.2.6 Validação do método analítico

A validação deste método foi feita baseando-se nas recomendações do INMETRO [70], MAPA [72, 73] e trabalhos científicos recentes de SOUZA e colaboradores [74, 75].

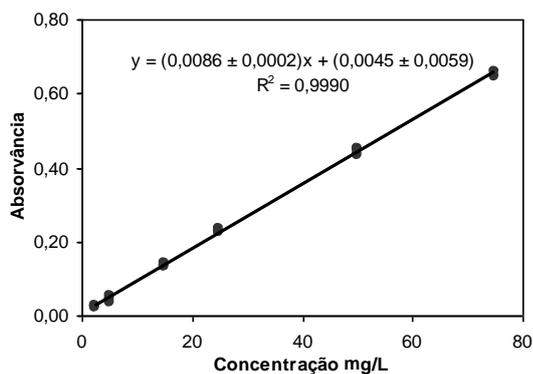
5.2.6.1 Seletividade e linearidade

A linearidade e a seletividade foram avaliadas de acordo com o guia de validação do Plano Nacional de Resíduos e Contaminantes [72] em conjunto com o procedimento proposto por SOUZA e colaboradores [74, 75], que estabelecem: definição da faixa de interesse; preparo de soluções de calibração em solvente ou matriz, em pelo menos cinco níveis de concentração, em três replicatas independentes; medida da resposta das soluções de calibração em uma ordem aleatória.

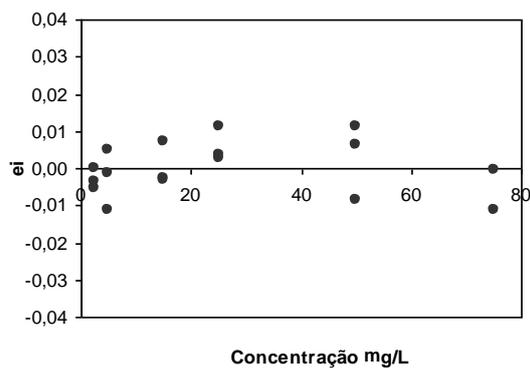
A seletividade e a linearidade do método de determinação de Hg em mel utilizando CVAAS foram avaliadas através do preparo de três curvas de calibração (Figura 08), contendo 4,0 % (v/v) de H₂O₂ e 6,0 % (v/v) de HNO₃ e Hg em concentrações de 0,0; 2,5; 5,0; 15,0; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µg/L, sendo duas curvas contendo também 5,0 % (m/v) de mel, provenientes de duas regiões distintas do estado de Minas Gerais e com aspectos visuais, tais como cor e presença de material precipitado, bastante diferentes. As três curvas foram preparadas em triplicatas independentes. A linearidade de resposta do detector foi determinada nas três curvas de calibração. As soluções contendo Hg foram medidas utilizando NaBH₄ 0,6 % (m/v) em NaOH 0,5 % (m/v) e HCl 6,0 mol/L e demais condições instrumentais descritas nos itens 4.11 e 5.2.5. Após as medidas, o tratamento estatístico dos dados foi feito utilizando as planilhas do programa Excel da Microsoft Office (2003).

A curva analítica e o gráfico dos resíduos obtidos após a exclusão dos pontos extremos são apresentados na Figura 08. A presença de valores discrepantes (*outliers*) foi avaliada como os pontos fora do intervalo $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} \cdot S_{res}$ e confirmada pelo método dos resíduos padronizados Jackknife (J_{ei}), calculado para cada ponto da curva de calibração. Valores de J_{ei} maiores que o valor de t crítico foram considerados valores extremos e removidos, exceto quando a porcentagem de dados excluídos for superior a 22,2 % do número original de dados [74, 85]. Para cada exclusão, o MMQO foi reaplicado aos dados restantes.

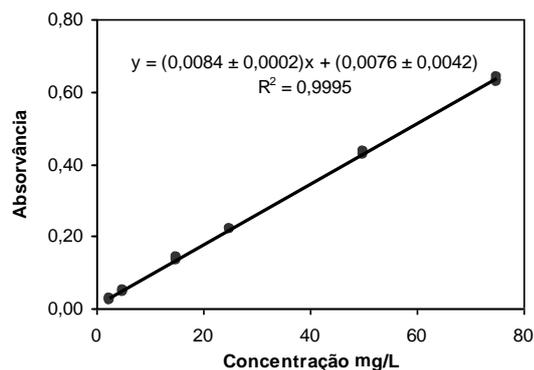
O método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO) foi adotado para estimar os parâmetros da equação: $Y_i = \beta X_i + \alpha$. Onde Y_i representa a resposta do instrumento e X_i a concentração dos padrões dos metais. O MMQO minimiza a soma dos quadrados dos resíduos da regressão e assume que os resíduos seguem a distribuição normal, são independentes e homoscedásticos, ou seja, possuem variância constante ao longo do eixo x [86].



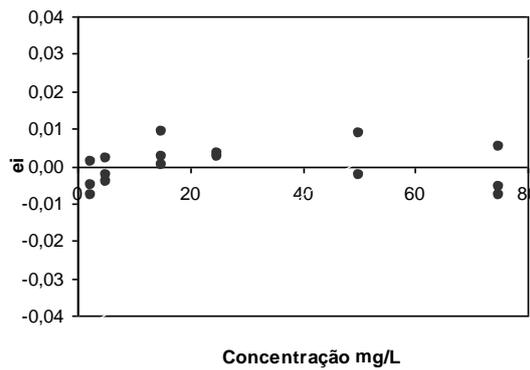
(a)



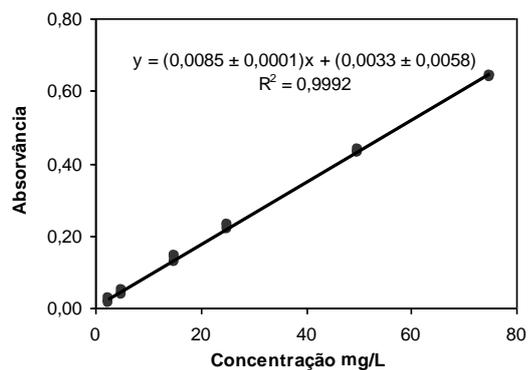
(d)



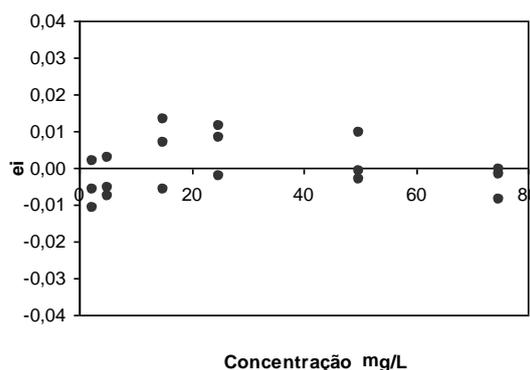
(b)



(e)



(c)



(f)

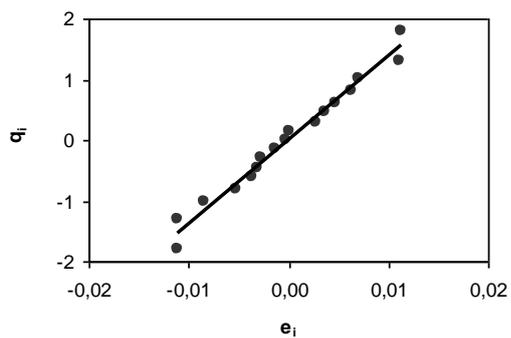
Figura 08. Curvas de calibração de Hg sem a matriz (a) e com adição de mel (b) e (c). Gráficos dos resíduos da calibração obtidos para o método de determinação Hg sem a matriz (d) e com adição de mel (e) e (f).

Para avaliação dos requisitos de normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos foram utilizados os testes de RYAN & JOINER, 1976 [87], LEVENE, 1960 [88] com modificações feitas por BROWN & FORSYTHE, 1974 [89] e DURBIN & WATSON, 1951 [90], respectivamente. O teste F (ANOVA) foi adotado para verificar a significância da regressão e do desvio da linearidade. Os resultados obtidos foram resumidos na Tabela 21. Esta sequência de testes estatísticos foi proposta por SOUZA e colaboradores e teve a sua eficácia comprovada e aplicada na análise de contaminantes em alimentos [74, 75].

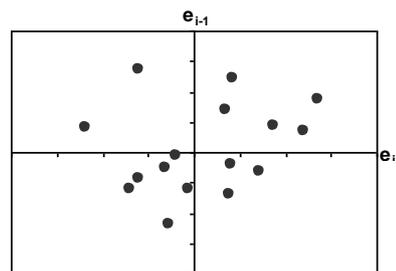
Tabela 21. Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise de variância da regressão e desvio da linearidade, para as três curvas de calibração do método de determinação Hg sem a matriz e com adição de mel (1) e (2).

| Estatística | Curva sem matriz | Curva matriz 1 | Curva matriz 2 |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Número de observações | | | |
| n | 17 | 16 | 18 |
| Normalidade | | | |
| R | 0,990 | 0,985 | 0,984 |
| R _{crítico} | 0,955 | 0,953 | 0,954 |
| p | p > 0,10 | p > 0,10 | p > 0,10 |
| Independência | | | |
| d | 1,462 | 2,400 | 1,595 |
| <i>Não há autocorrelação</i> | 1,380 < d < 2,619 | 1,370 < d < 2,629 | 1,390 < d < 2,609 |
| p | p > 0,10 | p > 0,10 | p > 0,10 |
| Homoscedasticidade | | | |
| t _L | 0,772 | 0,098 | 0,157 |
| p | 0,452 | 0,923 | 0,876 |
| Regressão | | | |
| F | 1,474 x 10 ⁴ | 2,665 x 10 ⁴ | 1,590 x 10 ⁴ |
| p | 7,250 x 10 ⁻²⁴ | 2,300 x 10 ⁻²⁴ | 2,040 x 10 ⁻²⁵ |
| Desvio da linearidade | | | |
| F | 1,283 | 1,524 | 1,752 |
| p | 3,347 x 10 ⁻¹ | 2,677 x 10 ⁻¹ | 2,035 x 10 ⁻¹ |

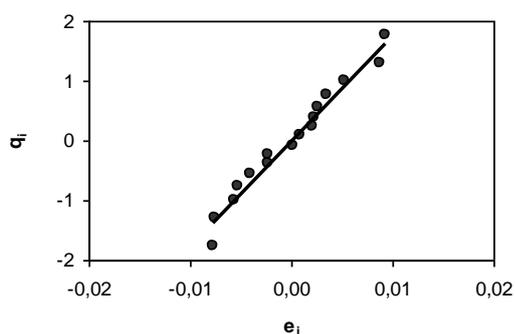
A realização do teste de Ryan-Joiner confirmou que os resíduos da regressão (e_i) seguem a distribuição normal, pois os desvios da normalidade não foram significativos ($p > 0,10$). Os coeficientes de correlação (R) obtidos: 0,990; 0,985 e 0,984 foram superiores ao R crítico: 0,955; 0,953 e 0,954, (Tabela 21) para as três curvas de calibração do método de determinação Hg sem a matriz e com adição de mel (1) e (2), respectivamente. Os gráficos de probabilidade normal, mostrando os resíduos da regressão (e_i) em função do valor normal esperado (q_i) podem ser observados na Figura 09.



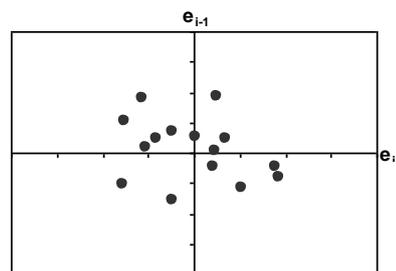
(a)



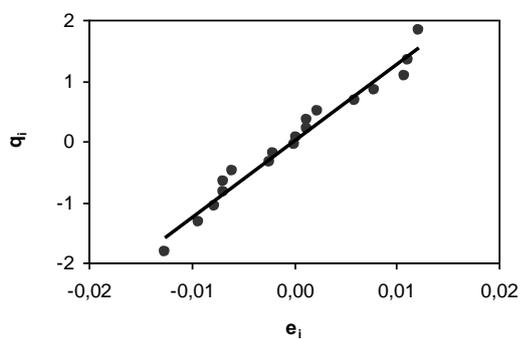
(d)



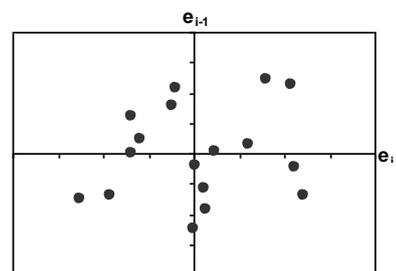
(b)



(e)



(c)



(f)

Figura 09. Gráficos de probabilidade normal para as três curvas de Hg sem a matriz (a) e com adição de mel (b) e (c). E gráficos de Durbin-Watson das três curvas de Hg sem a matriz (d) e com adição de mel (e) e (f). Onde: e_i = resíduo da regressão, q_i = valor normal esperado.

A independência dos resíduos foi confirmada pelo teste de Durbin-Watson. Os gráficos da Figura 09 apresentaram os pontos bem distribuídos em todos os quadrantes, não sendo observadas tendências positivas ou negativas. Os valores de d foram: 1,462; 2,400 e 1,595 (Tabela 21) para as curvas de calibração do método de determinação Hg sem a matriz e com adição de mel (1) e (2), respectivamente. Para os dados serem considerados não correlacionados os valores de d (estatística de Durbin-Watson) calculados devem estar dentro do intervalo apresentado na Tabela 21. A obtenção de

valores abaixo dos limites inferiores podem indicar correlação positiva, já a obtenção de valores acima dos limites superiores destes citados podem indicar correlação negativa. Os limites inferiores e superiores de d são tabelados e dependem basicamente do número de observações e da probabilidade p .

A estimativa da estatística t de Levene (t_L) permitiu avaliar a homoscedasticidade dos resíduos da regressão (Tabela 21), que foram divididos em dois grupos. Neste teste, quando as variâncias dos resíduos da regressão de cada grupo não diferem entre si, há homoscedasticidade, ou seja, quando t_L calculado é menor que o $t_{(1-\alpha/2; n_1+n_2-2)}$ crítico. Portanto, não houve diferença significativa entre as variâncias estudadas nos grupos 1 e 2 ($p > 0,05$), como mostra a Figura 10. O grupo 1 corresponde as concentrações de 2,5; 5,0 e 15,0 $\mu\text{g/L}$ e o grupo 2 compreende as concentrações de 25,0; 50,0 e 75,0 $\mu\text{g/L}$.

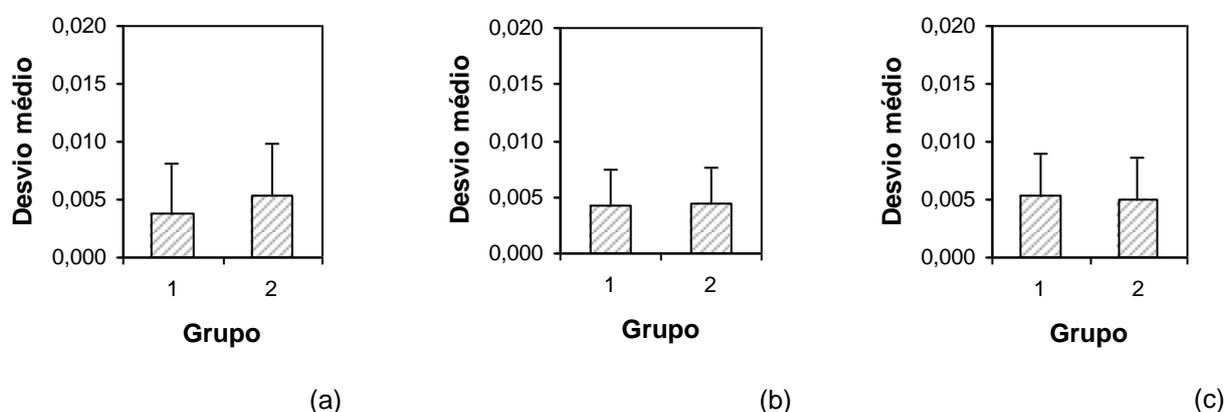


Figura 10. Gráficos representando a homoscedasticidade das variâncias para as três curvas de Hg sem a matriz (a) e com adição de mel (b) e (c) nos grupos 1 e 2. Onde: Grupo 1 = 2,5; 5,0 e 15,0 $\mu\text{g/L}$ e Grupo 2 = 25,0; 50,0 e 75,0 $\mu\text{g/L}$.

A faixa inicialmente proposta, de 2,5 $\mu\text{g/L}$ a 100,0 $\mu\text{g/L}$, apresentou desvio da linearidade segundo o teste F (ANOVA). E assim, a linearidade foi confirmada para as três curvas de calibração do método de determinação Hg sem a matriz e com adição de mel (1) e (2) somente na faixa de 2,5 $\mu\text{g/L}$ a 75,0 $\mu\text{g/L}$. A alta significância da regressão ($p < 0,001$) com desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$) pode ser observada na Tabela 21, indicando a adequação do uso do MMQO para a faixa de trabalho proposta.

A seletividade, em termos de efeito de matriz, foi avaliada após a verificação das premissas de normalidade, homoscedasticidade, independência dos resíduos, significância da regressão e do desvio da linearidade para as três curvas de calibração do método de determinação Hg sem a matriz e com adição de mel (1) e (2). O efeito de

matriz foi avaliado através da comparação entre os parâmetros de regressão β e α , da equação: $Y_i = \beta X_i + \alpha$, apresentados na Figura 08. Não foi observado efeito de matriz pelo teste t, ao nível de confiança de 95 %, entre a curva de calibração aquosa e as curvas adicionadas de matriz.

5.2.6.2 Limite de detecção e limite de quantificação

Os LD e LQ podem ser estimados utilizando os diferentes procedimentos, descritos no item 3.4. Em razão da variabilidade de formas para o cálculo do LD e LQ, neste trabalho os diferentes procedimentos foram aplicados e os resultados foram analisados criticamente, relacionando-os com a veracidade e precisão do método.

Branco de amostras e padrões da curva analítica foram preparados e analisados nas condições otimizadas para o método, descritas nos itens 4.11 e 5.2.5. Após a aquisição dos dados, os valores do intercepto e da inclinação da curva de calibração foram estimados pelo MMQO. A equação obtida foi utilizada para o cálculo das concentrações de Hg nos brancos de amostra e os procedimentos descritos na Tabela 22 foram empregados para a estimativa do LD e LQ. O LD variou de 18,6 a 74,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, enquanto o LQ variou de 37,6 a 109,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Entretanto, a menor concentração que pode ser quantificada com precisão (DPR = 6,4 %) e veracidade foi 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a qual está acima do LQ obtido pelos procedimentos recomendados pelo INMETRO [70] e EURACHEM [79].

Os procedimentos avaliados resultaram em diferenças consideráveis nos valores de LD e LQ, mas somente os procedimentos propostos por RIBEIRO [80], ICH [77] e SOUZA [74] apresentaram LQs que representaram bem o desempenho do método.

Os LDs obtidos pelos procedimentos de RIBEIRO [80], ICH [77] e SOUZA [74], de 74,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 26,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 30,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ correspondem à 3,7 $\mu\text{g}/\text{L}$, 1,3 $\mu\text{g}/\text{L}$ e 1,5 $\mu\text{g}/\text{L}$ em solução. Estes LDs estão próximos ao LD obtido por MATUSIEWICZ & ŚLACHCIŃSKI [91] de 3,0 $\mu\text{g}/\text{L}$ (na forma líquida) para Hg determinado utilizando a espectrometria de emissão com plasma acoplado indutivamente e utilizando um sistema de introdução de amostra composto por gerador de hidretos e nebulizador ultrassônico com micro fluxo contínuo integrado. Neste caso, o preparo da amostra não foi levado em conta para estimativa do LD.

Tabela 22. Resumo dos procedimentos recomendados para estimativa do LD e LQ e resultados obtidos para o método de determinação Hg por CVAAS.

| Referência | Resumo do procedimento | Resultados |
|----------------------------------|---|---|
| EURACHEM [79] | LD: $n = 10, t = 3$ | 18,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
| | LQ: $n = 10, t = 10$ | 37,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
| INMETRO [70] | LD: $n = 7, t = 3$ | 20,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
| | LQ: $n = 7, t = 10$ | 43,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
| THOMPSON, ELLISON & WOOD [78] | LD: $n = 6, t = 3$ | 21,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
| | LQ: Não recomendam a utilização desse limite. | - |
| RIBEIRO & FERREIRA [80] | LD e LQ obtidos a partir do intervalo de confiança da curva analítica ($n = 3$) | 74,3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 109,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
| | ICH [81] | LD = $3,3 s_{\beta}/s_{\alpha}$ ($n = 3$) LQ = $10 s_{\beta}/s_{\alpha}$ ($n = 3$) |
| SOUZA [74] | Cálculo do desvio padrão relativo (DPR) de amostras contendo concentrações baixas e conhecidas de Hg ($n = 3$). | |
| | No LD: DPR > 10 % | 30,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |
| | No LQ: DPR < 10 % | 60,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |

5.2.6.3 Veracidade e precisão

Neste estudo, a veracidade foi avaliada através de ensaios de adição e recuperação, utilizando-se de matriz branca fortificada, pois não existem materiais certificados de mel contendo Hg disponíveis. A precisão foi estudada em níveis de repetibilidade e precisão intermediária. A repetibilidade foi avaliada como a concordância entre resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição. Já a precisão intermediária foi avaliada em diferentes dias.

A veracidade e a precisão do método de determinação de Hg em mel utilizando CVAAS foram determinadas realizando-se o preparo de soluções contendo 5,0 % (m/v) de mel, contaminadas com Hg em concentrações de 0,50 mg/kg e 1,00 mg/kg num total de seis repetições. Em outro dia, seis soluções contendo 1,00 mg/kg foram preparadas novamente para avaliação da precisão intermediária. O Hg foi determinado seguindo a

metodologia otimizada descrita nos itens 4.11 e 5.2.5. Foram calculados a porcentagem de recuperação média, os desvios padrão relativos de repetibilidade e precisão intermediária para cada concentração. Os resultados obtidos para veracidade e precisão estão apresentados na Tabela 23.

Tabela 23. Porcentagem de recuperação (%R) e DPR de repetibilidade ou precisão intermediária para amostras de mel contaminadas com Hg em três concentrações diferentes e analisadas por CVAAS.

| Concentração (mg/kg) | %R | DPR (%) |
|-------------------------|-------|---------|
| 0,50 | 102,4 | 5,7 |
| 1,00 | 100,0 | 3,5 |
| 1,00* | 98,7* | 5,4* |

*Obtido nas condições de precisão intermediária.

Os resultados obtidos na avaliação da veracidade em termos de porcentagem de recuperação do método de determinação de Hg em mel utilizando CVAAS nas três concentrações estudadas variaram de 98,7 % a 102,4 % e estão de acordo com os critérios de aceitação definidos pelo MAPA [72] e pela comissão européia (EC – *European Commission*) [92], que estabelecem para concentrações acima de 10 µg/kg, recuperações entre 80 % e 110 %.

A precisão sob condições de repetibilidade variou de 3,5 % a 5,7 %, já a precisão intermediária calculada na concentração de 1,00 mg/kg foi de 5,4 %, e está de acordo com o critério de aceitabilidade definido pelo MAPA, que estabelece um desvio padrão relativo aceitável de até 10 % para concentrações de até 1,00 mg/kg [72].

5.3 Otimização do método de determinação de Hg em mel utilizando DMA

A metodologia analítica para determinação direta de Hg em mel empregando a CVAAS foi aplicada em amostras de mel provenientes de várias cidades de Minas Gerais, conforme o procedimento descrito nos itens 4.7 e 4.11.

Em todas as amostras estudadas, a concentração de Hg foi inferior ao limite de detecção do método (30 µg/kg) (Tabela 22). Não foi possível comparar os resultados dessa nova metodologia com os resultados obtidos pelo método de digestão em forno de micro-ondas com cavidade e determinação por ICP-MS, pois estes não foram conclusivos devido ao elevado desvio padrão entre as replicatas de cada amostra. Por essa razão, a técnica de determinação de Hg utilizando o DMA foi otimizada e utilizada para quantificar Hg nas mesmas amostras já estudadas, conforme o procedimento descrito no item 4.8.

Previamente às análises das amostras, foi realizada uma otimização do procedimento empregando um planejamento CCD, para avaliar as melhores condições de: tempo de secagem, tempo de queima e temperatura de secagem. Apenas o aumento da temperatura de secagem foi significativo, apresentou efeito positivo, e foi mantido em 310 °C (Figura 11).

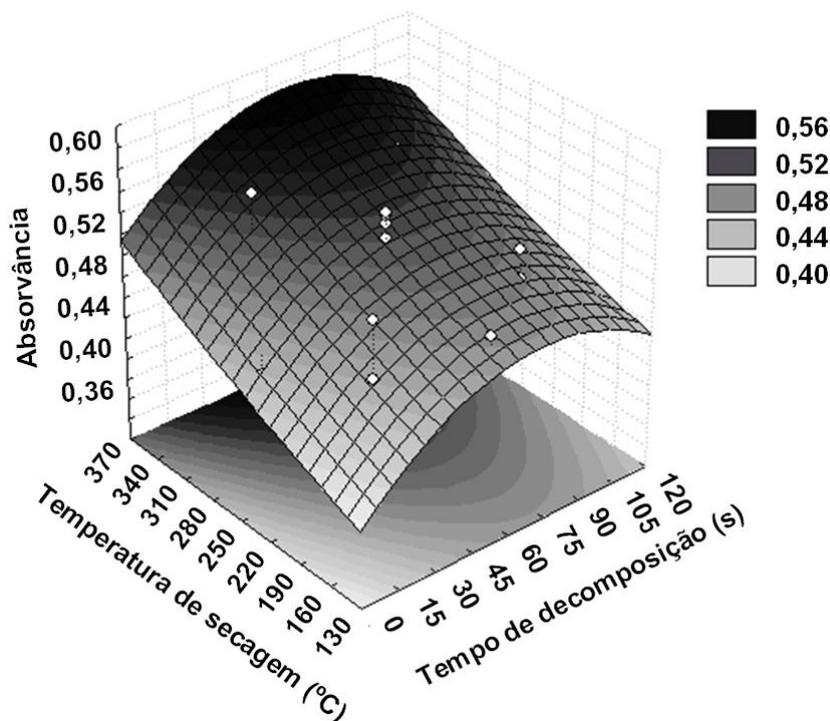


Figura 11. Superfície de resposta obtida na otimização das condições para determinação de Hg por DMA em mel, no qual somente o aumento da temperatura de secagem foi significativo e positivo.

Para atingir a temperatura de secagem e de queima foram utilizadas rampas de aquecimento de 60 s e 90 s. Após a rampa de aquecimento, o tempo de permanência em 310 °C foi fixado em 30 s (Tabela 24) para evitar um aumento de pressão observado no tempo inferior (10 s), apesar desse fator não ter sido significativo no CCD. Da mesma forma, optou-se por manter o tempo de queima em 30 s, pois foi observado que após a realização de testes com o recipiente de níquel vazio (após a leitura da amostra) e novamente submetido ao programa de aquecimento (Tabela 24), as leituras obtidas foram menores e próximas do branco. Portanto, a programação de temperatura mostrada na Tabela 24 permitiu a determinação de Hg nas amostras de mel introduzidas sem qualquer tratamento de dissolução ou decomposição com ácidos, requerendo um tempo total de 5 minutos por amostra.

Tabela 24. Programa de aquecimento otimizado no DMA-80 para amostras de mel.

| Etapa | Tempo (segundos) | Temperatura (°C) |
|-------|---------------------|---------------------|
| 1 | 60 | 310 |
| 2 | 30 | 310 |
| 3 | 90 | 650 |
| 4 | 30 | 650 |
| 5 | 30 | Resfriamento |

5.3.1 Validação do método analítico

O desempenho do método foi avaliado de forma a se conhecer a seletividade, linearidade, veracidade, precisão, limites LD e LQ, conforme o item 4.11.

A seletividade e a linearidade do método de determinação de Hg em mel utilizando o DMA foram avaliadas através do preparo de três curvas de calibração, contendo Hg em concentrações de 0,0; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 e 50,0 µg/kg, que correspondem a 0,00; 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 3,00; 4,00 e 5,00 ng de Hg em 100 mg de amostra, sendo duas curvas contendo mel e uma curva em água. As três curvas foram preparadas em triplicatas independentes. As curvas analíticas e os gráficos dos resíduos (e_i) obtidos após a exclusão dos pontos extremos são apresentados na Figura 12.

A presença de valores discrepantes foi avaliada como os pontos fora do intervalo $\pm t_{(1-\alpha/2; n-2)} \cdot S_{res}$ e confirmada pelo método dos resíduos padronizados Jackknife (J_{ei}), calculado para cada ponto da curva de calibração. Valores de J_{ei} maiores que o valor de t crítico foram considerados valores extremos e removidos [85]. Para cada exclusão, o MMQO foi reaplicado aos dados restantes.

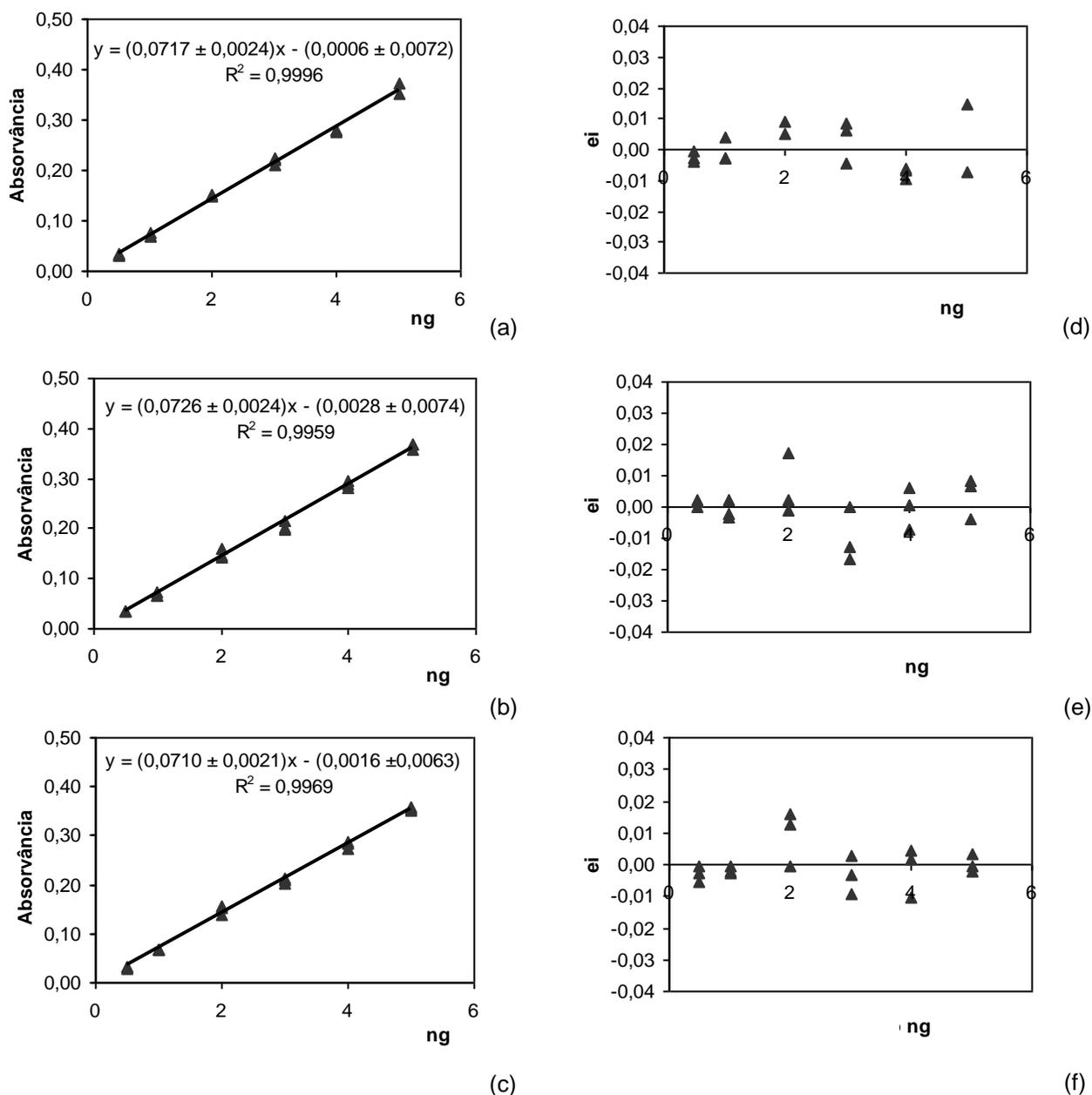


Figura 12. Curvas de calibração de Hg sem a matriz (a) e com adição de mel (b) e (c). Gráficos dos resíduos da calibração obtidos para o método de determinação Hg sem a matriz (d) e com adição de mel (e) e (f) utilizando DMA.

A linearidade foi confirmada na faixa de 2,5 µg/kg a 50,0 µg/kg e a equação obtida para a curva em água foi: $Y = (0,0717 \pm 0,0024)X - (0,0006 \pm 0,0072)$, com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,9996. A linearidade e a seletividade de resposta do detector foram determinadas após a confirmação dos requisitos de normalidade, homoscedasticidade e independência dos resíduos (Tabela 25), utilizando os mesmos testes estatísticos descritos no item 5.2.6, não sendo observado efeito de matriz. A alta significância da regressão ($p < 0,001$) com desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$) pode ser observada na Tabela 25, indicando a adequação do uso do MMQO para a faixa de trabalho proposta.

Tabela 25. Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise de variância da regressão e desvio da linearidade, para as três curvas de calibração do método de determinação Hg sem a matriz e com adição de mel (1) e (2) utilizando DMA.

| Estatística | Curva sem matriz | Curva matriz 1 | Curva matriz 2 |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Número de observações | | | |
| n | 16 | 18 | 18 |
| Normalidade | | | |
| R | 0,968 | 0,970 | 0,947 |
| $R_{\text{crítico}}$ | 0,953 | 0,957 | 0,946 |
| p | $p > 0,10$ | $p > 0,10$ | $p > 0,05$ |
| Independência | | | |
| d | 2,238 | 1,796 | 2,431 |
| <i>Não há autocorrelação</i> | $1,370 < d < 2,629$ | $1,390 < d < 2,609$ | $1,390 < d < 2,609$ |
| p | $p > 0,10$ | $p > 0,10$ | $p > 0,10$ |
| Homoscedasticidade | | | |
| t_L | 1,077 | 1,460 | 0,168 |
| p | 0,299 | 0,164 | 0,868 |
| Regressão | | | |
| F | $3,825 \times 10^3$ | $3,899 \times 10^3$ | $5,133 \times 10^3$ |
| p | $1,798 \times 10^{-18}$ | $1,529 \times 10^{-20}$ | $1,710 \times 10^{-21}$ |
| Desvio da linearidade | | | |
| F | 2,329 | 2,392 | 2,598 |
| p | $1,268 \times 10^{-1}$ | $1,087 \times 10^{-1}$ | $8,963 \times 10^{-2}$ |

A normalidade foi confirmada pela realização do teste de Ryan-Joiner, indicando que os resíduos da regressão seguem a distribuição normal, quando os desvios da normalidade não são significativos ($p > 0,05$) e os coeficientes de correlação (R) obtidos são superiores ao R crítico (Tabela 25) para as três curvas de calibração de Hg sem a matriz e com adição de mel (1) e (2), respectivamente. Os gráficos de probabilidade normal podem ser observados na Figura 13.

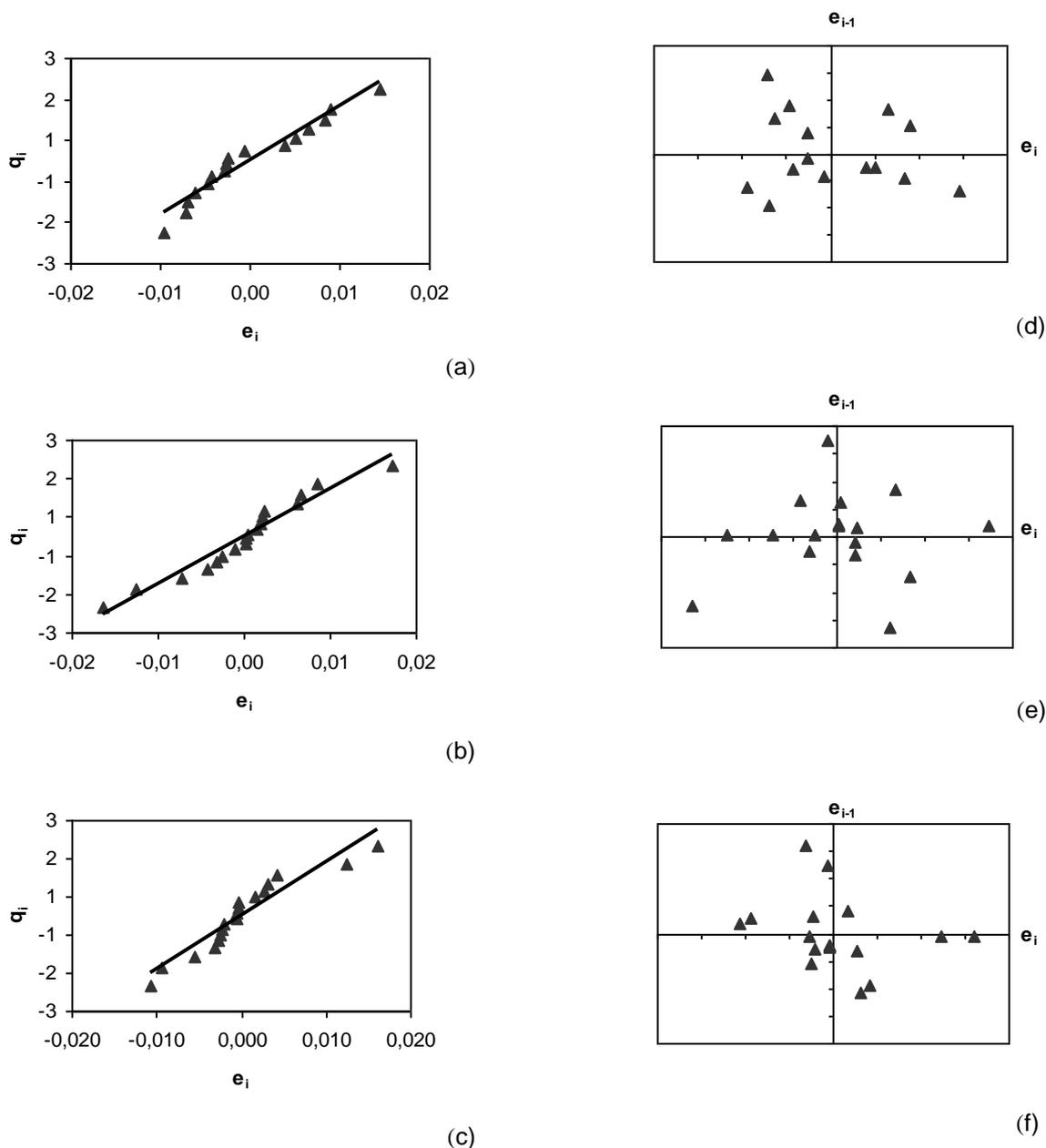


Figura 13. Gráficos de probabilidade normal para as três curvas de Hg sem a matriz (a) e com adição de mel (b) e (c). E gráficos de Durbin-Watson das três curvas de Hg sem a matriz (d) e com adição de mel (e) e (f) utilizando DMA. Onde: e_i = resíduo da regressão, q_i = valor normal esperado.

A independência dos resíduos foi confirmada pelo teste de Durbin-Watson. Os gráficos da Figura 13 apresentaram os pontos bem distribuídos em todos os quadrantes, não sendo observadas tendências positivas ou negativas. Os valores de d foram: 2,238; 1,796 e 2,431 (Tabela 25) para as curvas de calibração de Hg sem a matriz e com adição de mel (1) e (2), respectivamente. Para os dados serem considerados não correlacionados os valores de d calculado devem estar dentro do intervalo apresentado na Tabela 25, com $p > 0,10$. A obtenção de valores abaixo destes intervalos pode indicar correlação positiva, já a obtenção de valores superiores aos intervalos citados, pode indicar correlação negativa.

A homoscedasticidade dos resíduos da regressão pode ser estimada pelo cálculo de t_L (Tabela 25). Não houve diferença significativa entre as variâncias estudadas nos grupos 1 e 2, como mostra a Figura 14. O grupo 1 corresponde as concentrações de 2,5; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e o grupo 2 corresponde as concentrações de 30,0; 40,0 e 50,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

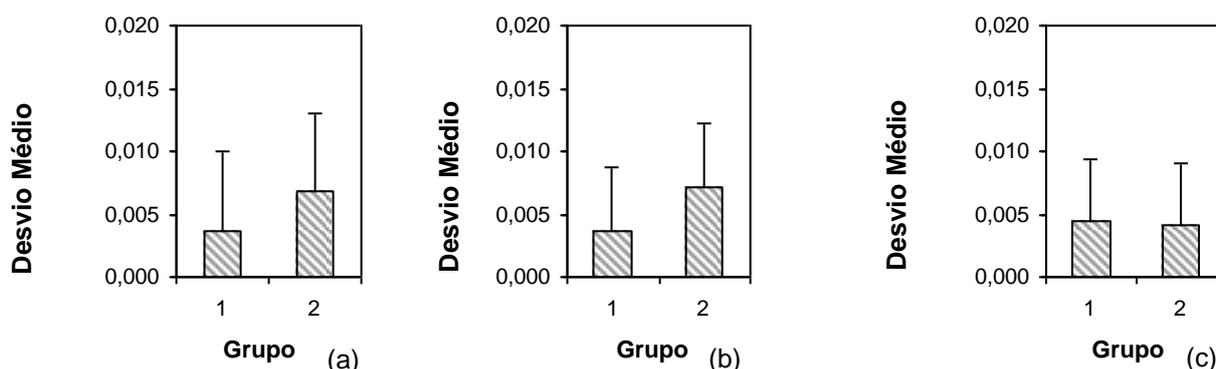


Figura 14. Gráficos representando a homoscedasticidade das variâncias para as três curvas de Hg sem a matriz (a) e com adição de mel (b) e (c) nos grupos 1 e 2 utilizando DMA. Onde: Grupo 1 = 2,5; 10,0 e 20,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e Grupo 2 = 30,0; 40,0 e 50,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

A veracidade do método de determinação de Hg por DMA foi avaliada utilizando-se os materiais de referência certificados SRM-8415 (ovo em pó integral, *National Institute of Standards and Technology*), IAEA-336 (líquen, *International Atomic Energy Agency*) e GBW-08301 (sedimento de rio, *Institute of Environmental Chemistry Academia Sinica*), com concentrações de Hg de $(4,0 \pm 3,0) \mu\text{g}/\text{kg}$, $(200 \pm 40) \mu\text{g}/\text{kg}$ e $(220 \pm 40) \mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Embora esses materiais não sejam similares ao mel, eles foram utilizados porque em princípio, independente da matriz, todo o Hg é liberado quando a amostra é queimada. No DMA estes materiais apresentaram concentração de $(5,2 \pm 0,2)$

$\mu\text{g}/\text{kg}$, $(238 \pm 18) \mu\text{g}/\text{kg}$ e $(223 \pm 9) \mu\text{g}/\text{kg}$ de Hg, respectivamente, e estes valores não diferiram do valor esperado pelo teste t, ao nível de 95 % de confiança.

A veracidade foi avaliada também por ensaios de adição e recuperação e variou de 75,3 % a 104,0 % nas concentrações de 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 50,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A precisão foi obtida sob condições de repetibilidade e precisão intermediária, conforme o procedimento descrito no item 4.11.3. O desvio padrão relativo variou de 2,7 % a 8,4 % para amostras de mel com concentrações de 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 50,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de Hg (Tabela 26).

Tabela 26. Porcentagens de recuperação média (%R) e DPR (%) obtidos em diferentes níveis de concentração de Hg utilizando DMA.

| Concentração ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | %R \pm DPR (%) |
|---|------------------|
| 50,0 | 99,1 \pm 2,7 |
| 50,0* | 104,0 \pm 2,9 |
| 10,0 | 101,0 \pm 3,5 |
| 10,0* | 93,9 \pm 7,3 |
| 2,5 | 75,3 \pm 8,4 |
| 1,0 | 78,2 \pm 28,4 |

*Obtido nas condições de precisão intermediária.

Inicialmente, os parâmetros da curva analítica utilizada para avaliação da linearidade foram empregados para estimar os valores dos limites LD e LQ pelo procedimento proposto por RIBEIRO [80], e foram obtidos 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Esses limites foram confirmados após avaliação da veracidade e precisão utilizando ensaios de adição e recuperação nas concentrações de Hg de 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, conforme a Tabela 26. Este procedimento foi escolhido devido aos resultados obtidos no item 5.2.6.2 e representou melhor as condições reais de análise.

Na concentração de 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0,25 ng) a porcentagem de recuperação de 75,3 % obtida está de acordo com os critérios de aceitação definidos pelo MAPA [72] e pela EC [92], que estabelecem para concentrações entre 1 e 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, recuperações entre 70 % e 110 %, e foi estabelecido como limite de quantificação do método. A concentração de 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (0,10 ng) não apresentou precisão sob condições de repetibilidade aceitáveis em conformidade com o critério de aceitabilidade definido pelo MAPA [72], que

estabelece um desvio padrão relativo de até 25 % para concentrações de 1,0 µg/kg, e foi estabelecido como limite de detecção do método.

Os LDs obtidos estão de acordo com os limites obtidos por MAGGI e colaboradores, e DURÃO JÚNIOR e colaboradores, de 1,5 µg/kg e 0,8 µg/kg, respectivamente [93, 94]. Portanto, os parâmetros de desempenho, seletividade, linearidade, veracidade, precisão, limites de detecção e de quantificação, confirmaram a adequação ao propósito de uso do DMA para determinação de Hg em mel.

5.3.2 Determinação de Hg nas amostras de mel

As metodologias analíticas para determinação direta de Hg em mel empregando a CVAAS e DMA foram aplicadas em amostras de mel provenientes de várias cidades de Minas Gerais, conforme o procedimento descrito nos itens 4.7, 4.8 e 4.11. Todas as amostras de mel (Tabela 02) apresentaram concentração de Hg abaixo do limite de detecção para o método de CVAAS, de 30 µg/kg e também pelo método de DMA, de 1,0 µg/kg. Portanto, estes resultados foram inferiores aos limites estabelecidos pela legislação brasileira de 500 µg/kg [8] e pelo Codex Alimentarius [7] (500 µg/kg a 1000 µg/kg para Hg em alimentos).

5.4 Otimização do método analítico para determinação direta de As total em mel empregando HGAAS

O desenvolvimento da metodologia analítica para determinação direta de As em mel empregando HGAAS foi feito de forma semelhante ao Hg, empregando os planejamentos fatoriais e CCD.

5.4.1 Planejamento fatorial

O redutor NaBH_4 foi escolhido por apresentar bom desempenho, baixo custo e facilidade de uso junto à técnica de HGAAS. O fabricante do equipamento de geração de hidretos recomenda o uso da concentração de 0,5 % (m/v) para amostras em geral. Optou-se por avaliar o desempenho do método em uma concentração maior, de 1,0 % (m/v).

A concentração do ácido clorídrico utilizado, de 5,0 % (v/v), também foi estabelecida pelo fabricante e o valor de 2,5 % (v/v) foi escolhido neste estudo numa tentativa de se obter respostas satisfatórias com um consumo menor deste reagente.

Na determinação de As, todas as espécies de As devem ser convertidas em As^{3+} através da adição de um pré-redutor, como KI ou $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$, antes da etapa de geração do hidreto. Isso é necessário porque o As^{5+} apresenta uma cinética de geração de hidreto mais lenta que o As^{3+} . Estes redutores foram escolhidos devido aos bons resultados obtidos em diversos trabalhos [10]. Ainda devido ao fato do As^{5+} apresentar uma cinética de geração de hidreto mais lenta que o As^{3+} , optou-se por utilizar uma solução padrão de As^{5+} durante o desenvolvimento e validação do método. Posteriormente, o desempenho do método também foi confirmado através de uma validação utilizando-se soluções padrão de As^{3+} e amostras contaminadas com As^{3+} .

Algumas dificuldades na geração do hidreto devido às características da solução contendo a amostra (concentração de amostra, pH e viscosidade) podem surgir, como a formação de espumas. Dessa forma, avaliou-se a eficiência da geração do hidreto através da adição ou não de um diluente. Foram estudados previamente, a adição de diluentes na concentração otimizada para a determinação de Hg, entretanto, ao adicionar os pré-redutores foi formado um precipitado de coloração escura, que comprometeu os resultados. Esse problema ocorreu devido ao forte meio oxidante em que a amostra se encontrava, assim, optou-se por trocar o diluente por apenas HCl, ao invés de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{HNO}_3$, e otimizar a sua concentração.

Portanto, para se obter as melhores condições de sensibilidade foram estudados os comportamentos simultâneos de quatro fatores: concentração do agente redutor NaBH_4 F(1), concentração de ácido HCl F(2) utilizado na etapa de geração do hidreto, concentração de ácido HCl F(3) utilizado como diluente da amostra e uso de diferentes redutores, KI ou $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ F(4) em amostras de mel, adicionadas com 0,50 mg/kg de As^{5+} , de acordo com o procedimento descrito no item 4.9.1.

A determinação de As em mel foi otimizada utilizando a técnica de HGAAS e empregando-se um planejamento fatorial completo 2^4 . Este experimento envolve quatro fatores com dois níveis cada, ele é do tipo 2^4 e requer dezesseis ensaios. Os ensaios foram feitos em duplicata, totalizando 32 ensaios. Os níveis estudados em cada fator foram listados na Tabela 08. Os resultados de resposta do instrumento em cada ensaio são mostrados na Tabela 27. As porcentagens de recuperação foram calculadas e o gráfico de Pareto foi construído (Figura 15).

Tabela 27. Resposta do instrumento e desvios padrão (em absorvância) obtidos nos experimentos do planejamento fatorial 2^4 para amostras de mel adicionadas com As .

| Ensaio | Fatores codificados | | | | Resposta instrumental \pm desvio padrão |
|---------|---------------------|------|------|------|---|
| | F(1) | F(2) | F(3) | F(4) | |
| 1 e 2 | -1 | -1 | -1 | -1 | 0,0701 \pm 0,0001 |
| 3 e 4 | 1 | -1 | -1 | -1 | 0,1628 \pm 0,0019 |
| 5 e 6 | -1 | 1 | -1 | -1 | 0,1109 \pm 0,0129 |
| 7 e 8 | 1 | 1 | -1 | -1 | 0,2173 \pm 0,0031 |
| 9 e 10 | -1 | -1 | 1 | -1 | 0,4592 \pm 0,0239 |
| 11 e 12 | 1 | -1 | 1 | -1 | 0,5522 \pm 0,0214 |
| 13 e 14 | -1 | 1 | 1 | -1 | 0,5326 \pm 0,0272 |
| 15 e 16 | 1 | 1 | 1 | -1 | 0,5751 \pm 0,0153 |
| 17 e 18 | -1 | -1 | -1 | 1 | 0,0985 \pm 0,0011 |
| 19 e 20 | 1 | -1 | -1 | 1 | 0,2085 \pm 0,0004 |
| 21 e 22 | -1 | 1 | -1 | 1 | 0,1277 \pm 0,0035 |
| 23 e 24 | 1 | 1 | -1 | 1 | 0,2484 \pm 0,0062 |
| 25 e 26 | -1 | -1 | 1 | 1 | 0,6499 \pm 0,0059 |
| 27 e 28 | 1 | -1 | 1 | 1 | 0,6798 \pm 0,0180 |
| 29 e 30 | -1 | 1 | 1 | 1 | 0,6669 \pm 0,0042 |
| 31 e 32 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,6790 \pm 0,0088 |

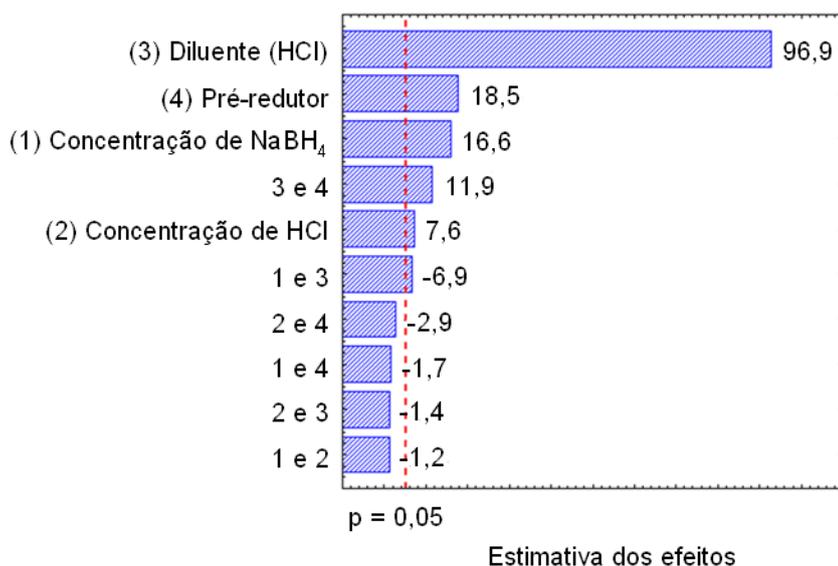


Figura 15. Gráfico de Pareto obtido no planejamento fatorial completo 2^4 para determinação de As em mel por HGAAS.

De acordo com a Figura 15, os fatores (1), (2), (3) e (4) e as interações entre F(1 e 3) e F(3 e 4) são significativos ao nível de 95 % de confiança. O aumento nas concentrações de NaBH₄ e HCl e a utilização de SC(NH₂)₂, ao invés de KI, apresentaram efeito positivo significativo na resposta instrumental. Em termos de custos, a SC(NH₂)₂ possui um preço cerca de quatro vezes inferior ao KI de qualidade similar.

A utilização de diluente apresentou efeito positivo e foi o fator mais significativo do planejamento e, portanto optou-se por estudar melhor a sua concentração na etapa seguinte de otimização, bem como a sua interação com novas concentrações de SC(NH₂)₂. A concentração de HCl, F(2), apresentou um efeito positivo significativo, porém inferior aos efeitos dos demais fatores e portanto, optou-se por estudar apenas a concentração de HCl utilizada no preparo da amostra, mantendo a concentração utilizada na geração do hidreto fixa no nível baixo (2,5 mol/L) no próximo CCD (item 5.4.2).

5.4.2 Planejamento composto central

O CCD foi executado com a finalidade de se obter a região ótima numa superfície de resposta, definida pelos fatores: concentração de HCl na amostra F(1), concentração do pré-redutor SC(NH₂)₂ F(2) e concentração do agente redutor NaBH₄ F(3), nos níveis listados na Tabela 09, de acordo com o item 4.9.2.

A análise deste CCD foi feita de forma semelhante aos itens 5.2.2 e 5.2.3, para os ensaios de otimização da metodologia de análise de Hg. A Tabela 28 mostra os resultados de resposta do instrumento, em absorvância, para cada ensaio do planejamento CCD. O ensaio 15 (ponto central) foi realizado em quintuplicada e por isso somente o desvio padrão referente a esse ensaio foi apresentado.

Tabela 28. Respostas do instrumento, em absorvância, obtidas nos ensaios do planejamento CCD para amostras de mel adicionadas com As.

| Ensaio | Fatores codificados | | | Resposta instrumental (Absorvância) |
|--------|---------------------|-------|-------|--|
| | F(1) | F(2) | F(3) | |
| 1 | -1 | -1 | -1 | 0,2252 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 0,2756 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 0,2622 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | 0,2919 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 0,3053 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | 0,3238 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | 0,3263 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 0,3365 |
| 9 | -1,68 | 0 | 0 | 0,2701 |
| 10 | 1,68 | 0 | 0 | 0,3556 |
| 11 | 0 | -1,68 | 0 | 0,2923 |
| 12 | 0 | 1,68 | 0 | 0,3618 |
| 13 | 0 | 0 | -1,68 | 0,1662 |
| 14 | 0 | 0 | 1,68 | 0,3398 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0,3439 ± 0,0028 |

Com os resultados foi possível calcular a recuperação média, os efeitos relacionados a cada fator e as interações entre os fatores na determinação de As em mel (Tabela 29).

Na Tabela 29, observou-se, isoladamente, que um aumento nas concentrações de $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$, NaBH_4 e HCl proporcionou aumento na resposta do equipamento. A região ótima definida pelos fatores pode ser melhor visualizada numa superfície de resposta. A Figura 16 foi construída fixando-se a concentração do agente redutor NaBH_4 em 0,85 % (m/v), que corresponde ao nível +0,50, pois nessa concentração foi possível obter o maior sinal do equipamento. Pela análise da Figura 16 pode-se inferir que o ponto de maior resposta foi obtido nas concentrações de 1,3 mol/L de HCl e 1,0 % (m/v) de $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$.

Portanto, pelos resultados obtidos na análise estatística, Tabela 29, e pela análise da superfície de resposta, Figura 16, as concentrações de 0,85 % (m/v) de NaBH₄, 1,3 mol/L de HCl e 1,0 % (m/v) de SC(NH₂)₂ apresentaram maior resposta instrumental e foram empregadas na próxima etapa, na qual foram avaliadas outras concentrações de amostra, mantendo constante as concentrações já otimizadas pelo CCD.

Tabela 29. Resposta média (\pm estimativa do erro experimental), efeitos de cada fator e interações entre os fatores e o valor de p , provenientes dos experimentos do planejamento CCD para amostras de mel adicionadas com As.

| | Efeito \pm erro | p |
|--|-----------------------|------------------------|
| Resposta média | 0,3440 \pm 0,0013* | 1,0 x 10 ⁻⁹ |
| F(1) HCl (diluyente) mol/L | 0,0185 \pm 0,0008* | 1,7 x 10 ⁻⁵ |
| F(2) SC(NH ₂) ₂ % (m/v) | 0,0149 \pm 0,0008* | 3,9 x 10 ⁻⁵ |
| F(3) NaBH ₄ % (m/v) | 0,0387 \pm 0,0008* | 8,8 x 10 ⁻⁷ |
| F(1 e 2) | -0,0036 \pm 0,0008* | 2,2 x 10 ⁻² |
| F(1 e 3) | -0,0064 \pm 0,0008* | 2,9 x 10 ⁻³ |
| F(2 e 3) | -0,0024 \pm 0,0008 | 6,9 x 10 ⁻² |

*Efeito estatisticamente significativo ao nível de significância α de 0,05, pelo teste t de Student.

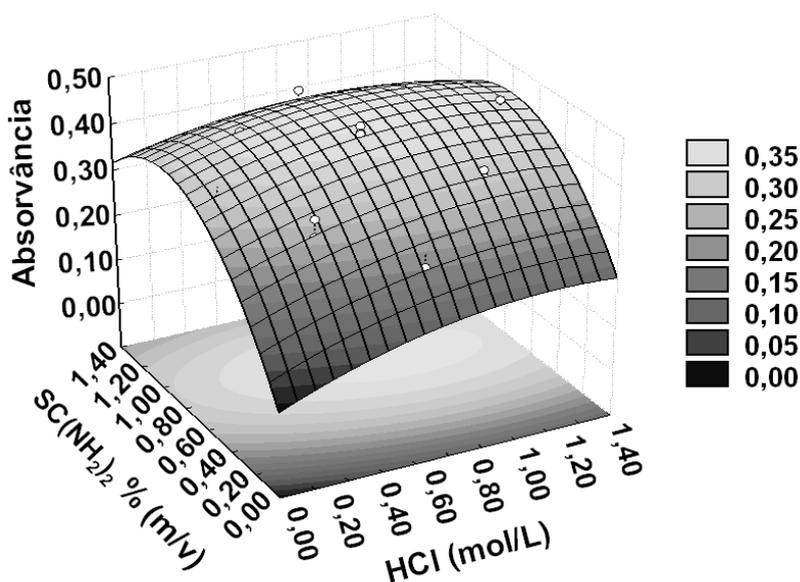


Figura 16. Superfície de resposta obtida na otimização das condições para determinação de As em mel por HGAAS, na qual foram avaliadas diferentes concentrações de HCl e SC(NH₂)₂, mantendo a concentração de NaBH₄ fixa em 0,85 % (m/v).

5.4.3 Otimização da proporção de amostra e tempo de contato

Esse estudo foi conduzido com o propósito de conhecer melhor o desempenho do método de determinação de As em mel por HGAAS frente a alterações no tempo de preparo e na concentração de amostra utilizada. Com esse objetivo, soluções contendo 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 % (m/v) de mel foram contaminadas com 20,0 µg/L de As⁵⁺ e analisadas de acordo com o procedimento descrito no item 4.9.3, em triplicata.

Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 30. A porcentagem de recuperação variou de 97,9 % a 105,3 % e o desvio padrão relativo de 0,6 % a 5,5 %. Em todas as proporções avaliadas, os resultados obtidos estão de acordo com os critérios de aceitação definidos pelo MAPA [72], e pela EC [92], que estabelecem para concentrações acima de 10 µg/kg, recuperações entre 80 % e 110 %.

Tabela 30. Porcentagem de recuperação (%R) ± DPR (%) para determinação de 20,0 µg/L de As em soluções contendo diferentes concentrações de amostra de mel.

| Concentração de mel % (m/v) | %R ± DPR (%) |
|--------------------------------|--------------|
| 2,0 | 97,9 ± 3,5 |
| 4,0 | 102,4 ± 0,6 |
| 6,0 | 105,3 ± 3,4 |
| 8,0 | 99,6 ± 1,9 |
| 10,0 | 98,8 ± 2,5 |

As soluções contendo 2,0 % (m/v) de mel também foram analisadas após quatro horas de repouso, nas condições descritas no item 4.9.3, e apresentaram porcentagem de recuperação média de 100,6 % e desvio padrão relativo de 0,6 %. Portanto, o método possui um bom desempenho utilizando até 10,0 % (m/v) de amostra e, após a adição do diluente, as soluções mantiveram-se estáveis por até quatro horas.

5.4.4 Método otimizado

Os experimentos realizados permitiram propor o seguinte método otimizado para a determinação de As em mel utilizando HGAAS: preparo de solução contendo 5,0 % (m/v) de mel, 1,3 mol/L de HCl e 1,0 % (m/v) de $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$. As soluções podem ser deixadas em repouso por até 4 horas após o preparo, e as medidas de As devem ser feitas utilizando como redutor, NaBH_4 0,85 % (m/v) em NaOH 0,5 % (m/v) e HCl 2,5 mol/L. Essa metodologia foi validada conforme o procedimento descrito no item 5.4.5 e foi aplicada na etapa de determinação de As em amostras mel (item 5.4.6).

5.4.5 Validação do método analítico

A seletividade e a linearidade do método de determinação de As em mel utilizando a HGAAS foi avaliada através do preparo de três curvas de calibração, contendo As^{5+} em concentrações de 0,0; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0 e 40,0 $\mu\text{g/L}$, sendo duas curvas contendo também 5,0 % (m/v) de mel, provenientes de duas regiões distintas do estado de Minas Gerais e com aspectos visuais, como cor e presença de material precipitado diferentes. As três curvas foram preparadas em triplicatas independentes. A linearidade de resposta do detector foi determinada nas três curvas de calibração. As soluções contendo As foram medidas nas condições descritas no item 4.11. Após as medidas, o tratamento estatístico dos dados foi feito utilizando as planilhas do programa Excel da Microsoft Office (2003).

Os requisitos de normalidade, independência e homoscedasticidade dos resíduos foram confirmados utilizando os testes estatísticos descritos no item 5.2.6.1. Entretanto, a linearidade não foi confirmada na faixa de 1,0 $\mu\text{g/L}$ a 40,0 $\mu\text{g/L}$, utilizando o teste F (ANOVA). Durante o tratamento dos dados foram feitas diversas tentativas de se obter uma faixa linear diminuindo-se a faixa de trabalho e mesmo num intervalo menor, de 1,0 $\mu\text{g/L}$ a 20,0 $\mu\text{g/L}$, não foi possível obter uma faixa linear, como pode ser observado nos gráficos dos resíduos mostrados na Figura 17.

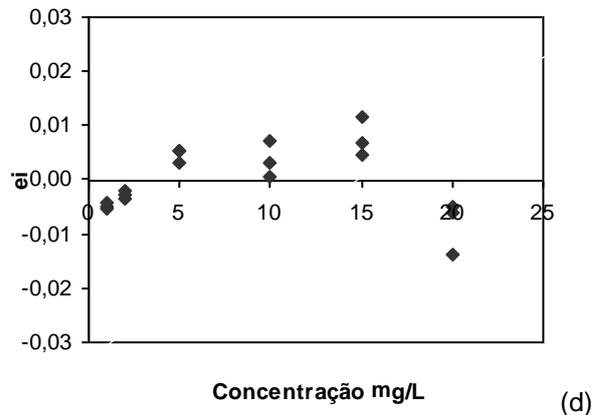
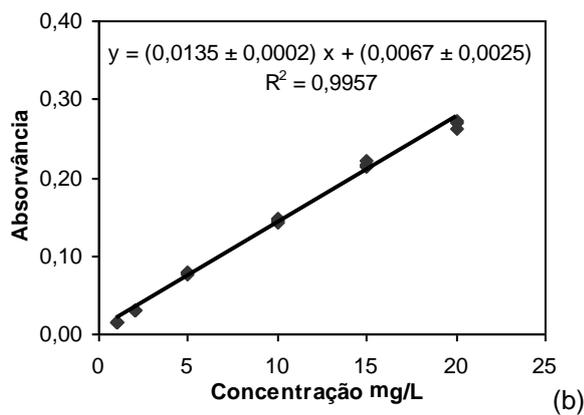
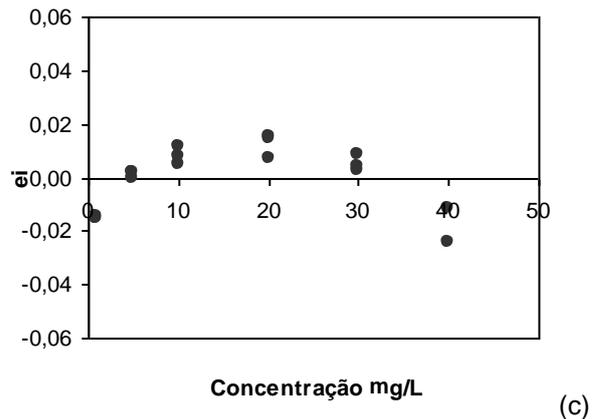
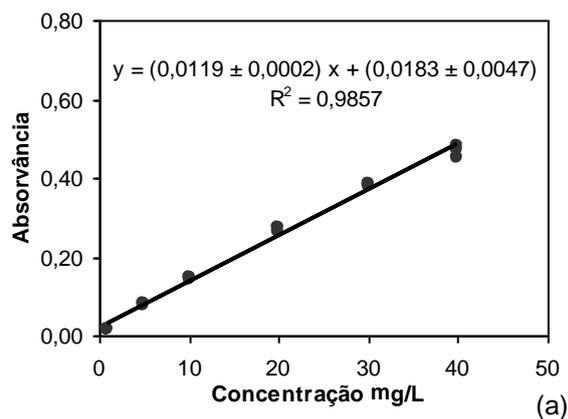
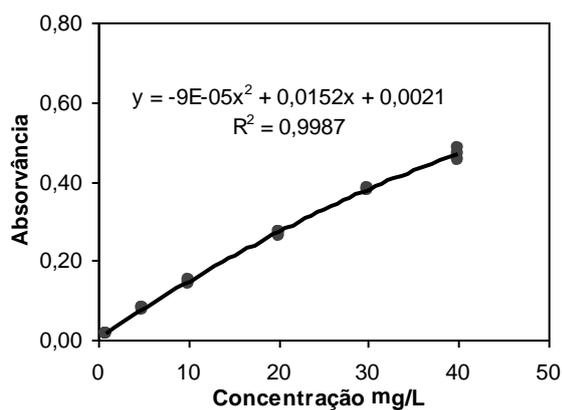
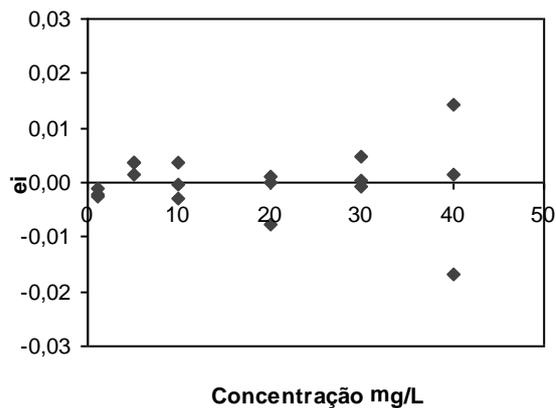


Figura 17. Curvas de calibração de As^{5+} sem a matriz (a) na faixa de 1,0 $\mu g/L$ a 40,0 $\mu g/L$ e (b) na faixa de 1,0 $\mu g/L$ a 20,0 $\mu g/L$. Gráficos dos resíduos da calibração (r_i) obtidos para o método de determinação As sem a matriz (c) na faixa de 1,0 $\mu g/L$ a 40,0 $\mu g/L$ e (d) na faixa de 1,0 $\mu g/L$ a 20,0 $\mu g/L$.

Como o ajuste linear não representou bem os dados, tentou-se utilizar o ajuste quadrático. A Figura 18 mostra a curva de calibração e o gráfico dos resíduos da calibração de As^{5+} , obtidos na faixa de 1,0 $\mu g/L$ a 40,0 $\mu g/L$, utilizando ajuste quadrático. O valor de R^2 obtido foi de 0,9987, confirmando a melhor adequação do ajuste quadrático aos dados.



(a)



(b)

Figura 18. (a) Curva de calibração de As^{5+} sem a matriz na faixa de 1,0 $\mu\text{g/L}$ a 40,0 $\mu\text{g/L}$ e gráfico dos resíduos da calibração obtidos para o método de determinação As sem a matriz (c) na faixa de 1,0 $\mu\text{g/L}$ a 40,0 $\mu\text{g/L}$, utilizando ajuste quadrático.

A seletividade foi verificada em termos de efeito de matriz, comparando-se a resposta instrumental proveniente de duas curvas de calibração adicionadas de matriz com uma curva sem a matriz, sendo as três curvas preparadas em triplicatas. Os resultados obtidos para as concentrações de 0,0; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 $\mu\text{g/L}$ (Tabela 31) para a curva sem a matriz foram comparados ponto a ponto com as curvas adicionadas de matriz através da utilização dos testes F (Snedecor) e t (Student). Não foi observado efeito de matriz, ao nível de confiança de 95 % em todos os níveis de concentração da curva de calibração aquosa e das curvas adicionadas de matriz.

Tabela 31. Resposta instrumental \pm desvio padrão (em absorvância) para as curvas preparadas com e sem adição de matriz e As.

| Concentração ($\mu\text{g/L}$) | Resposta instrumental \pm desvio padrão (absorvância) | | |
|-------------------------------------|---|-------------------|-------------------|
| | Sem matriz | Matriz 1 | Matriz 2 |
| 2 | 0,031 \pm 0,001 | 0,030 \pm 0,002 | 0,032 \pm 0,004 |
| 5 | 0,079 \pm 0,001 | 0,074 \pm 0,005 | 0,078 \pm 0,003 |
| 10 | 0,145 \pm 0,003 | 0,147 \pm 0,005 | 0,145 \pm 0,003 |
| 20 | 0,269 \pm 0,005 | 0,272 \pm 0,013 | 0,265 \pm 0,009 |
| 30 | 0,380 \pm 0,003 | 0,382 \pm 0,005 | 0,381 \pm 0,011 |
| 40 | 0,468 \pm 0,016 | 0,495 \pm 0,015 | 0,462 \pm 0,010 |

A veracidade e a precisão do método de determinação de As^{5+} em mel utilizando HGAAS foram determinadas com ensaios de adição e recuperação, pois não há material de referência certificado de mel contendo As. Soluções contendo 5,0 % (m/v) de mel, contaminadas com As^{5+} e As^{3+} em concentrações de 0,30 mg/kg e 0,50 mg/kg, foram preparadas num total de seis repetições. Em outro dia, essas soluções foram preparadas novamente para avaliação da precisão intermediária. O As foi determinado seguindo a metodologia otimizada descrita no item 4.11. Os resultados obtidos para veracidade e precisão estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32. Porcentagem de recuperação (%R) \pm DPR (%) de repetibilidade e precisão intermediária para amostras de mel contaminadas com As^{5+} e As^{3+} em concentrações diferentes.

| Concentração (mg/kg) | As^{5+} %R \pm DPR (%) | As^{3+} %R \pm DPR (%) |
|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0,30 | 94,4 \pm 4,9 | 94,6 \pm 0,7 |
| 0,30* | 95,2 \pm 2,1 | 94,8 \pm 2,0 |
| 0,50 | 105,3 \pm 5,2 | 104,1 \pm 2,6 |
| 0,50* | 103,7 \pm 4,0 | 102,2 \pm 3,2 |

*Obtido nas condições de precisão intermediária.

A veracidade, em termos de porcentagem de recuperação, nas amostras contaminadas com As^{5+} e As^{3+} variou de 94,4 % a 105,3 %, estando de acordo com os critérios de aceitação definidos pelo MAPA [72] e pela EC [92], que estabelecem para concentrações acima de 10 μ g/kg, recuperações entre 80 % e 110 %.

A precisão sob condições de repetibilidade variou de 0,7 % a 5,2 %, já a precisão intermediária foi de 2,1 % e 4,0 % para As^{5+} e 2,0 % e 3,2 % para As^{3+} nas concentrações de 0,30 mg/kg e 0,50 mg/kg, respectivamente, estando de acordo com o critério de aceitabilidade definido pelo MAPA [72], que estabelece um desvio padrão relativo de até 10 % para concentrações acima de 0,10 mg/kg.

Os limites de detecção e quantificação foram obtidos por ensaios de adição e recuperação através da avaliação da veracidade e precisão nas concentrações de 1,0 e 2,0 μ g/L, que correspondem a 20 e 40 μ g/kg de As^{5+} , conforme a Tabela 33.

Tabela 33. Porcentagem de recuperação (%R) \pm DPR (%) de repetibilidade em diferentes níveis de concentração de As.

| Concentração $\mu\text{g}/\text{kg}$ | %R \pm DPR (%) |
|---|------------------|
| 40 | 95,4 \pm 9,7 |
| 40* | 105,1 \pm 1,2 |
| 20 | 88,0 \pm 28,1 |
| 20* | 111,8 \pm 3,5 |

*Soluções preparadas a partir de padrões de As^{3+} .

Em relação à veracidade, a porcentagem de recuperação obtida está de acordo com o critério de aceitabilidade de 70 % a 110 % nas concentrações estudadas. A concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de As^{5+} apresentou desvio padrão relativo de 9,7 % e está de acordo com os critérios de aceitação definidos pelo MAPA [72] e pela EC [92], que aceitam um DPR de até 10 % para essa concentração e foi estabelecida como LQ do método. A concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ não apresentou precisão sob condições de repetibilidade aceitáveis em conformidade com o critério de aceitabilidade definido pelo MAPA [72] e foi estabelecida como LD.

Os valores de LD e o LQ também foram confirmados em soluções preparadas contendo 5,0 % (m/v) de mel e contaminadas com 1,0 $\mu\text{g}/\text{L}$ e 2,0 $\mu\text{g}/\text{L}$ de As^{3+} . As porcentagens de recuperação e os desvios padrão obtidos foram de 111,8 % e 3,5 % para a concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 105,1% e 1,2 % para 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente.

O LD e o LQ obtidos são próximos aos limites obtidos por SOUZA de 0,5 e 1,0 $\mu\text{g}/\text{L}$, equivalentes a 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, para As total determinado em fígado bovino HGAAS [74]. AJTONY e colaboradores também obtiveram LD de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ na determinação de As em mel por GFAAS [32].

Portanto, os parâmetros de desempenho estudados confirmaram a adequação ao propósito de uso da técnica de análise de As em mel por HGAAS.

5.4.6 Determinação de As nas amostras de mel

Após a validação, a metodologia analítica para determinação direta de As em mel empregando a HGAAS foi aplicada em amostras provenientes de várias cidades de Minas Gerais (Tabela 02), conforme o procedimento descrito nos itens 4.9 e 4.11 para

análise de As. Em todas as amostras estudadas, a concentração de As foi inferior ao limite de detecção do método (20 µg/kg) e também inferior ao limite estabelecido pelo MERCOSUL (0,30 mg/kg) [9], não sendo possível comparar os resultados obtidos por essa nova metodologia com os resultados apresentados na Tabela 14 (As < 23 µg/kg). Portanto, em relação à presença de As, todas as amostras estão adequadas para o consumo. Estes resultados estão de acordo com os valores obtidos por BATISTA e colaboradores [28] que determinaram de 0,4 µg/kg a 20,2 µg/kg de As em amostras coletadas no estado de São Paulo. Em outro trabalho, os resultados obtidos para análise de As em amostras de mel coletadas na França foram menores que 27 µg/kg [31]. Ambos empregaram ICP-MS nas determinações. AJTONY e colaboradores determinaram As em 42 amostras de mel coletadas na Hungria por GFAAS. O As foi encontrado em apenas 9 amostras, com resultados variando de 4,1 a 13,0 µg/kg [32].

5.5 Otimização de método analítico para determinação Cd, Cu e Pb em mel empregando TS-FF-FS-AAS

Para desenvolver um método de determinação de elementos traço como Cd, Cu e Pb em alimentos é necessário dispor de equipamentos com capacidade de medição de concentrações desses elementos em níveis de $\mu\text{g/L}$. O TS-FF-AAS é uma técnica relativamente nova que apresenta um incremento significativo na sensibilidade da tradicional espectrometria de absorção atômica com chama, através da adaptação de um capilar de cerâmica encaixado em um tubo de níquel posicionado sobre o queimador. Este sistema permite a introdução total da amostra sem o uso de um nebulizador, aumentando o tempo de residência da nuvem atômica dentro do atomizador e contribuindo para um aumento na sensibilidade [68]. Este sistema apresenta um baixo custo de aquisição, poupando-se gastos com compra de novos equipamentos como espectrômetros de atomização eletrotérmica e plasma indutivamente acoplado.

Um inconveniente do TS-FF-AAS era o maior tempo de análise requerido devido à determinação monoelementar. Contudo, um estudo recente mostrou que o TS-FF-AAS pode funcionar bem combinado com equipamentos que utilizam absorção atômica sequencial (TS-FF-FS-AAS), ou seja, que analisam mais de um elemento químico de forma sequencial rápida e, portanto, contribuindo para um menor tempo de análise [63]. É também frequente a ocorrência de efeito de matriz, quando se utiliza o preparo de amostras na forma de emulsões e suspensões com análise por TS-FF-AAS, sendo comum a utilização da calibração com adição de padrão [61, 68].

Dentro desse contexto, para obter a melhor condição para análise sequencial de Cd, Cu e Pb em amostras de mel, foram estudados os efeitos do comprimento e quantidade de furos do tubo de níquel, fluxo da amostra e o modo de aquisição de sinal. Em seguida, foram estudados os efeitos dos fatores tempo e temperatura de extração e o uso dos reagentes ácido nítrico, ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio, utilizando-se planejamentos fatoriais e CCD, descritos a seguir.

5.5.1 Avaliação do comprimento do tubo de níquel e da quantidade de furos na resposta instrumental

Este estudo foi conduzido para escolher o tubo de níquel que proporcionasse uma maior resposta em absorvância. Deste modo, o desempenho de quatro tubos de níquel

com comprimento e quantidade de furos distintos, foi avaliado após leitura de soluções contendo Cd (10,0 µg/L), Pb (100 µg/L) e Cu (100 µg/L), conforme o item 4.10.1. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 34.

As leituras foram feitas utilizando-se os tubos de níquel primeiramente com os furos posicionados para baixo, de forma que a chama penetrasse dentro do tubo, depois, de forma invertida com os furos posicionados para cima e com a chama envolvendo o tubo na parte exterior sem penetrar internamente. Para o Cd, a maior resposta foi obtida com os tubos de 10 cm (6 e 10 furos invertidos) sem a chama dentro do tubo, pois houve uma menor diluição do sinal pela chama, mas um resultado adequado pode ser obtido com o tubo de 10 cm e 6 furos na posição tradicional. Para o Pb, não houve sinal com o tubo invertido devido à menor temperatura em seu interior, portanto, o melhor tubo foi de 6 furos e 10 cm. Para o Cu, foi obtido um maior sinal no tubo chanfrado, devido à maior penetração da chama e maior temperatura, seguido dos tubos de 10 cm com 6 e 10 furos.

Tabela 34. Resultados obtidos (em absorvância ± desvio padrão) na avaliação do comprimento do tubo de níquel e da quantidade de furos, com furos posicionados para baixo e para cima, após leitura de soluções padrão contendo Cd, Cu e Pb por TS-FF-FS-AAS.

| Características do tubo (comprimento / nº de furos) | Absorvância ± desvio padrão | | |
|--|-----------------------------|------------------|------------------|
| | Cd | Cu | Pb |
| Furos posicionados para baixo | | | |
| 10 cm / 6 furos | 0,0151 ± 0,0002 | 0,0029 ± 0,0006 | 0,0076 ± 0,0009 |
| 10 cm / 10 furos | 0,0123 ± 0,0002 | 0,0029 ± 0,0003 | 0,0035 ± 0,0011 |
| 10 cm / chanfrado | 0,0061 ± 0,0014 | 0,0066 ± 0,0007 | 0,0053 ± 0,0003 |
| 6 cm / 6 furos | 0,0094 ± 0,0002 | 0,0007 ± 0,0002 | 0,0032 ± 0,0002 |
| Furos posicionados para cima | | | |
| 10 cm / 6 furos | 0,0172 ± 0,0005 | 0,0003 ± 0,0017 | -0,0006 ± 0,0003 |
| 10 cm / 10 furos | 0,0169 ± 0,0013 | 0,0028 ± 0,0004 | 0,0007 ± 0,0005 |
| 10 cm / chanfrado | 0,0040 ± 0,0003 | -0,0004 ± 0,0000 | -0,0001 ± 0,0004 |
| 6 cm / 6 furos | 0,0089 ± 0,0007 | 0,0010 ± 0,0008 | -0,0007 ± 0,0002 |

Para decidir qual tubo deveria ser utilizado nas etapas seguintes da otimização, foram considerados os limites máximos permitidos pelas legislações vigentes.

Considerando-se os limites estabelecidos pelo MERCOSUL [9] para o mel, de: 0,10 mg/kg (Cd) e 0,30 mg/kg (Pb) e o limite de 10,0 mg/kg (Cu) estabelecido pelo Brasil [6], optou-se pelo uso do tubo de 10 cm e 6 furos, que foi o que apresentou maior resposta para o Cd e Pb e a segunda melhor resposta para o Cu.

5.5.2 Avaliação do fluxo de amostragem na resposta instrumental

Nesta etapa foram avaliados os fluxos de: 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8 mL/min durante a leitura de soluções padrão de Cd (10,0 µg/L), Pb (100 µg/L) e Cu (100 µg/L), utilizando um tubo de níquel de 10 cm e 6 furos, conforme o item 4.10.2. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 19.

Para o Cu, o fluxo de 0,8 mL/min apresentou absorvância maior. Enquanto o Cd apresentou uma menor influência do fluxo na resposta instrumental, apresentando pouca diferença na faixa de 0,6 a 0,7 mL/min. Para o Pb, o fluxo de 0,6 mL/min apresentou absorvância maior. Portanto, optou-se por manter os estudos utilizando o fluxo de 0,6 mL/min nas etapas seguintes da otimização, pois este apresentou os melhores resultados para Pb e Cd.

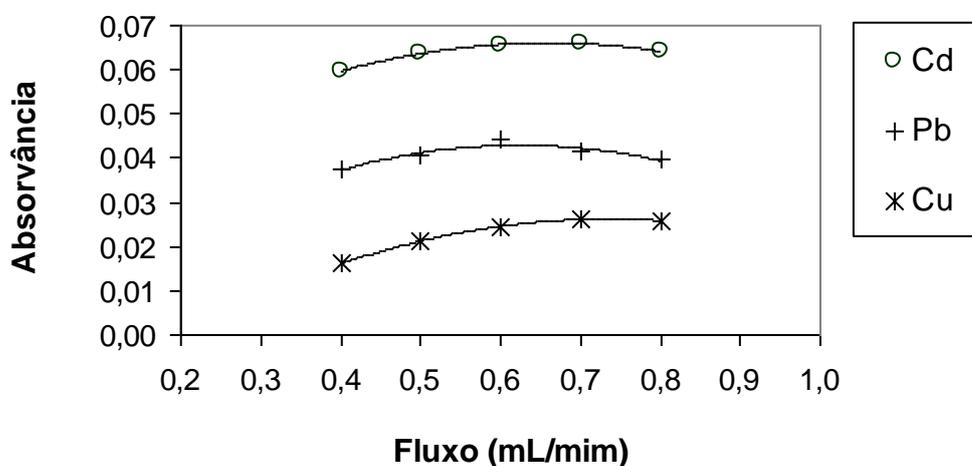


Figura 19. Gráfico obtido após leitura de soluções contendo Cd, Cu e Pb após leituras por TS-FF-FS-AAS, com fluxos de amostragem de: 0,4; 0,5; 0,6; 0,7 e 0,8 mL/min.

5.5.3 Avaliação do modo de aquisição de sinal

Durante as leituras por TS-FF-FS-AAS o *software Spectra* utilizado no equipamento permite a aquisição de sinal proveniente da medida da altura, integração e

área de pico, durante diferentes tempos (em s), conforme estabelecido pelo operador. Com esse propósito, soluções padrão contendo Cd (10,0 µg/L), Pb (100 µg/L) e Cu (100 µg/L), preparadas conforme descrito no item 4.10.3, foram lidas nos modos: altura de pico, integração e área de pico, com aquisição de sinal por 3 s. A absorvância foi maior utilizando o modo área de pico para Cd, Cu e Pb, como mostra a Figura 20, logo optou-se por utilizar esse modo de aquisição de sinal nas próximas etapas da otimização.

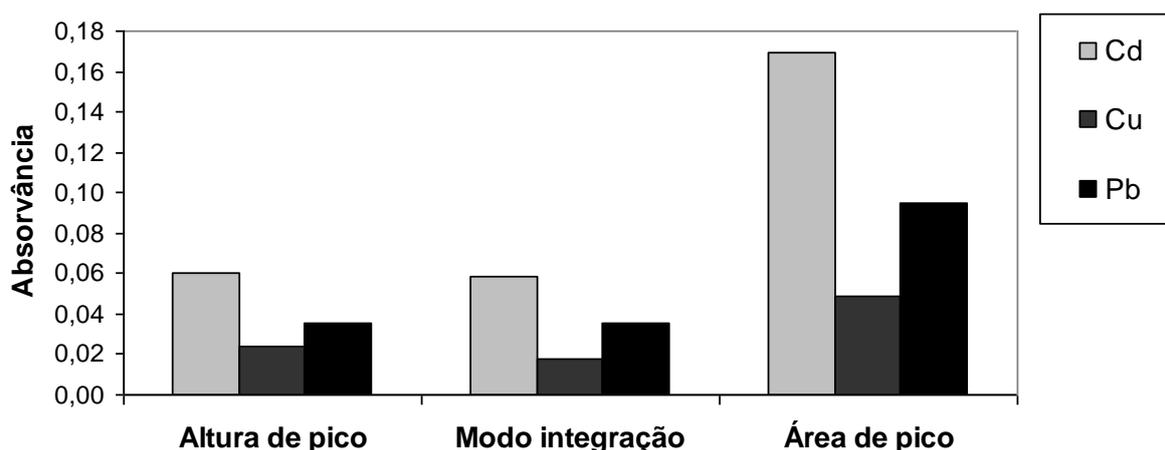


Figura 20. Gráfico obtido após leitura de soluções contendo Cd, Pb e Cu, nos modos: altura de pico, integração e área de pico, com aquisição de sinal por 3 s.

5.5.4 Estimativa do LD para utilização do TS-FF-FS-AAS nas análises de Cd, Cu e Pb em mel

Neste estudo foi feita uma estimativa inicial do LD para avaliar a possibilidade de uso do TS-FF-FS-AAS em conformidade com os limites estabelecidos pelas legislações vigentes para Cd, Cu e Pb em mel. Na Tabela 35, foram resumidas as absorvâncias médias obtidas e os desvios padrão relativos para cada concentração das curvas de calibração preparadas como descrito no item 4.10.4.

Considerando somente o critério da EC [92], que estabelece um desvio padrão relativo de no máximo 20 % para o LQ, pode-se estimar um LD de 2,5 µg/L para Cu e Pb e 0,05 µg/L para o Cd. Os limites estabelecidos pelas legislações vigentes para o mel são: 10,0 mg/kg (Cu) [6], 0,10 mg/kg (Cd) [9] e 0,30 mg/kg (Pb) [9]. Considerando uma diluição de 2,00 g de mel para 100,0 mL de solução, que corresponde a 200 µg/L de Cu, 2 µg/L de Cd e 6 µg/L de Pb, é possível atender à legislação utilizando o TS-FF-FS-AAS. Portanto, a concentração de 2 % (m/v) de amostra de mel em solução será utilizada nos planejamentos fatoriais e CCD seguintes.

Tabela 35. Resultados obtidos (em absorvância) e DPR para as curvas de calibração contendo Cd, Cu e Pb, após as leituras feitas por TS-FF-FS-AAS utilizando integração de área por 3 s.

| Cd | | | Cu | | | Pb | | |
|------------------------|--------|------------|------------------------|--------|------------|------------------------|--------|------------|
| Concentração (µg/L) | Abs | DPR (%) | Concentração (µg/L) | Abs | DPR (%) | Concentração (µg/L) | Abs | DPR (%) |
| 0,05 | 0,0016 | 33,9 | 0,5 | 0,0018 | 42,3 | 0,5 | 0,0038 | 90,7 |
| 0,10 | 0,0030 | 19,2 | 1,0 | 0,0027 | 36,8 | 1,0 | 0,0055 | 71,4 |
| 0,25 | 0,0057 | 5,4 | 2,5 | 0,0054 | 32,1 | 2,5 | 0,0067 | 23,6 |
| 0,50 | 0,0116 | 3,1 | 5,0 | 0,0076 | 12,9 | 5,0 | 0,0146 | 18,6 |
| 1,00 | 0,0205 | 2,0 | 10,0 | 0,0118 | 11,0 | 10,0 | 0,0235 | 6,3 |
| 2,50 | 0,0507 | 1,0 | 25,0 | 0,0180 | 3,4 | 25,0 | 0,0374 | 5,6 |
| 5,00 | 0,0960 | 1,4 | 50,0 | 0,0315 | 5,1 | 50,0 | 0,0614 | 6,1 |
| 10,00 | 0,1880 | 0,8 | 100,0 | 0,0564 | 2,4 | 100,0 | 0,1236 | 5,4 |

O cálculo do DPR das diferentes concentrações da curva de calibração para estimativa do LD foi uma estimativa otimista, mas na prática os LDs obtidos podem ser maiores, pois fatores como temperatura, tempo de extração e reagentes utilizados podem interferir alterando consideravelmente essa estimativa. Portanto, em relação ao modo de aquisição de sinal, nas próximas etapas será mantida a integração de área de pico durante 3 s para Cd e Cu e aumentado para 6 s para o Pb, numa tentativa de obter um LD inferior ao limite máximo permitido para esse metal em mel.

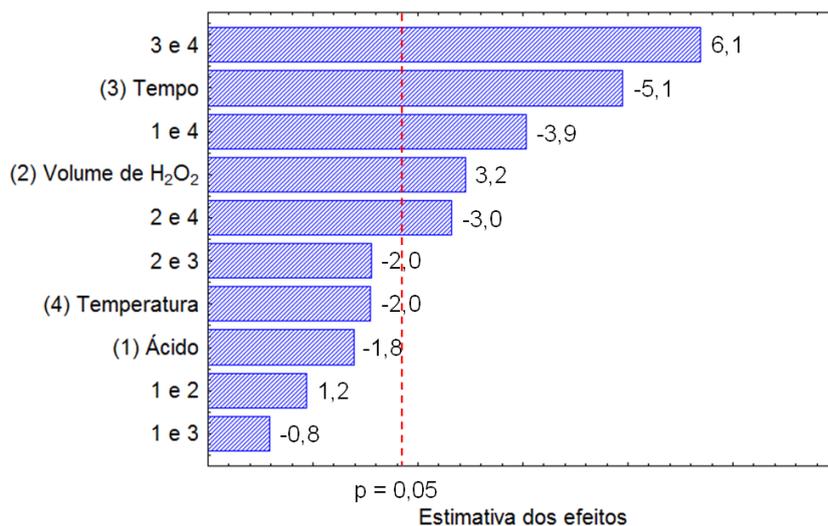
5.5.5 Planejamento fatorial

Uma vez que o uso de suspensões se mostrou viável para As e Hg utilizando HGAAS e CVAAS, foram realizados testes iniciais utilizando essa metodologia e TS-FF-FS-AAS. Entretanto, o uso de suspensões não foi adequado devido à formação de grande quantidade de resíduo de carbono dentro do capilar de cerâmica, seguido de entupimento do mesmo. Assim, uma etapa de decomposição para redução do carbono orgânico presente na amostra foi necessária. Optou-se pela decomposição via úmida em bloco digestor, devido ao menor custo e maior disponibilidade deste equipamento em laboratórios de controle de qualidade de alimentos. No entanto, por tratar-se de um sistema aberto, é necessário conhecer o efeito de alguns fatores, tais como o tempo e a

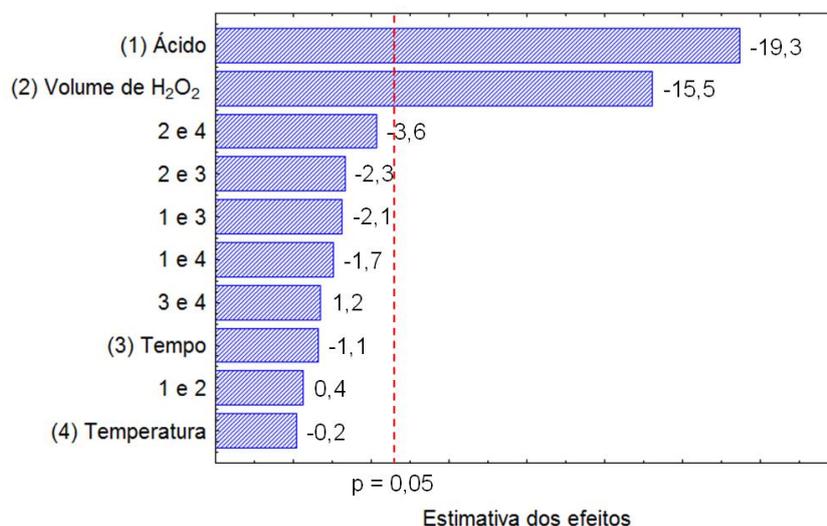
temperatura de aquecimento, pelos quais deve passar a solução contendo a amostra, evitando a perda dos elementos por volatilização. Outro fator relevante é a escolha do ácido ou mistura de ácidos que podem ser utilizados. Portanto, nesse trabalho foram utilizados um planejamento fatorial 2^4 e um planejamento CCD (item 5.5.6) para estudar os efeitos dos fatores: tempo e temperatura de decomposição e o uso dos reagentes ácido nítrico, ácido clorídrico e peróxido de hidrogênio para otimização do método analítico de determinação Cd, Cu e Pb em mel, utilizando TS-FF-FS-AAS.

No planejamento fatorial 2^4 foram estudados os efeitos dos fatores: F(1) ácidos (HNO_3 e HCl), F(2) volume de H_2O_2 , F(3) tempo e F(4) temperatura de decomposição, conforme o item 4.10.5. Os níveis estudados em cada fator foram listados na Tabela 10. Os resultados obtidos em termos de porcentagem de recuperação para soluções contendo amostra de mel contaminada com 10,0 mg/kg de Cu, 0,10 mg/kg de Cd e 0,30 mg/kg de Pb são mostrados na Tabela 36.

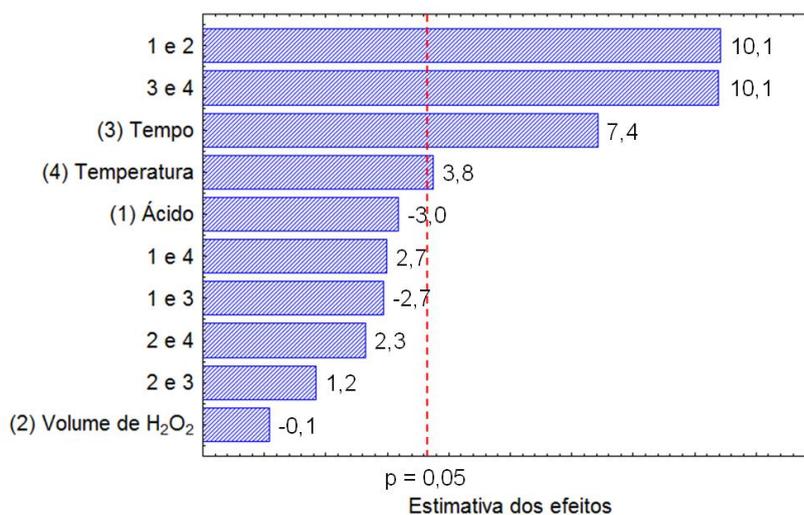
Após o cálculo das porcentagens de recuperação média, foram calculados os efeitos relacionados a cada fator e as interações entre os fatores para construção dos gráficos de Pareto para Cd, Cu e Pb (Figura 21). De acordo com a Figura 21, avaliando-se o fator ácido isoladamente, ao nível de 95 % de confiança, a utilização de HCl além de HNO_3 não contribuiu para um aumento na %R para Cu, e não apresentou efeitos significativos para Cd e Pb. No entanto, o uso de H_2O_2 aumentou a %R para o Cd nas amostras estudadas. Já o aumento na temperatura e no tempo de aquecimento favoreceu a %R para o Pb, mas o aumento no tempo de aquecimento desfavoreceu a %R para o Cd em mel. Em relação às interações entre os fatores (significativas ao nível de 95% de confiança) destacam-se a interação positiva entre o uso do H_2O_2 com o HNO_3 para o Pb e a interação positiva entre o tempo e a temperatura de aquecimento para Cd e Pb em mel. Portanto, optou-se por variar as proporções de H_2O_2 e HNO_3 e também o tempo e a temperatura de aquecimento na elaboração do CCD, conforme o item 4.10.6.



(a) Cd



(b) Cu



(c) Pb

Figura 21. Gráfico de Pareto obtido no planejamento fatorial completo 2^4 para determinação de: (a) Cd, (b) Cu e (c) Pb em mel por TS-FF-FS-AAS.

Tabela 36. Porcentagem de recuperação (%R) e desvios padrão (s) obtidos nos experimentos do planejamento fatorial 2⁴ para amostras de mel com Cd, Cu e Pb.

| Ensaio | Fatores codificados | | | | Cd | Cu | Pb |
|---------|---------------------|------|------|------|-------------|-------------|-------------|
| | F(1) | F(2) | F(3) | F(4) | %R ± s | %R ± s | %R ± s |
| 1 e 2 | -1 | -1 | -1 | -1 | 99,7 ± 5,1 | 129,2 ± 0,2 | 104,9 ± 2,9 |
| 3 e 4 | 1 | -1 | -1 | -1 | 91,1 ± 2,3 | 114,5 ± 0,7 | 89,2 ± 4,6 |
| 5 e 6 | -1 | 1 | -1 | -1 | 95,9 ± 3,0 | 116,2 ± 1,9 | 84,1 ± 5,1 |
| 7 e 8 | 1 | 1 | -1 | -1 | 109,7 ± 5,0 | 103,6 ± 5,2 | 95,8 ± 0,6 |
| 9 e 10 | -1 | -1 | 1 | -1 | 83,5 ± 2,3 | 129,6 ± 0,9 | 100,2 ± 3,4 |
| 11 e 12 | 1 | -1 | 1 | -1 | 87,1 ± 1,7 | 109,5 ± 8,0 | 79,1 ± 3,5 |
| 13 e 14 | -1 | 1 | 1 | -1 | 90,5 ± 0,6 | 119,1 ± 4,5 | 90,8 ± 0,3 |
| 15 e 16 | 1 | 1 | 1 | -1 | 90,2 ± 1,5 | 96,3 ± 0,8 | 93,1 ± 4,5 |
| 17 e 18 | -1 | -1 | -1 | 1 | 90,6 ± 3,2 | 131,1 ± 0,3 | 85,1 ± 8,5 |
| 19 e 20 | 1 | -1 | -1 | 1 | 88,4 ± 0,8 | 112,4 ± 0,8 | 84,6 ± 5,8 |
| 21 e 22 | -1 | 1 | -1 | 1 | 96,1 ± 2,2 | 118,6 ± 1,4 | 87,8 ± 7,4 |
| 23 e 24 | 1 | 1 | -1 | 1 | 88,9 ± 2,3 | 95,9 ± 0,1 | 91,0 ± 5,2 |
| 25 e 26 | -1 | -1 | 1 | 1 | 95,8 ± 1,6 | 139,1 ± 5,3 | 112,4 ± 7,3 |
| 27 e 28 | 1 | -1 | 1 | 1 | 90,8 ± 4,5 | 113,9 ± 0,1 | 97,2 ± 5,6 |
| 29 e 30 | -1 | 1 | 1 | 1 | 95,0 ± 1,1 | 111,5 ± 3,2 | 98,8 ± 1,7 |
| 31 e 32 | 1 | 1 | 1 | 1 | 86,2 ± 0,1 | 94,1 ± 0,7 | 110,3 ± 2,1 |

5.5.6 Planejamento composto central

O planejamento CCD foi realizado após a triagem dos fatores que afetam a determinação de Cd, Cu e Pb em mel por TS-FF-FS-AAS. Entre os fatores estudados no planejamento fatorial (item 5.5.5) somente o uso de ácido clorídrico não apresentou efeito significativo positivo, assim, os fatores: proporção de HNO₃ e H₂O₂, temperatura e tempo de aquecimento foram estudados neste CCD, conforme o item 4.10.6. Os níveis estudados em cada fator foram listados na Tabela 11. A Tabela 37 mostra os resultados de recuperação (%) em cada ensaio do planejamento CCD para amostras de mel, contaminadas com Cd, Cu e Pb.

Tabela 37. Porcentagens de recuperação (%R) e desvios padrão (s) obtidos nos ensaios do planejamento CCD para amostras de mel contaminadas com Cd, Cu e Pb.

| Ensaio | %R ± s | | |
|--------|------------|-------------|-------------|
| | Cd | Cu | Pb |
| 1 | 116,2 | 104,4 | 104,1 |
| 2 | 100,0 | 97,4 | 94,0 |
| 3 | 103,8 | 108,7 | 115,8 |
| 4 | 94,5 | 102,1 | 100,7 |
| 5 | 111,5 | 110,3 | 119,3 |
| 6 | 95,5 | 93,2 | 111,9 |
| 7 | 111,2 | 109,5 | 117,7 |
| 8 | 95,4 | 97,5 | 109,2 |
| 9 | 117,7 | 106,6 | 118,3 |
| 10 | 98,8 | 103,6 | 93,8 |
| 11 | 109,5 | 104,8 | 109,1 |
| 12 | 109,3 | 113,5 | 122,7 |
| 13 | 107,4 | 109,6 | 90,3 |
| 14 | 100,3 | 115,3 | 113,9 |
| 15 | 99,0 ± 5,5 | 115,1 ± 2,5 | 115,8 ± 5,9 |

Com os 19 resultados de porcentagem de recuperação foi possível calcular os efeitos relacionados a cada fator e as interações entre os fatores na determinação de Cd, Cu e Pb em mel (Tabela 38). Os efeitos, bem como a região ótima definida pelos fatores podem ser visualizados com o auxílio das superfícies de resposta, mostradas na Figura 22, e foram construídas fixando-se a temperatura no nível +1 (a e b) e o tempo no nível 0 (c). As melhores condições de temperatura, tempo e volume de H₂O₂ correspondem ao ponto máximo da superfície, que é o ponto onde a derivada da função da superfície é igual a zero. Estes pontos críticos são mostrados na Tabela 39.

O uso de H₂O₂ para o Cd no planejamento fatorial indicava um efeito positivo (Figura 24a), mas o CCD indicou um valor crítico (Tabela 39) de -0,4, que corresponde à adição de aproximadamente 0,8 mL deste reagente. Para o Pb, o efeito foi negativo (Tabela 38), indicando a adição de -0,6, que corresponde a 0,7 mL de H₂O₂ (Tabela 39). Para Cu, o efeito se manteve significativo e negativo (Figura 24b e Tabela 38), mas o valor crítico obtido foi positivo: +2,3, que corresponde à adição de 2,1 mL de H₂O₂. Como

os resultados do Cu foram inconclusivos, optou-se por manter o uso do H₂O₂, arredondando para um volume de 1,0 mL a ser adicionado.

O tempo foi significativo apenas para Cd, apresentando um valor crítico de 0,2, que corresponde a 33 minutos (Tabelas 38 e 39), apesar de ter sido significativo para Pb no planejamento fatorial, que indicou um tempo de 30 minutos.

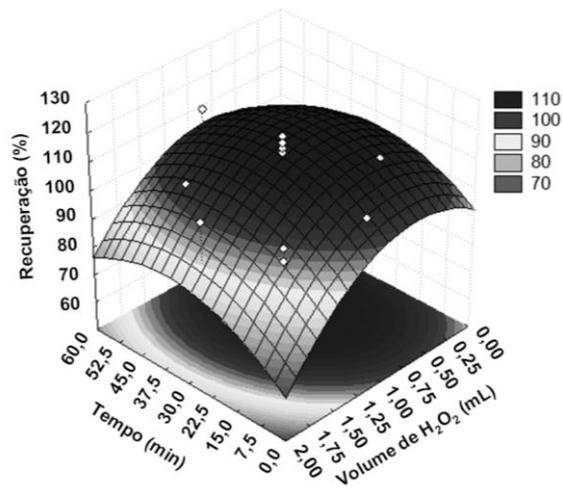
A temperatura foi significativa apenas para Pb, apresentando um valor crítico de 0,9, que corresponde a 128 °C, e manteve o efeito positivo observado no planejamento fatorial (item 5.5.5), que indicou o uso da maior temperatura (130 °C), ao invés da menor (80 °C).

Portanto, pode-se concluir que a utilização de 2,0 mL de HNO₃ e 1,0 mL de H₂O₂ numa temperatura de 128 ± 5 °C durante 30 minutos permite a determinação de Cd, Cu e Pb em amostras de mel por TS-FF-FS-AAS. Nestas condições o método foi considerado otimizado e a validação foi realizada conforme descrito no item 4.11.

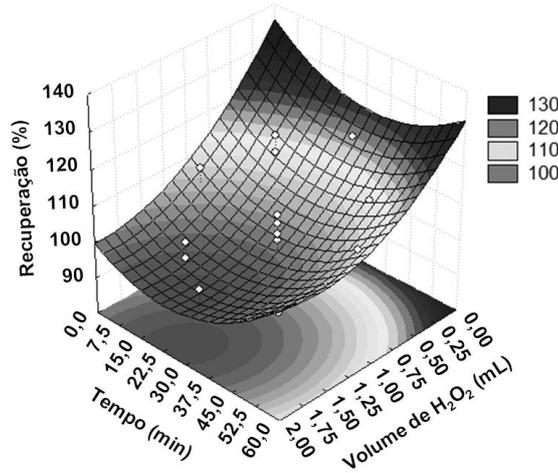
Tabela 38. Porcentagem de recuperação média (± estimativa do erro experimental) para os efeitos de cada fator e interações entre os fatores, provenientes dos experimentos do planejamento CCD para amostras de mel contaminadas com Cd, Cu e Pb.

| Fatores | Efeito ± erro | | |
|--|---------------|-----------|------------|
| | Cd | Cu | Pb |
| Porcentagem de recuperação | 115,4±1,2* | 99,2±2,8* | 115,8±3,0* |
| F(1) HNO ₃ + H ₂ O ₂ (mL) | -3,5±0,7* | -6,5±1,5* | -6,0±1,6* |
| F(2) Tempo (min) | 2,0±0,7 | -1,4±1,5 | 2,7±1,6 |
| F(3) Temperatura (°C) | 0,6±0,7 | -0,9±1,5 | 6,1±1,6* |
| F(1 e 1) | -4,8±0,7* | 2,4±1,6 | -3,1±1,7 |
| F(2 e 2) | -3,3±0,7* | 2,8±1,6 | 0,3±1,7 |
| F(3 e 3) | -2,2±0,7 | 0,8±1,6 | -4,5±1,7 |
| F(1 e 2) | 0,7±0,9 | 0,9±2,0 | -0,8±2,1 |
| F(1 e 3) | -1,9±0,9 | -0,8±2,0 | 1,2±2,1 |
| F(2 e 3) | -0,7±0,9 | 2,2±2,0 | -2,8±2,1 |

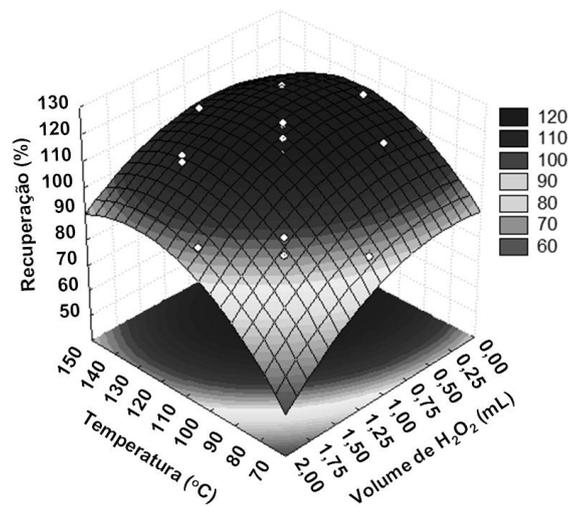
*Efeito estatisticamente significativo ao nível de significância α de 0,05, pelo teste t de *Student*.



(a) Cd



(b) Cu



(c) Pb

Figura 22. Superfícies de resposta obtidas na otimização utilizando CCD para determinação de (a) Cd, (b) Cu e (c) Pb em mel por TS-FF-FS-AAS. As figuras foram construídas fixando-se a temperatura no nível +1 (a e b) e o tempo no nível 0 (c).

Tabela 39. Valores críticos obtidos nos experimentos do planejamento CCD para amostras de mel contaminadas com Cd, Cu e Pb.

| Fatores | Valores críticos | | |
|--|------------------|--------------|---------------|
| | Cd | Cu | Pb |
| F(1) HNO ₃ (2,0 mL) + H ₂ O ₂ | -0,4 (0,8 mL) | 2,3 (2,1 mL) | -0,6 (0,7 mL) |
| F(2) Tempo | 0,2 (33 min) | -1,7 (5 min) | -1,0 (15 min) |
| F(3) Temperatura | 0,3 (116 °C) | 3,9 (190 °C) | 0,9 (128 °C) |

5.5.7 Método otimizado

O seguinte método foi otimizado para a determinação de Cd, Cu e Pb em mel utilizando TS-FF-FS-AAS: pesar 1,00 g de amostra diretamente para tubos de vidro, adicionar 2,0 mL de HNO₃ e levar ao aquecimento em bloco digestor. Os tubos devem ser colocados no bloco digestor, que deve estar à temperatura ambiente. Ajustar a temperatura do bloco para 70 °C. Ao atingir essa temperatura manter os tubos em aquecimento por 5 minutos e com agitação manual. Em seguida, elevar a temperatura a 128 ± 5 °C e manter o aquecimento durante 15 minutos. Adicionar 1,0 mL de H₂O₂ e continuar a digestão da amostra por mais 15 minutos, mantendo-se a temperatura em 128 ± 5 °C. Ao final, os tubos devem ser esfriados até atingir a temperatura do ambiente e os digeridos transferidos para frascos de polipropileno de 50 mL de capacidade, utilizando-se água ultra pura para completar o volume. As análises devem ser feitas por TS-FF-FS-AAS utilizando-se tubo de níquel com 6 furos. A aquisição de sinal deve ser feita utilizando a integração de área de pico durante 3 s para Cd e Cu e 6 s para o Pb e fluxo das soluções de 0,6 mL/min. Esta metodologia foi validada conforme o procedimento descrito no item 5.5.8 e foi aplicada na determinação de Cd, Cu e Pb em amostras de mel conforme o item 5.5.9.

5.5.8 Validação do método analítico

A seletividade e a linearidade do método de determinação de Cd, Cu e Pb em mel utilizando TS-FF-FS-AAS foi avaliada através do preparo de três curvas de calibração, contendo Cd, Cu e Pb em concentrações de 0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 µg/L; 0,0; 80,0; 110,0; 140,0; 170,0; 200,0 e 230,0 µg/L e 0,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0, 25,0 e 30,0 µg/L, respectivamente, sendo duas curvas contendo também 2,0 % (m/v) de mel, provenientes de duas regiões distintas do estado de Minas Gerais, sendo a amostra 1 de coloração amarelo claro e a amostra 2 de cor amarelo escuro. As três curvas foram

preparadas em triplicatas independentes. As soluções foram preparadas nas condições descritas nos itens 4.11 e 5.5.7. Após as medidas, o tratamento estatístico dos dados foi feito utilizando o mesmo procedimento descrito no item 5.2.6. Foram confirmados os requisitos de normalidade, homoscedasticidade, independência dos resíduos e a significância da regressão e desvio da linearidade nas curvas de calibração preparadas com ou sem adição de amostra. Os resultados obtidos foram resumidos nas Tabelas 40, 41 e 42 para Cd, Cu e Pb, respectivamente.

Tabela 40. Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise de variância da regressão e desvio da linearidade, para as três curvas de calibração do método de determinação Cd sem e com adição de mel (1) e (2).

| Estatística | Curva sem matriz | Curva matriz 1 | Curva matriz 2 |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| α | 0,0008 ± 0,0007 | 0,0021 ± 0,0020 | 0,0023 ± 0,0018 |
| β | 0,0181 ± 0,0002 | 0,0183 ± 0,0007 | 0,0182 ± 0,0006 |
| Número de observações | | | |
| n | 15 | 18 | 18 |
| Normalidade | | | |
| R | 0,9884 | 0,9692 | 0,9895 |
| R _{crítico} | 0,9506 | 0,9567 | 0,9567 |
| p | p > 0,10 | p > 0,10 | p > 0,10 |
| Independência | | | |
| d | 2,334 | 1,339 | 2,301 |
| <i>Não há autocorrelação</i> | 1,360 < d < 2,640 | 1,260 < d < 2,740 | 1,390 < d < 2,610 |
| p | p > 0,10 | p > 0,05 | p > 0,10 |
| Homoscedasticidade | | | |
| t _L | 1,358 | 0,638 | 0,109 |
| p | 0,197 | 0,532 | 0,914 |
| Regressão | | | |
| F | 2,858 x 10 ⁴ | 3,534 x 10 ³ | 4,375 x 10 ³ |
| p | 4,09 x 10 ⁻²³ | 3,35 x 10 ⁻²⁰ | 6,11 x 10 ⁻²¹ |
| Desvio da linearidade | | | |
| F | 0,671 | 2,378 | 1,654 |
| p | 6,28 x 10 ⁻¹ | 1,10 x 10 ⁻¹ | 2,25 x 10 ⁻¹ |

A distribuição normal dos resíduos da regressão foi confirmada pelo cálculo do R de Ryan-Joiner, indicando desvios da normalidade não significativos ($p > 0,10$). A independência dos resíduos da regressão foi observada pelas estatísticas d de Durbin-Watson, não foi observada autocorrelação significativa para $p > 0,10$, com exceção do Cd ($p > 0,05$, Tabela 40). A homoscedasticidade foi observada com estatísticas t_L não significativas para $p > 0,05$. A alta significância da regressão ($p < 0,001$), com desvio da linearidade não significativo ($p > 0,05$) pode ser observada nas Tabelas 40, 41 e 42, indicando a adequação do uso do MMQO para a faixa de trabalho proposta.

Tabela 41. Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise de variância da regressão e desvio da linearidade, para as três curvas de calibração do método de determinação Cu sem e com adição de mel (1) e (2).

| Estatística | Curva sem matriz | Curva matriz 1 | Curva matriz 2 |
|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| α | -0,013 \pm 0,003 | 0,006 \pm 0,003 | 0,001 \pm 0,003 |
| β | 0,00029 \pm 0,00002 | 0,00034 \pm 0,00002 | 0,00037 \pm 0,00002 |
| Número de observações | | | |
| n | 16 | 14 | 17 |
| Normalidade | | | |
| R | 0,9713 | 0,9708 | 0,9670 |
| R _{crítico} | 0,9529 | 0,9481 | 0,9549 |
| p | $p > 0,10$ | $p > 0,10$ | $p > 0,10$ |
| Independência | | | |
| d | 2,288 | 2,198 | 1,941 |
| <i>Não há autocorrelação</i> | 1,370 < d < 2,630 | 1,350 < d < 2,650 | 1,380 < d < 2,620 |
| p | $p > 0,10$ | $p > 0,10$ | $p > 0,10$ |
| Homoscedasticidade | | | |
| t_L | 0,803 | 0,702 | 0,534 |
| p | 0,435 | 0,496 | 0,601 |
| Regressão | | | |
| F | 1,324 $\times 10^3$ | 2,298 $\times 10^3$ | 1,622 $\times 10^3$ |
| p | 3,03 $\times 10^{-15}$ | 4,43 $\times 10^{-15}$ | 1,05 $\times 10^{-16}$ |
| Desvio da linearidade | | | |
| F | 2,392 | 0,511 | 0,797 |
| p | 1,20 $\times 10^{-1}$ | 7,30 $\times 10^{-1}$ | 5,51 $\times 10^{-1}$ |

Tabela 42. Dados estatísticos obtidos na avaliação dos requisitos de normalidade, independência, homoscedasticidade, análise de variância da regressão e desvio da linearidade, para as três curvas de calibração do método de determinação Pb sem e com adição de mel (1) e (2).

| Estatística | Curva sem matriz | Curva matriz 1 | Curva matriz 2 |
|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| α | -0,009 ± 0,001 | -0,006 ± 0,002 | -0,004 ± 0,002 |
| β | 0,0019 ± 0,0001 | 0,0018 ± 0,0001 | 0,0021 ± 0,0001 |
| Número de observações | | | |
| n | 14 | 14 | 14 |
| Normalidade | | | |
| R | 0,9880 | 0,9713 | 0,9747 |
| R _{crítico} | 0,9481 | 0,9481 | 0,9481 |
| p | p > 0,10 | p > 0,10 | p > 0,10 |
| Independência | | | |
| d | 1,858 | 2,408 | 1,528 |
| <i>Não há autocorrelação</i> | 1,350 < d < 2,650 | 1,350 < d < 2,650 | 1,350 < d < 2,650 |
| p | p > 0,10 | p > 0,10 | p > 0,10 |
| Homoscedasticidade | | | |
| t _L | 0,978 | 1,011 | 0,312 |
| p | 0,347 | 0,332 | 0,760 |
| Regressão | | | |
| F | 4,187 x 10 ³ | 1,955 x 10 ³ | 2,945 x 10 ³ |
| p | 1,23 x 10 ⁻¹⁶ | 1,16 x 10 ⁻¹⁴ | 1,01 x 10 ⁻¹⁵ |
| Desvio da linearidade | | | |
| F | 1,222 | 0,811 | 1,002 |
| p | 3,74 x 10 ⁻¹ | 5,16 x 10 ⁻¹ | 4,60 x 10 ⁻¹ |

As curvas analíticas preparadas sem adição de amostra e os gráficos dos resíduos obtidos após a exclusão dos pontos extremos são apresentados na Figura 23. A linearidade foi confirmada para o Cd, Cu e Pb, nas faixas de 0,5 a 5,0 µg/L, 80,0 a 230,0 µg/L e 5,0 a 30,0 µg/L, respectivamente, que correspondem a 0,025 e 0,250 mg/kg (Cd), 4,00 e 11,50 mg/kg (Cu) e 0,25 e 1,50 mg/kg (Pb). Portanto, as faixas lineares obtidas são adequadas para determinar os limites de 0,10 mg/kg (Cd), 10,0 mg/kg (Cu) e 0,30 mg/kg (Pb), estabelecidos pela legislação [6, 9].

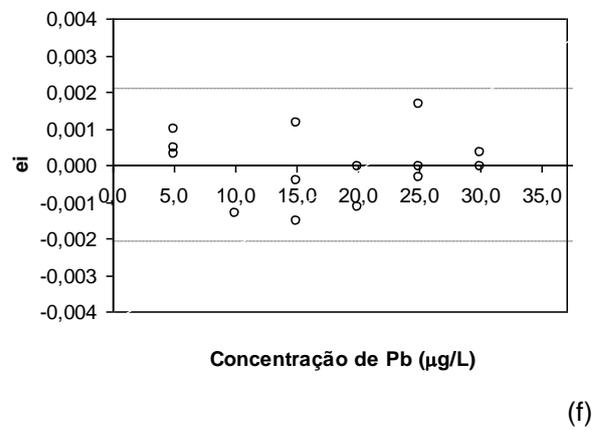
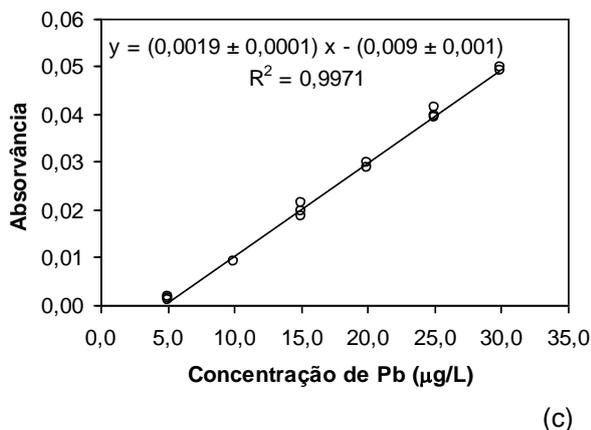
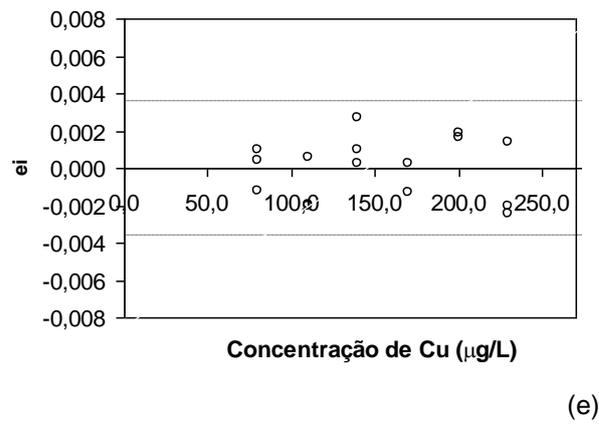
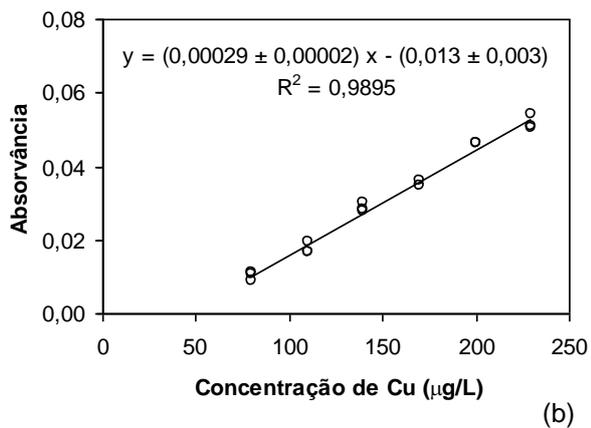
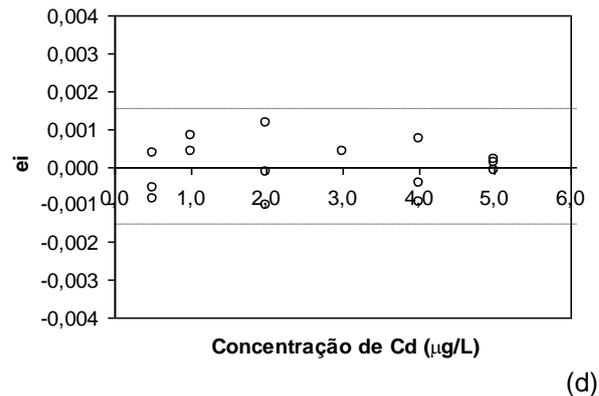
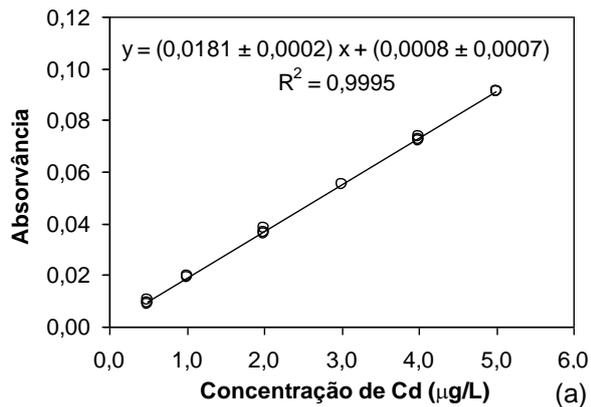


Figura 23. Curvas de calibração de: (a) Cd, (b) Cu e (c) Pb sem a matriz. Gráficos dos resíduos da calibração obtidos para o método de determinação (d) Cd, (e) Cu e (f) Pb sem a matriz utilizando TS-FF-FS-AAS.

A seletividade, em termos de efeito de matriz, foi avaliada através da comparação entre os parâmetros de regressão β e α , da equação: $Y_i = \beta X_i + \alpha$, apresentados nas Tabelas 40, 41 e 42. Não foi observado efeito de matriz pelo teste t, ao nível de confiança de 95 %, entre a curva de calibração aquosa e as curvas adicionadas de

matriz para o Cd e Pb. Entretanto, para o Cu, foi observado efeito de matriz entre as curvas de calibração aquosa e as curvas adicionadas de matriz, mas não houve diferença ao comparar as duas curvas adicionadas de matriz. Dessa forma, a curva de calibração deve ser preparada com adição de matriz branca, ou seja, amostra sem os analitos Cd, Pb e Cu.

A veracidade e a precisão foram avaliadas através de ensaios de adição e recuperação, utilizando-se de matriz branca fortificada, pois não existem materiais certificados de mel disponíveis. A precisão foi estudada em níveis de repetibilidade e de precisão intermediária, que consistiu na repetição dos ensaios em diferentes dias.

A veracidade e a precisão do método de determinação de Cd, Cu e Pb em mel foram determinadas realizando-se o preparo de soluções contendo 2,0 % (m/v) de mel e adição de Cd, Cu e Pb nas concentrações mostradas na Tabela 43 e submetidas aos procedimento de preparo descrito no item 4.11, num total de seis repetições. Em outro dia foram preparadas seis soluções contendo 2,0 % (m/v) de mel, contaminadas com 0,100 mg/kg de Cd, 10,0 mg/kg de Cu e 0,50 mg/kg de Pb para avaliação da precisão intermediária. Os resultados obtidos para veracidade e precisão estão apresentados na Tabela 43.

Tabela 43. Porcentagem de recuperação (%) e DPR (%) de repetibilidade ou precisão intermediária em diferentes níveis de concentração de Cd, Cu e Pb.

| Cd | | Cu | | Pb | |
|-------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| Concentração (mg/kg) | %R ± DPR (%) | Concentração (mg/kg) | %R ± DPR (%) | Concentração mg/kg | %R ± DPR (%) |
| 0,010 | 63,2 ± 36,1 | 1,0 | 129,4 ± 10,7 | 0,10 | 154,1 ± 29,0 |
| 0,025 | 108,4 ± 19,7 | 4,0 | 97,8 ± 9,4 | 0,25 | 96,8 ± 10,0 |
| 0,050 | 91,4 ± 6,8 | 5,5 | 102,0 ± 7,1 | 0,50 | 92,5 ± 11,6 |
| 0,100 | 98,9 ± 4,1 | 7,0 | 98,7 ± 5,9 | 0,50* | 91,6 ± 8,1 |
| 0,100* | 98,8 ± 6,0 | 8,5 | 101,1 ± 3,6 | 0,75 | 98,7 ± 8,4 |
| 0,150 | 102,8 ± 3,8 | 10,0 | 97,3 ± 3,1 | 1,00 | 102,1 ± 2,0 |
| 0,200 | 101,0 ± 1,6 | 10,0* | 99,0 ± 3,2 | 1,25 | 96,6 ± 8,0 |
| 0,250 | 99,0 ± 2,0 | 11,5 | 97,2 ± 1,9 | 1,50 | 98,7 ± 5,5 |

*Obtido nas condições de precisão intermediária.

A avaliação da veracidade, em termos de porcentagem de recuperação, variou de 91,4 % a 108,4 % na faixa de 0,025 a 0,250 mg/kg (Cd), 4,00 a 11,50 mg/kg (Cu) e 0,25 e 1,50 mg/kg (Pb), estando de acordo com os critérios de aceitação definidos pelo MAPA [72] e pela EC [92], que estabelecem para concentrações acima de 0,01 mg/kg, recuperações entre 80 % e 110 %.

A precisão sob condições de repetibilidade e precisão intermediária variaram de 1,6 % a 19,7 %, na faixa de 0,025 a 0,250 mg/kg (Cd), 4,00 a 11,50 mg/kg (Cu) e 0,25 e 1,50 mg/kg (Pb), estando de acordo com os critérios de aceitação definidos pelo MAPA [72] conforme a faixa de concentração: de 0,01 a 0,10 mg/kg até 20%, de 0,10 mg/kg até 1,0 mg/kg até 15 % e acima de 1,0 mg/kg até 10 %.

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos comparando a veracidade e precisão obtidos em ensaios de adição e recuperação em diferentes níveis de concentração de Cd, Cu e Pb, conforme a Tabela 43. Nas concentrações de 0,025 mg/kg (Cd), 4,0 mg/kg (Cu) e 0,25 mg/kg (Pb), as porcentagens de recuperação e os DPR obtidos estão de acordo com os critérios de aceitação definidos pelo MAPA [72] e foram estabelecidos como limite de quantificação do método. As concentrações de 0,010 mg/kg (Cd), 1,0 mg/kg (Cu) e 0,10 mg/kg (Pb) não atenderam a faixa de 80 % a 110 % de recuperação definida pelo MAPA [72] e foram estabelecidos como limite de detecção do método. Em solução, essas concentrações correspondem a 0,2 µg/L (Cd), 30,0 µg/L (Cu) e 2,0 µg/L (Pb). Em estudos recentes, utilizando TS-FF-FS-AAS para determinação de Cd, Cu e Pb em material de referência certificado de cabelo em pó, foram obtidos LDs de 0,3 µg/L (Cd), 7,5 µg/L (Cu) e 4,4 µg/L (Pb) [63]. Os autores estimaram os LDs como três vezes o valor do desvio padrão obtido das medidas de 10 brancos, dividido pela inclinação da curva analítica. Essa diferença encontrada nos LDs, e de forma mais pronunciada no caso do Cu, pode ser explicada pelos diferentes métodos empregados para estimativa desse parâmetro de desempenho.

Portanto, a linearidade, veracidade, precisão, limites de detecção e de quantificação, confirmaram a adequação ao propósito de uso do TS-FF-FS-AAS para determinação de Cd, Cu e Pb em mel em atendimento aos limites máximos adotados pelo BRASIL [6] e MERCOSUL [9].

Destaca-se ainda, que houve um ganho de sensibilidade com o uso do TS-FF-FS-AAS em comparação ao FS-FAAS de 67,2; 3,4 e 72,8 vezes para o Cd, Cu e Pb, respectivamente, comprovando que o confinamento da nuvem atômica dentro do tubo de

níquel aquecido proporciona maior sensibilidade do que utilizando-se somente a chama no modo FS-FAAS (Tabela 44),

Tabela 44. Comparação entre o desempenho do TS-FF-FS-AAS e FS-FAAS para determinação de Cd, Cu e Pb.

| | | Cd | Cu | Pb |
|------------------------|-----------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| Faixa linear (µg/L) | TS-FF-AAS | 0,5 a 5,0 | 80,0 a 230,0 | 5,0 a 30,0 |
| | FS-FAAS | 150 a 900 | 350 a 2100 | 550 a 3300 |
| Curva de calibração | TS-FF-AAS | $y = 0,0183x + 0,002$ | $y = 0,00034x + 0,006$ | $y = 0,0018x - 0,006$ |
| | FS-FAAS | $y = 0,0003 + 0,005$ | $y = 0,00010x + 0,004$ | $y = 0,00003x + 0,002$ |
| Ganho analítico | | 67,2 | 3,4 | 72,8 |

5.5.9 Determinação de Cd, Cu e Pb nas amostras de mel

Após a validação, a metodologia desenvolvida para determinar Cd, Cu e Pb em mel utilizando TS-FF-FS-AAS, descrita no item 5.5.7, foi aplicada na análise das 35 amostras produzidas no estado de Minas Gerais (Tabela 02). O Cu foi detectado em uma amostra, sendo obtido 1,1 mg/kg, o Pb foi determinado em duas amostras, sendo obtido 0,14 mg/kg e 0,17 mg/kg (Tabela 45). Estes valores não diferiram do valor esperado (Tabela 45), obtido por ICP-MS (conforme os itens 4.6 e 4.11.3), utilizando o teste t, ao nível de 95 % de confiança. Em relação ao Cd, todas as amostras apresentaram concentração menor que 0,010 mg/kg. Esses valores são inferiores ao limite estabelecido pelo Brasil, de até 10 mg/kg (Cu) [6], e MERCOSUL [9], de: 0,10 mg/kg (Cd) e 0,30 mg/kg (Pb) para mel e possivelmente não oferecem riscos à saúde dos consumidores em relação a esses contaminantes.

Tabela 45. Comparação entre os resultados obtidos na determinação de Cu e Pb em mel por TS-FF-FS-AAS e ICP-MS.

| Município de origem | Cu (mg/kg) | | Pb (mg/kg) | |
|------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| | TS-FF-FS-AAS | ICP-MS | TS-FF-FS-AAS | ICP-MS |
| João Monlevade | 1,08 ± 0,30 | 1,18 ± 0,05 | - | - |
| Mariana | - | - | 0,14 ± 0,04 | 0,13 ± 0,01 |
| Brumadinho | - | - | 0,17 ± 0,03 | 0,16 ± 0,01 |

As três amostras que apresentaram Cu ou Pb acima do LD do método foram coletadas nos municípios de Mariana, João Monlevade e Brumadinho e apresentam uma coloração intensamente escura. Na amostra de mel coletada no município de João Monlevade foi possível detectar Cu e nas amostras coletadas em Mariana e Brumadinho o Pb (Tabela 45). Os três municípios localizam-se na região central do estado de Minas Gerais, conhecida como quadrilátero ferrífero, onde se concentram atividades de exploração de ferro e siderurgia.

Esta contaminação pode ter sido causada por fontes externas ao apiário, mas procedimentos incorretos empregados durante o processamento do mel e durante a sua conservação não devem ser descartados. Adicionalmente, devido à natureza ácida do mel, a liberação de elementos, por exemplo, Cu e Pb de ferramentas metálicas ou recipientes pode ocorrer [33]. E ainda, a presença de metais em mel produzido em regiões próximas a centros industriais pode ser causada por fontes externas, tais como, a poluição industrial de fundição, as emissões das fábricas e metalurgia de metais, que contaminam o solo. Entretanto, as produções na zona rural também podem estar sujeitas à contaminação que pode ocorrer devido ao uso de agroquímicos, como adubos que podem conter As, Cd, Cu, Hg e Pb, e tratamento farmacológico com antiparasitas ou acaricidas [29].

6 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, foram desenvolvidos novos métodos para determinação de contaminantes inorgânicos em mel: As por HGAAS, Hg por CVAAS e DMA, e Cd, Cu e Pb por TS-FF-FS-AAS.

Para a determinação direta de Hg em mel empregando CVAAS, as condições otimizadas permitem determinar Hg em mel em concentrações acima de 30,0 µg/kg. Um segundo método foi otimizado e validado usando DMA para uma massa de amostra de até 100 mg. Os dois métodos foram utilizados para quantificar Hg em amostras de mel de diferentes municípios do estado de Minas Gerais e todas apresentaram concentração de Hg abaixo dos limites de detecção de 30 µg/kg para CVAAS e 1,0 µg/kg para o DMA. Pode-se concluir que esses valores não representam riscos à saúde dos brasileiros (Hg < 500 µg/kg [6]) ou à população mundial, embora a comissão do Codex Alimentarius [7] não estabeleça um limite máximo de Hg em mel para exportação.

Pode-se concluir que os métodos propostos para determinação de Hg em mel foram rápidos e simples e não necessitaram de decomposição das amostras utilizando ácidos concentrados e aquecimento, o que é vantajoso, considerando a elevada volatilidade do metal. No procedimento de determinação de Hg utilizando o DMA foi possível obter um LD bastante inferior ao procedimento de CVAAS, porque o DMA não requer etapas de diluição da amostra e ainda conta com uma etapa de pré-concentração em um amalgamador de ouro. No entanto, este método utiliza um equipamento dedicado à análise de Hg, enquanto o equipamento utilizado para geração de vapor frio pode ser usado também na geração de hidretos para outros elementos. Além disso, a CVAAS permite o uso de massas maiores de amostra, ao contrário do DMA.

Um novo método para determinação direta de As em mel empregando HGAAS também foi desenvolvido. Durante a validação não foi possível estabelecer uma faixa linear e mesmo utilizando o ajuste quadrático foi possível obter parâmetros de desempenho satisfatórios. Todas as amostras estudadas apresentaram concentração de As abaixo do LD do método (20 µg/kg) e também inferiores aos limites estabelecidos pelo MERCOSUL (300 µg/kg) [9].

Os novos métodos desenvolvidos para determinação de As e Hg em mel foram inovadores, pois os métodos tradicionalmente empregados nos centros de controle de

qualidade de alimentos utilizam a decomposição à quente da amostra para esse tipo de detecção. Dessa forma, novas metodologias que possam ser aplicadas nesses laboratórios de forma a evitar a digestão da amostra refletem em uma inovação relevante em termos de controle de qualidade. Os métodos otimizados são rápidos, de baixo custo e sem problemas de contaminação e perdas dos elementos As e Hg por volatilização.

Para determinar os elementos Cd, Cu e Pb em mel não foi possível utilizar a análise direta e por isso, foi desenvolvido um método que realiza a decomposição da amostra com pequenos volumes de HNO₃ (2,0 mL) e H₂O₂ (1,0 mL), antes da análise por TS-FF-FS-AAS. Os limites de detecção obtidos 0,010 mg/kg (Cd), 1,0 mg/kg (Cu) e 0,10 mg/kg (Pb) confirmaram a adequação ao propósito de uso do TS-FF-FS-AAS para determinação de Cd, Cu e Pb em mel em atendimento aos limites máximos estabelecidos pelo Brasil [6] e MERCOSUL [9]. Nas 35 amostras de mel analisadas, foi possível detectar Cu em uma amostra, sendo obtido 1,1 mg/kg e Pb em duas amostras: 0,14 mg/kg e 0,17 mg/kg. Em relação ao Cd, todas as amostras apresentaram concentração menor que 0,010 mg/kg. Cabe destacar que houve um ganho de sensibilidade com o uso do TS-FF-FS-AAS de 67,2; 3,4 e 72,8 vezes para o Cd, Cu e Pb, respectivamente, em relação ao FS-FAAS. A combinação do TS-FF-AAS com o FS-FAAS contribuiu para que houvesse um ganho de tempo de três vezes em relação aos equipamentos que utilizam o TS-FF-AAS de forma monoelementar, reduzindo os custos dessa análise.

Embora o número de amostras analisadas pelos métodos propostos não tenha sido tão grande, os resultados comprovaram a importância do monitoramento previsto em legislação, uma vez que foi possível quantificar Cu e Pb em algumas amostras.

O projeto proposto traz, portanto, contribuições importantes na área da Química Analítica, sugerindo métodos mais simples e viáveis de serem implementados na rotina de laboratórios de controle de qualidade de alimentos. Nesse contexto, para trabalhos futuros sugere-se a realização de estudos colaborativos em diferentes laboratórios para confirmar a aplicabilidade dos novos métodos.

7 REFERÊNCIAS

[1] COUNTER, S. A.; BUCHANAN L. H. Mercury exposure in children: a review. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 198: 209-230, 2004.

[2] ROONEY, J. P. K. The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury. *Toxicology*, 234: 145-156, 2007.

[3] DANI, S. U. Arsenic for the fool: An exponential connection. *Science of the Total Environment*, 408: 1842-1846, 2010.

[4] MADEJCZYK, M.; BARALKIEWICZ, D. Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES. *Analytica Chimica Acta*, 617: 11-17, 2008.

[5] GOMES, S. P. M. Caracterização e avaliação biológica de méis comerciais. Dissertação de mestrado em qualidade e segurança alimentar. Escola Superior Agrária de Bragança, Portugal, 2009.

[6] BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 685, de 27 de agosto de 1998. Aprova o Regulamento Técnico: "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". Brasília, 1998.

[7] CODEX STAN 193-1995. Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/17/CXS_193e.pdf. Acessado em: 2 de agosto de 2012.

[8] BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova o Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos e Pescado para o exercício de 2010. Instrução Normativa nº 8, de 29 de abril de 2010. Diário Oficial da União. Brasília, 3 de maio de 2010.

[9] MERCOSUL. Mercado Comum do Sul. GMC/RES. nº 012/2011. Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de contaminantes inorgânicos em alimentos. LXXXIV GMC (Grupo Mercado Comum). Assunção, 17 de junho de 2011. Disponível em: <http://www.mercosur.int/show?contentid=3187>. Acessado em: 2 de agosto de 2012.

[10] DĚDINA, J.; TSALEV, D. L. Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. Wiley, New York, vol. 130, 1995.

[11] IBRAM. Instituto Brasileiro de Mineração. Disponível em: <http://www.ibram.org.br>. Acessado em: 14 de setembro de 2012.

[12] DESCHAMPS, E.; WILLER, P. Projeto arsênio / Estudo de áreas impactadas por rejeito da mineração de ouro na região do Quadrilátero Ferrífero. X Encontro Sobre Contaminantes Inorgânicos. Livro de Resumos, 19-23, 2006.

[13] MATSCHULLAT, J.; BORBA, R. P.; DESCHAMPS, E.; FIGUEIREDO, B. R.; GABRIO, T.; SCHWENK, M. Human and environmental contamination in the iron quadrangle, Brasil. Applied Geochemistry, 15: 181-190, 2000.

[14] PALMIERI, H. E. L. Distribuição, especiação e transferência de Hg e As para a biota em áreas do Sudeste do Quadrilátero Ferrífero, MG. Tese de doutorado em geoquímica ambiental. Escola de Minas, Universidade Federal de Ouro Preto, 2006.

[15] BORBA, R. P.; FIGUEIREDO, B. R.; CAVALCANTI, J. A. Arsênio na água subterrânea em Ouro Preto e Mariana, Quadrilátero Ferrífero (MG). Revista Escola de Minas, Ouro Preto, 57(1): 45-51, 2004.

[16] WINDMÖLLER, C. C.; SANTOS, R. C.; ATHAYDE, M.; PALMIERI, H. E. L. Distribuição e especiação de Hg em sedimentos de áreas de garimpo de ouro do Quadrilátero Ferrífero (MG). Química Nova, 30(5): 1088-1094, 2007.

[17] SEGURA-MUNÓZ, S. I.; OLIVEIRA, A. S.; NIKAIIDO, M.; TREVILATO, T. M. B.; BÓCIO, A.; TAKAYANAGUI, A. M. M.; DOMINGO, J. L. Metal levels in sugar cane

(*Saccharum* spp.) samples from an area under the influence of a municipal landfill and a medical waste treatment system in Brazil. *Environment International*, 32: 52-57, 2006.

[18] KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Inc., Flórida, 4ª impressão, 1986.

[19] DAUS, B.; WENNRICH, R.; MORGENSTERN, P.; WEIB, H.; PALMIERI, H. E. L.; NALINI, H. A.; LEONEL, L. V.; MONTEIRO, R. P. G.; MOREIRA, R. M. Arsenic speciation in plant samples from the Iron Quadrangle, Minas Gerais, Brazil. *Microchimica Acta*, 151:175-180, 2005.

[20] ANJOS, A. R. M.; MATTIAZZO, M. E. Metais pesados em plantas de milho cultivadas em latossolos repetidamente tratados com biossólido. *Scientia Agrícola*, 57(4): 769-776, 2000.

[21] SIMONETE, M. A.; KIEHL, J. C. Extração e fitodisponibilidade de metais em resposta à adição de lodo de esgoto no solo. *Scientia Agrícola*, 59(3): 555-563, 2002.

[22] KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V. Mineral profile of raw and cooked leafy vegetables consumed in Southern Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16: 605-611, 2003.

[23] BULDINI, P. L.; CAVALLI, S.; MEVOLI, A. Ion chromatographic and voltammetric determination of heavy and transition metals in honey. *Food Chemistry*, 73: 487-495, 2001.

[24] CRANE, E. Bee, honey and pollen as indicators of metals in the environment. *Bee World*, 65(1): 47-49, 1984.

[25] AL RMALLI, S. W.; HARIS, P. I.; HARRINGTON, C. F.; AYUB, M. A survey of arsenic in foodstuffs on sale in the United Kingdom and imported from Bangladesh. *Science of the Total Environment*, 337: 23-30, 2005.

- [26] DEPOI, F. S.; BENTLIN, F. R. S.; POZEBON, D. Methodology for Hg determination in honey using cloud point extraction and cold vapour-inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Analytical Methods*, 2:180-185, 2010.
- [27] PAES, L. C. Determinação de cobre, manganês e cádmio em mel por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. Dissertação de mestrado em Química. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- [28] BATISTA B. L.; DA SILVA, L. R. S.; ROCHA, B. A.; RODRIGUES, J. L.; BERRETTA-SILVA, A. A.; BONATES, T. O.; GOMES, V. S. D.; BARBOSA, R. M.; BARBOSA, F. Multi-element determination in Brazilian honey samples by inductively coupled plasma mass spectrometry and estimation of geographic origin with data mining techniques. *Food Research International*, 49: 209-215, 2012.
- [29] BILANDŽIĆ, N.; ĐOKIĆ, M.; SEDAK, M.; KOLANOVIĆ, B. S.; VARENINA, I.; KONČURAT, A.; RUDAN, N. Determination of trace elements in Croatian floral honey originating from different regions. *Food Chemistry*, 128: 1160-1164, 2011.
- [30] TERRAB, A.; HERNANZ, D.; HEREDIA, F. J. Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of minerals in thyme honeys and their contribution to geographical discrimination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 3441-3445, 2004.
- [31] MILLOUR, S.; NOËL, L.; KADAR, A.; CHEKRI, R.; VASTEL, C.; SIROT, V.; LEBLANC, J. C.; GUÉRIN, T. Pb, Hg, Cd, As, Sb and Al levels in foodstuffs from the 2nd French total diet study. *Food Chemistry*, 126: 1787-1799, 2011.
- [32] AJTONY, Z.; BENCS, L.; HARASZI, R.; SZIGETI, J.; SZOBOSZLAI, N. Study on the simultaneous determination of some essential and toxic trace elements in honey by multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 71: 683-690, 2007.
- [33] PISANI, A.; PROTANO, G.; RICCOBONO, F. Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chemistry*, 107: 1553-1560, 2008.

- [34] CHUA, L. S.; ABDUL-RAHAMAN, N. L.; SARMIDI, M. R.; AZIZ, R. Multi-elemental composition and physical properties of honey samples from Malaysia. *Food Chemistry*, 135: 880-887, 2012.
- [35] ROMAN, A.; MADRAS-MAJEWSKA, B.; POPIELA-PLEBAN, E. Comparative study of selected toxic elements in propolis and honey. *Journal of Apicultural Science*, 55(2): 97-105, 2011.
- [36] YÜCEL, Y.; SULTANOĞLU, P. Determination of industrial pollution effects on citrus honeys with chemometric approach. *Food Chemistry*: 135: 170-178, 2012.
- [37] CREW, H. M. Speciation of trace elements in foods, with special reference to cadmium and selenium: is it necessary? *Spectrochimica Acta Part B*, 53: 213-219, 1998.
- [38] CHAM, K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere*, 52: 1361-1371, 2003.
- [39] IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/00000010444810212012482617926711.pdf>. Acessado em: 15 de novembro de 2012.
- [40] IAL. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=20. Acessado em: 15 de novembro de 2012.
- [41] BARONI, M. V.; ARRUA, C.; NORES, M. L.; FAYÉ, P.; DÍAZ, M. D. P.; CHIABRANDO, G. A.; WUNDERLIN, D. A. Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics. *Food Chemistry*, 114: 727-733, 2009.
- [42] CONTI, M. E.; BOTRÈ, F. Honeybees and their products as potencial bioindicator of heavy metals contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*, 69: 267-282, 2001.

[43] PELLERANO, R. G.; UÑATES, M. A.; CANTARELLI, M. A.; CAMIÑA, J. M.; MARCHEVSKY, E. J. Analysis of trace elements in multifloral Argentine honeys and their classification according to provenance. *Food Chemistry*, 134: 578-582, 2012.

[44] KÜÇÜK, M.; KOLAYLI, S.; KARAOĞLU, S.; ULUSOY, E.; BALTAÇI, C.; CANDAN, F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100: 526-534, 2007.

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

[46] FERNANDEZ-TORRES, R.; PÉREZ-BERNAL, J. L.; BELLO-LÓPEZ, M. A.; CALLEJÓN-MOCHÓN, M.; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, J. C.; GUIRAÚM-PÉREZ, A. Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. *Talanta*, 65: 686-691, 2005.

[47] DEVILLERS, J.; DORÉ, J. C.; MARENCO, M.; POIRIER-DUCHÊNE, F.; GALAND, N.; VIEL, C. Chemometrical analysis of 18 metallic and nonmetallic elements found in honey sold in France. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5998-6007, 2002.

[48] 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*, 49: 2741-2749, 2011.

[49] MENDES, T. M. F. F.; BACCAN, N.; CADORE, S. Sample treatment procedures for the determination of mineral constituents in honey by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 17(1): 168-176, 2006.

[50] LACHMAN, J.; KOLIHOVÁ, D.; MIHOLOVÁ, D.; KOŠATA, J.; TITĚRA, D.; KULT, K. Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. *Food Chemistry*, 101: 973-979, 2007.

[51] RODRÍGUES-GARCÍA, J. C.; GARCÍA, J. B.; LATORRE, C. H.; MARTÍN, S. G.; CRECENTE, R. M. P. Direct and combined methods for the determination of chromium,

copper, and nickel in honey by eletrothermal atomic spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6616-6623, 2005.

[52] IOANNIDOU, M. D.; ZACHARIADS, G. A.; ANTHEMIDIS, A. N. STRATIS, J. A. Direct determination of toxic trace metals in honey and sugars using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Talanta*, 65: 92-97, 2005.

[53] POHL, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(1): 117-128, 2009.

[54] GOLOB, T.; DOBERŠEK, U.; KUMP, P.; NEČEMER, M. Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. *Food Chemistry*, 91: 593-600, 2005.

[55] CAL-PRIETO, M. J.; FELIPE-SOTELO, M.; CARLOSENA, A.; ANDRADE, J. M.; LÓPEZ-MAHÍA, P.; MUNIATEGUI, S.; PRADA, D. Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990 to 2000. *Talanta*, 56: 1-51, 2002.

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

[57] FEDOROV, P. N.; RYABCHUK, G. N.; ZVEREV, A. V. Comparison of hydride generation and graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of arsenic in food. *Spectrochimica Acta Part B*, 52: 1517-1523, 1997.

[58] TAKASE, I.; PEREIRA, H. B.; LUNA, A. S.; GRIMBERG, P.; CAMPOS, R. C. A geração química de vapor em espectrometria atômica. *Química Nova*, 25(6B): 1132-1144, 2002.

[59] BRODIE, K.; FRARY, B.; STUMAN, B.; VOTH, L. An automatic vapor generation accessory for atomic absorption analysis. *Varian Instruments at work*, AA38, 1983.

- [60] BOYLAN, H. M.; KINGSTON, S. One-step mercury analysis. Milestone Application Note, 1998.
- [61] NASCENTES, C. C.; ARRUDA, M. A. Z.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Direct determination of Cu and Zn in fruit juices and bovine milk by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 64: 912-917, 2004.
- [62] GÁSPÁR, A.; BERNDT H. Beam Injection Flame Furnace Atomic Absorption Spectrometry: A New Flame Method. *Analytical Chemistry*, 72: 240-246, 2000.
- [63] MIRANDA, K.; PEREIRA-FILHO, E. R. Potentialities of thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FF-AAS) in the fast sequential determination of Cd, Cu, Pb and Zn. *Analytical Methods*, 1: 215–219, 2009.
- [64] BEZERRA, M. A.; LEMOS, V. A.; GARCIA, J. S.; SILVA, D. G.; ARAÚJO, A. S.; ARRUDA, M. A. Z. Thermospray generation directly into a flame furnace - An alternative to improve the detection power in atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 82: 437-443, 2010.
- [65] NASCENTES, C. C.; KAMOGAWA, M. Y.; FERNANDES, K. G.; ARRUDA, M. A. Z.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA J. A. T. Direct determination of Cu, Mn, Pb, and Zn in beer by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 60: 749-753, 2005.
- [66] DAVIES, J.; BERNDT, H. Improvements in thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 479: 215-223, 2003.
- [67] REZENDE, H. C.; NASCENTES, C. C.; COELHO, N. M. M. Cloud point extraction for determination of cadmium in soft drinks by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*, 97: 118-121, 2011.
- [68] SCHIAVO D.; NEIRA, J. Y.; NÓBREGA, J. A. Direct determination of Cd, Cu and Pb in wines and grape juices by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 76: 1113-1118, 2008.

[69] DA-COL, J. A.; DOMENE, S. M. A.; PEREIRA-FILHO, E. R. Fast determination of Cd, Fe, Pb, and Zn in food using AAS. *Food Analytical Methods*, 2: 110-115, 2009.

[70] INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, revisão 4, Rio de Janeiro, 2011.

[71] ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Requisitos Gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração, 2ª edição, ABNT, 2005.

[72] MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa número 24, de 14 de julho de 2009. Define os requisitos e critérios específicos para funcionamento dos laboratórios de análises de resíduos e contaminantes em alimentos integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. Anexo II: Guia para validação de métodos analíticos e controle de qualidade interna das análises de monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC Animal. *Diário Oficial da União*. Brasília, 22 de julho de 2009.

[73] MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de garantia da qualidade analítica, 1ª edição, Brasília, 2011.

[74] SOUZA, S. V. C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos. Tese de doutorado em ciência de alimentos. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

[75] SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. *Analytica Chimica Acta*, 552: 25-35, 2005.

[76] INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Vocabulário Internacional de Metrologia - Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. Edição Luso-Brasileira, Rio de Janeiro, 2012.

[77] ICH. International Conference on Harmonization. Guidance for industry Q2A: Text on validation of Analytical Procedures, 1995.

[78] THOMPSON, M.; ELLISON; WOOD, R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, 74(5): 835-855, 2002.

[79] EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 1998.

[80] RIBEIRO, F. A. L; FERREIRA, M. M. C. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova*, 31(1): 164-171, 2008.

[81] ICH. International Conference on Harmonization. Guidance for industry Q2B: Text on validation of Analytical Procedures, 1996.

[82] US EPA METHOD 7473: Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrophotometry, 1998.

[83] HERNANDEZ, O. M.; FRAGA, J. M. G.; JIMENEZ, A. I.; JIMENEZ, F.; ARIAS, J. J. Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. *Food Chemistry*, 93: 449-458, 2005.

[84] TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. *Química Nova*, 29(2): 338-350, 2006.

[85] BELSLEY, D. A.; KUH, E.; WELSCH, R. E. Regression diagnostics: identifying influential data and sources of collinearity. Wiley, New York, 1980.

[86] DRAPER, N. R.; SMITH, H. Applied regression analysis. New York: Wiley, 1998.

[87] RYAN, T. A.; JOINER, B. L. Normal probability plots and tests for normality. Technical Report. Statistics Department, Pennsylvania State University, 1976.

- [88] LEVENE, H. Robust tests for equality of variances. In: OLKIN, I.; GHURYE, S. G.; Hoeffding, W.; MADOW, W. G.; MANN, H. B. Contributions to probability and statistics. Stanford University Press, 278-292, 1960.
- [89] BROWN, M. B.; FORSYTHE, A. B. Robust tests for the equality of variances. Journal of the American Statistical Association, 69: 364-367, 1974.
- [90] DURBIN, J.; WATSON, G. S. Testing for serial correlation in least squares regression ii. Biometrika, 38: 159-178, 1951.
- [91] MATUSIEWICZ, H.; ŚLACHCIŃSKI, M. Method development for simultaneous multi-element determination of hydride forming elements (As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn) and Hg by microwave induced plasma-optical emission spectrometry using integrated continuous-microflow ultrasonic nebulizer-hydride generator sample introduction system. Microchemical Journal, 95:213-221, 2010.
- [92] EC. European Commission. Commission decision 2002/657/EC of August, 12, 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, L 221/8, 2002.
- [93] MAGGI, C.; BERDUCCI, M. T.; BIANCHI, J.; GIANI, M.; CAMPANELLA, L. Methylmercury determination in marine sediment and organisms by Direct Mercury Analyser. Analytica Chimica Acta, 641: 32-36, 2009.
- [94] DURÃO JÚNIOR, W. A.; PALMIERI, H. E. L.; TRINDADE, M. C.; BRANCO, O. E. A.; FILHO, C. A. C.; FLEMING, P. M.; SILVA, J. B. B.; WINDMOLLER, C. C. Speciation, distribution, and transport of Mercury in contaminated soils from Descoberto, Minas Gerais, Brazil. Journal of Environmental Monitoring, 11: 1056-1063, 2009.

APÊNDICE

PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O PERÍODO DE EXECUÇÃO DA TESE

TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS

VIEIRA, H. P.; NASCENTES, C. C.; WINDMÖLLER, C. C. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de mercúrio em mel e avaliação de amostras produzidas em Minas Gerais. XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia, Belo Horizonte, 2009.

VIEIRA, H. P.; NASCENTES, C. C.; WINDMÖLLER, C. C. Avaliação de diferentes procedimentos para estimativa dos limites de detecção e de quantificação na determinação direta de Hg em mel por CVAAS. 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, 2009.

VIEIRA, H. P.; NASCENTES, C. C.; WINDMÖLLER, C. C. Desenvolvimento de método para determinação de mercúrio em mel empregando a espectrometria de absorção atômica com geração de vapor frio. 15º Encontro Nacional de Química Analítica e 3º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, Salvador, 2009.

VIEIRA, H. P.; NASCENTES, C. C.; WINDMÖLLER, C. C. Development of analytical methodology for direct determination of arsenic in honey. Eleventh Rio Symposium on Atomic Spectrometry, Mar del Plata, 2010.

VIEIRA, H. P.; LOPES, F. C. P.; NASCENTES, C. C.; WINDMÖLLER, C. C. Determinação de mercúrio em amostras de leite produzidas em Minas Gerais empregando analisador direto de mercúrio (DMA). XXV Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Lavras, 2011.

VIEIRA, H. P.; NASCENTES, C. C.; MOREIRA, K.; WINDMÖLLER, C. C. Determinação de mercúrio em amostras de ovos e mel produzidos em Minas Gerais empregando analisador direto de mercúrio (DMA). XII ENCI - Encontro Nacional sobre Contaminantes Inorgânicos, São Paulo, 2011.

ARTIGOS ESCRITOS

VIEIRA, H. P.; NASCENTES, C. C.; GERMANO, A.; WINDMÖLLER, C. C. Development of a method for the direct determination of arsenate in honey by hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytical Methods*, 4:2068–2073, 2012. Anexo 1.

VIEIRA, H. P.; NASCENTES, C. C.; WINDMÖLLER, C. C. Development of analytical methods to quantify the mercury content of honey without sample digestion (Artigo submetido ao *Journal of Food Composition and Analysis*, aguardando revisão).

Cite this: *Anal. Methods*, 2012, **4**, 2068

www.rsc.org/methods

PAPER

Development of a method for the direct determination of arsenate in honey by hydride generation atomic absorption spectrometryHeulla Pereira Vieira,^{*ab} Clésia Cristina Nascentes,^a Amarildo Germano^c and Cláudia Carvalhinho Windmüller^d

Received 9th December 2011, Accepted 28th March 2012

DOI: 10.1039/c2ay05875h

This paper describes the development of a fast method for determination of arsenate in samples of honey. The variables studied in the optimization of the method were NaBH₄ concentration, pre-reducing agent, HCl concentration, the diluent type and contact time with the sample. The optimized conditions were 50 g L⁻¹ of sample prepared in 1.3 mol L⁻¹ HCl and 10 g L⁻¹ SC(NH₂)₂. The hydride generation solutions were 8.5 g L⁻¹ NaBH₄ and 2.5 mol L⁻¹ HCl. The limit of detection (LOD) was 20 ng g⁻¹. The validated method was used to quantify arsenate in 27 samples of honey collected from different cities of Minas Gerais state, Brazil. All samples showed arsenate concentrations below the LOD.

1. Introduction

Arsenic (As) is very dangerous when in contact with the human body either by ingestion, skin absorption or by air. The toxicity of this metalloid is directly related to the chemical species, as it is known that inorganic As is more toxic than organic. In addition, among the inorganic species, the trivalent As compounds are more toxic than those that are pentavalent. Long-term exposure can lead to systemic manifestations that are classified as either carcinogenic or noncarcinogenic. The most affected organ is the skin with cutaneous lesions, such as hyperpigmentation and hyperkeratosis. Arsenic can also cause neuropathies, cardiovascular disease, anemia and diabetes.¹ Thus, the presence of As in food is undesirable.

Honey is a food subject to the accumulation of inorganic contaminants because bees tend to cover large areas in search of nectar. Thus, the knowledge of As in honey is of interest not only for quality control but also as an environmental indicator; it is estimated that bees can travel over an area of 7 km² around the hive, interacting with air, water and soil along the way.^{2,3}

In recent years, the concentrations of total As have been determined in honey from several countries, such as: Croatia (4–105 ng g⁻¹),⁴ Hungary (<13 ng g⁻¹),⁵ France (<27 ng g⁻¹),⁶ Italy (<20 ng g⁻¹),⁷ Spain (140–260 ng g⁻¹),⁸ Poland (26–344 ng g⁻¹)⁹ and Bangladesh (17–20 ng g⁻¹).¹⁰ It is worth noting that in

Bangladesh there is arsenic contamination in groundwater due to the geology of the area and the reported concentrations are of samples imported by United Kingdom. Only the honey from Poland exceeded the standards set for As by this country (<200 ng g⁻¹).⁹

Elevated levels of As in honey are undesirable because of its toxicity. In 2010, the Brazilian Program for Control of Residues and Contaminants in Foods, such as honey, established a limit of 500 ng g⁻¹ for As.¹¹ While the Codex Alimentarius Commission¹² has established maximum levels for As in water, oil and salt of 10 ng g⁻¹, 100 ng g⁻¹ and 500 ng g⁻¹, respectively, a value has not been established regarding honey. Recently, Mercosur¹³ adopted a limit of up to 300 ng g⁻¹ for As in honey. This value became valid also in Brazil, a member of Mercosur.

The extraction of As from foods can be made using digestion by heating and with mixtures of acids or other oxidants. However, to avoid loss by evaporation, these procedures are usually carried out using microwave systems. A more economical alternative, which has been showing good results for As and other contaminants, is solid sampling and direct analysis using slurries.^{5,14} Besides the advantage of reducing contamination of the sample due to lower consumption of concentrated acids, direct analysis also reduces the sample preparation time and, because it is a procedure performed at room temperature, the chance of loss of analytes by volatilization decreases, providing a higher sensitivity. These methods are mainly used with electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS).^{5,14} However, the determination of As in food by atomic absorption spectrometry with hydride generation (HGAAS) typically shows better results.¹⁵ The main advantage of this technique is the separation of the analyte from the matrix due to the fact that only a few elements are capable of forming volatile hydrides. Then, the analyte can be transferred to the atomizer in an environment free of contaminants to avoid possible interferences.

^aDepartamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos, 6627, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. E-mail: heulla@qui.dout.ufmg.br; Fax: +55 (31) 3409-5700; Tel: +55 (31) 3409-5725

^bLaboratório de Química Agropecuária, Instituto Mineiro de Agropecuária (LQAIMA), BR 040, km 527, CEP: 32145-900, Contagem, Minas Gerais, Brazil

^cLaboratório Nacional Agropecuário, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (LANAGRO/MAPA), Avenida Rômulo Joviano sh, Fazenda Modelo, 33600-000 Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil

Furthermore, the HGAAS sample introduction system is more efficient than those based on conventional pneumatic nebulization, with limits of detection (LOD) at the level of $\mu\text{g L}^{-1}$. On the other hand, some factors related to the reaction of hydrides, such as pH, concentration of reagents and the oxidation states of the analyte, are critical. Its limitations may also include a susceptibility to interference from the sample solution that could affect the generation of steam and the purge of the solution.¹⁶

This study aimed to develop and validate a method, for the direct determination of arsenate in honey using slurry sampling and HGAAS, which is possible to be implemented in food quality control laboratories.

2. Materials and methods

2.1. Instrumentation

Measurements were performed using an atomic absorption spectrometer (SpectrAA 220FS, Varian Inc., Mulgrave, Australia) and a hydride generation system (VGA 77, Mulgrave, Varian Inc., Australia). Solutions of NaBH_4 and HCl were used for the hydride generation, with a flow rate of 1.3 mL min^{-1} . The sample flow rate was 8.0 mL min^{-1} . A hollow cathode lamp of As was used, operating at 193.7 nm. Argon (White Martins, Brazil) was used as carrier gas.

2.2. Reagents and samples

All reagents were of analytical grade. The solutions were prepared with ultrapure water (resistivity of $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtained using a Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, USA). A stock solution containing 1000 mg L^{-1} of As^{5+} (Titrisol, Merck, Darmstadt, Germany) was used in this study. A $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ solution of As^{5+} was prepared by diluting the stock solution and was used to prepare the other reference solutions. HCl, HNO_3 , NaBH_4 , NaOH, KI and $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ solutions were prepared with Merck reagents (Darmstadt, Germany). All glassware used was decontaminated before use by being washed with detergent (Extran, Merck, Darmstadt, Germany), rinsed with tap water followed by distilled water, and soaked in 100 mL L^{-1} HNO_3 for at least 16 hours. Then, they were rinsed with ultrapure water and dried at room temperature in a clean and protected place.

The 27 honey samples were purchased from stores and farmers' fairs located in several cities of Minas Gerais state, Brazil, some of which were obtained in collaboration with Food Safety Laboratory of the IMA (Instituto Mineiro de Agropecuária). Initially, fourteen honey samples were collected and analyzed by ICP-MS (Section 2.5), in order to check if originally there was arsenic present. As none of them showed arsenic concentration above the limit of quantification (LOQ) of the ICP-MS method (23 ng g^{-1}), one of these samples was chosen and contaminated with arsenic (500 ng g^{-1}) for the development and validation of the proposed methodology.

2.3. Method development

The method for direct determination of arsenate in honey by HGAAS was developed employing a complete factorial design (2^4) followed by a central composite design (CCD). In the

complete factorial design (2^4), the factors studied were: concentrations of reducing agent (NaBH_4), concentration of HCl used in the hydride generation, concentration of HCl in the sample (as a diluent) and the use of two different pre-reducing agents (KI and $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$) (Table 1). To obtain an appropriate signal in the HGAAS system, As^{5+} was added to the honey samples used in the optimization to reach a final concentration of 500 ng g^{-1} . This experiment involved four factors with two levels each. In each experiment, two replicates were made (total of 32 determinations). The samples were prepared from the dilution of 5.0 g of honey in 100.0 mL of different HCl concentrations (Table 1). The measurements in the HGAAS system were made approximately two hours after the preparation of these solutions.

After processing the data of the factorial design, a CCD was made to optimize the following factors: the HCl concentration in the sample diluent, $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ concentration (pre-reducing agent) and the NaBH_4 concentration, on the five different levels presented in Table 1. Honey samples spiked with concentrations of 500 ng g^{-1} were also used in this study. The test level corresponding to the central point was conducted in quintuplicate, requiring a total of 19 experiments.

Subsequently, the sample concentration and the contact time with the diluent were evaluated by preparing solutions containing 2.0 g, 4.0 g, 6.0 g, 8.0 g and 10.0 g of honey spiked with 500 ng g^{-1} of As^{5+} . HCl was added to the sample to obtain a 1.3 mol L^{-1} solution with 1.0 g $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$. The final volume of solution that contains the sample was 100.0 mL. After two hours, the solutions were analyzed using HGAAS, and As measurements were made using optimized conditions: 8.5 g L^{-1} NaBH_4 in 5.0 g L^{-1} NaOH and 2.5 mol L^{-1} HCl. The solution containing 2.0 g of honey was also examined under the same conditions after four hours. All tests were conducted in triplicate.

2.4. Validation

A study of the performance of the developed method was conducted to demonstrate that it operated properly in routine laboratories. The analytical performance parameters evaluated were linearity, selectivity, accuracy, precision, LOD and LOQ. The validation process was conducted through tests with standard solutions, blanks and samples spiked with analyte. The validation of this method was based mainly on the recommendations of the Guide for Validation of Analytical Methods of INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial).¹⁷

Table 1 Factors and levels studied in the complete factorial design and central composite design

| Factors | Levels |
|--|-----------------------------------|
| <i>Complete factorial design:</i> | |
| NaBH_4 (g L^{-1}) | 5.0 and 8.5 |
| HCl (mol L^{-1}) | 2.5 and 5.0 |
| HCl (diluent) (mol L^{-1}) | 0.0 and 1.0 |
| Pre-reducing (10 g L^{-1}) | KI and $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ |
| <i>Central composite design:</i> | |
| HCl (diluent) (mol L^{-1}) | 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 and 1.8 |
| $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ (g L^{-1}) | 2, 4, 7, 10 and 12 |
| NaBH_4 (g L^{-1}) | 2, 4, 7, 10 and 12 |

2.5. Determination of As in honey

The validated analytical methodology for direct determination of arsenate in honey using HGAAS was applied to 27 honey samples from several cities of the Minas Gerais state, Brazil. Solutions containing 5.0 g of samples in a final volume of 100 mL were analyzed according to the description in Section 3.2.

The honey samples were also analyzed employing a reference method to ensure accurate results. Reference method: a microwave oven system equipped with quartz vessels and a temperature sensor (Multiwave 300, Anton-Paar, Graz, Austria) was employed for sample digestion. Sample masses of 300 mg were digested using 6.0 mL of HNO_3 (150 mL L^{-1}) in a closed vessel. After decomposition, digested solutions were transferred to volumetric flasks and diluted to 15.0 mL with ultrapure water. The microwave oven heating program was performed in five steps: (1) 10 minutes until 1000 W (ramp); (2) 5 minutes at 1000 W; (3) 15 minutes at 900 W; (4) 15 min at 700 W; and (5) 15 min at 0 W (vent). The samples were analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Varian 820 MS, Varian Inc., Mulgrave, Australia) using isotope As^{75} and yttrium as an internal standard. Operational conditions were: plasma power 1.5 kW, plasma gas flow 17.0 L min^{-1} , auxiliary gas flow 1.7 L min^{-1} , and nebulizer flow 1.0 L min^{-1} .

3. Results and discussion

3.1. Development of the method for the direct determination of arsenate

The reducing agent NaBH_4 was chosen because of its traditionally good performance, low cost and ease of use with the HGAAS technique. The concentration of 5.0 g L^{-1} was recommended by the manufacturer of the HGAAS for general samples and the performance of the method was evaluated at a concentration of 8.5 g L^{-1} as well. The 5.0 mol L^{-1} HCl was also established by the manual of the equipment, but the value of 2.5 mol L^{-1} was chosen in this study as an attempt to obtain satisfactory results with a lower consumption of this reagent. In the determination of As, all species must be converted to As^{3+} by adding a pre-reducing agent, such as KI or $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$, before the hydride generation step. This addition is necessary because As^{5+} has hydride generation kinetics much slower than As^{3+} . This pre-reducing step was chosen because of the good results obtained in other reports.¹⁸

Some difficulties may occur during hydride generation due to the characteristics of the solution containing the sample, such as sample concentration, pH, viscosity and foam production. Thus, the effectiveness of the hydride generation with or without the addition of HCl as a diluent was evaluated. Then, the experimental design presented in Table 1 was performed and the results are shown in Fig. 1.

According to Fig. 1, all factors studied were significant ($p = 0.05$), and the increase in concentrations of NaBH_4 and HCl showed an increase in instrumental response. In addition, the use of $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ instead of KI showed a significant positive effect on the instrumental response. In terms of costs, $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ values about four times less than KI of similar quality. The use of HCl (acidity of sample) showed the greatest positive effect on experimental design, so this factor was varied and the concentration of

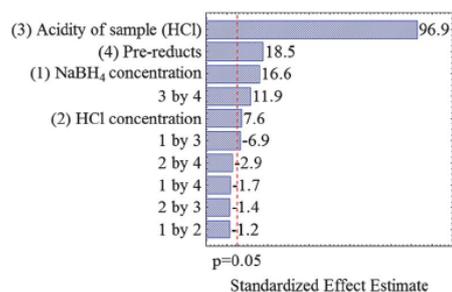


Fig. 1 Standardized Pareto chart obtained in the factorial design 2^4 for honey samples spiked with arsenic.

HCl used in the hydride generation was fixed at a low level (2.5 mol L^{-1}) in the next step of optimization.

The CCD was carried out in order to obtain the optimal condition in a response surface (Fig. 2), which was defined by the HCl and $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ concentration in the sample and by the NaBH_4 solution. Fig. 2 was obtained by fixing the concentration of NaBH_4 at 8.5 g L^{-1} , as this concentration had the best response from the equipment. Observing Fig. 2, the point of maximum response for the HCl concentration was obtained at 1.3 mol L^{-1} and 10.0 g L^{-1} $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$.

The optimized conditions were: 50.0 g L^{-1} of sample in 1.3 mol L^{-1} of HCl, 10.0 g L^{-1} of $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$, 8.5 g L^{-1} of NaBH_4 and 2.5 mol L^{-1} of HCl for hydride generation. These conditions were used in the next step to study the ratio of sample mass/diluent and the contact time of the sample with the diluent (HCl). This study was done to better understand the performance of the proposed procedure considering the practicality of the preparation of the samples for HGAAS.

For this purpose, solutions containing 2.0 g, 4.0 g, 6.0 g, 8.0 g and 10.0 g of honey were analyzed according to the procedure described in Section 2.3. The percentage recoveries ranged from 97.9% to 105.3%, and the relative standard deviation (RSD) ranged between 0.6% and 5.5%. In all ratios evaluated, the results are consistent with the acceptance criteria set by MAPA

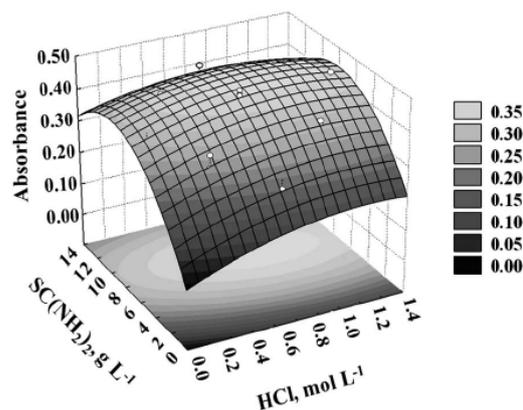


Fig. 2 Plot of estimate response surface for the As absorbance according to concentrations of $\text{SC}(\text{NH}_2)_2$ and HCl, by fixing the concentration of NaBH_4 at 8.5 g L^{-1} .

(Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento)¹⁹ and by the EC (European Commission),²⁰ which provide recoveries between 80% and 110% for concentrations above 10 ng g⁻¹. Furthermore, after four hours of rest, the analysis of the solutions containing 2.0 g of honey showed an average recovery of 100.6% and a RSD of 0.6%. Therefore, the method has a good performance for samples up to 10.0 g, and the solutions were found to be stable for up to four hours after preparation.

3.2. Optimized method

The optimized methods were: 2.0–10.0 g of sample prepared in 1.3 mol L⁻¹ HCl followed by an addition of 10 g L⁻¹ SC(NH₂)₂ to a final volume of 100 mL. After a maximum of four hours resting, measurements in the HGAAS must be made using 8.5 g L⁻¹ NaBH₄ in 5.0 g L⁻¹ NaOH as a reducing agent and 2.5 mol L⁻¹ HCl as a hydride generation reagent. The equipment conditions were described in Section 2.1.

3.3. Validation

The linearity and selectivity were evaluated in accordance with the INMETRO.¹⁷ This guide recommends the procedure, which establishes the range of interest, the preparation of blank or sample calibration curves for at least five concentration levels in three independent replicates and the measurement of the response of the equipment for the calibration solutions in a random order.²¹ Thus, the selectivity and linearity were evaluated by measuring six calibration curves prepared by the addition of As at concentrations of 0, 2, 5, 10, 20, 30 and 40 µg L⁻¹, corresponding to 0, 40, 100, 200, 400, 600 and 800 ng g⁻¹, respectively. Three of these six curves were prepared with the addition of honey 50 g L⁻¹ in 1.3 mol L⁻¹ HCl and the other three only with 1.3 mol L⁻¹ HCl.

The detector response linearity was studied using the calibration curves with and without honey addition. The presence of outliers was evaluated as points outside the range $\pm t_{(1-\alpha/2, n-2)} \times s_{res}$ and was confirmed by the test of Jackknife standardized residuals (J_{ei}) calculated for each point on the calibration curve.²² J_{ei} values greater than the critical t value were considered outliers and were removed. For each exclusion, the ordinary least squares method (OLSM) was reapplied to the remaining data. The OLSM was used to estimate the parameters of the equation $Y_i = aX_i + b$, where Y_i represents the instrument response and X_i the concentration of As (Fig. 3a and b). The OLSM minimizes the sum of squared residuals from the regression curve and assumes that the residues follow a normal distribution and are independent and homoscedastic (*i.e.*, with constant variance along the X axis).²¹

The requirements of normality were confirmed using the Ryan and Joiner test.²² The homoscedasticity was confirmed by the Levene test²³ with modifications.²⁴ The independence of residuals was evaluated by the Durbin and Watson test,²⁵ and the residuals were autocorrelated. The F test (ANOVA) was used to assess the significance of the regression and linearity deviation.²¹ However, the linearity was not confirmed in the range of 2 µg L⁻¹ to 40 µg L⁻¹. During the data processing, several attempts were made to obtain a linear range by reducing the working range, and, even in a smaller range of 2 µg L⁻¹ to 20 µg L⁻¹, it was not possible (Fig. 3b). The shape of a parabola observed in the plot of the

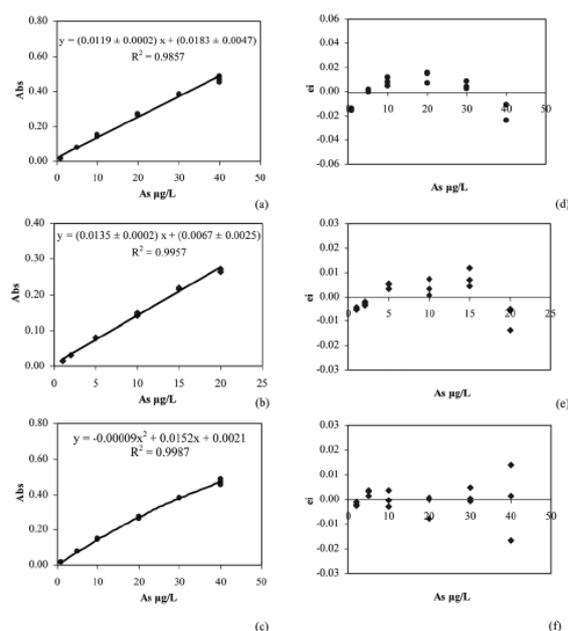


Fig. 3 Linear curves without the matrix addition: (a) in the range of 2 µg L⁻¹ to 40 µg L⁻¹ and (b) in the range of 2 µg L⁻¹ to 20 µg L⁻¹. (c) Curve without the matrix addition in the range of 2 µg L⁻¹ to 40 µg L⁻¹, using quadratic regression. (d), (e) and (f) Residuals plots referent to graphics (a), (b) and (c), respectively.

residuals (Fig. 3d and e) suggested the use of a quadratic regression, which could be represented by the equation $Y_i = aX_i^2 + bX_i + c$. Fig. 3c shows the calibration curve and Fig. 3f the plot of the residuals of the calibration of As obtained in the range of 2 µg L⁻¹ to 40 µg L⁻¹ using quadratic regression. The R^2 value of 0.9987 confirmed that the quadratic fit was more appropriate to these data, compared to the R^2 value of 0.9857 obtained in the linear regression.

The same calibration curves used for linearity evaluation were also used for the selectivity evaluation. It was performed in terms of matrix effect and the results are presented in Table 2. The results for concentrations of 0, 2, 5, 10, 20, 30 and 40 µg L⁻¹ for the curve without the matrix were compared point-by-point with the curves with sample added using the F -test and t -test (Student's).¹⁷ No matrix effects were observed in any of the concentration levels when calibration curves with and without matrix addition were compared by the t -test at $\alpha = 0.05$.

Table 2 Absorbance \pm standard deviation in the curves prepared with or without matrix addition

| Concentration As (µg L ⁻¹) | Absorbance \pm standard deviation | |
|---|-------------------------------------|-------------------|
| | Without matrix | With matrix |
| 2 | 0.031 \pm 0.001 | 0.032 \pm 0.004 |
| 5 | 0.079 \pm 0.001 | 0.078 \pm 0.003 |
| 10 | 0.145 \pm 0.003 | 0.145 \pm 0.003 |
| 20 | 0.269 \pm 0.005 | 0.265 \pm 0.009 |
| 30 | 0.380 \pm 0.003 | 0.381 \pm 0.011 |
| 40 | 0.468 \pm 0.016 | 0.462 \pm 0.010 |

The accuracy of the method was evaluated by addition and recovery experiments using spiked samples because there are no certified reference materials for honey containing As. The precision was studied under conditions of repeatability and intermediate precision.¹⁷ The accuracy and precision were determined by preparing solutions containing 50 g L⁻¹ of honey spiked with As up to concentrations of 300 ng g⁻¹ and 500 ng g⁻¹ in a total of six replicates. On a separate day, six solutions were prepared again by another analyst for the evaluation of intermediate precision in the same laboratory using the conditions described in Sections 2.1 and 3.2. The accuracy ranged from 94.4% to 105.3% in terms of recovery percentage and agreed with the acceptance criteria set by MAPA¹⁹ and the EC,²⁰ which provides recoveries between 80% and 110% for concentrations above 10 ng g⁻¹. Precision under repeatability conditions obtained for different levels (300 ng g⁻¹ and 500 ng g⁻¹) ranged from 4.9% to 5.2% and the intermediate precisions were 4.0% and 2.1%, respectively. Repeatability and intermediate precision were consistent with the acceptability criterion set by MAPA¹⁹ and the EC,²⁰ which establishes a RSD of up to 10% for concentrations above 100 ng g⁻¹.

The LOD and LOQ were also obtained by testing the accuracy and precision in samples spiked with As. A recovery of 95.4% and a RSD of 9.7% were obtained at a concentration of 2 µg L⁻¹, equivalent to 40 ng g⁻¹ which was established as the LOQ, considering the concentration of 50 g L⁻¹ of honey in sample solution. These results were consistent with the acceptance criteria set by MAPA¹⁹ and the EC,²⁰ which provide a RSD up to 20% for concentrations between 1.0 ng g⁻¹ and 100.0 ng g⁻¹. The LOD was 1.0 µg L⁻¹, equivalent to 20 ng g⁻¹, as it showed no precision under repeatability conditions (RSD of 28.1%). The LOD and LOQ obtained were close to the limits obtained for total As determined in bovine liver by HGAAS: 15 ng g⁻¹ and 30 ng g⁻¹, respectively.²⁶ The determination of total As in honey by ETAAS also obtained a LOD of 20 ng g⁻¹.⁵ Therefore, the performance parameters studied confirmed quality assurance in the direct determination of arsenate in honey.

3.4. Arsenate determination in honey samples

In all samples studied, the proposed methodology for the direct determination of arsenate in honey using HGAAS showed concentrations below the LOD (20 ng g⁻¹) and, thus, also below the limit established by the Brazilian government and Mercosur (300 ng g⁻¹).⁵ Comparative analysis performed with the same honey samples decomposed in a microwave oven system and determined by ICP-MS provided concentration of total As below 23 ng g⁻¹. Therefore, all of the samples analyzed were fit for human consumption, concerning the presence of As. According to the literature, As has been determined in honey samples from Hungary (<13 ng g⁻¹)⁵ and France (<27 ng g⁻¹),⁶ by ETAAS and ICP-MS, respectively.

4. Conclusion

An analytical method for the direct determination of arsenate in honey using HGAAS was developed and validated. The method was innovative because the traditional methods used by food surveillance centers are the decomposition of samples for this

type of detection. A new methodology that could be applied in these laboratories in order to avoid sample digestion would reflect in a relevant innovation in terms of potentiality of quality control. The optimized method was found to be easy, fast, with a low cost and without contamination problems. The validation showed that it was not possible to make a linear fit for the calibration curve, but satisfactory performance parameters were obtained using quadratic regression. The standard validation procedure used ensured that the merit parameters obtained were satisfactory and adequate for quality control of honey samples. All collected samples showed arsenate concentrations below the LOD of the method.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the Brazilian agencies CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) for financial support.

References

- 1 S. U. Dani, *Sci. Total Environ.*, 2010, **408**, 1842.
- 2 P. L. Buldini, S. Cavalli and A. Mevoli, *Food Chem.*, 2001, **73**, 487.
- 3 M. Madejczyk and D. Baralkiewicz, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **617**, 11.
- 4 N. Bilandžić, M. Đokić, M. Sedak, B. S. Kolanović, I. Varenina, A. Končurat and N. Rudan, *Food Chem.*, 2011, **128**, 1160.
- 5 Z. Ajtony, L. Bencs, R. Haraszi, J. Szigeti and N. Szoboszlai, *Talanta*, 2007, **71**, 683.
- 6 S. Millour, L. Noël, A. Kadar, R. Chekri, C. Vastel, V. Sirot, J. C. Leblanc and T. Guérin, *Food Chem.*, 2011, **126**, 1787.
- 7 A. Pisani, G. Protano and F. Riccobono, *Food Chem.*, 2008, **107**, 1553.
- 8 A. Terrab, D. Hernanz and F. J. Heredia, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 3441.
- 9 A. Roman, B. Madras-Majewska and E. Popiela-Pleban, *J. Apicult. Sci.*, 2011, **55**(2), 97.
- 10 S. W. Al Rmalli, P. I. Haris, C. F. Harrington and M. Ayub, *Sci. Total Environ.*, 2005, **337**, 23.
- 11 MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brazilian Program for Control of Residues and Contaminants in Foods. Normative Instruction no. 8, April 29, 2010.
- 12 Codex Alimentarius Commission, Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed (CODEX STAN 193-1995), Rome, Italy (Amended 2010), http://www.codexalimentarius.net/download/standards/17/CXS_193e.pdf, accessed 30 November 2011.
- 13 Mercosur, GMC/RES 012/2011 Technical regulation on maximum inorganic contaminants in food, <http://www.mercosur.int/show?contentid=3187>, accessed 30 November 2011.
- 14 J. Sardans, F. Montes and J. Peñuelas, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2010, **65**, 97.
- 15 P. N. Fedorov, G. N. Ryabchuk and A. V. Zverev, *Spectrochim. Acta, Part B*, 1997, **52**, 1517.
- 16 I. Takase, H. B. Pereira, A. S. Luna, P. Grimberg and R. C. Campos, *Quim. Nova*, 2002, **25**(6B), 1132.
- 17 INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Guide for Validation of Analytical Methods, 2011.
- 18 J. Dédina and D. L. Tsalev, *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, Wiley, New York, 1995, vol. 130.
- 19 MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Guide for Validation of Analytical Methods and Internal Quality Control of the Brazilian Program for Control of Residues and Contaminants in Foods. Normative Instruction no. 24, July 22, 2009.
- 20 EC, European Commission, Commission decision 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results, August 12, 2002.

-
- 21 S. V. C. Souza and R. G. Junqueira, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **552**, 25.
- 22 T. A. Ryan and B. L. Joiner, *Normal Probability Plots and Tests for Normality*, The State College, Pennsylvania State University, 1976.
- 23 H. Levene, Robust Tests for Equality of Variances, in *Contributions to Probability and Statistics*, ed. I. Olkin, S. G. Ghurye, W. Hoeffding, W. G. Madow and H. B. Mann, Stanford University Press, Stanford, 1960, vol. 278.
- 24 M. B. Brown and A. B. Forsythe, *J. Am. Stat. Assoc.*, 1974, **69**, 364.
- 25 J. Durbin and G. S. Watson, *Biometrika*, 1951, **38**, 159.
- 26 S. V. C. Souza and R. G. Junqueira, *J. Food Compos. Anal.*, 2007, **20**, 241.