



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



Mauro Agildo Barbosa Guida

**ESTRATÉGIAS PARA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL
DA PRÓPOLIS “IN NATURA” EMPREGANDO ESPECTROMETRIA
ATÔMICA**

**Salvador
Março 2010**

MAURO AGILDO BARBOSA GUIDA

**ESTRATÉGIAS PARA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO
MINERAL DE PRÓPOLIS “IN NATURA” EMPREGANDO
ESPECTROMETRIA ATÔMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças Andrade Korn
Co – Orientador: Prof. Dr. Ednildo Torres

* Bolsista CAPES

Salvador
2010

“Dê sempre o melhor de você, e o melhor virá.
Mesmo que todas as pessoas digam o contrário...
Mesmo assim dê sempre o melhor de você.
E veja que, no final das contas, é entre você e sua consciência”
Madre Tereza de Calcutá

A minha companheira e amiga Maria José Barretto da Silva.

Ao meu sobrinho, querido e amigo Márcio Junior.

A minha querida mãe, Marilurdes Gomes Barbosa Guida

Ao meu pai, José Guida Filho

As minhas irmãs e sobrinhas (Vitória, Ana Clara, Eduarda, Tânia, Tamires)

AGRADECIMENTOS

À Nossa Senhora Aparecida e Santo Expedito.

À toda a minha família.

Aos membros da Comissão Examinadora.

À professora Maria das Graças Korn pela amizade e orientação no presente trabalho.

Ao professor Ednildo Torres pela co-orientação neste trabalho.

Ao professor Mauro Korn por gentilmente nos acolher em seu laboratório.

Ao professor Sérgio Luís Costa Ferreira pela contribuição à minha formação acadêmica.

Aos professores do Instituto de Química.

Ao professores Raildo Mota e Josué Carinhanha pelas discussões científicas e contribuição no trabalho.

Ao Prof. Euro do Instituto Agro-técnico de Catú.

Ao meu amigo Claudio Martins (xique-xique) pela amizade.

À Andréa Pires pela contribuição no trabalho.

À Elisângela por toda contribuição e amizade.

À Daniele, Elane, Tiago, Gabriel, Geovane Cláudio pela amizade e apoio.

A todos os funcionários do Instituto de Química da UFBA que estão sempre dispostos a colaborar em especial a Wilson, Cristóvão e Paulo.

À Wagna pelas discussões científicas.

Ao pessoal do GPQA: À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio concedido na forma de bolsa de estudo nos devidos períodos.

Ao Programa de Pós – Graduação em Química da UFBA pela oportunidade.

A todos os meus verdadeiros amigos que torcem pelo meu sucesso.

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

A EBDA de Alagoinhas.

Ao Sr. Leonardo Presidente da Associação de Apicultores.

Ao Sr. Gilmar funcionário da EBDA.

MUITO OBRIGADO!

Resumo

A própolis é um produto apícola, originário de vegetais utilizado na medicina popular e na indústria de alimentos. Tem composição mineral complexa e dependente do tipo de abelha e tipo de vegetação da região onde é produzida. Neste trabalho foram propostas estratégias analíticas visando quantificar os elementos Al, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, V e Zn presentes nas 51 amostras de própolis “*in natura*”, produzidas em apiários instalados no Estado da Bahia. Foram investigados dois procedimentos para decomposição das amostras e os digeridos foram usados para determinação dos analitos por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de absorção atômica de alta resolução utilizando fonte contínua (HR-CS FAAS). Os procedimentos de decomposição investigados empregando aquecimento condutivo ou assistido por radiação microondas, mostraram-se eficientes com recuperações na faixa de 94-105%. O procedimento empregando forno de microondas com cavidade apresenta como vantagens menor tempo de análise, resultados precisos e baixos limites de detecção. Foram testados dois sistemas para introdução das amostras: nebulizador concêntrico seaspray-câmara de nebulização ciclônica (SP) e nebulizador com ranhuras em V e câmara de nebulização Sturman Masters (VG). Aplicando o teste t pareado ao nível de confiança de 95% não houve diferença significativa nas concentrações obtidas pelos dois sistemas, mas as sensibilidades alcançadas, para todos os elementos estudados, foram aproximadamente 50% melhores para o sistema SP quando comparadas com os valores obtidos quando se utilizou o sistema VG em condições robustas do ICP OES. As determinações mostraram ausência de efeito da matriz e desvio padrão relativo (RSD) inferior a 10%. A exatidão do método foi avaliada usando materiais de referência certificados NIST 1515, folhas de maçã e NIST 1570^a, folhas de espinafre e aplicando o teste t pareado ao nível de 95% não foram verificadas diferenças significativas nas concentrações obtidas. Todas as amostras apresentaram elevadas concentrações de Ca e K. Maiores teores de Cr foram obtidos para amostras de Pojuca. Utilizou-se PCA para classificar a própolis produzida na Bahia e os resultados mostraram que há tendência a formação de uma classe formada por amostras de própolis do litoral e outra classe formada por própolis do interior do estado.

Palavras chave: própolis, abelhas, minerais, ICP OES e HR-CSFAAS.

Abstract

Propolis is a bee product, originating from plants used in folk medicine and food industry. The mineral composition of propolis is complex and dependent on the type of bee and type of vegetation in the region where it is produced. In this work, analytical strategies were proposed to quantify the elements Al, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, and Zn present in 51 samples of fresh propolis. All samples were produced in apiaries installed in the State of Bahia. Two procedures for pre-treatment of sample were investigated to determination of analytes by optical emission spectrometry of inductively coupled plasma (ICP OES) and atomic absorption spectrometry high-resolution continuous source (HR-CS FAAS). The decomposition procedures of samples using conductive heating or microwave assisted heating, proved to be efficient with recoveries in the range of 94-105%. The procedure using cavity microwave oven with closed vessels has the advantages of shorter time of analysis, more accurate results and lower limits of detection. We tested two systems for introduction of samples: Seaspray concentric nebulizer-cyclonic chamber and V-groove nebulizer-spray chamber Sturman Masters. Applying the paired t test at 95% confidence level there was no significant difference in concentrations obtained by both systems, but the sensitivity for all elements investigated were 50% better in SP system compared with the VG system using ICP OES under robust conditions. Matrix effects did not occur and RSDs generally lower than 10% were obtained. The accuracy of the method was evaluated using certified reference materials NIST 1515 apple leaves and NIST 1570a, spinach leaves and applying the paired t test at 95% confidence level there was not observed significant difference in concentrations obtained both CRMs. All the samples showed high concentration of Ca and K. Higher content of Cr was obtained for samples collected at Pojuca. Using PCA to classify the propolis produced in Bahia the results showed that there is a tendency to form a class consisting of propolis samples from the coast, and another class formed of propolis originated inland.

Keyword: própolis, bees, minerals, ICP OES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Indicação do local de coleta na colméia	32
Figura 2. Fluxograma do procedimento proposto em bloco digestor	42
Figura 3. Curvas de calibração por ICP OES para Cr, Cu, Fe, Mn e Zn em meio ácido diluído (4,4 mol L ⁻¹), branco digerido, em meio matriz (A), meio matriz (B) e meio matriz (C)	51
Figura 4. Curvas de calibração para potássio, no HR-CS-FAAS em meio ácido , em meio branco digerido , em meio matriz A em meio matriz B e em meio matriz C	62
Figura 5. Curvas de calibração para sódio, no HR-CS-FAAS em meio ácido, em meio branco digerido, em meio matriz A, em meio matriz B e em meio matriz C	62
Figura 6. Curvas de calibração para magnésio no HR-CS-FAAS em meio ácido em meio branco digerido em meio matriz A , em meio matriz B e em meio matriz C	63
Figura 7. Curvas de calibração para cálcio, no HR-CS-FAAS em meio ácido, em meio branco digerido , em meio matriz A , em meio matriz B e em meio matriz C	63
Figura 8: Mapa de divisão econômica do Estado da Bahia extraído do site SEI (Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia).	68
Figura 9: Resultados obtidos para Cu, Mn e Ni nas amostras coletadas em diferentes estações do ano, sendo Al/1, P/1, C/1 e Se/1 para o verão; Al/2, P/2, C/2 e Se/2 para o outono; Al/3, P/3, C/3 e Se/3 para o inverno e Al/4, P/4 e C/4 para a primavera	74

Figura 10: Resultados obtidos para Fe, Mg, Na e Zn para amostras coletadas em diferentes estações do ano, sendo Al/1, P/1, C/1 e Se/1 para o verão; Al/2, P/2, C/2 e Se/2 para o outono; Al/3, P/3, C/3 e Se/3 para o inverno e Al/4, P/4 e C/4 para a primavera.....	74
Figura 11: Teor ($\mu\text{g g}^{-1}$) de Ca, K, Mg e Na em amostras coletadas no Estado da Bahia	77
Figura 12: Teor ($\mu\text{g g}^{-1}$) de Ba, Cr, Cu e Ni em amostras coletadas no Estado da Bahia	77
Figura 13: Teor de Fe e Zn em amostras coletadas no Estado da Bahia	78
Figura 15: Modeling Power das variáveis	80
Figura 16: Gráfico de Scores correspondente a classificação de 28 amostras de própolis do Litoral Norte do Estado da Bahia.....	81
Figura 17: Gráfico de score e loading para amostras procedentes do Litoral Norte da Bahia	81
Figura 18: Gráfico de pesos: (a) variáveis X PC e (b) variáveis X PC2	82
Figura 19: Gráfico de score: PC 2 x PC1 para todas as amostras coletadas no Estado da Bahia.....	84
Figura 20: Gráfico de X-Loading: PC 2 x PC1 para todas as amostras coletadas no Estado da Bahia.....	84
Figura 20A: gráfico de pesos: (a) variáveis X PC 1 e (b) variáveis X PC2 para todas as amostras da Bahia.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Classificação da própolis bruta	3
Tabela 2.	Programa utilizado para decomposição de própolis em microondas com cavidade (MW)	27
Tabela 3.	Condições experimentais utilizadas no equipamento ICP OES com configuração axial	28
Tabela 4.	Condições experimentais utilizadas no equipamento HR-CSFAAS ..	29
Tabela 5.	Identificação, cor, data e local de coleta das amostras de própolis doadas por distribuidores e apicultores da região	30
Tabela 6.	Programa de mineralização para amostras de propolis bloco digestor	34
Tabela 7	Teores de macro e microelementos em $\mu\text{g g}^{-1}$ e seus respectivos desvios relativos, obtidos para amostra C, utilizando forno de micro-ondas doméstico, gral com pistilo e moinho criogênico para (n = 3).....	39
Tabela 8	Teores de Ca, K, Mg, Na, P, Al, Ba, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V e Zn por ICP OES, em amostra própolis utilizando PBD.(Teor médio \pm desvio padrão ; DPR< 10%,n=3)	41
Tabela 9.	Teores de Ca, K, Mg, Na, P, Al, Ba, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V e Zn por ICP OES, em amostra própolis utilizando PFM. (Teor médio \pm desvio padrão ; DPR< 10%, n=3)	44
Tabela10.	Inclinações das curvas analíticas para os elementos investigados nos diferentes meios em ICP OES com sistema V-groove-câmara Struman-Masters, procedimento PFM	46
Tabela 11.	Inclinações das curvas analíticas para os elementos investigados, nos diferentes meios, em ICP OES com sistema nebulizador seaspray-câmara ciclônica. Procedimento PFM	47
Tabela 12.	Limites de detecção e quantificação obtidos por ICP OES para PFM utilizou-se Sistema SP de introdução de amostras e PBD sistema com ranhuras em V-groove, (n= 10, RSD % < 10%)	53
Tabela 13.	Parâmetro das curvas analíticas obtidos por ICP OES para procedimentos de decomposição de amostras de própolis: PFM	54

Tabela 14.	Resultados obtidos para as recuperações dos elementos Ba, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V e Zn - teste de adição de analito em amostras de própolis (amostra A, B e C). média \pm desvio padrão, n = 3 e RSD \leq 10%. Procedimento PFM	56
Tabela 15.	Resultados obtidos para as recuperações dos elementos Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ba, Ni, Pb, V e Zn - teste de adição de analito em amostras de própolis (amostra A, B e C). média \pm desvio padrão, n = 3 e RSD \leq 5%. Procedimento PBD	57
Tabela 16.	Concentração de Ca, K, Mg, Na e P por ICP OES em amostras de própolis utilizando PBD, PFM e método recomendado pela AOAC. (teor médio \pm desvio padrão, $\mu\text{g g}^{-1}$, PDR < 10%, n=3)	58
Tabela 17.	Teores Al, Ba, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, V e Zn em, $\mu\text{g g}^{-1}$, por ICP OES utilizando os procedimentos PBD, PFM e recomendado pela AOAC. (teor médio \pm desvio padrão, n=3)	59
Tabela 18.	Comparação dos valores certificados de macro, micro elementos obtidos aplicando digestão em forno de microondas com cavidade ($\mu\text{g g}^{-1}$). (* valores não certificados)	60
Tabela 19.	Inclinações das curvas analíticas para K, Na, Mg e Ca em HR-CS FAAS construídas em diferentes meios	64
Tabela 19A.	Parâmetro das curvas analíticas obtidos por HR- CS FAAS	64
Tabela 20.	Resultados dos testes de adição e recuperação para Ca, K, Mg e Na em amostras de própolis após quantificação por HR-CS FAAS (média \pm desvio padrão, n=3)	65
Tabela 21.	Concentrações de Ca, K, Mg e Na em amostras de própolis empregando ICP OES e HR-CS FAAS. (Teor médio \pm desvio padrão; DPR < 10%, n=3)	66
Tabela 22A.	Concentração média de macro e micro elementos, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas amostras de própolis do Litoral Norte (n=3)	69
Tabela 22B.	Concentração média de macro e micro elementos, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas amostras de própolis na Região Oeste da Bahia (n=3)	70
Tabela 22C.	Concentração média de macro e micro elementos, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas amostras de própolis da Chapada Diamantina (n=3)	71

Tabela 22D.	Concentração média de macro e micro elementos, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas amostras de própolis do Extremo Sul e Recôncavo Sul (n=3).....	71
Tabela 22E.	Concentração média de macro e micro elementos, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas amostras de própolis da Região Sudoeste (n=3)	72
Tabela 23.	Variância (%) e variância acumulada (%) porcentagem para cada PC , obtidos por PCA das amostras procedentes do litoral Norte do estado da Bahia	82

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	Do Inglês: American Association of Official Analytical Chemists
AAS	do Inglês <i>Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de absorção atômica)
EBDA	Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola
HR-CS FAAS	do Inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry High Resolution Continuum Source</i> (Espectrometria de Absorção atômica com chama)
ET AAS	do Inglês <i>Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry</i> (Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica)
FAES	do Inglês <i>Flame Atomic Emission Spectrometry</i> (Espectrometria de Emissão atômica com chama)
ICP OES	do Inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> (Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado).
NIST	do Inglês National Institute of Standards and Technology
PFM	Procedimento de Decomposição em Microondas com Cavidade
PBD	Procedimento de Decomposição em Bloco Digestor
PR	Procedimento Referência Padrão
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
RSD	do Inglês <i>Relative Standard Deviation</i> (Desvio Padrão Relativo)
SP	sea spray nebulizer with a glass cyclonic Spray chamber (SP)
VG	V-Groove nebulizer with a Sturman Master Spray Chamber (VG)
SEI	Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia

SUMÁRIO

CAPITULO 1		
1.0.0	INTRODUÇÃO.....	1
1.1.0	Classificação da Própolis.....	2
1.2.0	Comercialização da Própolis.....	3
1.3.0	Objetivos	4
1.3.1	Objetivo Geral	4
1.3.2	Objetivos Específicos	4
CAPITULO 2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.0.0	PRÓPOLIS: Origem Botânica e Geográfica da Própolis	7
2.1.0	PROPOLIS: Propriedades Medicinais e Terapêuticas da Própolis	10
2.2.0	PROPOLIS: Propriedades Nutricionais.....	11
2.3.0	PRÓPOLIS: Legislação e Comercialização.....	13
2.4.0	Determinação da Composição Mineral em Própolis e Matrizes Similares.....	14
2.5.0	Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução Fonte Continua	18
2.6.0	Quimiometria	22
CAPITULO 3	PARTE EXPERIMENTAL	25
3.0.0	Parte Experimental	26
3.1.0	Reagentes e Soluções	26
3.2.0	Instrumentação	26
3.2.1	Procedimentos envolvendo sistemas abertos e pressurizados	26
3.2.2	Determinação dos analitos	27
3.3.0	Amostras	29
3.4.0	Sistema de coleta das amostras de própolis “in natura”	31

3.5.0	Procedimentos experimentais	33
3.5.1	Pré-tratamento das amostras de própolis	33
3.5.2	procedimentos para decomposição das amostras	33
3.5.2.1	Decomposição por aquecimento condutivo em forno mufla	33
3.5.2.2	Decomposição por aquecimento condutivo em bloco digestor	33
3.5.2.3	Decomposição Assistida em Forno de Microondas com Cavidade	34
3.6.0	Determinação da acidez final dos digeridos	34
3.7.0	Comparação de sistemas de introdução de amostras	34
3.8.0	Validação dos métodos propostos	35
3.8.1	Avaliação do efeito de matriz	35
3.8.2	Limites de detecção e quantificação	35
3.8.3	Avaliação da exatidão	36
CAPITULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES		37
4.0.0	Apresentação e discussão dos resultados	38
4.1.0	Sistema de Coleta das Amostras de Própolis In natura	38
4.2.0	Pré-tratamento das amostras de própolis	38
4.3.0	Avaliação dos procedimentos para decomposição	40
4.3.1	Decomposição em bloco digestor	40
4.3.2	Decomposição em forno de microondas com cavidade	42
4.4.0	Determinação de carbono residual e acidez final	44
4.4.1	Estudo de sistemas de introdução de amostras	45
4.5.0	Efeito do padrão interno	48
4.6.0	Validação dos procedimentos de decomposição para amostras de própolis	49
4.6.1	Avaliação do efeito de matriz ICP- OES.	50
4.6.2	Características dos métodos propostos	52
4.6.2.1	Avaliação da exatidão dos procedimentos propostos	55
4.6.2.2	Teste de Adição e Recuperação dos Analitos para ICP OES ..	55
4.6.2.3	Comparação com método de referência da OAC	58
4.6.2.4	Análise de material de referência certificado	60

4.7.0	Avaliação das potencialidades do HR-CS FAAS na determinação da composição mineral de amostras de própolis	61
4.7.1.0	Validação do método empregando HR-CS FAAS	61
4.7.1.1	Avaliação do Efeito de Matriz para a técnica HR-CS FAAS	61
4.7.1.2	Características analíticas empregando HR-CS FAAS	64
4.7.1.3	Avaliação da Exatidão do método empregando HR-CS FAAS	65
4.7.1.3.1	Teste de adição e recuperação dos Analitos para HR-CS FAAS	65
4.7.1.3.2	Comparação dos resultados do HR-CS FAAS e ICP OES	66
4.8.0	Avaliação da composição de elementos químicos presentes em amostras de própolis “ in natura” produzidas no Estado da Bahia	66
4.9.0	Análise quimiométrica	79
4.9.1	Análise por PCA para amostras de própolis da Região Econômica Litoral Norte	79
4.9.2	Análise por PCA para amostras de própolis do Estado da Bahia	82
4.10	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
CAPITULO 5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
5.0.0	Referências bibliográficas	88

CAPITULO 1

INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

Própolis é um produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, de brotos, flores e exsudados de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto que desempenha na colméia importantes funções dentre as quais se destaca a proteção contra a entrada de agentes patogênicos que podem exterminar com a colméia (BRASIL-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2001).

A composição química da própolis é muito variada, apresentando 55% em resinas e bálsamos, 30% em ceras, 10% em óleos voláteis e 5% em pólen. Os compostos químicos majoritários presentes são ácido benzóico, álcool, ácido cinâmico, benzaldeído, compostos terpênicos, ácido salicílico e flavonóides. A própolis também contém quantidade considerável de minerais, entre as quais, manganês, zinco, cálcio, fósforo, cobre, etc., vitaminas B1, B2, B6, C, E, ácido nicotínico, pantotênico e aminoácidos (BANSKOTA; TEZUKA; KADOTA, 2001)

Há relatos na literatura da utilização da própolis como medicamento. Os primeiros registros destes relatos remontam ao antigo Egito e à Mesopotâmia (CASTALDO; CAPASSO, 2002). Atualmente desde a década 80, este produto oriundo de abelhas, vem sendo largamente utilizado em suplementos alimentares e beberagens, como preventivo de enfermidades. É um produto que tem seu uso já disseminado por todas as camadas da população. Participa desde a formulação de um simples xarope para crianças até a formulação de um creme mais sofisticado para a pele. A própolis tem sua composição diretamente relacionada com o tipo de abelha e de vegetação onde é produzida. Dependendo da região pode conter até 400 substâncias químicas diferentes e por ser um produto exposto ambientalmente a probabilidade de contaminação, também, é maior (UESB-CPT, 2007).

1.1.0 CLASSIFICAÇÃO DA PRÓPOLIS

Com relação a classificação da própolis há um fator que deve ser considerado é o fato de cada mercado consumidor exigir padrões de classificação diferentes. Em alguns países como China, Japão e Malásia a tendência é a preferência por pedaços inteiro, sem serem amassados, com tamanhos maiores que 1,0 cm para melhor inspeção do produto. Para comercialização a própolis é classificada em sete categorias, visando às exigências do mercado externo, conforme mostrado na Tabela 1.

A classificação visual considera vários fatores como: remoção de impurezas, cheiro, odor, sabor, tamanho e frescor. A própolis considerada de primeira qualidade é granulada ou solta, em escamas ou em cavacos, livre de qualquer impureza e de aroma característico e agradável. A de segunda qualidade é a própolis coletada nos alvados, na tampa ou nas paredes da colméia livre de qualquer impureza e com aroma característico e agradável, enquanto que a própolis de terceira qualidade é aquela oriunda de raspagens dos quadros, tampas e paredes de colméias, apresentam excesso de poeira, pedaços de madeira, sem grânulos uniformes e resíduos de cera e abelhas.

Tabela 1: Classificação da Própolis Bruta.

Classificação	Tipo	Região de Origem
1 ^o .	“Ultra Green” (Verde clara)	Sul de Minas Gerais
2 ^o .	“Super Green” (Verde)	Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo
3 ^o .	“Standard Blend” (Verde)	Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Paraná.
4 ^o .	“Paraná Green” (Verde)	Paraná.
5 ^o .	“Brown Grade” (Marrom ou preta)	Indefinida
6 ^o .	“Especial Conap”	Paraná e Sudeste do Brasil.
7 ^o .	Própolis em pó.	Indefinida

Fonte: UESB, 2007, p. 34

1.2.0 COMERCIALIZAÇÃO DA PRÓPOLIS “IN NATURA”

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos visando avaliar os benefícios e novas formas de utilização da própolis, com resultados promissores. Assim a procura por esse produto “in natura” deverá aumentar tanto em nível nacional e internacional. Logo, visando adequar o produto para o mercado, bem como

preservar a saúde e bem estar da população torna-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes para fazer a adequada caracterização da própolis produzida no Estado da Bahia, em termos de sua composição mineral. Neste trabalho, a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) é atraente por ser robusta e apresentar baixo nível de radiação de fundo, baixo limite de detecção, análise multielementar rápida, ampla faixa de calibração e poucas interferências (SKOOG et al, 2006). Outra técnica bastante atraente é a espectrometria de absorção atômica com atomização em chama e fonte contínua com alta resolução (HR-CS FAAS), principalmente para a determinação de elementos essenciais, tais como cálcio, potássio e mágnesio, por ser de fácil implementação em análise de rotina, ter baixo custo operacional e apresentar sensibilidade adequada para a determinação desses elementos (BORGES; CURTIUS; WELZ, 2005).

1.3.0 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar estratégias analíticas para determinação de elementos essenciais e não essenciais em amostras de própolis “*in natura*” produzidas em apiários instalados no Estado da Bahia.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Otimizar e comparar diferentes procedimentos de preparo de amostras de própolis empregando aquecimento condutivo e assistido por radiação microondas;
- Acompanhar a eficiência de decomposição dos diferentes procedimentos através da análise dos digeridos por ICP OES e determinação do teor de carbono residual e acidez dos digeridos.
- Avaliar os métodos selecionados através do estabelecimento dos parâmetros de desempenho: limites de detecção e de quantificação, faixa linear dinâmica, efeito de matriz, testes de adição e recuperação, interferentes, precisão e exatidão.

- Determinar os teores de elementos essenciais e não essenciais nas amostras coletadas empregando ICP OES e HR-CS FAAS.
- Aplicar ferramentas quimiométricas para classificar amostras de própolis produzida no Estado da Bahia.

CAPITULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão apresentados alguns aspectos sobre a própolis com relação a suas características botânicas, geográficas, medicinais, bem como, estudos desenvolvidos para determinar sua composição mineral, em termos de procedimentos para pré-tratamento de amostras de própolis e mel.

2.0.0 PRÓPOLIS: Origem Botânica e Geográfica da Própolis

A composição orgânica e inorgânica da própolis, a forma como estes compostos chegam até a própolis, quais as plantas que contribuem para que ocorra a presença destes compostos são questionamentos que acompanham os estudiosos desde o início do século passado.

Hoje, sabe-se que várias substâncias presentes na própolis provêm de flores, ramos, brotos, exsudatos e de outras partes do tecido vegetal. Estas substâncias podem ser modificadas na colméia pela adição de secreções salivares. Ainda, deve-se considerar que a associação da origem botânica aos fatores climáticos do local de produção implica diferenças marcantes, tanto no aspecto qualitativo como quantitativo da composição química do produto final (JÉANNE, 1984, GREENAWAY et al, 1990; CHENG; WONG, 1996).

Ghislbert em sua revisão apresentou trabalhos pioneiros que visaram relacionar a origem botânica da própolis que foi produzida no oeste dos Estados Unidos. Entre estes trabalhos destacam-se os seguintes conclusões: Helfenberg(1908) observou que as abelhas coletavam própolis de ramos, folhas e brotos de *Betula* spp. (Betulaceae), *Fraxinus* spp. (Oleaceae), *Ulmus* spp. (Ulmaceae) e árvores de bálsamo. A primeira indicação de que a própolis seria obtida, também, de *Populus nigra* var. *pyramidalis*, família Salicaceae, foi efetuada por Jaubert, em 1926. Posteriormente, Vansell e Bisson (1940) concluíram que também a própolis do oeste dos Estados Unidos era originária de gemas de *Populus nigra*, além de *Alnus viridis* (Betulaceae) (GHILSBERT, 1999).

Popravko e colaboradores, citado por König, afirmaram que espécies de *Populus*, que é um tipo de vegetação que abrange América do Norte, Europa, norte da África e regiões não-tropicais da Ásia, incluindo oeste da China e Coréia (de nome vulgar choupo ou álamo) são fontes principais de própolis na Europa, sendo *Betula* spp., *Quercus* spp. (Fagaceae), *Alnus* spp., *Salix* spp. (Salicaceae) e *Corylus avellana* (Corylaceae, aveleira) de importância secundária. Todavia, na Rússia

central, segundo o autor, *Betula* parece predominar em relação à *Populus* como fonte de própolis (KONIG, 1985)

Popravko descreveu a importância das secreções de gemas de *Betula* (que ocupa grande superfície de bosques de zonas temperadas) para a planta e, provavelmente, também para as abelhas que as coletam. O autor concluiu que a natureza das substâncias presentes nas gemas era equivalente àquelas presentes na própolis (basicamente: hexabiterpenos, ácidos aromáticos e flavonóides). Segundo o autor, as secreções das gemas exercem papel essencial no sistema de defesa do vegetal, apresentando notável atividade biológica contra microorganismos fitopatogênicos, como fungos (POPRAVKO, 1976).

Nagy e colaboradores afirmaram que na Hungria, as principais fontes de própolis são: *Acacia* (Fabaceae), *Betula* (Betulaceae), *Populus* (Salicaceae), *Pinus* (Pinaceae), *Prunus* (Rosaceae), além de espécies como *Aesculus hypocastane* (Hippocastanaceae), de onde as abelhas fazem coletas em gemas ainda fechadas, (NAGY; PAPAY; LITKEY, 1985).

De acordo com Bonvehi e Coll, as principais fontes de resinas do Hemisfério Norte são: *Aesculus hippocastanum*, *Betula* spp., *Fraxinus* spp., *Picea* spp., *Pinus* spp., *Populus* spp., *Quercus* spp., *Salix* spp. e *Ulmus* spp. Na Albânia, *Populus nigra* e *Populus canadensis* são principais fontes de matéria prima para a própolis. Avaliando amostras de própolis oriundas do Uruguai e apenas uma amostra originária do Brasil, empregando análises espectrométricas, encontraram diferenças no padrão de flavonóides das amostras o que foi suficiente para discriminar a origem geográfica. No entanto, os autores não esclareceram de que forma foram correlacionados os resultados químicos das amostras com suas origens botânicas e afirmaram que as seguintes espécies (*Araucaria heterophylla*, Pinaceae) contribuíram para essa classificação (BONVEHÍ; COLL, 1994).

Em regiões tropicais, em especial no Brasil, devido a grande diversidade de flora, é um desafio traçar o perfil botânico da própolis. O País é recordista em termos de biodiversidade, detendo cerca de 20% das espécies do planeta. Aproximadamente 55.000 espécies de plantas estão catalogadas em território nacional, de um total estimado entre 350.000 e 500.000 espécies (TEIXEIRA et al., 2002).

Bankota e colaboradores por meio de comparações dos resultados de análises químicas efetuadas em amostras de própolis e informações da literatura de

constituintes químicos presentes em diversas espécies vegetais, sugeriram que *Baccharis* spp. seria uma importante fonte de própolis no Brasil, além de *Clusia minor*, *Clusia major* (BANSKOTA et al, 1998).

Tomas-Barberán e colaboradores constataram a presença de benzofenonas polipreniladas em amostras de própolis oriundas da Venezuela e as principais fontes destes compostos na própolis eram provenientes da *Clusia minor* e *Clusia major* (Guttiferae) (TOMÁS-BERBERÁN; GARCIA –VIGUERA; VITOLIVER, 1993).

A própolis brasileira produzida no cerrado, rica em derivados prenilados do ácido-p-cumárico, a própolis verde, tem como principal fonte vegetal à espécie de *Baccharis dracunculifolia* D.C., possuindo uma coloração característica que é utilizada pelos japoneses para sua rápida identificação no processo de comercialização (PARK et et, 2004).

A origem botânica dos principais tipos de própolis brasileiras produzidas por abelhas *Apis mellifera* africanizadas foram classificadas e analisadas por Alencar. foram coletadas 201 amostras de própolis nas regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste e 47 amostras de mel das regiões das regiões Nordeste, Sul e Sudeste do Brasil. Foi utilizado para as análises espectrofotometria na região UV-visível e cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE). Com os resultados foi possível classificar a própolis em 12 grupos distintos. As diferenças na composição química dos grupos de própolis foram detectadas pelas técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massas (CGEM). Em um grupo de amostras há presença do éster do ácido dimetil dialil caféico, o qual é um composto altamente alergênico e comumente encontrado em própolis de climas temperados. Outro grupo de amostras apresentaram uma composição química distinta dos demais grupos, principalmente pela completa ausência de flavonóides (ALENCAR.; 2002).

Sousa e colaboradores realizaram análises para o controle de qualidade físico-químico de amostras de própolis, provenientes de seis diferentes locais situados nas microrregiões de Franca (SP) e Passo (MG), bem como verificaram a qualidade deste produto para o consumo humano e selecionaram regiões produtoras de própolis verde. Neste trabalho o teor de flavonóides totais nas tinturas obtidas com esta própolis foi determinado por espectrofotometria de absorção molecular utilizando-se cloreto de alumínio ($AlCl_3$) como reagente de deslocamento, de acordo com a metodologia descrita por Woisky (1996). Os resultados apresentados

demonstram que a própolis produzida naquela região está dentro dos padrões de qualidade e que existe uma estreita relação entre *Apis mellifera* e *B. dracunculifolia* na produção de própolis verde. Contudo, em havendo a presença de *B. dracunculifolia*, *A. mellifera* produz, preferencialmente, própolis verde, independentemente da época do ano ou do estágio de crescimento da plantas (SOUSA et al, 2007).

Nascimento e colaboradores avaliaram a presença de marcadores químicos em amostras comerciais de extratos etanólicos de própolis. A detecção foi feita por cromatografia gasosa e foi isolado um marcador químico (MQ) volátil para a própolis do alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). Trata-se do composto 3-prenilcinamato de alila presente somente em própolis proveniente de regiões que possuem a planta alecrim-do-campo. Tal descoberta facilita o rápido controle de qualidade de extratos etanólicos de própolis verdes (NASCIMENTO et al, 2008).

2.1.0 PROPOLIS: Propriedades Medicinai s e Terapêuticas da Própolis.

Na literatura há trabalhos que relatam e correlacionam as características curativas da própolis com a presença de inúmeros compostos orgânicos presentes, nesta matriz. Essas propriedades medicinais e terapêuticas têm sido constatadas em vários estudos realizados no Brasil e no exterior (KUMAZAWA et al, 2004; FUKUDA et al., 2006).

Banskota e colaboradores avaliaram as propriedades hepatoprotetoras e antibactericida de constituintes da própolis brasileira, em extratos alcoólicos. O resultado indicou que a atividade hepatoprotetora do extrato alcoólico da própolis do cerrado brasileiro é devido principalmente a compostos fenólicos, incluindo flavonóides (BANSKOTA et al., 2000).

Menezes e colaboradores utilizaram 14 extratos hidroalcoólicos de própolis de origem brasileira. Testaram a atividade antiinflamatória, em camundongos, induzidos pelo ácido araquidônico. Observaram que os flavonóides e compostos relacionados agem como inibidores da peroxidação do ácido araquidônico estando, portanto, envolvidos no processo antiinflamatório. Além disso, observaram que associados a anti-inflamatórios esteróides e ácido acetil salicílico podem agir sinergicamente sobre atividade antiinflamatória (MENEZES; ALVAREZ; ALMEIDA, 1999).

Em 1997, Volpi e Bangozini aplicaram cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa para determinar componentes fenólicos em extratos alcoólicos e concluíram que cromatografia gasosa nas condições experimental proposta é valiosa para a análise qualitativa e quantitativa de um dos componentes mais relevantes da própolis. Esta análise constitui uma alternativa para obter impressões típicas de própolis e de uma identificação de um grande número de componentes polifenólicos na própolis (VOLPI; BERGONZINI, 2006).

Atividade fungicida da própolis foi demonstrada em *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida gilliermondi*, em pessoas acometidas de estomatites (OTA et al., 2001).

Marcucci e colaboradores utilizando as técnicas de espectrometria de massa (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN) isolaram e identificaram os compostos (1) 3-fenil-4-ácido hidroxicinâmicos (PHGA), (2) 2,2-dimetil-6-carboxyethenyl-2H-1-benzopirano (DCBEN), (3) 3,5-difenil-4-ácido hidroxicinâmicos Total (PCT), e (4) 2,2-dimetil-6-carboxyethenyl-8-fenil-2H-1-benzopirano (DPB), na própolis brasileira. Todos os compostos foram testados contra *Tripanossoma cruzi* e bactéria *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus faecalis*. Os quatro compostos foram ativos contra *T. cruzi*. Com exceção do composto 3-fenil-4-ácido hidroxicinâmicos (PHGA), os demais compostos apresentaram atividade contra as bactérias testadas. Avaliaram, também, soluções com etanol, soluções hidro-alcólicas e extratos aquosos da própolis como agentes no tratamento de *trypanosoma*. Masterov e Nersesian, em 1995, avaliaram a atividade da própolis em doenças pulmonares crônicas não específicas (MARCUCCI et al., 2001).

Várias estudos têm sido realizados comprovando a atividade da própolis como: Cardioprotetores (CHOPRA et al., 1995), em ferimentos orais e da pele (PARK et al., 1998), no tratamento local de doenças reumáticas (SIRO et al., 1996), em doenças reprodutivas animais (SANTOS, 1999), como hepatoprotetor (BASNET et al., 1996; BANSKOTA et al., 1998) e antimicrobiano (SFORCIN et al., 2000; MARCUCCI et al., 2001).

Na Argentina, pesquisas com a própolis proveniente de La Banda demonstraram atividade microbiológica contra bactérias gram-positivas, principalmente *Streptococcus pyogenes* (MIC = 7,8 µg-mL⁻¹) (NIEVA MORENO et al., 1999).

Estudos demonstram que a própolis brasileira que é produzida a partir de resinas coletadas da planta *Baccharis dracunculifolia* apresenta elevada concentração de arteplina C e atividade anti-câncer (FREIRE, 2000).

Ainda há muito que se descobrir sobre a própolis, principalmente a própolis brasileira. No Brasil, país de grande extensão territorial, clima tropical e vegetação muito diversificada, pode-se produzir própolis de composição variada, pois, a composição da própolis está diretamente relacionada com o clima, vegetação e tipo de abelha que a produz.

2.2.0 PRÓPOLIS: Propriedades Nutricionais

A própolis apresenta consideráveis quantidades de substâncias minerais, entre as quais, manganês, zinco, cálcio, fósforo, cobre etc., vitaminas B1, B2, B6, C, E, ácidos nicotínico, pantotênico e aminoácidos todos já comprovados. Elementos como: alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, magnésio, silício, titânio e zinco também estão presentes na própolis (CONAPIS, 2008). Vitaminas, como as provitaminas A e todas do complexo B. Flavonóides e ésteres cafeinados. A quantidade de cada um desses elementos depende da flora utilizada pelas abelhas. A variabilidade genética das rainhas, também influencia na composição química da própolis. A importância destes elementos na própolis está relacionada as funções nutricionais que estes macro e micro elementos desempenham no organismo humano, sendo indicador da utilização deste produto como suplemento alimentar.

Ferro, Cr, Co, Cu, I, Mn, Mo, Se e Zn são elementos conhecidos como essenciais e Ni, Si, Sn, V e F vem sendo estudados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) com a finalidade de se determinar sua essencialidade. Ainda de acordo com a OMS, os elementos Ca, K, Mg, P, Fe, Zn, Mn, Cu, Mo, Cr e Co são minerais essenciais para funcionamento do metabolismo humano. Como exemplos, podemos citar: o elemento Ca, que é geralmente encontrado em todo o tecido animal, apresenta diversas funções, como o controle da transmissão de impulsos nervosos, da ação muscular, da coagulação do sangue e da permeabilidade celular (HARDMAN; LIMBIRD, 2001; RAMALHO, 1998). A deficiência dos valores de cálcio no sangue caracteriza a hipocalcemia o que pode resultar de algumas patologias (insuficiência das paratireóides, raquitismo) ou devido a redução da absorção do cálcio e vitamina D. O elemento Fe que faz parte da constituição da hemoglobina e mioglobina, bem como de um grande número de enzimas. Já o elemento Zn

participa da síntese de degradação dos carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos e o Mn funciona um ativador e constituinte de várias enzimas (OMS, 1998).

2.3.0 PRÓPOLIS: Legislação e Comercialização

A própolis ao longo dos anos tem sido utilizada pelas populações por suas propriedades terapêuticas e somente nas últimas décadas é que se intensificaram os estudos científicos visando comprovar essas propriedades. De maneira geral, a população utiliza a própolis como complemento alimentar e como medicamento, a OMS estima que 65 a 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional como sua primeira forma de cuidado com a saúde, sendo assim, o controle de qualidade deve abranger todas as fases de manipulação da própolis.

Para todo e qualquer produto destinado ao consumo existe uma legislação específica a ser seguida na composição dos rótulos. A composição e a concentração do produto devem estar de acordo com os valores colocados nos rótulos. Somente produtos registrados no Ministério da Saúde (MS) podem conter bula ou indicação terapêutica e aqueles registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) recebem o código de Serviço de Inspeção Federal (SIF) e só devem ser comercializados como complemento alimentar e não podem conter indicação terapêutica (PRÓPOLIS BRASILEIRA, 2005).

É uma tendência mundial estabelecer critérios de comercialização e determinação de uma qualidade padrão para a própolis in natura e purificada. Ainda não foi definida uma legislação oficial nem um padrão para própolis “in natura” ou para extrato em relação ao controle de qualidade. Apenas alguns países como a Rússia e Japão tem mostrado uma maior preocupação com esse assunto (MUNN, 1998). No Japão são utilizados vários parâmetros diferentes, dependendo da empresa ou da associação responsável (não oficial), mas não há padronização de parâmetros ou de valores para cada variável.

Na Inglaterra, em 1999, a HFMA (Heath Food Manufactures' Association) estabeleceu um critério para determinar uma qualidade padrão da própolis in natura e purificada. Dentre esses critérios são considerados aparência, cor, propriedades organolépticas, flavonóides e pureza.

No Brasil, os produtos apícolas são registrados no Ministério da Agricultura e apresentam legislações específicas como o Regulamento Técnico de Identidade e

Qualidade do Mel (Instrução Normativa n.11, de 20 de outubro de 2000) (BRASIL-2001) e o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade dos outros Produtos Apícolas (Instrução Normativa n. 3 de 19 de janeiro de 2001) dentre os quais se inclui a própolis (BRASIL, 2001). A proposta do Ministério da Agricultura elaborada dispõe os requisitos mínimos de qualidade a que deve atender a própolis. Essa norma contempla a própolis in natura e o extrato alcoólico, com uma classificação segundo o teor de flavonóides, as características sensoriais (aroma, sabor, consistência e granulometria), os requisitos físico-químicos (umidade, cera, cinzas, compostos fenólicos, flavonóides e oxidação) e as provas qualitativas (ausência de contaminantes de origem sintética e aditivos, e critérios de qualidade higiênica sanitária). O Ministério da Agricultura propõe alguns procedimentos para determinação de elementos químicos em alimentos, portanto é necessário o desenvolvimento de procedimentos analíticos para determinação de macro e micro nutrientes na própolis. Para caracterização da própolis, em termos da sua composição mineral, há muito para ser feito, por isso, é grande o interesse analítico no estudo desta matriz.

2.4.0 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL EM PRÓPOLIS E MATRIZES SIMILARES

Há na literatura poucos estudos visando determinar a composição mineral da própolis. Assim, para realização deste trabalho, levou-se em consideração procedimentos que foram propostos para outras matrizes similares como: mel, biodiesel, óleos e alimentos.

Em muitos casos, dependendo da técnica selecionada, as amostras devem passar por uma etapa de decomposição. Geralmente esta etapa envolve mistura de ácidos ou reagentes altamente oxidantes. Ácido nítrico é o mais utilizado e em alguns casos quando combinado com ácido sulfúrico, gera uma mistura mais agressiva, ideal para decomposição de compostos orgânicos mais resistentes. Em alguns dos trabalhos descritos abaixo, foi proposto o uso de radiação microondas porque apresenta vantagens relacionadas ao tempo de digestão, quantidade de reagentes e diminuição no risco de contaminação (NOBREGA; COSTA; SANTOS, 2002).

Conti e Botré, em 2001, avaliaram a abelha e seus produtos (cera, pólen, e própolis), como possíveis indicadores de contaminação ambiental. Neste estudo,

empregando a espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) foram determinados os elementos Cd, Cr e Pb. Amostras de própolis, pólen, cera e abelhas foram mineralizadas empregando forno de microondas com cavidade. Para determinar Cd e Pb utilizou-se como modificador químico monofosfato hidrogênio de amônio e para determinar Cr utilizou-se nitrato de magnésio. A própolis foi definida como um bom indicador de poluição ambiental, reforçando que este insumo está sujeito a contaminação por elementos Cd, Cr e Pb.

Do mesmo modo, a mineralização para vegetais, plantas medicinais e seus extratos aquosos, alimentos em geral, água, dentre outros já foram realizados.

Em trabalho desenvolvido por Villanueva, Abellán e Rodriguez foram determinadas as concentrações de K, Ca, Na e Mg em tabletes de cereais, cápsulas, ampolas e xaropes contendo própolis, que foram adquiridos em lojas de Madrid. As formulações sólidas foram misturadas e incineradas a 450 °C, depois as cinzas foram retomadas com solução de HCl e HNO₃ 50% e o volume final ajustado para 50 mL. As determinações foram feitas por espectrometria de absorção atômica com chama ar-acetileno (F AAS). Os resultados obtidos demonstraram que as formulações contendo própolis possuem maiores concentrações de potássio e magnésio e as cápsulas com própolis apresentaram maiores concentrações de Ca (VILLANUEVA; ABELLAN; RODRIGUES, 1999).

Sales e colaboradores avaliaram três diferentes métodos de coleta de própolis: (1) tradicional que consiste da rasgagem da própolis numa tampa de madeira, (2) uso de telas descontaminadas e (3) placas com ranhuras que estimularam as abelhas a propolizar entre as ranhuras. O pré-tratamento da própolis consistiu da pesagem de 5,0 g de própolis e incineração em forno mufla a 400 °C por 4 h, depois as cinzas foram dissolvidas em 10 ml de ácido nítrico 20% v v⁻¹, foram filtradas e o volume final ajustado para 50 ml com água desionizada. As determinações foram feitas por GF AAS e espectrofotometria no UV-Vísivel. Os resultados demonstraram que o método de coleta com telas é o mais aconselhável (SALES et al.; 2006).

Santana em 2003 desenvolveu metodologia de análise para determinar a presença de contaminantes metálicos, macroelementos e oligoelementos na própolis in natura e em extratos. Os elementos pesquisados foram: Cd, Ca, Pb, Cu, Cr, Mg, Mn, Hg, Ni e Zn. Para a decomposição das amostras foi utilizado forno de microondas com cavidade. Para o preparo das amostras de própolis utilizou-se a

quantidade em 1,0 g (hidroalcoólicos ou *in natura*), pesados diretamente nos frascos de reação e adicionou-se 4,0 mL de ácido nítrico concentrado. O programa de aquecimento proposto foi: 5 min, a 250 W (etapa 1); 2 min a 500 W (etapa 2); 4 min a 800 W (etapa 3) e finalmente ajustados para 000 W por 4 min. As amostras digeridas foram transferidas para frascos de polietileno, com enxágües de 3 mL de água desionizada e o volume completado para 10 mL com água desionizada. As determinações foram realizadas em espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS) e espectrofotometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) e espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos (SANTANA, 2003).

Em 2008, Santana e colaboradores determinaram a concentração de Ca e Mg em extratos etanólicos de própolis, utilizando nas determinações a técnica F AAS. Pesou-se a massa de 0,6 g do extrato e adicionou-se 4,00 mL de ácido nítrico (65 % m⁻¹) e submeteu ao procedimento de decomposição com aquecimento por radiação microondas seguindo o programa de aquecimento: 1^a. etapa 250 W/ 5 min.; 2^a. Etapa 500 W/ 2 min.; 3^a. Etapa 800 W/ 4 min e ventilação.

Iliskander determinou os elementos Br, Co, Cr, Fe, K, Na, Rb, Sb, SC, Se, SM, Zn, e Zr em amostras de mel produzidas em áreas recuperadas de uma mina de urânio no Texas, aplicando a técnica de análise por ativação por nêutrons. Esta técnica apresenta baixos limites de detecção, mas o alto custo ainda é um fator limitante da aplicabilidade da análise por ativação por nêutrons na determinação de elementos químicos em trabalhos de rotina (IISKANDER, 1996).

Lachaman e colaboradores determinaram Al, B, Ca, Cu, Mg, Mn, Ni e Zn em amostras de mel originárias da República Checa. Avaliou-se o teor de minerais em colheitas feitas no período de 2003 e 2004. O mel foi digerido utilizando ácido nítrico 65%, ácido clorídrico 37%, peróxido de hidrogênio e água desionizada. Os analitos foram determinados por FAAS e ICP OES em condições robustas. Os autores compararam amostras de mel provenientes da República Checa com as de mel de outras partes do mundo e constataram que os méis da republica Checa apresentaram elevadas concentrações de níquel (LACHMAN et al., 2007).

Mendes e colaboradores, desenvolveram métodos para a quantificação de constituintes inorgânicos em mel, usando-se digestão assistida por radiação microondas e banho de ultra-som e determinações por ICP OES. No estudo foram considerados aspectos como a complexidade da matriz, otimização instrumental e essencialidade/toxicidade das espécies K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Ni, Pb e

Cd. A decomposição assistida por microondas consistiu da pesagem de 1,0 g de mel e uma mistura de 2,0 mL de HNO₃, 2,0 mL de H₂O₂ 30% (v/v) com 0,5 mL de ítrio (100,0 mg L⁻¹). Foram obtidas recuperações entre 93 e 107% (digestão assistida por microondas) e entre 90 e 110% (banho de ultra-som) com desvios-padrão relativos menores do que 10%. Amostras de mel brasileiro, procedentes de diferentes Estados, foram analisadas para obtenção de informações sobre o seu conteúdo mineral. Através do estudo de 69 amostras de mel de abelha foram determinados os teores de K, Ca, Mg, Mn, Zn, Fe (MENDES et al., 2006).

Szoboszlai e colaboradores determinaram As, Cd, Cr, Cu, and Pb em vários tipos de méis. As amostras foram analisadas direta e indiretamente, ou seja, com e sem etapas de decomposição. As determinações foram feitas utilizando GF-AAS. O procedimento de digestão consistiu da pesagem de 1,0 g de mel e adicionou-se uma mistura de 5 mL HNO₃ e 1 mL H₂O₂. Esta mistura foi submetida ao procedimento de digestão em microondas com cavidade. Os méis que não foram submetidos ao procedimento de digestão foram sonicados antes das determinações. Para amostras que foram tratadas com HNO₃, H₂O₂ os resultados mostraram que houve diminuição do sinal analítico para Arsênio. A faixa de concentração de Cu nas amostras variou de 35 a 445 ng g⁻¹ (SZOBOSZLAI, 2007).

Foram desenvolvidos na Turquia, estudos para determinar a concentração de Cd, Pb, Fe, Mn, Cu, Ni, Cr, Zn, Al e Se em amostras de mel empregando FAAS e GFAAS. Neste estudo avaliaram diferentes procedimentos de digestão. Microondas com cavidade(1), incineração das amostras com posterior retomada das cinzas com mistura de ácidos(2) e amostra seca (3). O procedimento utilizando microondas com cavidade consistiu da pesagem de 1,0 g de mel e adicionou-se 3,0 mL de HNO₃ (65%) e 1 mL de H₂O₂ (30%) e aplicou-se o seguinte programa de digestão: 2 min por 250 W, 2 min por 0 W, 6 min por 250 W, 5 min por 400 W, 8 min por 550 W, ventilação: 8 min. (SILICI, 2007).

Baralkiewicz e Madejczyk, avaliaram o teor dos elementos Al, B, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn em 30 amostras de mel de diferentes regiões da Polônia, empregando FAAS e ICP-MS para as determinações. A etapa de pré-tratamento consistiu da pesagem de 1,0g de mel em frascos PTFE e adicionou-se 10 ml de ácido nítrico concentrado. A mistura foi submetida ao programa de digestão em microondas com cavidade. Os resultados obtidos demonstraram que K é o elemento encontrado em maior quantidade 1233 mg kg⁻¹ entre as amostras de mel.

Na, Mg e Ca estão presentes na faixa de concentração: 0.38–89.6mgkg⁻¹; 0.07–19.83mgkg⁻¹;3.3–159.2 mg kg⁻¹ (BARALKIEWICZ; MADEJCZYK, 2008).

As concentração dos elementos Zn, Cu, Fe, Mn, Cd, Na, K, Ca e Mg foram determinadas em 123 amostras diferentes de méis originários de diferentes regiões da República da Macedônia. Foram pesadas aproximadamente 0,5 g de mel e transferidos para vasos PTFE. Adicionou-se 2,0 mL de HNO₃ concentrado e 2,0 mL de H₂O₂ (30%, m/v) e a mistura foi submetida ao seguinte programa de aquecimento: 500 W/ 5 min para 180°C; 0 W/ 2 min; então 500 W/ 10 min até 180°C. Nas amostras analisadas a média da concentração dos elementos contidos foram: 2,25, 0,69, 1,88, 1,75, 0,04, 29,52, 984,8, 40,11, 18,24 mg kg⁻¹ para Zn, Cu, Fe, Mn, Cd, Na, K, Ca e Mg, respectivamente (STANKOVSKA; STAFILOV; SAJN, 2008).

2.5.0 ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA DE ALTA RESOLUÇÃO COM FONTE CONTINUA.

Empregada na determinação de elementos traço a técnica de espectrometria de absorção atômica é utilizada atualmente. Baseada na absorção de radiação eletromagnética, de comprimento de onda específico, por átomos em seu estado neutro, fundamental, nesta técnica, a fonte de emissão de radiação específica (LS AAS) é quase exclusivamente utilizada o que implica que apenas a linha do elemento que se deseja determinar é emitida pela fonte, o que de certa forma traz certos inconvenientes como a necessidade de uma fonte para determinar cada elemento. A substituição das fontes de emissão de linhas por uma fonte de emissão contínua tem sido um desafio desde os primeiros experimentos envolvendo o fenômeno de absorção atômica realizados no século XIX. Mas atualmente o uso da fonte contínua em espectrometria de absorção atômica representa uma alternativa viável nas determinações de elementos traços em diversos tipos de matrizes.

Em HR-CSAAS, o equipamento é composto de uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta pressão (15 bar, quando fria), operando em modo de emissão que compreende a faixa contínua entre 190 e 850 nm. A lâmpada é aplicada uma potência de 300 W, e é constituída por dois eletrodos de tungstênio com uma distância de 1 mm entre eles. Estas características físicas permitem que a intensidade de emissão da lâmpada de xenônio exceda a de uma lâmpada de cátodo oco em pelo menos 1 a 3 ordens de magnitude. A lâmpada de xenônio tem

seu posicionamento ajustado por computador garantindo que o feixe de radiação esteja constantemente incidindo no centro do atomizador e, portanto, na fenda de entrada do monocromador. O uso de um monocromador duplo de alta resolução denominado DEMON (Double-Echelle Monochromator) fornece a alta resolução do intervalo espectral selecionado, que é melhor que 2pm por pixel (unidade fotossensível do detector) em 200nm (HEITMANN et al., 1996).

Nestes equipamentos os detectores são constituídos por um arranjo linear de dispositivos de carga acoplada (CCD), similar aos dispositivos utilizados em câmeras fotográficas digitais, sensível na região do UV. Isso permite o acesso a uma série de informações que não são possíveis em instrumentos convencionais. O equipamento opera de fato com 512 detectores completamente independentes, porque cada pixel é equipado com um amplificador individual, o que significa que todo ambiente espectral $\pm 200\text{pm}$ ao redor da linha analítica na região do ultra-violeta e até $\pm 500\text{pm}$ na região visível do espectro torna-se "visível", fornecendo informações importantes. Em HR-CS AAS é possível visualizar os dados das seguintes maneiras: (i) No gráfico de tempo(s) X Absorvância; (ii) o sinal de absorvância integrada versus comprimento de onda, que permite visualizar qualquer absorção de radiação que tenha ocorrido no intervalo espectral em análise e (iii) a imagem tridimensional, que mostra a absorvância como função do tempo e do comprimento de onda é o modo visualmente mais interessante de representação do potencial do HR-CS AAS no que diz respeito à visualização do ambiente espectral (WELZ et al., 2005).

Em HR-CS AAS utiliza-se o conceito de feixe duplo simultâneo, que é possível devido ao detector CCD do instrumento. Então os 200 pixels podem ser considerados detectores independentes e isto permite corrigir efeitos como flutuações de intensidade da lâmpada, uma vez que tais flutuações afetam todos os pixels da mesma maneira mesmo as flutuações mais rápidas na intensidade de emissão serão perfeitamente corrigidas.

O sistema de feixe duplo simultâneo também é capaz de corrigir qualquer mudança temporal na transmissão da radiação como, por exemplo, nos gases da chama. A ausência de componentes ópticos adicionais no HR-CS AAS, que são requeridos para o sistema de feixe duplo em instrumentos de LS AAS, faz com que a condutância óptica seja consideravelmente superior, o que auxilia na obtenção de uma excelente razão sinal/ruído (BORGES et al., 2005).

Para este novo conceito instrumental, diversas vantagens podem ser citadas e entre elas podemos destacar: uso de uma única fonte de radiação para todos os elementos cuja determinação é possível por AAS; Sistema de feixe duplo simultâneo, capaz de corrigir flutuações de intensidade da lâmpada e na transmissão de radiação, sem prejuízo à razão sinal/ruído; possibilidade de realização de determinações multielementares, com emprego de um detector adequado; análise multielementar sequencial rápida automatizada com atomização em chama (ContrAA 300); alta intensidade de emissão da lâmpada de arco curto de Xe; ausência de “linhas fracas”, uma vez que a emissão é contínua e a intensidade é aproximadamente uniforme nas diversas regiões do espectro UV-Vis; toda a região espectral na vizinhança da linha analítica torna-se visível, permitindo obter mais informações, por exemplo a respeito do fundo, indisponíveis em aparelhos convencionais de AAS; correção simultânea do fundo nas proximidades da linha analítica; o programa de computador permite o processamento total pós-leitura dos sinais, selecionar pixels de referência adequados e definir limites de integração; possibilidade de armazenar espectros de referência de absorção de fundo causada por moléculas com estrutura fina, para subtração do espectro da amostra através de um algoritmo de mínimos quadrados; correção automática para todos os eventos contínuos, como absorção molecular e outros fenômenos em banda larga como emissão do atomizador; faixa de calibração com variação de até cinco ordens de grandeza e melhor desempenho analítico na determinação de elementos traço em amostras complexas (WELZ et al., 2005).

Na literatura são encontrados alguns trabalhos para diferentes amostras, empregando a técnica HR-CS AAS. Raposo Júnior e colaboradores, em 2008 propuseram o emprego da técnica HR-CS FAAS para a determinação de elementos traço em extratos de DTPA de amostras de dois materiais de referência de solos. Em outro trabalho Gumes e colaboradores, em 2009, avaliaram o desempenho da técnica na determinação de Mn e Pb em diferentes extratos de solos, e os resultados obtidos foram validados por comparação com os determinados por ICP OES. Eles concluíram que a técnica HR-CS FAAS pode ser utilizada para a determinação multielementar sequencial destes elementos, em uma análise de rotina. As vantagens estão relacionadas ao menor custo da instrumentação e de operação e as limitações são o maior consumo da amostra, devido ao maior volume de amostra aspirado e a menor frequência analítica.

Em 2008, Amorim Filho e Gomes Neto validaram os procedimentos de decomposição por microondas, diluição direta de óleo em querosene e emulsão água-óleo para determinação de Cu, Cr, Fe, Ni, Pb, Sb e Zn em HR-CS FAAS. Os resultados obtidos para os digeridos foram comparados com LS- FAAS. As percentagens de recuperação ficaram na faixa de 81-106% (Cu), 80-107% (Cr), 85-114% (Fe), 82-116% (Ni), 86-117% (Pb), 85-115% (Sb), e 81-114% (Zn) . A técnica HR-CS FAAS mostrou ser mais rápida e mais sensível que LS-FAAS (AMORIM FILHO; GOMES NETO, 2008). Em 2009, Amorim Filho e Gomes Neto validaram procedimentos de preparo de óleo lubrificante para determinação de Al, Ba, Mo, Si e V por HR-CS FAAS. Realizaram testes de adição e recuperação para validar os procedimentos: (1) Decomposição assistida por microondas e (2) preparo de emulsão água e óleo. Os resultados mostraram que os digeridos apresentaram recuperação na faixa de 107, 103 e 101% para Al, Ba e V respectivamente. As recuperações para Mo ficaram entre 105 e 46 % para emulsão e óleo digerido. A técnica analítica HR-CS FAAS apresentou baixos limites de detecção, aumento de sensibilidade e elevada capacidade multielementar na determinação destes elementos (AMORIM FILHO; GOMES NETO, 2009)

Matusiewicz e Krawczyk, em 2009, determinaram As, Bi, Cd, In, Pb, Se, Te, Tl por geração de hidretos (HG-STAT) acoplado ao HR-CS FAAS. Os limites de detecção obtidos foram 25;10,5; 80; 10, 10,20 and 40 ng mL⁻¹ para As, Bi, Cd, In, Pb, Se e Tl, respectivamente. O método oferece precisão, em termos de RSD, na faixa de 6 a 11%.

As técnicas HR-CS FAAS e HR-CS GF-AAS também já foram aplicadas para determinação de elementos químicos em diversos tipos de matrizes: Determinação de Ni e V em óleo cru (VALE et al., 2004; LEPRI et al., 2005), na determinação de Cd, Pb e Co em amostras biológicas (BORGES et al., 2005), na determinação de Cd, em carvão, com amostragem direta de sólidos; uso de Ir como modificador permanente e calibração com padrões aquosos (BORGES et al., 2004) e na determinação de Pb e Ti, em amostras de carvão com amostragem direta de sólidos, com e sem uso de modificador permanente, calibração com padrões aquosos e calibração com amostra sólida (SILVA et al., 2005; BORGES et al, 2004).

2. 6.0 QUIMIOMETRIA

Quimiometria é uma área que se refere à aplicação de métodos estatísticos e matemáticos, assim como aqueles baseados em lógica matemática, a problemas de origem química. Com o desenvolvimento das técnicas instrumentais, o uso de microprocessadores e microcomputadores em laboratório químico tornou-se freqüente o uso de ferramentas quimiométricas para tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico, a fim de relacionar os sinais obtidos (intensidades por exemplo) com os resultados desejados (concentrações). Com alguns métodos quimiométricos conhecidos como reconhecimento de padrões, é possível obter informações como: tendência para formação de grupos em determinadas espécie ou região, a relação de um conjunto de dados etc... Estes métodos para reconhecimento de padrões são classificados em não supervisionados e supervisionados. Nos métodos não supervisionados o objetivo é identificar a formação de classes ou agrupamentos naturais dos dados de modelagem.

Análise de componentes principais (PCA) e agrupamentos hierárquicos (HCA) são métodos quimiométricos não supervisionados. PCA é uma das ferramentas utilizadas para avaliar diferenças e similaridades entre um grupo de amostras. A análise de componentes principais (PCA) é baseada na decomposição dos dados em autovetores e autovalores. Alguns autores apontam uma diferença conceitual entre CPs e fatores: as CPs explicam o máximo de variância contida nas variáveis observadas, enquanto os fatores explicam o máximo de intercorrelação entre as variáveis. Em PCA a matriz de dados é decomposta em escores e matrizes de cargas. Os vetores de escores descrevem a relação entre as amostras no sub espaço modelo e os vetores de cargas descrevem a importância de cada vetor descrito no modelo. À semelhança do PCA, o agrupamento das amostras revela semelhanças entre as amostras, enquanto o agrupamento de variáveis aponta relações intervariáveis. O objetivo principal de técnicas de agrupamento é apresentar os dados em uma abordagem que demonstra o agrupamento em um espaço multidimensional e possibilitem encontrar uma propriedade de um grupo de amostras que não é diretamente mensurável (BEEBE; PELL; SEASHOLTZ, 1998). Apresentar os resultados sob a forma de um dendrograma (HCA), é também, um modo de facilitar o reconhecimento visual de tais grupos. Segue alguns trabalhos que utilizaram ferramenta quimiométrica para melhor interpretação dos dados analíticos.

Franca e colaboradores, em 2007, discriminaram a presença de grãos de café defeituosos e não defeituosos por seus componentes voláteis. Em vista do fato de que o sabor do café e a qualidade estão diretamente relacionados aos compostos voláteis produzidos durante a torrefação, o objetivo do estudo foi realizar uma avaliação comparativa da fração volátil a fim de encontrar possíveis marcadores químicos para a detecção de grãos de café defeituosos. A extração e concentração de voláteis foram feitas por fase sólida utilizando divinilbenzeno, carboxen e fibra de polidimetilsiloxano. As determinações foram feitas por GC-MS. Os resultados mostraram que a metodologia proposta foi adequada para a extração, concentração de voláteis de cafés. A análise estatística dos dados pelos componentes principais (PCA), através de uma matriz de dimensão (251 X 18), PC1 explicou 78% da variância cromatográfica e mostrou que o perfil de voláteis permite a diferenciação de cafés saudáveis e com defeito.

Cadore e colaboradores, em 2005, classificaram água de coco processada e in natura por meio de HCA, PCA e pelos teores de íons metálicos determinados por ICP OES. Para tanto, as amostras foram adquiridas em Campinas, sendo uma amostra industrializada e oito amostras naturais (coco verde). Para o preparo das amostras, estas foram filtradas em placa porosa (G3) e diluídas a 20% m v⁻¹ em HNO₃ 2% v v⁻¹. Os teores de Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu, Al, Se, Cd e Pb foram determinados utilizando ICP OES. Os valores de cada replicata foram utilizados individualmente constituindo uma matriz (36 X 6), os dados foram pré-escalonados e em seguida, são submetidos aos métodos de análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) e análise de componentes principais (PCA). Os resultados demonstraram que Ca e Mg são macroconstituintes tanto de água de coco natural quanto processada. Através do dendograma obtido por HCA observou-se que as amostras processadas têm composição semelhante às naturais. Para PCA construiu-se um modelo com quatro PCs que explicam 91,98% da variância dos dados. Desta forma comparando os gráficos de escores com o de pesos é possível concluir que a concentração de Ca é o principal fator responsável pela classificação das amostras “MG1” e “MG2” em uma classe diferente das demais amostras, ou seja, essas amostras têm concentrações de Ca diferentes das demais. Este aspecto esclarece a classificação obtida através da HCA e da PCA (CADORE et al., 2006).

Consonni e Cagliani avaliaram a origem geográfica de um total de 41 amostras de méis (polifloral e acácia), utilizando ressonância magnética nuclear (1H

RMN) juntamente com métodos estatísticos multivariados. Análise de componentes principais se mostrou como uma ferramenta eficiente na distinção (1H RMN) espectros das amostras de mel de acácia e polifloral e para a caracterização geográfica das mesmas. Os dados preliminares indicam uma relação entre as diferentes isoformas para polifloral argentinas. A análise PCA foi feita considerando as 15 amostras de polifloral e 18 de acácia . A primeira PC explicou 95% do total da variância (CONSONNI; CAGLIANI, 2008).

Mendes e colaboradores em 2006 aplicaram tratamento quimiométrico em 69 amostras de mel. As amostras foram pré-tratadas por US e as concentrações determinadas por ICP OES. Através do estudo quimiométrico não foi possível estabelecer uma classificação nítida das amostras por região geográfica, com estas variáveis, observando-se apenas uma tendência à sua formação. Esta tendência é fortalecida quando o número de amostras por região é maior e as dimensões regionais são menores. De um modo geral, os resultados obtidos assinalam novas informações sobre os méis nacionais que, eventualmente, poderão ser úteis para a formação de uma base de dados de composição mineral (MENDES et al, 2006).

CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.0.0 PARTE EXPERIMENTAL

3.1.0 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes utilizados foram de pureza analítica. Nos procedimentos de digestão utilizaram os seguintes reagentes: ácido sulfúrico 98% v v⁻¹ (Merck), ácido nítrico 65% v v⁻¹ (Merck), peróxido de hidrogênio 30% v v⁻¹ (Merck) e água desionizada.

As soluções multielementares contendo 100,0 mg L⁻¹ de Al, Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V e Zn foram preparadas por diluição adequada, em água, das soluções estoques de cada um dos elementos a 1000,0 mg L⁻¹ (todas da marca Qhemis). A solução multielementar contendo 100,0 mg L⁻¹ de Ca, K, Mg, Na e P foi preparada por diluição em água da solução estoque de 1000,0 mg L⁻¹ de Ca (Qhemis) e K, Mg, Na e P (Merck).

Todas as vidrarias, frascos de microondas, espátulas etc... utilizadas neste trabalho passaram pelo processo de limpeza para eliminar quaisquer presenças de metais contaminantes que pudessem interferir nos resultados. Os materiais foram lavados com detergente extran e mantidos por 24 h em solução de ácido nítrico a 10% v v⁻¹. Depois deste tempo de descontaminação foram retirados do banho e lavados com água desionizada e colocados para secar. A descontaminação dos frascos de microondas para mineralização foi realizada com ácido nítrico 65% e água desionizada (1:1) v v⁻¹. Ainda para descontaminação os frascos foram levados à estufa por 3 h, a temperatura de 180 °C. Depois foram lavados com água desionizada.

3.2.0 INSTRUMENTAÇÃO

3.2.1 Procedimentos envolvendo sistemas abertos e pressurizados

O procedimento de incineração (via seca) foi realizado em forno tipo mufla com controle automático de temperatura (modelo Q318S, Quimis, São Paulo, SP, Brasil), fazendo o uso de cadinhos de porcelana como recipiente de amostra

Os procedimentos de digestão em sistemas pressurizados foram conduzidos em forno de microondas com cavidade, modelo Ethos EZ (Milestone, Sorisole, Itália). Esse sistema possui um rotor com capacidade para 10 frascos de 100 mL

confeccionados em TFM (Teflon quimicamente modificado) e opera sob altas temperaturas e pressões. Permite o acoplamento de sensores de temperatura e pressão que possibilitam o acompanhamento do processo de digestão e promovem uma maior segurança operacional. Os programas de aquecimento utilizado nos experimentos com ácido concentrado e diluído estão descritos nas Tabelas 2, respectivamente. Em ambos os programas foram programados os valores máximos de potência e pressão de 1000 W e 35 bar, respectivamente.

No procedimento baseado em sistema aberto, foi utilizado um bloco digestor TECNAL, modelo TE-040/25, com controlador de temperatura analógico e capacidade para 40 tubos em borossilicato, com dimensões de 25 x 250 mm,

Tabela 2 - Programa utilizado para decomposição da própolis em forno de microondas com cavidade (MW).

<i>Etapa</i>	<i>Potência (W)</i>	<i>Tempo (min)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>
1	500	4	90
2	500	2	90
3	1000	6	180
4	1000	10	180
ventilação	-----	20	-----

3.2.2 Determinação dos analitos

Os equipamentos empregados para a determinação dos analitos de interesse foram:

- 1) Espectrômetro de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES) simultâneo com visão axial e detector de estado sólido VISTA PRO (Varian, Mulgrave, Austrália). O sistema óptico do ICP OES foi calibrado com solução de referência multielementar e alinhamento da tocha foi realizado com uma solução de Mn 5,0 mg L⁻¹. As linhas espectrais foram selecionadas considerando-se as intensidades dos sinais de emissão dos analitos e do sinal de fundo, o desvio padrão das medidas e a sensibilidade adequada para a determinação de elementos presentes em altas e baixas

concentrações nas amostras. As condições experimentais estão apresentadas na Tabela 3. (BOA MORTE, 2006).

Tabela 3. Condições experimentais utilizadas no equipamento de ICP OES com configuração axial

<i>Potência RF (kW)</i>	1,3				
Vazão do gás de nebulização (L min ⁻¹)	0,70				
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,5				
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15				
Tempo de integração (s)	1,0				
Tempo de estabilização (s)	15				
Tempo de leitura (min)	1				
Replicatas	3				
Sistemas de introdução da amostras	Nebulizador Seaspray com Câmara ciclônica (SP) Nebulizador Com Ranhuras em V com câmara Sturman Master				
Linhas Espectrais (nm)					
<i>Ca (II)</i> 396,847	<i>K (I)</i> 766,468	<i>Na (I)</i> 589,592	<i>Cr (II)</i> 267,716	<i>Co (II)</i> 238,892	<i>Cu (I)</i> 327,398
Mg (II) 280,267	P (I) 177,434	Al (II) 396,152	Fe (II) 238,203	Mn (I) 257,611	Ni (II) 231,604
Ba (II) 455,403	C (I) 193,024	Cd (II) 226,502	Pb (II) 220,354	V (II) 309,310	Zn (I) 213,858

- 2) Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama de Alta Resolução com Fonte Contínua modelo ContrAA 300 (Analytica Jena). Os comprimentos de onda (nm) selecionados e as condições experimentais utilizadas no equipamento espectrômetro de absorção atômica de alta resolução fonte contínua (HR-CS-FAAS) estão na Tabela 4. Para estas determinações, seguindo recomendação do fabricante, nas amostras, padrões e nas curvas analíticas construídas foram adicionados 1% HCl v v⁻¹, conforme recomendação do fabricante.

Tabela 4. Condições experimentais utilizadas no espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS-FAAS).

	<i>Sódio (Na)</i>	<i>Potássio (K)</i>	<i>Cálcio (Ca)</i>	<i>Magnésio (Mg)</i>
Linhas de medida [nm]	588,9953	766,4908	422,6728	285,2125
	Linha primária	Linha primária	Linha primária	Linha primária
Sensibilidade [%]	100	100	100	100
Tipo de Chama	Ar/Acetileno	Ar/Acetileno	Oxido nitroso/ acetileno	Ar/Acetileno
Vazão de gás (acetileno) L/h	90	80	215	70
Altura do queimador [mm]	4-8	5-9	5-8	5-8
Replicatas	3	3	3	3
Nebulizador	Pneumático Concentrico	Pneumático Concentrico	Pneumático Concentrico	Pneumático Concêntrico

3.3.0 AMOSTRAS

Os procedimentos de decomposição foram investigados através da análise de 3 amostras de própolis “in natura” adquiridas em apiários instalados no litoral norte do Estado da Bahia, conforme descrição abaixo:

- Duas amostras foram obtidas de apiários da região de Esplanada, denominadas A e B.
- Uma amostra foi adquirida em apiário da região de Massarandupió, litoral norte do Estado da Bahia, nomeada como C.

Todas as amostras foram extraídas de colméias de abelhas (*Apis mellífera*) e beneficiadas retirando-se partes de abelhas, folhas secas, ceras, pedaços de madeira ou ainda insetos embalsamados, garantindo a qualidade das amostras analisadas.

As amostras de própolis provenientes de Palame, Catu, Alagoinhas e Seabra foram coletadas periodicamente, objetivando avaliar as possíveis variações das concentrações dos elementos de acordo com a época de coleta. Buscando mais

informações do perfil e da composição mineral da própolis produzida no Estado da Bahia, 51 amostras de própolis “in natura”, foram coletadas, analisadas e submetidas a tratamento quimiométrico. As amostras de própolis estão devidamente relacionadas e identificadas na Tabela 5.0.

TABELA 5. Identificação, cor, data e local de coleta das amostras de própolis doadas por distribuidores e apicultores da região.

	<i>Cor</i>	<i>Local de Coleta</i>	<i>Data</i>
E/1	Marrom	Município de Esplanada/Litoral Norte	15/10/2008
E/2	Marrom	Município de Esplanada/Litoral norte	04/03/2009
S/1	Marrom	Sauípe/ Litoral Norte	20/03/2008
S/2	Marrom	Sauípe/ Litoral Norte	15/07/2008
S/3	Marrom	Sauípe/ Litoral Norte	26/10/2008
S/4	Marrom	Sauípe/ Litoral Norte	21/01/2009
M	Cinza	Massarandupio / Litoral Norte	15/11/2007
A/1	Marrom	Município de Alagoinhas/Litoral norte	01/04/2008
A/2	Marrom	Município de Alagoinhas/Litoral norte	21/07/2008
A/3	Marrom	Município de Alagoinhas/Litoral norte	02/11/2008
A/4	Marrom	Município de Alagoinhas/Litoral norte	18/01/2009
P/1	Vermelha	Palame/ Litoral Norte	22/03/2008
P/2	Vermelha	Palame/ Litoral Norte	24/06/2008
P/3	Vermelha	Palame/ Litoral Norte	22/10/2008
P/4	Vermelha	Palame/ Litoral Norte	21/01/2009
C/1	Castanho	Catú/Litoral Norte	24/03/2008
C/2	Castanho	Catú/Litoral Norte	01/07/2008
C/3	Castanho	Catú/Litoral Norte	22/10/2008
C/4	Castanho	Catú/Litoral Norte	21/01/2009
ER	Castanho	Entre rios/Litoral Norte	01/05/2009
Jn	Verde	Jandaíra/ Litoral Norte	01/06/2009
PF	Verde	Praia do Forte/Litoral Norte	13/06/2009
ET	IND	Estância/Litoral Norte	11/05/2009
PJ	Preta	Município de pojuca/Litoral Norte	01/07/2009
PJ	Preta	Município de pojuca/Litoral Norte	26/05/2009
M1	Cinza	Mata de São João/ Litoral Norte	21/05/2009

TABELA 5: (Continuação). Identificação, cor, data e local de coleta das amostras de própolis doadas por distribuidores e apicultores da região.

M2	Cinza	Mata de São João/ Litoral Norte	17/05/2009
M3	Cinza	Mata de São João/ Litoral Norte	17/05/2009
B 1	Cinza	Barreiras/ Oeste	17/05/2009
B 2	Cinza	Barreiras/ Oeste	17/05/2009
SD 1	Cinza	São Desidério/ Oeste	17/05/2009
SD 2	Cinza	São Desidério/ Oeste	17/05/2009
Se/1	Marrom	Seabra/ Chapada Diamantina	23/03/2008
Se/2	Marrom	Seabra/ Chapada Diamantina	28/06/2008
Se/3	Marrom	Seabra/ Chapada Diamantina	22/10/2008
Ira	Castanha	Iraquara/ Chapada Diamantina	22/10/2008
Ire	castanha	Irecê / Chapada Diamantina	22/10/2008
Ita	indefinido	Itaquara/ Extremo Sul	22/10/2008
Bel	Indefinido	Belmonte / Extremo Sul	13/06/2009
FS 1	Esverdeada	Feira de Santana/ Recôncavo Sul	13/06/2009
FS 2	Esverdeada	Feira de Santana/ Recôncavo Sul	11/05/2009
FS 3	Esverdeada	Feira de Santana/ Recôncavo Sul	13/06/2009
Ca 1	Esverdeada	Cruz das Almas/ Recôncavo Sul	19/05/2009
Ca 2	Esverdeada	Cruz das Almas/ Recôncavo Sul	12/06/2009
SAP	Esverdeada	Cruz das Almas/ Recôncavo Sul	16/06/2009
J 1	Cinza	Município de Jequié/ Sudoeste	13/06/2009
J 2	Cinza	Município de Jequié/ Sudoeste	13/06/2009
J 3	Cinza	Município de Jequié/ Sudoeste	13/06/2009
J 4	Cinza	Município de Jequié/ Sudoeste	15/06/2009
LÇ	Cinza	Laçu/ Sudoeste	17/06/2009
IBI	Cinza	Ibicuí/ Sudoeste	11/06/2009

3.4.0 SISTEMA DE COLETA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS “IN NATURA”

Inicialmente prepararam telas de polietileno devidamente descontaminadas, que eram fixadas nas aberturas das colméias. Mas depois, optaram por abrir as colméias e coletar as amostras em seu interior. Os quadros com mel foram retirados e as amostras de própolis extraídas de dentro da colméia (Figura 1).



Apicultor aplicando fumaça no alvado com o fumegador, garantindo manejo seguro e adequado das colméias.



Abertura da colméia:
Procedimento fundamental para garantir boa colheita.



Retirada dos quadros de mel e posterior coleta de própolis na parte interna da colméia

fonte: Ministério Agricultura, ISSN 19815999, 2007

FIGURA 1: Etapas de extração das amostras de própolis na colméia

3.5.0 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.5.1 Pré-tratamento das amostras de própolis

Para garantir a homogeneidade da própolis, as amostras foram submetidas a trituração com moinho criogênico de impacto modelo MA 775 (Marconi, Piracicaba, Brasil), com gral de porcelana com pistilo e por aquecimento, por 6 s, em forno de microondas doméstico para posterior maceração.

3.5.2 Procedimentos para decomposição das amostras

3.5.2.1 Decomposição por aquecimento condutivo em forno mufla

O método oficial recomendado para amostras de alimentos (AOAC 999.11) foi usado como referência para fins comparativos com os demais sistemas propostos.

Pesou-se (~1,7 g) das amostras de própolis em cadinhos de porcelana e posteriormente submetidas à incineração em forno mufla. A mufla foi ajustada para atingir a temperatura de 450 °C numa taxa de 50 °C/h, permanecendo nesta temperatura durante aproximadamente 12 h. As cinzas brancas obtidas foram solubilizadas em HCl 6 mol L⁻¹ numa chapa aquecedora até evaporação. Após resfriados, os resíduos foram dissolvidos em 5 mL de HNO₃ 0,1 mol L⁻¹, deixando-os em contato com o ácido por 2 h para posterior ajuste de volume com o mesmo ácido até 20 mL em tubos de polipropileno. As concentrações dos elementos nos digeridos foram determinadas por ICP OES e FAAS (AOAC-1999).

3.5.2.2 – Decomposição por aquecimento condutivo em bloco digestor

O procedimento em bloco digestor (PBD) consistiu na pesagem de aproximadamente 1,0 g de amostra e posterior adição de 2,0 mL de H₂SO₄, 5,0 mL de HNO₃, 1,0 mL de H₂O₂ e aqueceu a mistura por 30 min. Depois houve adições subsequentes de 3,0 e 2,0 ml de HNO₃, perfazendo o total de 10,0 mL de HNO₃ (Tabela 6). Os digeridos foram avolumados para 10,0 mL e as determinações feitas sem e com adição de 100 µL de ítrio como padrão interno (SANTOS, 2008). Determinou-se a acidez residual dos digeridos, carbono residual e os parâmetros

das curvas analíticas. As concentrações dos elementos foram obtidas por ICP OES em condições robustas.

Tabela 6- Programa de mineralização para amostra de própolis em bloco digestor.

<i>Etapa</i>	<i>H₂SO₄</i> <i>(mL)</i>	<i>HNO₃</i> <i>(mL)</i>	<i>H₂O₂</i> <i>(mL)</i>	<i>* Temp. °C</i>	<i>Tempo</i> <i>(min)</i>
1	2,00	5,00	1,00	100	30
2	—	—	1,00	150	30
3		3,00	1,00	200	60
4		2,00	3,00	230	20

* Temperatura indicada pelo termostato digital do equipamento

3.5.2.3 Decomposição Assistida em Forno de Microondas com Cavidade

O procedimento em forno de microondas com cavidade (PFM) constituiu da pesagem de aproximadamente 200 mg de amostra, adição de 5,0 mL HNO₃ 14,0 mol L⁻¹, 3,0 mL de H₂O₂ 30% (v v⁻¹) e o sistema submetido ao programa de digestão em forno de microondas na Tabela 2. Os digeridos foram transferidos para tubos de centrífuga e avolumados para 20,00 mL. Foram também avaliados: a acidez residual dos digeridos, a concentração de carbono residual e os parâmetros das curvas analíticas obtidas. As concentrações dos elementos foram determinadas por ICP OES em condições robustas de trabalho.

3.6.0 DETERMINAÇÃO DA ACIDEZ FINAL DOS DIGERIDOS

A acidez final dos digeridos foi determinada utilizando volumetria de neutralização. O procedimento consistiu da tomada de uma alíquota de 100 µL dos digeridos que foram transferidos para erlenmeyer de 10 mL. Depois adicionou-se uma alíquota de 1,0 mL de água desionizada e titulou-se com solução de NaOH 0,09972 mol L⁻¹, usando solução de fenolftaleína (1,0% m v⁻¹ em etanol) como indicador.

3.7.0 COMPARAÇÃO DOS SISTEMAS DE INTRODUÇÃO DE AMOSTRAS

Foram avaliados dois sistemas de introdução de amostras, em termos da sensibilidade e limites de detecção e de quantificação: nebulizador concêntrico modelo “seaspray” com uma câmara de nebulização ciclônica (SP) e o nebulizador com ranhuras em V acoplado com uma câmara de nebulização Sturman-Masters (VG).

3.8.0 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS PROPOSTOS.

No processo de validação foram determinados alguns parâmetros de desempenho dos procedimentos propostos. A seguir estão descritos os métodos empregados para a avaliação da seletividade, efeito de matriz, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

3.8.1 Avaliação do Efeito de Matriz

O efeito da matriz sobre o sinal analítico foi avaliado para os dois procedimentos propostos. Foram preparadas curvas analíticas em diferentes meios: (1) soluções de ácido diluído, (2) soluções preparadas em meio do branco digerido e (3) soluções preparadas em meio das amostras de própolis digeridas. Para construir as curvas analíticas foram preparadas soluções de trabalho multielementares a partir de soluções estoque individuais dos elementos, na concentração 1000 mg L⁻¹. As curvas analíticas de calibração foram preparadas nas seguintes faixas de concentrações: 0,10; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,0; 8,0 e 10,0 mg L⁻¹ para Al, Ba, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V e Zn a partir de solução multielementar de 100,0 mg L⁻¹ e 0,50; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 7,0; 8,0; 10,0; 13,0; 15,0; 17,0 e 20 mg L⁻¹ para K, Na, Ca, Mg e P tomando-se alíquotas da solução estoque concentração 200,0 mg L⁻¹.

3.8.2 Limites de Detecção e Quantificação

O limite de detecção (LOD) representa a menor concentração de substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental. Já o limite de quantificação (LOQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada com exatidão e precisão (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Para os métodos que empregam uma curva analítica, o limite de detecção é definido como a concentração analítica que gera uma resposta com um fator de confiança superior ao desvio padrão do branco (SKOOG et al., 2006).

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados utilizando três e dez vezes o desvio padrão do branco, respectivamente, segundo as equações:

$$\text{LOD} = 3 * \text{SD} / (\text{coeficiente angular})$$

$$\text{LOQ} = 10 * \text{SD} / (\text{coeficiente angular})$$

3.8.3 Avaliação da Exatidão

Define-se exatidão do método como sendo o grau de concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Os materiais de referência certificados (CRM) devem, sempre que possível, ser utilizados para validar um método analítico. A própolis é uma resina balsâmica e não há material de referência certificado (CRM) ou similar, portanto para avaliar a exatidão e validar os procedimentos propostos foram utilizadas três estratégias: (1) comparação com procedimento de referência, (2) teste de adição e recuperação e (3) utilização de dois materiais de referência certificados NIST 1515, folhas de maçã e NIST 1570^a, folhas de espinafre, que foram submetidos aos procedimentos propostos. As determinações foram feitas por ICP OES e HR-CS FAAS.

A técnica de adição de analitos foi aplicada em tres amostras de propolis (A, B e C), nos níveis de concentração dos macroelementos e microelementos na matriz. As adições foram feitas a partir de solução multielementar de concentração 50,0 mg L⁻¹ (Merck) tomando-se alíquotas de 200; 600 e 1200 µL da solução multielementar cujas concentrações finais são 0,5 mg L⁻¹; 1,5 mg L⁻¹ e 3,0 mg L⁻¹ respectivamente. Para macro elementos, as adições foram feitas a partir de solução multielementar de concentração 200 mg/L (Merck) para K, Na, K, Mg e P. Depois as amostras foram submetidas aos procedimento de decomposição propostos e as determinações foram feitas por ICP OES.

CAPÍTULO 4

APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.0.0 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

4.1.0 SISTEMAS DE COLETA DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS IN NATURA

Uma das maiores dificuldades encontradas na realização deste projeto foi a obtenção das amostras. Embora existam na Bahia muitos apiários instalados, principalmente no litoral norte do Estado, a maioria destes apiários tem o manejo das colméias voltadas para a produção de mel, o que de certa forma prejudicou a obtenção das amostras em algumas regiões. Pois, é natural que as abelhas propolizem, mas se o manejo fosse direcionado para produzir própolis, e não mel, a quantidade de própolis seria maior e não teriam dificuldade em obtê-las.

A princípio, pensou-se em criar aberturas na colméia e fixar telas de polietileno, devidamente descontaminadas em ácido nítrico (10%), para que as abelhas propolizassem sobre estas telas, e depois as telas seriam removidas e congeladas para posterior remoção da placa de própolis. Mas a maioria dos apicultores que sobrevivem da produção de mel, não concordaram em atrapalhar o equilíbrio da colméia temendo diminuição da produção. Assim, considerando a necessidade de usar o mesmo protocolo para todas as amostras, optou-se por coletar as amostras de própolis na abertura principal da colméia, por dentro, visto que a própolis da abertura externa da colméia é ressecada e não é utilizada na produção de extratos, xaropes, balas, bombons etc... A coleta das amostras de própolis foi feita na época de coleta do mel, que ocorre geralmente no final de setembro, mas também, em junho e julho na época de manutenção da colméia..

4.2.0 PRÉ-TRATAMENTO DAS AMOSTRAS DE PRÓPOLIS

Com relação a homogeneidade da amostra, de acordo com guia ISO 35 [ISO GUIA, 1989] um material é perfeitamente homogêneo com relação a determinada característica se ao comparar duas partes distintas desse material, não houver diferença significativas nos valores dessas características (KRUG, 2006). A microhomogeneidade pode ser determinada fazendo medidas de uma propriedade da matriz, como por exemplo, a média da concentração, de determinado elemento e seus desvios padrão (SD) e desvios padrão relativos (RSD).

Os resultados para amostras que foram homogeneizadas em gral com pistilo, moinho criogênico e aquecidas em forno de microondas doméstico para depois serem maceradas estão na Tabela 7. Aplicando o teste t pareado, nas

concentrações, constataram que não há diferença significativa, no intervalo de confiança de 95 %, para a maioria dos elementos, exceto para Al e Cr. Como pode ser observado, para as amostras homogenizadas com gral com pistilo, foi obtida uma faixa de desvio padrão relativo entre 3,5 % para Al e 5,6 % para Mn enquanto que, utilizando moinho criogênico, os valores variaram entre 1,2 % para V e 5,3 % para Mn. Quando se utilizou forno de microondas convencional a variação foi entre 2,7 % e 6,0 %, para Al e Mn respectivamente. Avaliando os resultados para Cr, utilizando os três sistemas, verificou-se que entre as amostras trituradas em moinho criogênico e submetidas a aquecimento em forno de microondas doméstico não ocorreu diferença significativa nas concentrações obtidas, enquanto que para gral e pistilo há diferença significativa ($p < 95\%$).

Assim, embora o procedimento de trituração empregando moinho criogênico tenha apresentado desvios relativos menores para todos os elementos, optou-se por utilizar o forno de microondas doméstico por ser o equipamento disponível no laboratório e ter apresentado desvios abaixo de 6% para maioria dos elementos, com exceção Ni. O desempenho para os elementos Cd, Co e Pb cujos teores foram $0,012 \mu\text{g g}^{-1}$, $0,032 \mu\text{g g}^{-1}$ e $0,032 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente, não foi avaliado nesta etapa, pois, suas concentrações estavam abaixo do limite de quantificação.

Tabela 7: Teores de macro e microelementos em $\mu\text{g g}^{-1}$ e seus respectivos desvio relativos, obtidos para amostra C, utilizando forno de microondas doméstico, gral com pistilo e moinho criogênico, (n=3)

<i>Elemento</i>	<i>Forno de microondas</i> $\mu\text{g g}^{-1}$	<i>Gral c/ pistilo</i> $\mu\text{g g}^{-1}$	<i>Moinho Criogênico</i> $\mu\text{g g}^{-1}$
Al	402 ± 11 (2,7%)	414 ± 4 (3,5%)	497 ± 12 (2,4%)
Ba	2,86 ± 0,09 (3,2%)	2,81 ± 0,14 (4,9%)	2,88 ± 0,12 (4,2%)
Cr	4,63 ± 0,18 (5,0%)	3,01 ± 0,21 (6,9%)	4,69 ± 0,15 (3,2%)
Cu	2,91 ± 0,09 (3,4%)	2,96 ± 0,09 (4,4%)	2,95 ± 0,06 (2,1%)
Fe	495 ± 20 (4,2%)	499 ± 22 (5,0%)	497 ± 15 (3,1%)
Mn	25,8 ± 0,3 (11%)	26,6 ± 1,5 (5,6%)	25,0 ± 1,3 (5,3%)
Ni	1,70 ± 0,12 (7,0%)	1,69 ± 0,01 (5,0%)	1,74 ± 0,09 (5,1%)
V	14,2 ± 1,0 (6,8%)	16,6 ± 0,7 (4,2%)	16,5 ± 0,2 (1,2%)
Zn	89,1 ± 4,9 (5,4%)	87,3 ± 4,7 (5,3%)	88,7 ± 4,1 (4,6%)

4.3.0 AVALIAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS PARA DECOMPOSIÇÃO

A própolis é uma resina de composição complexa e os compostos químicos mais frequentes neste tipo de matriz são: ácido benzóico, álcool, ácido cinâmico, benzaldeído, compostos terpênicos, ácido salicílico e flavonóides em maior concentração. Há, também, quantidade considerável de manganês, zinco, cálcio, fósforo, cobre etc., vitaminas B1, B2, B6, C, E, ácidos nicotínico, pantotênico e aminoácidos todos já comprovados. (BANSKOTA et al., 2001,2002; KUJUMGIEV et al., 1999).

Devido a essa complexidade da matriz, a etapa de decomposição é a mais crítica. Portanto faz-se necessário utilizar uma mistura de ácidos minerais oxidantes, geralmente ácido nítrico ou ácido sulfúrico e elevadas temperaturas, podendo, em alguns casos, chegar a 300 °C. O procedimento deve ser capaz de proporcionar o rompimento dos diferentes tipos de interações químicas dos compostos orgânicos presentes na matriz, quebrando a cadeia carbônica desses compostos, eliminando a matéria orgânica sobre a forma de CO₂, sem que ocorram perdas dos analitos, disponibilizando em solução, geralmente ácida, os elementos químicos de interesse para serem determinados.

Para avaliar a eficiência destes procedimentos um dos parâmetros utilizado é o teor de carbono residual. Assim, a obtenção de menor teor de carbono residual será um indicativo de que a oxidação foi satisfatória (GOUVEIA et al., 2001).

4.3.1 Decomposição em bloco digestor (PBD)

A proposta de um procedimento para decomposição de amostras de própolis empregando aquecimento condutivo em bloco digestor é oportuno por se tratar de um sistema aberto, que possibilita digerir maiores massas da amostra, aumentando assim a concentração do elemento de interesse no digerido final o que facilita sua detecção.

Inicialmente o procedimento para decomposição das amostras de própolis foi uma adaptação do procedimento para decomposição de mel (DENNAUD et al., 2001). O procedimento inicial consistia, a princípio, da pesagem de 1,0 g da amostra com adição inicial de 1,0 mL de ácido sulfúrico e 2,0 mL de ácido nítrico; esta mistura permanecia por 1 h a 95 °C. Em seguida a cada hora, uma alíquota de 2,0 mL de HNO₃ era adicionada totalizando oito adições, sendo que a temperatura foi

monitorada de forma a não ultrapassar 180 °C para que não houvesse projeção. Após esta etapa, peróxido de hidrogênio 30% V V⁻¹ era adicionado até que a solução se mostrasse límpida. O volume final foi reduzido a aproximadamente 3,0 mL e o digerido avolumado para 10 mL. Esse procedimento leva aproximadamente 9 a 10 h para ser concretizado, há gasto elevado de reagentes, aproximadamente 20 mL de HNO₃, 10 mL de H₂O₂ e há muito tempo de exposição do analista a condições insalubres de trabalho. O uso de ácido sulfúrico justifica-se pelo alto ponto de ebulição (330°C) propiciando assim uma maior temperatura, aumentando a eficiência oxidativa do meio, possibilitando a decomposição de glóbulos de gordura, resinas etc. (KRUG, 2006).

Visando melhorar a frequência analítica, o custo e as condições de operação, modificaram o volume de reagentes e a temperatura do procedimento anteriormente proposto. O procedimento em bloco modificado esta mostrado no fluxograma da Figura 2. Estas modificações contribuíram para reduzir o tempo de decomposição para aproximadamente 2,5 h. O digerido final apresentou-se límpido, transparente e o volume final de digerido foi 3,0 mL que então foi avolumado com água desionizada para 10,00 mL. As concentrações dos elementos, listadas na Tabela 8, foram determinadas por ICP OES em condições robustas de operação.

Tabela 8: Teores, em µg g⁻¹, de Ca, K, Mg, Na, P, Al, Ba, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V e Zn por ICP OES, em amostra de própolis utilizando PBD. (Teor médio ± desvio padrão; DPR < 10%, n=3)

<i>Elementos</i>	<i>Amostra A</i>	<i>Amostra B</i>	<i>Amostra C</i>
Ca	312 ± 17	625 ± 30	1371 ± 145
K	248 ± 6	761 ± 22	997 ± 65
Mg	118 ± 5	232 ± 18	646 ± 61
Na	148 ± 10	90 ± 9	252 ± 20
P	110 ± 5	212 ± 12	622 ± 23
Al	471 ± 43	76,1 ± 5,4	414 ± 18
Ba	3,32 ± 0,09	1,19 ± 0,09	2,96 ± 0,17
Cr	1,17 ± 0,19	1,57 ± 0,13	4,08 ± 0,18
Cu	2,52 ± 0,18	1,72 ± 0,01	2,81 ± 0,10
Fe	163 ± 15	86,0 ± 2,5	497 ± 12
Mn	15,4 ± 1,3	23,0 ± 1,9	25,6 ± 2,1
Ni	0,70 ± 0,09	0,71 ± 0,06	1,79 ± 0,16
V	0,34 ± 0,06	0,73 ± 0,05	1,32 ± 0,09
Zn	81,2 ± 2,6	47,6 ± 2,4	76,0 ± 3,5

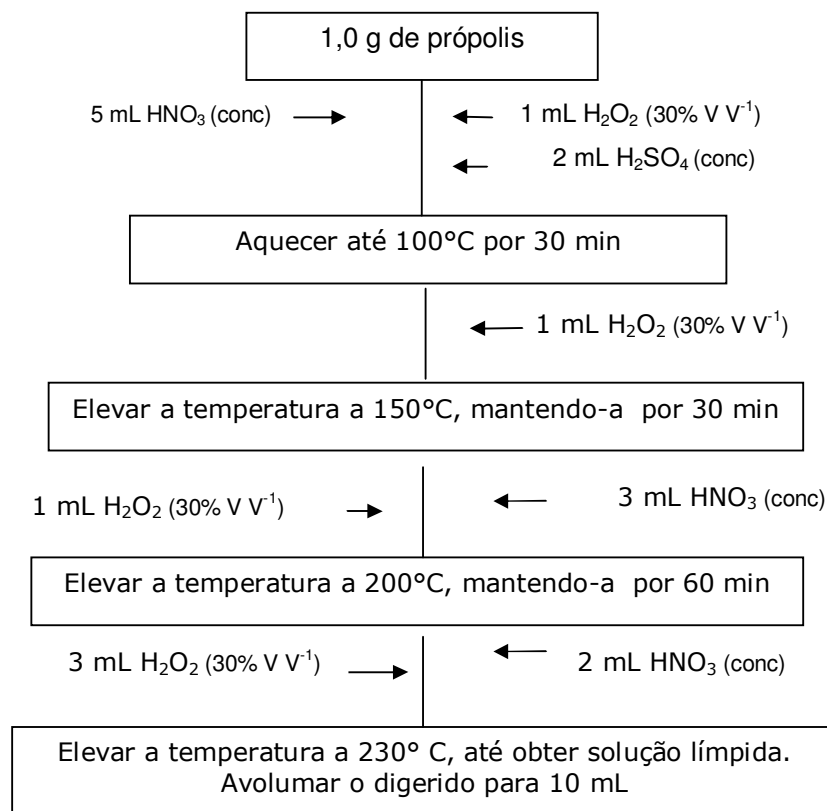


Figura 2. Fluxograma do procedimento proposto em bloco digester

4.3.2 Decomposição em forno de micro-ondas com cavidade (PFM)

De forma a propor um procedimento para decomposição de amostras de própolis empregando radiação microondas foi feito um estudo minucioso da literatura e avaliação das condições de trabalho. A maior dificuldade encontrada nesta etapa do trabalho é o fato de que não há muitos artigos relacionados a esta matriz. Existem alguns procedimentos otimizados para mel e alguns poucos trabalhos relacionados a própolis. Então foi adaptado um procedimento utilizado para mineralização de óleos lubrificantes (AMORIM FILHO; GOMES NETO, 2008), mas também, foram considerados procedimentos para decomposição de mel e cera (MENDES, 2006).

O uso de radiação microondas na decomposição das amostras de própolis requer maior controle das variáveis envolvidas, pois, por ser um sistema fechado, uma mudança brusca em qualquer variável poderia provocar rompimento dos frascos de PTFE durante o procedimento de decomposição. Portanto, optou-se por utilizar uma massa da amostra de 200 mg e foram avaliadas as variáveis volume,

concentração e tipo de reagentes a serem utilizados para decompor essa matriz adequando o procedimento proposto às condições eficientes e seguras de trabalho, gerando menor volume de resíduo possível. Foi utilizado o programa descrito na Tabela 2.

Estudos preliminares foram desenvolvidos visando verificar a eficiência na utilização de soluções de ácido nítrico diluído, nas concentrações 7 mol L^{-1} e $3,5 \text{ mol L}^{-1}$, para a decomposição da amostra de própolis, visando diminuir contaminação, acidez final dos digeridos, teor de carbono residual e volume final de resíduos gerados. Esta alternativa foi utilizada com sucesso na decomposição de plantas e outras matrizes orgânicas, onde a combinação de ácido nítrico diluído e peróxido de hidrogênio tornou mais eficiente a digestão, apresentando digeridos com carbono residual abaixo de 13% e acidez menor quando comparados com os digeridos com ácido nítrico concentrado. Quando se emprega a técnica ICP OES, recomenda-se a utilização de digeridos com menor acidez residual, minimizando os problemas nas etapas de nebulização e transporte da amostra, além de preservar mais o nebulizador, a câmara de nebulização e a tocha.

O uso de ácido nítrico diluído apresenta uma excelente estratégia para decomposição de matéria orgânica em sistemas fechados. O processo é criticamente dependente do tamanho do frasco, da disponibilidade de O_2 e temperatura. Quando se utiliza ácido nítrico diluído preferencialmente produz-se NO que é convertido a NO_2 na reação com oxigênio, regenerando o ácido nítrico [Castro et al / Talanta 78(2009)]. Entretanto, quando aplicado as amostras de própolis in natura, esta estratégia não foi eficiente, considerando que o digerido final apresentou partes sólidas de amostras que não foram decompostas. O fato de ácido nítrico diluído não ter sido uma alternativa eficiente para este tipo de matriz pode ser atribuído a presença de compostos orgânicos estáveis na própolis, compostos com cadeias carbônicas cíclicas, interações fortes, difíceis de serem rompidas, requerendo o uso de ácido mais concentrado na etapa de decomposição.

Através dos resultados obtidos, em termos da acidez dos digeridos, bem como a determinação de carbono residual, foi proposto o procedimento descrito no item 3.6. As concentrações obtidas para os elementos essenciais e não essenciais estão mostradas nas Tabelas 9.

Tabela 9: Teores, em $\mu\text{g g}^{-1}$, de Ca, K, Mg, Na, P, Al, Ba, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V e Zn por ICP OES, em amostra de própolis utilizando PFM. (Teor médio \pm desvio padrão ; DPR < 10%, n=3)

<i>Elementos</i>	<i>Amostra A</i>	<i>Amostra B</i>	<i>Amostra C</i>
Ca	315 \pm 10	616 \pm 23	1369 \pm 103
K	251 \pm 4	749 \pm 21	994 \pm 50
Mg	144 \pm 1	234 \pm 13	632 \pm 63
Na	169 \pm 8	97 \pm 6	254 \pm 17
P	147 \pm 13	220 \pm 5	626 \pm 56
Al	443 \pm 28	75 \pm 4	414 \pm 14
Ba	3,35 \pm 0,08	1,22 \pm 0,04	2,81 \pm 0,14
Cr	1,13 \pm 0,015	1,53 \pm 0,15	4,39 \pm 0,21
Cu	2,54 \pm 0,08	1,62 \pm 0,09	2,96 \pm 0,09
Fe	162 \pm 12	91,0 \pm 2,1	489 \pm 10
Mn	16,5 \pm 0,9	21,0 \pm 1,7	26,6 \pm 1,5
Ni	0,98 \pm 0,15	0,98 \pm 0,15	1,69 \pm 0,01
V	0,36 \pm 0,02	0,79 \pm 0,09	1,25 \pm 0,07
Zn	79,3 \pm 1,1	46,6 \pm 1,4	87,3 \pm 2,7

4.4.0 – Determinação de carbono residual e da acidez final dos digeridos

A acidez final dos digeridos foi determinada utilizando volumetria de neutralização, onde uma alíquota de 100 μL do digerido foi titulado com uma solução de NaOH 0,09865 mol L^{-1} , usando solução de fenolftaleína (1,0% m/v em etanol) como indicador. As amostras submetidas ao procedimento de decomposição empregando forno de micro-ondas e bloco digestor apresentaram acidez 4,40 mol L^{-1} e 2,2 mol L^{-1} , respectivamente.

O teor de carbono residual (RCC, do inglês Residual Carbon Content) corresponde à fração do carbono original remanescente após a decomposição da amostra e subsequente pré-concentração da solução por evaporação (WÜRFELS; JACKWERTH; STOEPLER, 1989). Este teor de carbono pode ser investigado através de análise elementar, de modo que a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado é largamente utilizada para este fim (CARRILHO et al, 2001). No presente estudo, a determinação do RCC presente nos

digeridos foi determinada por ICP OES, utilizando a linha de emissão do carbono 193,091 nm. As amostras submetidas ao procedimento de decomposição em forno de micro-ondas e em bloco digestor apresentaram teores de carbono residual de $0,458 \pm 0,023$ % e $0,269 \pm 0,012$ % respectivamente. O menor teor foi relativo ao procedimento de decomposição em bloco digestor, o que pode ser creditado a elevada temperatura do processo, implicando, assim em uma maior destruição da matéria orgânica, indicando maior eficiência de decomposição no PBD.

4.4.1 ESTUDO DE SISTEMAS DE INTRODUÇÃO DE AMOSTRAS

A forma como as amostras líquidas são carregadas até o plasma afetam os limites de detecção, precisão e exatidão em medidas feitas por ICP OES. Até chegar ao plasma, as amostras são transformadas em aerossol na câmara de nebulização onde as gotas são selecionadas para então serem transferidas. Qualquer falha na etapa de formação do aerossol afeta o desempenho analítico, pois, deve-se garantir que a porção de amostra que chega ao plasma é reprodutível e representativa, logo, as sucessivas etapas as quais a amostra é submetida, até chegar ao plasma são fundamentais para se obter resultados confiáveis.

Considerando que neste trabalho, para determinação da composição mineral da própolis, as amostras foram submetidas a diferentes procedimentos de decomposição que resultaram em digeridos com propriedades diferentes como: acidez, viscosidade, densidade, foram avaliados dois sistemas de introdução de amostras: nebulizador seaspray (tipo Meinhard) com câmara de nebulização ciclônica e nebulizador com ranhuras em V com câmara de nebulização Struman-Masters. Ambos os sistemas trabalham numa vazão mínima de gás $0,50 \text{ L min}^{-1}$ para garantir um bom desempenho (NOLTE, 2003).

O nebulizador concêntrico possui um orifício interno por onde a amostra é conduzida através do arraste por gás argônio pressurizado, e pode aspirar até 1,0 mL de solução e são calibrados para essa vazão. Este nebulizador apresenta uma limitação para aspirar amostras mais concentradas, com elevada acidez e que apresentem material particulado em suspensão, pois podem causar entupimento do canal interno.

O nebulizador com ranhuras em V é utilizado para soluções com elevado teor de material particulado. Sua alta taxa de aspiração, acima de $4,0 \text{ mL min}^{-1}$, representa uma desvantagem. Além disso, neste tipo de nebulizador também pode

ocorrer acúmulo de sais nas proximidades da saída de gás, seu uso é inadequado para soluções diluídas devido baixa precisão e é verificado aumento de efeito de memória.

Os resultados das inclinações para curvas analíticas construídas em solução de ácido nítrico 4,4 mol L⁻¹ (AC), solução do branco digerido (BC) e em meio dos digeridos das amostras (DA) estão relacionados nas Tabelas 10 e 11. Vale ressaltar que as soluções foram introduzidas a partir de uma bomba peristáltica para garantir uma vazão constante, melhorando a repetibilidade.

Tabela 10: Inclinações das curvas analíticas para os elementos investigados, nos diferentes meios, em ICP OES com sistema V-groove-câmara Sturman-Masters. Procedimento PFM.

	<i>AC</i>	<i>BC</i>	<i>DA (A)</i>	<i>DA (B)</i>	<i>DA (C)</i>
Al	2168	2068	1789	2001	1813
Ba	337714	325885	299544	306344	299032
Cd	10633	10508	9796	9924	9803
Cr	3395	3287	3063	3137	3059
Co	2273	2188	1944	2077	2043
Cu	4414	4205	4204	4317	4187
Fe	4546	4351	3751	4212	3741
Mn	19953	19011	16983	18002	17485
Ni	1755	1696	1589	1631	1585
Pb	659	603	555	585	570
V	2493	2369	2217	2295	2221
Zn	9903	9733	8961	9383	8996

Tabela 11: Inclinações das curvas analíticas para os elementos investigados, nos diferentes meios, em ICP OES com sistema com sistema nebulizador seaspray-câmara ciclônica Procedimento PFM.

	<i>AC</i>	<i>BC</i>	<i>DA</i> <i>(A)</i>	<i>DA</i> <i>(B)</i>	<i>DA</i> <i>(C)</i>
Al	5060	4877	3826	4653	4448
Ba	672222	596634	572445	589807	582966
Cd	21430	27536	26670	27310	27248
Cr	7049	7067	7163	7029	6990
Co	5195	5739	4693	4813	4756
Cu	9961	9916	9728	9927	9825
Fe	9914	9767	8112	9699	8889
Mn	48032	42790	41793	42613	44905
Ni	18283	4063	3956	4054	4026
Pb	4579	1492	1409	1449	1435
V	5746	5041	4988	5026	4989
Zn	26009	26366	25099	26371	26190

Os resultados obtidos para os sistemas de introdução de amostra VG e SP apresentaram diferença significativa na intensidade do sinal analítico. Para o sistema SP, as intensidades de emissão foram em torno de 50% maiores que para o sistema VG. As razões médias entre as inclinações obtidas para os sistemas foram: para o meio ACIDO (SP/VG) = 2,66; para o meio BRANCO (SP/VG) = 2,17 e para as amostras de própolis digeridas (SP/VG) = 2,44. O aumento na sensibilidade, a maior eficiência de atomização e a ausência de interferências químicas estão diretamente relacionadas com o tamanho das gotículas introduzidas no plasma. É indesejável que gotas de aerossol grandes sejam introduzidas no plasma, uma vez que se verifica aumento da radiação de fundo, piorando a precisão (CANAL; HERNANDIS; BROWNER, 1990).

Até atingir o plasma, o processo de geração do aerossol passa por vários estágios: O aerossol primário é formado no nebulizador, a câmara de nebulização forma o aerossol secundário e a passagem ao longo da câmara de nebulização forma o aerossol terciário até entrada do aerossol no plasma. As características do aerossol terciário dependem do aerossol primário e de fatores que modificam o

aerossol primário ao longo de sua trajetória. O sistema de introdução SP, pela sua própria estrutura forma gotículas menores de aerossol e quando combinados com o uso de câmara ciclônica a sensibilidade aumenta em torno de 50% e os LDs são melhorados em torno de um fator 3, quando nebulizadores com baixo consumo de amostras são utilizados. Isso porque o efeito da nebulização é aumentada e os efeitos de matriz são menos pronunciáveis.

Para digeridos do procedimento PBD, que utilizaram ácido sulfúrico para decompor as amostras de própolis, observou-se diminuição na intensidade do sinal analítico de aproximadamente 50% para o sistema VG quando comparado com o SP. Ainda comparando as inclinações para os digeridos com ácido nítrico, com os digeridos com ácido sulfurico, utilizando o sistema SP houve diminuição do sinal analítico para os digeridos com ácido sulfúrico. Entretanto, aplicando o teste t pareado para intervalo de confiança de 95%, esta diferença não foi significativa. Essa diminuição no sinal analítico pode ser creditada a elevada viscosidade do ácido sulfúrico.

4.5.0 EFEITO DO PADRÃO INTERNO

No procedimento proposto PBD, a acidez final dos digeridos foi $2,2 \text{ mol L}^{-1}$, em ácido sulfúrico, considerando a alta temperatura utilizada para a decomposição (230° C). Assim, a viscosidade do ácido sulfúrico pode interferir no sistema de transporte, na formação do aerossol, resultando em um decréscimo nas intensidades de emissão dos analitos, com a conseqüente redução da sensibilidade e obtenção de resultados inexatos e imprecisos. Esse efeito pode ser corrigido pela adição de Y ou Sc como padrão interno, na concentração final de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. Um padrão interno deve ser adicionado aos brancos, soluções de referências e às amostras e deve possuir propriedades físico-químicas semelhantes às do analito e não deve interferir na determinação do analito (FERNANDES et al., 2003). Já nos digeridos que contenham apenas HNO_3 não é necessária a adição de padrão interno, pois geralmente o processo de nebulização com este ácido ocorre sem perda da intensidade do sinal do analito. O uso de bomba peristáltica também auxilia na correção dos efeitos causados por ácidos de elevada viscosidade (TODOLÍ; MERMET, 1999). Embora a utilização desta técnica já esteja bem fundamentada na literatura, foram realizados testes para avaliar a eficiência da utilização de ítrio como padrão interno. Os resultados das concentrações obtidas em digeridos com adição

de ítrio apresentaram diferença significativa, para um nível de 95% de confiança, quando comparados com os resultados obtidos para digeridos sem adição de ítrio. Também, digeridos com adição de ítrio apresentaram resultados mais preciso, logo, optou-se por adicionar 100 µL de ítrio nos digeridos tratados com ácido sulfúrico, partindo de uma solução padrão de concentração 100 mg L⁻¹.

4.6.0 VALIDAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS DE DECOMPOSIÇÃO PARA AMOSTRAS DE PRÓPOLIS

Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT-NBRT ISO/IEC 17025), validar é confirmar por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos. A validação no laboratório pode ser aplicada para validar um método novo. Para o processo de validação podem ser empregadas comparações entre resultados obtidos por outros métodos e/ou avaliação sistemática dos fatores que influenciam o resultado. O processo de validação inclui a especificação dos requisitos, determinação das características do método além de uma verificação de que os requisitos podem ser atendidos com a aplicação do método (ABNT, 2005).

As principais características de desempenho do método incluem: seletividade e especificidade, faixa de aplicação/linearidade, limite de detecção/limite de quantificação e precisão. A precisão pode ser considerada em três níveis diferentes (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e expressa em termos da estimativa do desvio padrão absoluto e do desvio padrão relativo, como também, do intervalo de confiança da média. A seletividade é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em análise na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (INMETRO, 2007).

No processo de validação foram determinadas algumas figuras de mérito dos procedimentos de digestão propostos neste trabalho. A seguir estão descritos os resultados obtidos para a avaliação da seletividade, com a técnica de adição de analito, avaliação do efeito de matriz, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

4.6.1 Avaliação do efeito de matriz para ICP OES

Conhecido também como efeito interelementos, o efeito de matriz é um tipo de interferência causada basicamente por fenômenos de absorção ou intensificação do sinal de emissão, por parte dos outros elementos constituintes da matriz analisada (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001). Na matriz da amostra podem-se encontrar espécies que possuam propriedades similares ao analito. Essas espécies podem reagir com o solvente ou outro constituinte da matriz provocando uma resposta que não pode ser distinguida. Pode ocorrer uma diminuição ou aumento na resposta analítica. Esses efeitos podem ser induzidos não apenas pela amostra (matriz), como também, por reagentes e solventes empregados no preparo da amostra para determinação (SKOOG et al., 2006).

Neste trabalho, de forma a avaliar se a matriz resultante do procedimento de decomposição interfere na determinação de Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V e Zn, os coeficientes angulares das curvas analíticas construídas em meio de solução de ácido diluído (AC), solução do branco digerido (BC) e em meio dos digeridos das amostras (DA) foram comparadas. As curvas analíticas de calibração obtidas para a avaliação do efeito de matriz nas determinações por ICP OES são mostradas na Figura 3 e nas Tabelas 10 e 11.

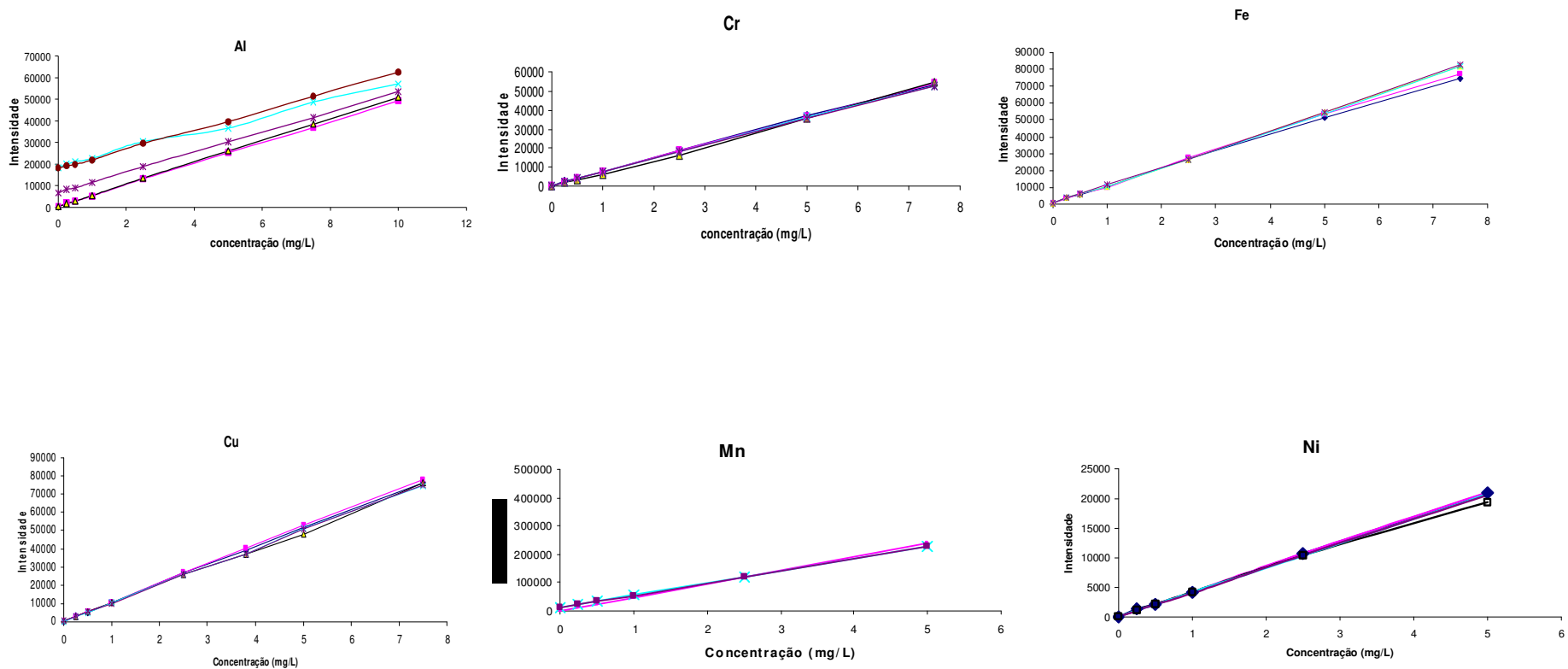


FIGURA 3. Curvas de calibração por ICP OES para Al, Cr, Fe, Cu, Mn e Ni em meio ácido diluído nítrico (AC) ($4,4 \text{ mol L}^{-1}$), branco digerido (BC), em meio matriz (A), meio matriz (B) e meio matriz (C) utilizando sistema seaspray de introdução de amostras.

As inclinações das curvas analíticas construídas em meio de ácido nítrico 4,4 mol L⁻¹, branco digerido e em meio da matriz, foram comparadas aplicando o teste t pareado e os resultados para o procedimento PFM indicaram que estas não diferem significativamente, para um nível de confiança de 95%, para a maioria dos elementos, com exceção de Al. Para o procedimento PBD, não foram observadas diferença significativas nas inclinações das curvas analíticas para alguns dos elementos investigados, com exceção de Al. Assim, pode-se concluir que as determinações podem ser efetivadas utilizando curvas analíticas de calibração preparadas em meio de solução de de ácido nítrico 4,4 mol L⁻¹ ou ácido sulfúrico 2,2 mol L⁻¹.

4.6.2 Características dos Métodos Propostos

As características dos métodos analíticos propostos foram estabelecidas em termos dos Limites de Detecção (LOD) e de Quantificação (LOQ) e dos parâmetros obtidos para as curvas analíticas de calibração.

Os resultados obtidos para LOD e LOQ e os parâmetros das curvas analíticas para os procedimentos propostos estão resumidos nas Tabelas 12 e 13. Os coeficientes de determinação, r^2 , calculados para todos os elementos, na faixa de concentração estudada, foram > 0.9999 para maioria dos elementos.

Tabela 12. Limites de detecção e quantificação obtidos por ICP OES. Para PFM utilizou-se sistema SP de introdução de amostras e PBD sistema com ranhuras em V.

(n= 10, RSD % < 10%)

Elemento	PBD			PFM		
	<i>LOD</i> (<i>mg L⁻¹</i>)	<i>LOQ</i> (<i>mg L⁻¹</i>)	<i>LOQ</i> (<i>µg g⁻¹</i>)	<i>LOD</i> (<i>mg L⁻¹</i>)	<i>LOQ</i> (<i>mg L⁻¹</i>)	<i>LOQ</i> (<i>µg g⁻¹</i>)
Ca	0,121	0,303	15,2	0,067	0,223	11,1
K	0,035	0,083	4,15	0,022	0,073	3,65
Mg	0,023	0,076	3,80	0,005	0,015	0,75
Na	0,010	0,033	1,67	0,007	0,023	1,15
P	0,011	0,036	1,83	0,006	0,021	1,05
Al	0,130	0,432	21,6	0,063	0,209	10,4
Ba	0,003	0,009	0,50	0,002	0,007	0,32
Cd	0,005	0,016	0,83	0,003	0,009	0,45
Cr	0,0009	0,002	0,15	0,001	0,003	0,13
Co	0,003	0,009	0,50	0,004	0,012	0,61
Cu	0,002	0,006	0,39	0,001	0,004	0,25
Fe	0,036	0,128	5,90	0,025	0,083	4,15
Mn	0,008	0,029	1,20	0,005	0,017	0,85
Ni	0,0006	0,0029	0,16	0,0005	0,003	0,14
Pb	0,0019	0,063	3,16	0,002	0,006	0,35
V	0,0002	0,0006	0,03	0,003	0,009	0,45
Zn	0,0018	0,058	2,90	0,025	0,048	3,90

Tabela 13. Parâmetro das curvas analíticas obtidos por ICP OES para procedimentos de decomposição de amostras de própolis: Procedimento por microondas com cavidade e sistema seaspray de introdução de amostra.

PFM		
	<i>Faixa linear (mg L⁻¹)</i>	<i>Equação da Reta</i>
Ca**	0,223 - 15	Y = 73000 x + 210
K **	0,073 - 12	Y = 2130x - 240
Mg**	0,015 - 5	Y = 14800 x + 280
Na**	0,023 - 10	Y = 2533x + 18
P **	0,021 - 15	Y = 97x + 1,3
Al	0,209 - 10	Y = 5060x + 153
Ba	0,0065 - 7,5	Y = 672222x + 320
Cd	0,009 - 5	Y = 21430x - 238
Cr	0,0026 - 5	Y = 7049x + 179
Co	0,012 - 5,5	Y = 5195x + 7
Cu	0,0041 - 5	Y = 9961x + 122
Fe	0,083 - 7,5	Y = 9914x + 407
Mn	0,017 - 5	Y = 48032x - 92
Ni	0,0028 - 4	Y = 4283x + 18
Pb	0,0065 - 6	Y = 1579x + 22
V	0,0009 - 6	Y = 5746x - 23
Zn	0,048 - 7	Y = 26009x + 986

Constatou-se que o procedimento de decomposição em forno de micro-ondas apresentou brancos mais baixos quando comparados com os resultados obtidos para bloco digestor. Os valores maiores de brancos para o sistema PBD podem ser creditados à maior exposição e manipulação das amostras e reagentes, visto que no procedimento proposto existem várias etapas de adição de ácido nítrico e peróxido. Para o procedimento empregando o forno de microondas com cavidade há redução dos brancos analíticos devido ao menor volume de ácidos utilizados, além de manter a mistura ácida isolada durante a digestão, reduzindo assim, a contaminação pela atmosfera do laboratório.

4.6.2.1 Avaliação da Exatidão dos Procedimentos Propostos

No presente trabalho, para avaliação da exatidão dos procedimentos propostos foram utilizadas três estratégias: (1) comparação com procedimento de incineração de acordo com o método oficial de referência para alimentos, da AOAC 999.1; (2) testes de adição e recuperação dos analitos, e (3) utilização de material de referência certificado NIST 1515 e 1570 a.

4.6.2.2 Teste de Adição e Recuperação dos Analitos para ICP OES

Na ausência de CRM adequado para validação dos procedimentos, uma das estratégias utilizadas foi a realização de experimentos de adição e recuperação de analitos para as três amostras (A, B, C) em três níveis de concentração, em uma tentativa de simular valores de possíveis concentrações naturais (FREITAS, 2003). A técnica de adição de analitos foi aplicada utilizando os procedimentos PBD e PFM. Os analitos foram adicionados as amostras e submetidos às etapas de decomposição. As determinações foram feitas em condições robustas de operação do ICP OES. Os resultados das recuperações para os elementos de interesse estão listados nas Tabelas 13 e 14.

Pode-se constatar que para Mn, quando utilizando o procedimento PFM, as recuperações ficaram na faixa de 91-106% enquanto no PBD os resultados ficaram na faixa de 93 a 108 % (Tabelas 14 e 15). Na amostra B, obteve-se maior recuperação utilizando PFM que foi 113 % para Ni. Para o procedimento PBD, Ba, na amostra A obteve recuperação na faixa de 96-103 %, na amostra B de 98 a 101 % e na amostra C 94 a 97 %. As menores percentagens de recuperação foram obtidas para V e Zn 86 e 88 %, respectivamente. Foram realizados testes de adição e recuperação para Ca, K, Mg, Na e P e as recuperações variaram na faixa de 96-101 %.

Tabela 14. Resultados para as recuperações dos elementos Ba, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V e Zn - teste de adição de analito em amostras de própolis (amostras A, B e C). média \pm desvio padrão, n = 3 e RSD \leq 10%. Procedimento PFM.

	<i>Concentração adicionada (mg L⁻¹)</i>	<i>Amostra A (Rec.%)</i>	<i>Amostra B (Rec.%)</i>	<i>Amostra C (Rec.%)</i>
Ba	0,5	81 \pm 5	89 \pm 2	89 \pm 2
	1,5	100 \pm 1	98 \pm 2	98 \pm 2
	3,0	92 \pm 1	94 \pm 1	94 \pm 1
Cr	0,5	100 \pm 5	95 \pm 1	99 \pm 3
	1,5	99 \pm 5	100 \pm 5	97 \pm 3
	3,0	81 \pm 5	94 \pm 2	95 \pm 1
Cu	0,5	100 \pm 1	100 \pm 5	102 \pm 3
	1,5	95 \pm 7	99 \pm 6	95,2 \pm 3
	3,0	94,4	95 \pm 1	92 \pm 2
Fe	0,5	92 \pm 1	94 \pm 2	107 \pm 3
	1,5	99 \pm 3	86 \pm 1	93 \pm 9
	3,0	95 \pm 2	101 \pm 1	94 \pm 8
Mn	0,5	96 \pm 5	93 \pm 5	97 \pm 3
	1,5	97 \pm 1	100 \pm 1	91 \pm 4
	3,0	106 \pm 4	92 \pm 1	99 \pm 3
Ni	0,5	87 \pm 7	95 \pm 1	108 \pm 15
	1,5	94 \pm 6	113 \pm 5	96 \pm 6
	3,0	95 \pm 7	94 \pm 2	94 \pm 5
V	0,5	93 \pm 5	87 \pm 7	97 \pm 2
	1,5	94 \pm 2	94 \pm 6	99 \pm 3
	3,0	95 \pm 2	95 \pm 7	91 \pm 4
Zn	0,5	86 \pm 1	98 \pm 1	100 \pm 9
	1,5	101 \pm 1	96 \pm 3	91 \pm 4
	3,0	94 \pm 8	101 \pm 8	93 \pm 5

Tabela 15. Resultados para as recuperação dos elementos Ba, Cr, Fe, Mn, Ni, V e Zn - teste de adição de analito em amostras de própolis (amostras A, B e C). Média \pm desvio padrão, n = 3 e RSD \leq 10%. Procedimento PBD.

	<i>Concentração adicionada (mg L⁻¹)</i>	<i>Amostra A (Rec.%)</i>	<i>Amostra B (Rec.%)</i>	<i>Amostra C (Rec.%)</i>
Ba	0,5	96 \pm 6	98 \pm 3	97 \pm 5
	2,5	103 \pm 8	92 \pm 2	99 \pm 1
	4,0	98 \pm 4	101 \pm 1	94 \pm 4
Cr	0,5	87 \pm 7	93 \pm 5	99 \pm 3
	2,5	94 \pm 6	100 \pm 1	97 \pm 3
	4,0	95 \pm 7	92 \pm 1	93 \pm 4
Fe	0,5	96 \pm 4	99 \pm 5	110 \pm 5
	2,5	94 \pm 7	99 \pm 2	99 \pm 4
	4,0	98 \pm 1	104 \pm 5	93 \pm 2
Mn	0,5	93 \pm 5	96 \pm 5	94 \pm 5
	2,5	97 \pm 1	100 \pm 1	96 \pm 6
	4,0	106 \pm 4	92 \pm 1	108 \pm 4
Ni	0,5	< LOQ	97 \pm 3	95 \pm 1
	2,5	<LOQ	91 \pm 4	113 \pm 5
	4,0	<LOQ	99 \pm 3	94 \pm 3
V	0,5	92 \pm 5	97 \pm 2	87 \pm 7
	2,5	84 \pm 2	99 \pm 3	94 \pm 6
	4,0	75 \pm 2	91 \pm 4	95 \pm 7
Zn	0,5	91 \pm 3	88 \pm 1	97 \pm 3
	2,5	99 \pm 3	96 \pm 1	95 \pm 2
	4,0	92 \pm 5	101 \pm 8	101 \pm 5

4.6.2.3 Comparação com método de referência da AOAC

Objetivando avaliar os procedimentos de decomposição em bloco digestor e em forno de microondas com cavidade, as amostras A, B e C foram submetidas a método oficial de referência para alimentos da AOAC (999.11). Os teores determinados estão listados nas Tabelas 16 e 17. Aplicando o test t pareado para um intervalo de confiança de 95%, não houve diferença significativa para Ca, K, Mg e Na. PFM apresentou menores valores de RSD que PBD.

Tabela 16: Concentração de Ca, K, Mg, Na e P por ICP OES, em amostra própolis utilizando PBD, PFM e método recomendado pela AOAC. (Teor médio \pm desvio padrão, em $\mu\text{g g}^{-1}$; DPR < 10%, n=3)

<i>Elementos</i>	<i>Procedimento</i>	<i>Amostra A</i>	<i>Amostra B</i>	<i>Amostra C</i>
Ca	Bloco	312 \pm 17	625 \pm 30	1371 \pm 145
	Microondas	315 \pm 10	616 \pm 23	1369 \pm 103
	AOAC	313 \pm 19	611 \pm 12	1309 \pm 113
K	Bloco	248 \pm 6	761 \pm 22	997 \pm 65
	Microondas	251 \pm 4	749 \pm 21	994 \pm 50
	AOAC	232 \pm 3	776 \pm 32	974 \pm 52
Mg	Bloco	118 \pm 5	232 \pm 18	646 \pm 61
	Microondas	144 \pm 1	234 \pm 13	632 \pm 63
	AOAC	130 \pm 2	232 \pm 12	622 \pm 23
Na	Bloco	148 \pm 10	90 \pm 9	252 \pm 20
	Microondas	169 \pm 8	97 \pm 6	254 \pm 17
	AOAC	150 \pm 2	96 \pm 12	245 \pm 23
P	Bloco	110 \pm 5	212 \pm 12	622 \pm 23
	Microondas	147 \pm 13	220 \pm 5	626 \pm 56
	AOAC	110 \pm 2	212 \pm 12	619 \pm 23

Tabela 17: Teores de Al, Ba, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, V e Zn, em $\mu\text{g g}^{-1}$, por ICP OES, utilizando os procedimentos PBD, PFM e recomendado pela AOAC. Teor médio \pm desvio padrão (n=3)

<i>Elementos</i>	<i>Procedimento</i>	<i>Amostra A</i>	<i>Amostra B</i>	<i>Amostra C</i>
Al	Bloco	471 \pm 43	76,1 \pm 5,4	414 \pm 18
	Microondas	443 \pm 28	75 \pm 4	414 \pm 14
	AOAC	445 \pm 23	75,6 \pm 3,4	412 \pm 12
Ba	Bloco	3,32 \pm 0,09	1,19 \pm 0,09	2,96 \pm 0,17
	Microondas	3,35 \pm 0,08	1,22 \pm 0,04	2,81 \pm 0,14
	AOAC	3,25 \pm 0,29	1,18 \pm 0,16	2,71 \pm 0,06
Cr	Bloco	1,17 \pm 0,19	1,57 \pm 0,13	4,08 \pm 0,18
	Microondas	1,13 \pm 0,015	1,53 \pm 0,15	4,39 \pm 0,21
	AOAC	1,14 \pm 0,12	1,57 \pm 0,12	4,08 \pm 0,18
Cu	Bloco	2,52 \pm 0,18	1,72 \pm 0,01	2,81 \pm 0,10
	Microondas	2,54 \pm 0,08	1,62 \pm 0,09	2,96 \pm 0,09
	AOAC	2,01 \pm 0,42	1,55 \pm 0,09	2,72 \pm 0,10
Fe	Bloco	163 \pm 15	86,0 \pm 2,5	497 \pm 12
	Microondas	162 \pm 12	91,0 \pm 2,1	489 \pm 10
	AOAC	165 \pm 12	88,0 \pm 4,2	495 \pm 12
Mn	Bloco	15,4 \pm 1,3	23,0 \pm 1,9	25,6 \pm 2,1
	Microondas	16,5 \pm 0,9	21,0 \pm 1,7	26,6 \pm 1,5
	AOAC	16,2 \pm 1,2	22,8 \pm 0,3	25,4 \pm 1,1
Ni	Bloco	0,70 \pm 0,09	0,71 \pm 0,06	1,79 \pm 0,16
	Microondas	0,98 \pm 0,15	0,98 \pm 0,15	1,69 \pm 0,01
	AOAC	0,92 \pm 0,12	0,98 \pm 0,12	1,71 \pm 0,05
V	Bloco	0,34 \pm 0,06	0,73 \pm 0,05	1,32 \pm 0,09
	Microondas	0,36 \pm 0,02	0,79 \pm 0,09	1,25 \pm 0,07
	AOAC	0,33 \pm 0,12	0,88 \pm 0,75	1,26 \pm 0,04
Zn	Bloco	81,2 \pm 2,6	47,6 \pm 2,4	76,0 \pm 3,5
	Microondas	79,3 \pm 1,1	46,6 \pm 1,4	87,3 \pm 2,7
	AOAC	79,0 \pm 0,5	50,7 \pm 2,0	87,9 \pm 5,2

Aplicando test pareado ($p > 95\%$), não foram observadas diferenças significativas nos teores dos elementos investigados.

4.6.2.4 Análise de Material de Referência Certificado

Para a avaliação da exatidão do procedimento empregando forno de microondas com cavidade, amostras dos CRMs 1515 e 1570a foram tratadas com o procedimento proposto. Para Al e Fe, aplicando t-teste pareado, ao nível de 95% de confiança foi verificada diferença significativa nas concentrações obtidas para o material CRM 1515 (Tabela 18). Para os outros elementos investigados não foi encontrado diferença significativa ($p > 95$).

Tabela 18. Comparação dos valores certificados de macro, micro elementos obtidos aplicando digestão em forno de microondas com cavidade ($\mu\text{g g}^{-1}$). (* valores não certificados)

Elemento	CRM 1515		CRM 1570a	
	Valor certificado	Valor obtido	Valor certificado	Valor obtido
Ca	1,526 ± 0,015	1,508 ± 0,007	1,527 ± 0,041	1,500 ± 0,031
K	1,610 ± 0,020	1,482 ± 0,044	2,903 ± 0,052	3,044 ± 0,035
Mg	0,271 ± 0,008	0,264 ± 0,006	0,89*	0,827 ± 0,007
P	0,159 ± 0,011	0,160 ± 0,005	0,518 ± 0,011	0,528 ± 0,005
Al	286 ± 9	237 ± 12	310 ± 11	215 ± 7
As	0,038 ± 0,007	< LOQ	0,068 ± 0,012	< LOQ
Ba	49 ± 2	43,7 ± 0,2	-	3,56 ± 0,15
Cd	0,013 ± 0,002	< LOQ	2,89 ± 0,07	2,35 ± 0,06
Co	-	-	0,39 ± 0,51	< LOQ
Cu	5,64 ± 0,24	5,17 ± 0,59	12,2 ± 0,6	10,9 ± 0,7
Fe	83 ± 5	69,0 ± 1,1	-	246 ± 4
Mn	54 ± 3	49,0 ± 3,5	75,9 ± 1,9	72,9 ± 1,0
Mo	0,094 ± 0,013	< LOQ	-	< LOQ
Ni	0,91 ± 0,12	1,10 ± 0,16	2,14 ± 0,10	2,07 ± 0,29
Pb	0,470 ± 0,024	< LOQ	0,20*	< LOQ
Se	0,050 ± 0,009	< LOQ	0,117 ± 0,009	< LOQ
Sr	25 ± 2	< LOQ	55,6 ± 0,8	50,7 ± 0,6
V	0,26 ± 0,03	0,27 ± 0,05	0,57 ± 0,03	0,55 ± 0,13
Zn	12,5 ± 0,3	11,9 ± 0,1	82 ± 3	79,8 ± 8,1

4.7.0 AVALIAÇÃO DAS POTENCIALIDADES DA HR-CS-FAAS NA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO MINERAL DE AMOSTRAS DE PRÓPOLIS

As concentrações de Ca, K, Mg, Na e P nas amostras de própolis também foram determinadas por HR-CS FAAS, de forma a avaliar a aplicabilidade da técnica para esta matriz. Para tal foram selecionados os digeridos resultantes do procedimento PFM, uma vez que a concentração dos analitos de interesse no digerido final foram 10 vezes menores que no procedimento PBD e com isso não seria necessário maior diluição para ajustar as concentrações dos analitos nas amostras às curvas de calibração.

4.7.1.0 Validação do Método EMPREGANDO HR-CS FAAS

Foram investigadas as seguintes características de desempenho do método: seletividade, faixa de aplicação/linearidade, limite de detecção/limite de quantificação, efeito de matriz e precisão.

4.7.1.1– Avaliação do Efeito de matriz para a técnica HR-CS FAAS

O efeito da matriz sobre o sinal analítico foi avaliado, usando a técnica de adição de analito, construindo-se curvas analíticas em diferentes meios: meio ácido nítrico diluído (AC) ($4,4 \text{ mol L}^{-1}$), meio branco digerido (BC) e meio dos digeridos D(A), D(B) e D(C). As curvas analíticas de calibração foram preparadas nas seguintes faixas de concentração: $0,20 - 4,0 \text{ mg L}^{-1}$ para Mg e $0,20 - 5,0 \text{ mg L}^{-1}$ para K, Na, Ca, Mg e P tomando-se alíquotas da solução estoque concentração 200 mg L^{-1} . Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 4-7 e na Tabela 19.

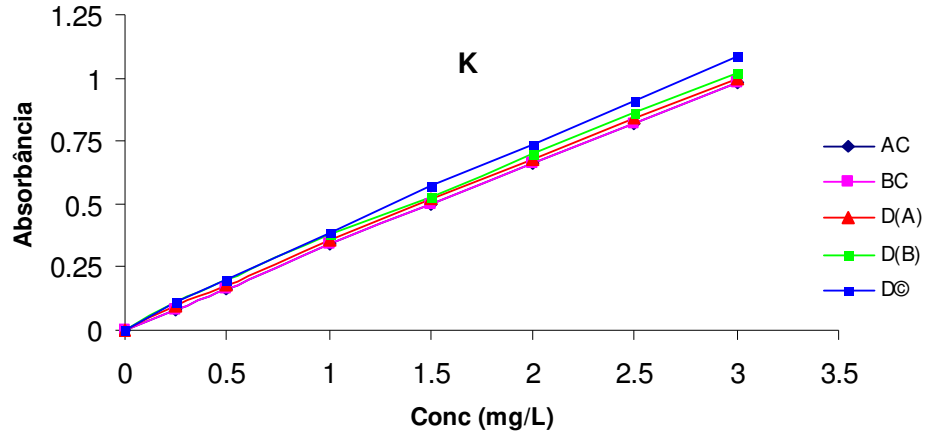


Figura 4. Curvas de calibração para potássio, no HR-CS-FAAS em meio ácido, em meio branco digerido, em meio matriz A, em meio matriz B e em meio matriz C.

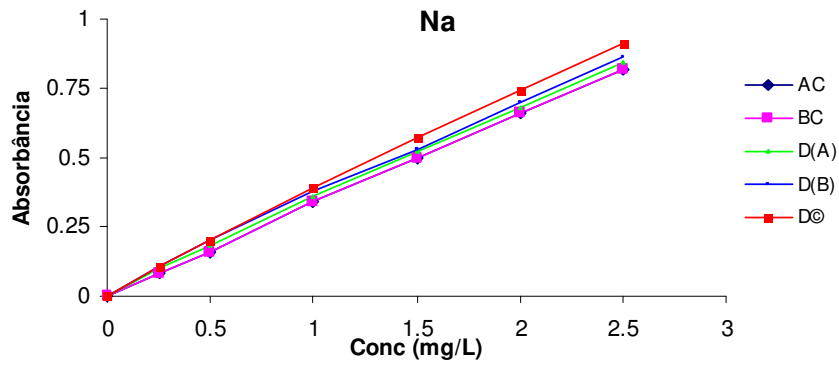


Figura 5. Curvas de calibração para sódio, no HR-CS-FAAS em meio ácido, em meio branco digerido, em meio matriz A, em meio matriz B e em meio matriz C.

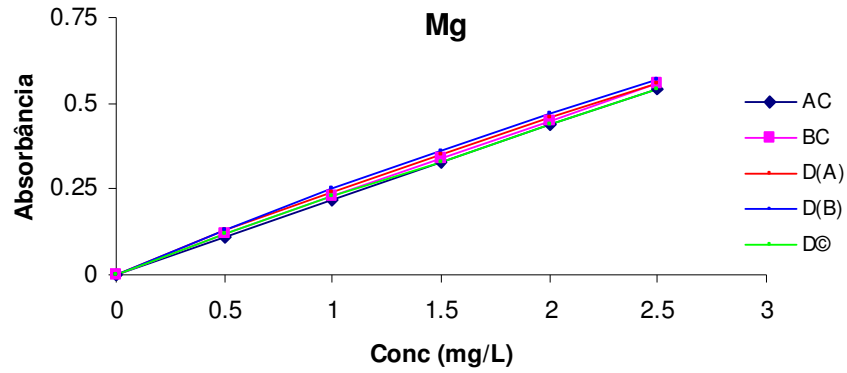


Figura 6. Curvas de calibração para magnésio no HR-CS-FAAS em meio ácido, em meio branco digerido, em meio matriz A, em meio matriz B e em meio matriz C.

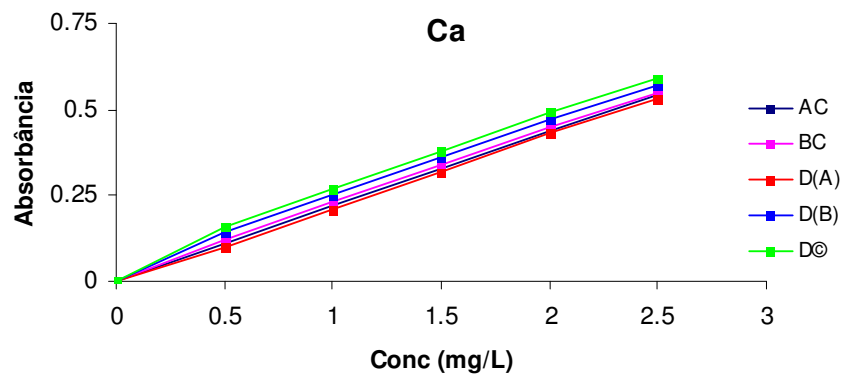


Figura 7. Curvas de calibração para cálcio, no HR-CS-FAAS em meio ácido, em meio branco digerido, em meio matriz A, em meio matriz B e em meio matriz C.

Os coeficientes angulares das curvas analíticas nos diferentes meios foram comparados e pode-se concluir que não foi observada interferência na determinação de K, Ca, Na e Mg por HR-CS FAAS e aplicando o teste t pareado não houve diferença significativa para um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 19: Inclinações das curvas analíticas para K, Na, Mg e Ca em HR-CS FAAS construídas em diferentes meios.

	<i>ÁCIDO</i>	<i>BRANCO</i>	<i>AMOSTRA A</i>	<i>AMOSTRA B</i>	<i>AMOSTRA C</i>
K (766.4908)	0,947	0,921	0,956	0,964	0,966
Ca (422.6728)	0,522	0,515	0,529	0,523	0,520
Mg (285.2125)	0,689	0,699	0,692	0,690	0,695
Na (588.9953)	0,717	0,718	0,716	0,717	0,719

4.7.1.2 Características analíticas empregando HR-CS FAAS

Foram realizados 10 ensaios correspondentes ao branco submetidos ao processo de decomposição PFM e os sinais de absorvância medidos por HR-CS FAAS. Os parâmetros das curvas analíticas e os limites de detecção e quantificação obtidos estão mostrados na Tabela 19. A faixa linear esta expressa em termos de LOQ e máximo de concentração obtida.

Tabela 19 A: Parâmetro das curvas analíticas obtidos por HR-CS FAAS.

<i>Elementos</i>	<i>Faixa Linear, (mg L⁻¹)</i>	<i>LOD (mg L⁻¹)</i>	<i>LOQ (mg L⁻¹)</i>	<i>LOQ (µg g⁻¹)</i>
Ca	0,27 – 2,50	0,08	0,27	13,5
K	0,16 – 3,00	0,05	0,16	8,00
Mg	0,09 – 2,50	0,03	0,09	4,50
Na	0,13 – 2,50	0,04	0,13	6,50
P	0,07 – 2,00	0,02	0,06	3,00

4.7.1.3 Avaliação da Exatidão do método empregando HR-CS FAAS

A exatidão do método empregando a técnica HR-CS FAAS foi avaliada empregando testes de adição e recuperação e por comparação com os resultados obtidos por ICP OES.

4.7.1.3.1 Teste de Adição e Recuperação dos Analitos para HR-CS FAAS

Esta etapa do procedimento foi bastante crítica, pois, as concentrações dos analitos nas amostras são diferentes e como a faixa de linearidade do equipamento é relativamente estreita, as amostras tiveram de ser diluídas para adequar a concentração à faixa linear de trabalho. Foram avaliados três pontos de adição e recuperação da curva de calibração. As concentrações adicionadas dependeram da concentração final dos analitos nos digeridos sendo Nível 1 (50%), nível 2 (100%) e nível 3 (150%) da concentração final dos analitos nos digeridos. Os resultados estão listados na tabela 20.

Tabela 20. Resultados dos testes de adição e recuperação para Ca, K, Mg e Na em amostras de própolis após quantificação por HR-CS FAAS(média \pm desvio padrão, n=3).

	<i>Nível de Concentração adicionada</i>	<i>Amostra A (Rec.%)</i>	<i>Amostra B (Rec.%)</i>	<i>Amostra C (Rec.%)</i>
K	Nível 1	86 \pm 6	100 \pm 1	99 \pm 4
	Nível 2	103 \pm 8	92 \pm 1	92 \pm 2
	Nível 3	98 \pm 4	95 \pm 4	101 \pm 1
Ca	Nível 1	96 \pm 4	97 \pm 5	99 \pm 3
	Nível 2	94 \pm 7	99 \pm 1	97 \pm 6
	Nível 3	98 \pm 1	94 \pm 4	99 \pm 1
Mg	Nível 1	110 \pm 9	96 \pm 5	97 \pm 5
	Nível 2	99 \pm 2	100 \pm 1	99 \pm 1
	Nível 3	98 \pm 6	92 \pm 1	94 \pm 4
Na	Nível 1	94 \pm 5	99 \pm 5	110 \pm 5
	Nível 2	108 \pm 14	99 \pm 2	91 \pm 2
	Nível 3	97 \pm 1	104 \pm 5	93 \pm 2

A faixa de recuperação variou de $(86 \pm 6$ a $110 \pm 5)$ % para K e Na, respectivamente. A amostra C foi diluída 10 vezes por apresentar maiores concentrações de K e Ca. De modo geral as recuperações foram excelentes, viabilizando o procedimento para análise de K, Ca, Na e Mg.

4.7.1.3.2 – Comparação dos resultados do HR-CS FAAS com ICP OES

Nesta etapa do trabalho, a proposta é verificar a aplicação da técnica HR-CS FAAS na determinação dos elementos essenciais Ca, K, Mg e Na em amostras de própolis, validando os resultados obtidos com as concentrações determinadas por ICP OES.

Na Tabela 21 estão mostrados os resultados obtidos para duas técnicas. Para todos os elementos, com exceção de Ca na amostra B, não foram encontradas diferenças significativas, aplicando o teste t pareado no nível de confiança de 95%.

Tabela 21 - Concentrações de Ca, K, Mg e Na em amostras de própolis empregando ICP OES e HR-CS FAAS. (Teor médio \pm desvio padrão; DPR < 10 %, n=3)

	<i>Amostra A ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>		<i>Amostra B ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>		<i>Amostra C ($\mu\text{g g}^{-1}$)</i>	
	ICP OES	HR-CS FAAS	ICP OES	HR-CS FAAS	ICP OES	HR-CS FAAS
K	251 \pm 4	257 \pm 4	749 \pm 21	753 \pm 45	994 \pm 12	965 \pm 5
Ca	315 \pm 10	321 \pm 2	616 \pm 23	684 \pm 59	1369 \pm 103	1355 \pm 99
Mg	144 \pm 1	141 \pm 4	234 \pm 13	238 \pm 3	632 \pm 63	626 \pm 1
Na	169 \pm 8	189 \pm 4	97,6 \pm 6,1	92,4 \pm 1,9	254 \pm 20	243 \pm 2

4.8.0 AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO ELEMENTOS QUÍMICOS PRESENTES EM AMOSTRAS DE PRÓPOLIS “ IN NATURA” PRODUZIDAS NO ESTADO DA BAHIA.

O relatório de especialista da OMS sobre elementos essenciais na nutrição humana reforça a necessidade de obtenção de informações confiáveis a respeito do conteúdo mineral de diversos tipos de alimentos, bem como monitorar a presença de contaminantes, especialmente em alimentos para crianças.

A princípio todos os minerais são essenciais, mas alguns devem estar presentes em maior quantidade, tais como Ca, K e Mg, porque o organismo

necessita de elevada concentração destes elementos. O elemento Ca, para adultos de 19 a 50 anos, a necessidade diária pode chegar há 1200 mg/dia. Sabendo-se a respeito da composição mineral dos alimentos é possível interferir e, se necessário, enriquecê-los com elementos essenciais para que possam desempenhar sua função nutritiva.

Diante da falta de informação a respeito da composição mineral da própolis produzida na Bahia, foi feita análise submetendo as amostras ao procedimento de digestão por micro-ondas e as determinações foram feitas por ICP OES em condições robustas de trabalho.

As amostras foram identificadas com códigos de acordo com o município onde se localizada o apiário e separadas por região econômica (Figura 8) de acordo com a classificação da superintendência de estudos econômicos e sociais da Bahia (SEI). Embora Feira de Santana seja classificada, pela SEI como região do Recôncavo Paraguaçu, aqui foi classificada como Recôncavo Sul devido a proximidade das regiões de área de coleta das amostras de própolis (SEI; 2009). O mesmo ocorreu com Irecê (região econômica Irecê) aqui classificada como Chapada Diamantina. Na Tabela 22A, 22B, 22C, 22D e 22E estão os resultados obtidos para as concentrações das amostras de própolis. Para todas as amostras, as concentrações de Pb, Co e Cd estavam abaixo do LOQ do método.

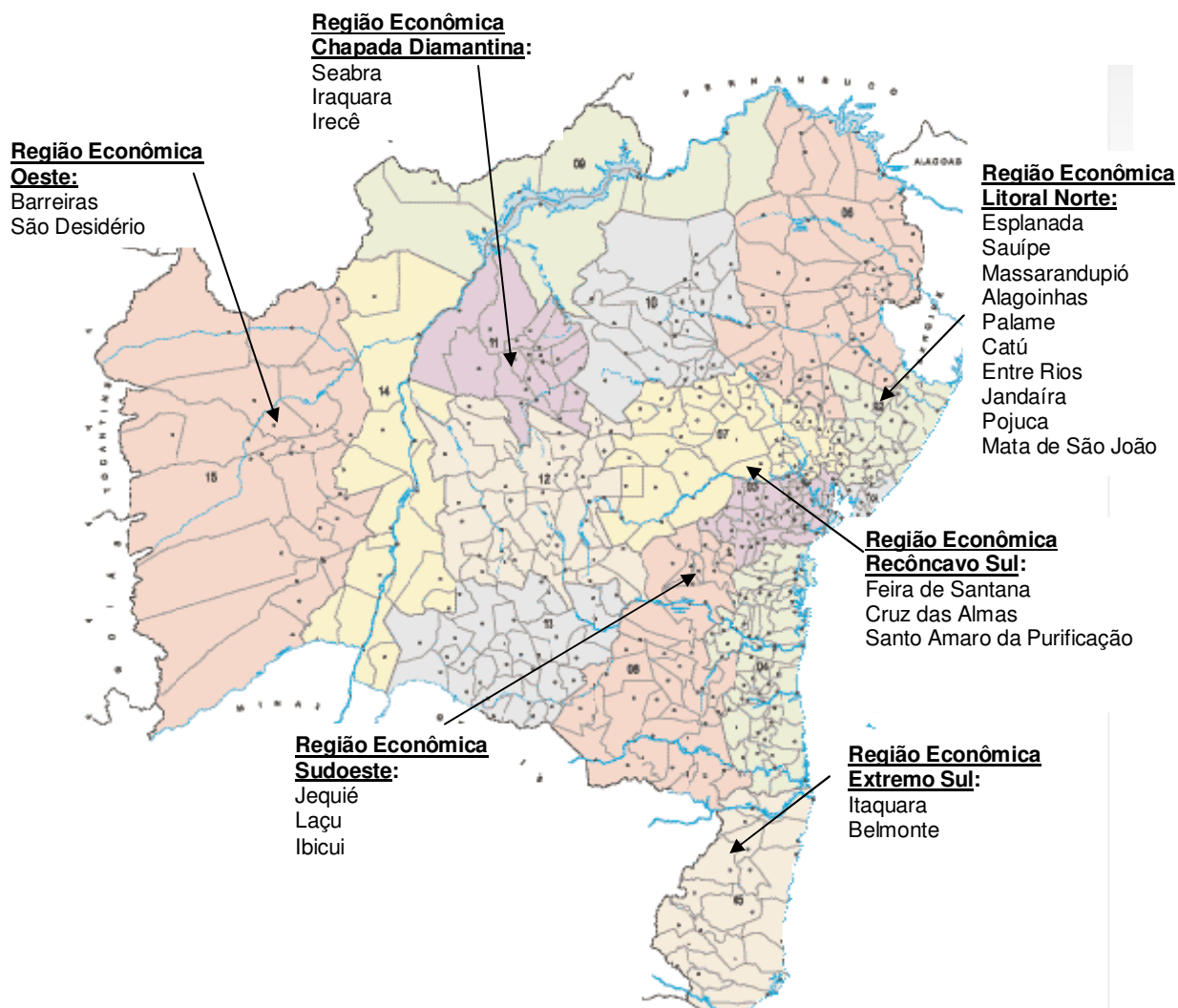


Figura 8: Mapa de divisão econômica do Estado da Bahia extraído do site SEI (Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia).

Tabela 22 A - Concentração média de macro e micro elementos, em $\mu\text{g g}^{-1}$, nas amostras de própolis do Litoral Norte (n=3).

Região Econômica: Litoral Norte											
Código	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	Zn
E/1	1,26 ± 0,01	312 ± 9	*	0,61 ± 0,05	193 ± 12	1745 ± 121	193 ± 2	2,22 ± 0,13	61,2 ± 2,1	3,21 ± 0,09	101 ± 1
E/2	1,32 ± 0,05	311 ± 3	*	0,52 ± 0,05	192 ± 14	1637 ± 22	171 ± 6	2,23 ± 0,04	62,4 ± 2,9	3,24 ± 0,09	99,2 ± 4,3
S 1	1,45 ± 0,02	325 ± 9	*	0,42 ± 0,02	167 ± 3	1801 ± 55	212 ± 9	5,12 ± 0,11	90,6 ± 1,1	2,13 ± 0,12	89,6 ± 3,9
S 2	1,46 ± 0,09	329 ± 15	*	0,43 ± 0,02	169 ± 9	1744 ± 79	215 ± 11	5,12 ± 0,04	90,9 ± 3,0	2,13 ± 0,02	88,9 ± 4,5
S 3	1,46 ± 0,07	297 ± 21	*	0,43 ± 0,05	165 ± 4	1721 ± 65	215 ± 13	5,15 ± 0,22	92,2 ± 9,1	2,14 ± 0,11	99,2 ± 4,9
S 4	1,42 ± 0,02	330 ± 24	*	0,41 ± 0,04	150 ± 12	1516 ± 12	211 ± 11	5,13 ± 0,02	93,3 ± 7,2	2,19 ± 0,08	112 ± 3
M	1,22 ± 0,01	331 ± 11	*	0,72 ± 0,02	184 ± 11	1613 ± 90	201 ± 3	1,92 ± 0,21	52,2 ± 2,5	1,91 ± 0,02	110 ± 2
AI/1	1,21 ± 0,02	292 ± 20	1,10 ± 0,06	0,56 ± 0,05	197 ± 17	1875 ± 43	261 ± 11	3,39 ± 0,11	95,1 ± 5,0	1,99 ± 0,01	92,3 ± 1,3
AI/2	0,97 ± 0,01	313 ± 31	1,12 ± 0,05	0,53 ± 0,02	194 ± 9	1892 ± 67	258 ± 14	3,23 ± 0,12	82,3 ± 1,2	1,81 ± 0,01	94,2 ± 9,0
AI/3	0,81 ± 0,05	305 ± 21	0,29 ± 0,03	0,36 ± 0,01	155 ± 10	1895 ± 92	234 ± 5	2,29 ± 0,02	96,5 ± 4,9	1,41 ± 0,08	64,6 ± 3,9
AI/4	1,14 ± 0,11	299 ± 6	1,00 ± 0,05	0,66 ± 0,01	184 ± 6	1890 ± 23	231 ± 3	2,99 ± 0,31	93,6 ± 4,1	1,82 ± 0,12	96,4 ± 2,1
P/1	1,21 ± 0,22	345 ± 5	0,11 ± 0,02	0,43 ± 0,02	163 ± 9	1403 ± 156	225 ± 3	4,50 ± 0,11	96,7 ± 3,2	1,89 ± 0,21	70,5 ± 3,1
P/2	1,22 ± 0,11	341 ± 9	0,15 ± 0,01	0,65 ± 0,01	158 ± 7	1402 ± 32	220 ± 8	4,37 ± 0,31	84,6 ± 7,1	1,88 ± 0,02	62,2 ± 3
P/3	1,42 ± 0,12	339 ± 17	*	0,35 ± 0,02	118 ± 11	1415 ± 24	229 ± 11	4,01 ± 0,42	85,2 ± 4,7	1,47 ± 0,12	46,7 ± 2,3
P/4	1,46 ± 0,06	346 ± 26	*	0,61 ± 0,01	145 ± 3	1389 ± 11	239 ± 3	4,83 ± 0,04	77,3 ± 3,1	1,68 ± 0,02	70,9 ± 1,1
C/1	0,52 ± 0,01	499 ± 21	3,83 ± 0,03	2,50 ± 0,06	338 ± 2	885 ± 98	342 ± 21	3,10 ± 0,02	5,25 ± 0,28	1,02 ± 0,01	94,4 ± 4,2
C/2	0,42 ± 0,02	498 ± 8	4,28 ± 0,03	2,58 ± 0,05	341 ± 13	890 ± 34	335 ± 18	3,01 ± 0,11	5,52 ± 0,20	1,04 ± 0,10	90,6 ± 2,2
C/3	0,51 ± 0,01	499 ± 31	2,82 ± 0,21	2,01 ± 0,21	289 ± 2	779 ± 67	339 ± 14	2,40 ± 0,02	5,50 ± 0,31	0,71 ± 0,02	48,1 ± 3,6
C/4	0,50 ± 0,05	493 ± 42	3,86 ± 0,05	2,60 ± 0,24	340 ± 13	791 ± 32	347 ± 18	2,40 ± 0,01	25,1 ± 2,24	1,04 ± 0,04	79,5 ± 6,9
ER	1,45 ± 0,11	312 ± 9	0,23 ± 0,01	0,77 ± 0,01	242 ± 21	1372 ± 25	223 ± 3	2,46 ± 0,04	83,6 ± 1,2	1,14 ± 0,08	83,3 ± 3,2

Continuação da tabela 22 A – Concentração média de macro e micro elementos, $\mu\text{g g}^{-1}$ nas amostras de própolis do litoral norte (n=3).

Jn	1,21 ± 0,11	298 ± 12	1,20 ± 0,05	0,65 ± 0,03	195 ± 6	1357 ± 21	251 ± 12	3,20 ± 0,12	94,5 ± 1,1	1,5 ± 0,12	70,2 ± 4,2
PF	1,21 ± 0,09	412 ± 13	*	0,67 ± 0,01	167 ± 9	1401 ± 88	213 ± 6	4,30 ± 0,11	74,3 ± 4,2	2,17 ± 0,11	73,4 ± 2,1
ET	0,99 ± 0,04	356 ± 15	2,98 ± 0,02	0,71 ± 0,04	153 ± 11	1510 ± 100	304 ± 12	4,01 ± 0,15	73,1 ± 6,1	1,27 ± 0,04	75,7 ± 2,0
PJ	0,56 ± 0,02	513 ± 31	6,29 ± 0,31	2,49 ± 0,21	324 ± 23	778 ± 12	364 ± 32	3,72 ± 0,21	21,3 ± 1,9	1,88 ± 0,11	71,3 ± 4,1
PJ	0,54 ± 0,01	545 ± 37	7,95 ± 0,23	2,60 ± 0,22	356 ± 26	776 ± 12	328 ± 9	3,13 ± 0,19	22,9 ± 1,1	1,99 ± 0,07	65,2 ± 3,1
MJ 1	1,45 ± 0,11	424 ± 21	2,91 ± 0,15	0,33 ± 0,01	158 ± 8	1567 ± 14	205 ± 11	6,42 ± 0,32	93,1 ± 1,3	2,27 ± 0,12	92,6 ± 2,2
MJ 2	1,41 ± 0,09	430 ± 32	0,50 ± 0,02	0,59 ± 0,01	163 ± 12	1562 ± 45	189 ± 12	5,39 ± 0,22	94,3 ± 2,0	2,39 ± 0,21	83,9 ± 4,3
MJ 3	1,32 ± 0,12	267 ± 11	*	0,39 ± 0,02	170 ± 10	1730 ± 87	162 ± 6	4,79 ± 0,32	94,4 ± 4,3	1,99 ± 0,11	87,1 ± 2,7

tabela 22 B – Concentração média de macro e micro elementos, $\mu\text{g g}^{-1}$ em amostras de própolis da Região Oeste da Bahia (n=3).

<i>Código</i>	<i>Região Econômica: Oeste</i>										
	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	Zn
Bar 1	0,62 ± 0,02	533 ± 12	0,33 ± 0,04	0,59 ± 0,04	21,2 ± 2,1	721 ± 15	329 ± 11	8,39 ± 0,12	22,2 ± 1,1	1,90 ± 0,01	64,1 ± 1,2
Bar 2	0,57 ± 0,04	545 ± 16	0,17 ± 0,01	0,69 ± 0,01	26,4 ± 2,2	690 ± 34	351 ± 4	9,04 ± 0,32	23,6 ± 2,1	1,60 ± 0,02	62,5 ± 3,2
SD 1	0,62 ± 0,01	499 ± 37	1,13 ± 0,14	0,62 ± 0,14	29,4 ± 1,7	787 ± 31	234 ± 6	2,01 ± 0,15	22,4 ± 1,1	1,00 ± 0,01	66,3 ± 3,0
SD 2	0,43 ± 0,03	542 ± 21	1,19 ± 0,12	0,96 ± 0,04	27,3 ± 1,1	741 ± 20	362 ± 11	6,87 ± 0,09	24,1 ± 0,3	1,70 ± 0,03	87,6 ± 2,1

tabela 22 C – Concentração média de macro e micro elementos, $\mu\text{g g}^{-1}$ em amostras de própolis da Chapada Diamantina (n=3).

Região Econômica: Chapada Diamantina											
Código	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	Zn
Se/1	0,66 ± 0,06	423 ± 15	0,52 ± 0,03	0,77±0,02	55,1 ± 2,2	850 ± 15	344 ± 32	6,87 ± 0,03	14,6 ± 1,2	1,50 ± 0,03	99,5 ± 5,1
Se/2	0,55 ± 0,02	524 ± 21	0,72 ± 0,04	0,66±0,02	58,8 ± 6,2	859 ± 16	350 ± 21	6,38 ± 0,03	21,3 ± 2,0	1,10 ± 0,04	84,1 ± 2,3
Se/3	0,62 ± 0,04	499 ± 9	*	0,45±0,02	35,2 ± 2,4	844 ± 54	345 ± 22	3,41± 0,03	21,6 ± 0,9	1,60 ± 0,02	87,4 ± 1,1
Ira	0,62 ± 0,01	465 ± 11	0,42 ± 0,01	0,78±0,02	57,2 ± 2,2	835 ± 11	345 ± 23	8,70±0, 23	17,9 ± 0,8	1,20 ± 0,09	92,3 ± 4,2
Ire	0,65 ± 0,02	587 ± 51	0,47 ± 0,02	0,67±0,02	28,2 ± 1,9	759 ± 5	276 ± 12	8,38 ± 0,13	24,2 ± 2,2	2,41 ± 0,04	86,1 ± 8,0

tabela 22 D – Concentração média de macro e micro elementos, $\mu\text{g g}^{-1}$ em amostras de própolis do Extremo Sul e Recôncavo Sul (n=3).

Região Econômica: Extremo Sul											
Código	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	Zn
Ita	1,20 ± 0,12	327 ± 12	*	0,62 ± 0,02	185± 11	1650 ± 99	231± 9	3,12 ± 0,12	96,3 ± 8,1	1,43 ± 0,12	104 ± 6,3
Bel	1,72 ± 0,08	1099±90	*	1,55 ± 0,12	364± 24	1412 ± 56	387± 13	13,0 ± 0,9	89,4± 5,0	1,30 ± 0,10	132 ± 4,0
Região Econômica: Recôncavo sul											
FS 1	0,61 ± 0,01	423 ± 34	0,20±0,02	0,42 ± 0,01	64,1 ± 1,2	235 ± 7	192 ± 11	4,12 ± 0,33	11,3 ± 0,9	1,10 ± 0,09	86,3 ± 2,3
FS 2	0,58 ± 0,04	422 ± 40	0,19±0,02	0,73 ± 0,04	96,2 ± 3,2	236 ± 6	157 ± 13	5,21 ± 0,21	13,5 ± 1,1	0,60 ± 0,01	76,2 ± 4,1
FS 3	0,60 ± 0,02	423 ± 23	0,24±0,02	0,66 ± 0,02	95,5 ± 6,1	231± 9	189 ± 12	3,34 ± 0,12	14,8 ± 1,2	0,50 ± 0,02	66,5 ± 2,0
CA 1	0,61 ± 0,05	512 ± 11	1,77±0,02	0,71 ± 0,01	45,2 ± 2,3	245 ± 9	201 ± 9	5,61 ± 0,34	34,1 ± 2,3	0,80 ± 0,04	52,4 ± 3,2
CA 2	1,51 ± 0,05	615 ± 15	0,32±0,02	0,54 ± 0,03	62,3 ± 2,1	242 ± 11	197 ± 6	6,59 ± 0,43	33,2 ± 3,0	0,50 ± 0,01	79,6 ± 1,1
SAP	0,62 ± 0,02	412 ± 12	2,48±0,02	0,79 ± 0,01	78,4 ± 3,2	248 ± 12	245 ± 14	2,63 ± 0,11	39,5 ± 2,0	0,60 ± 0,06	76,4 ± 2,5

tabela 22 E – Concentração média de macro e micro elementos, $\mu\text{g g}^{-1}$ em amostras de própolis da Região Sudoeste (n=3).

<i>Região Econômica: Sudoeste</i>											
<i>Código</i>	Ba	Ca	Cr	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	Zn
Jq 1	1,11 ± 0,06	499 ± 40	*	0,56 ± 0,04	71,3 ± 1,2	199 ± 12	178 ± 5	4,71 ± 0,12	23,1 ± 2,1	1,04 ± 0,01	79,2 ± 3,1
Jq 2	1,21 ± 0,10	515 ± 24	*	0,76 ± 0,03	87,5 ± 3,1	215 ± 13	201 ± 9	5,53 ± 0,31	27,4 ± 0,90	3,30 ± 0,21	52,4 ± 2,5
Jq 3	1,15 ± 0,09	567 ± 12	*	0,72 ± 0,03	75,6 ± 2,9	234 ± 16	221 ± 12	4,61 ± 0,12	28,4 ± 1,2	1,00 ± 0,09	62,7 ± 2,1
Jq 4	1,13 ± 0,10	502 ± 32	*	0,81 ± 0,06	108 ± 1	213 ± 8	213 ± 11	3,38 ± 0,21	34,8 ± 0,99	1,19 ± 0,07	74,2 ± 5,1
LAÇ	0,72 ± 0,03	313 ± 10	0,43 ± 0,02	0,42 ± 0,02	115 ± 2	245 ± 11	232 ± 12	4,52 ± 0,22	12,2 ± 0,75	0,42 ± 0,02	59,1 ± 2,6
IBI	0,54 ± 0,02	402 ± 9	0,31 ± 0,03	0,67 ± 0,01	109 ± 8	279 ± 17	190 ± 6	3,95 ± 0,19	19,3 ± 0,11	0,40 ± 0,01	64,3 ± 1,9

(*) < LOQ

Outra variável avaliada foi a época de coleta da própolis, de forma a verificar sua influencia sobre a composição mineral. Portanto, as amostras de própolis produzidas em Alagoinhas, Catú, Palame e Seabra foram coletadas aproximadamente a cada 3 meses durante um ano (Tabela 4). As coletas foram feitas no final de cada estação, isso para garantir que as amostras tenham sido produzidas naquela estação específica. Analisando os resultados, observou-se o que amostras de própolis Al/3, C/3, P/3 e Se/3, coletadas no final do inverno e começo da primavera, aplicando o teste t pareado num intervalo de confiança de 95%, apresentaram diferença significativa na concentração dos seguintes elementos: Cu, Cr, Fe, Mn e Ni (Figura 9).

As concentrações de Cr, para Al/3, de Fe e Mg para P/3 e de Cr, Cu, Fe e Ni para C/3 foram menores que os resultados obtidos para amostras coletadas em outras estações. Os teores de Cr e Fe em amostras de Catú coletadas logo após o inverno foram aproximadamente 25% menores (Tabela 22, Figura 10). Essa variação pode ser explicada possivelmente porque nos meses de produção dessa própolis (julho a setembro) é período chuvoso na Bahia (INGA; 2009) e, geralmente, uma das formas como estes elementos chegam até a colméia é através do ar e da poeira que é carregada, também, pelos corpos das abelhas. Como nestes períodos a umidade do ar é maior, logo, as abelhas estão menos expostas.

Em Seabra, as coletas logo após o inverno, também, apresentaram teores de Cu, Fe e Mn aproximadamente 20 % inferiores à das amostras coletadas no verão, outono e primavera (Figuras 9 e 10).

Aplicando o teste t pareado, não ocorreu diferença significativa (95%) nas concentrações dos elementos Ba, Ca, K, Mg, Na e Zn independente do período de coleta das amostras.

Na Bahia, nas amostras analisadas a faixa de concentração de K variou de $(199 \pm 22$ a $1892 \pm 36)$, para as cidades de Jequié e Alagoinhas, respectivamente (FIGURA11). Os teores de K obtidos para as amostras de própolis coletadas no Recôncavo Sul variou de 235 ± 15 a $248 \pm 18 \mu\text{g g}^{-1}$, para as cidades de Feira de Santana e Santo Amaro da Purificação, respectivamente. Nas amostras do Sudoeste baiano e no Recôncavo Sul, Ca é o elemento encontrado em maior concentração em todas as amostras sendo que a faixa de variação foi de 313 ± 16 a 567 ± 7 e 412 ± 13 a $615 \pm 41 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente (Figura 11).

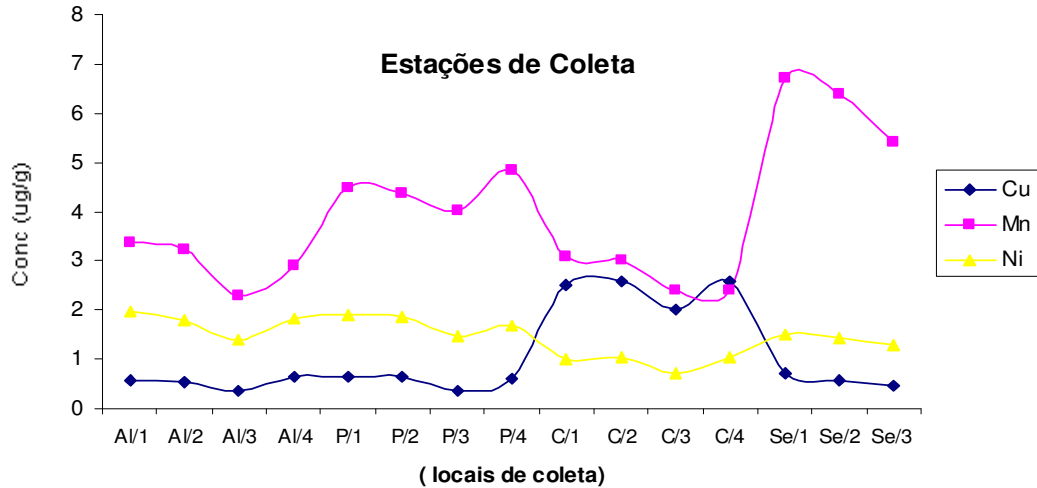


Figura 9: Resultados obtidos para Cu, Mn e Ni nas amostras coletadas em diferentes estações do ano, sendo Al/1, P/1, C/1 e Se/1 para o verão; Al/2, P/2, C/2 e Se/2 para o outono; Al/3, P/3, C/3 e Se/3 para o inverno e Al/4, P/4 e C/4 para a primavera.

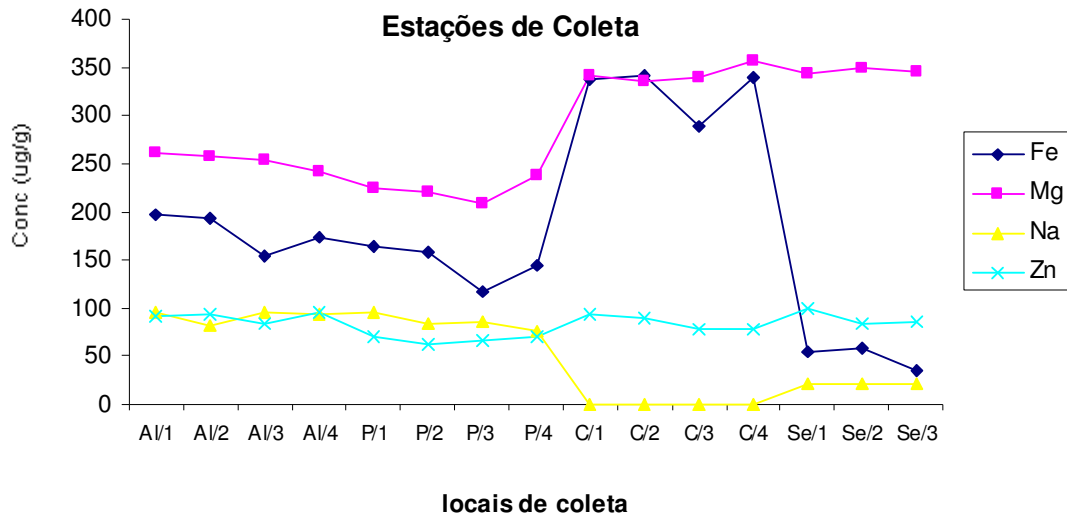


Figura 10: Resultados obtidos para Fe, Mg, Na e Zn para amostras coletadas em diferentes estações do ano, sendo Al/1, P/1, C/1 e Se/1 para o verão; Al/2, P/2, C/2 e Se/2 para o outono; Al/3, P/3, C/3 e Se/3 para o inverno e Al/4, P/4 e C/4 para a primavera.

Em Massarandupió, no litoral norte do Estado a concentração de Ca foi $331 \pm 12 \mu\text{g g}^{-1}$. De modo geral todas as amostras apresentaram $[\text{Na}] < [\text{Mg}] < [\text{Ca}] < [\text{K}]$ com exceção das regiões anteriormente mencionadas.

Na região sudoeste da Bahia, as amostras apresentaram aproximadamente o mesmo teor de Mg (Figura 11) A faixa de concentração de Mg nesta região variou de $(178 \pm 2$ a $232 \pm 8) \mu\text{g g}^{-1}$, para as cidades de Jequié e Laçu, respectivamente.

O teor de bário encontrado em amostras de própolis variou de $(0,42 \pm 0,02$ a $1,72 \pm 0,05) \mu\text{g g}^{-1}$ em Catú e Belmonte, respectivamente (Figura 12).

Com relação ao cromo há poucas informações científicas que possibilitem determinar qual a necessidade basal e normativa para este elemento. Os Estados Unidos admitem $50 \mu\text{g}/\text{dia}$ e a OMS recomenda na água $0,05 \text{ mg L}^{-1}$. Por questão de segurança, o consumo não deve ultrapassar $250 \mu\text{g}/\text{dia}$. Para as amostras que foram analisadas a faixa de concentração de Cr variou de $(0,15 \pm 0,01$ a $7,95 \pm 0,23) \mu\text{g g}^{-1}$ para Palame e Pojuca, respectivamente. Pojuca e Catu apresentaram elevado teor de Cr $7,95 \pm 0,23$ e $4,28 \pm 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 12). Em 47% das amostras analisadas, o teor de cromo estava abaixo do limite de quantificação.

O Conselho de Alimentos e Nutrição dos Estados Unidos estabelece, para cobre, a ingestão segura diária, em dieta, de $2 \text{ mg}/\text{dia}$ a $3 \text{ mg}/\text{dia}$. Mas estudos recentes baseados em dietas duplicadas sugerem que as ingestões reais são de $1,0 \text{ mg}/\text{dia}$ e $1,5 \text{ mg}/\text{dia}$, respectivamente. Em alimentos a legislação brasileira estabelece $30 \mu\text{g g}^{-1}$. Para as amostras analisadas todas apresentaram concentração de cobre abaixo do limite máximo permitido pela legislação brasileira.

A faixa de concentração de Ni nas amostras analisadas variou de $(0,50 \pm 0,03$ a $3,39 \pm 0,13) \mu\text{g g}^{-1}$ em Cruz das Almas e Jequié, respectivamente (Figura 12).

Ferro é um elemento importante para manutenção da saúde humana. Homens adultos necessitam de $10 \text{ mg}/\text{dia}$, mulheres adultas requerem $15 \text{ mg}/\text{dia}$, gestantes requerem $30 \text{ mg}/\text{diárias}$. As necessidades de crianças variam de 6 a $12 \text{ mg}/\text{dia}$, conforme as recomendações dietéticas internacionais (OMS). A própolis analisada a faixa de concentração de ferro variou de $(21$ a $364) \mu\text{g g}^{-1}$ para Barreiras e Belmonte respectivamente (Figura 13). Elevada concentração de Fe em Pojuca pode ser explicada pela intensa atividade industrial naquela região, pois lá, empresa baiana trabalha com beneficiamento de liga de ferro-cromo.

A faixa de concentração de Mn variou de (1,92 a 13,00) $\mu\text{g g}^{-1}$ para Belmonte e Massarandupio respectivamente. Amostras de Sauípe apresentaram maior concentração de Zn $112\pm 2,1 \mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 13). Os teores de Cd, Co, Pb e V estavam abaixo do LOQ.

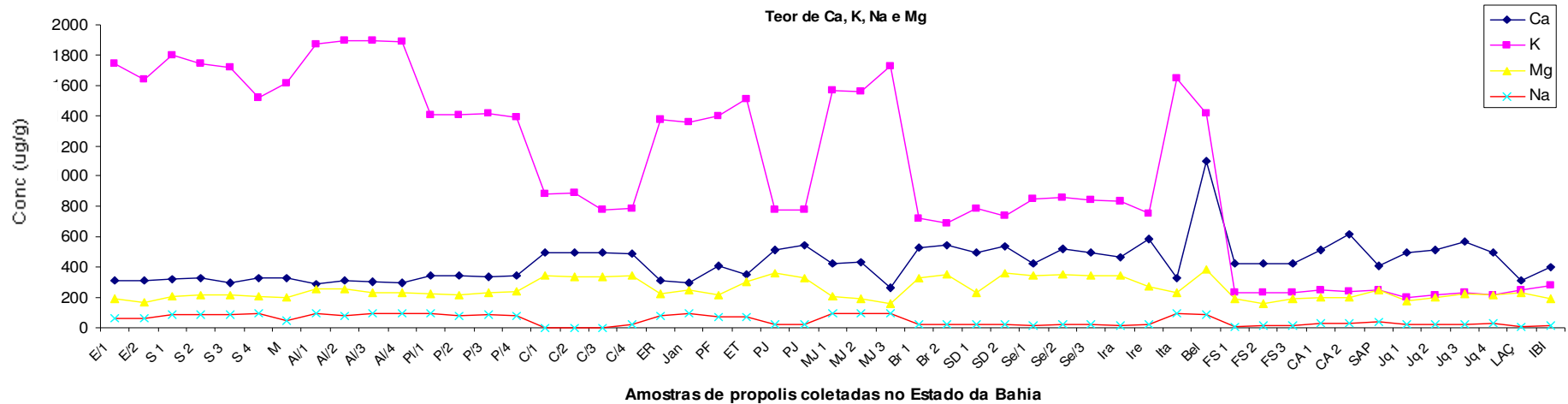


FIGURA 11: Teor ($\mu\text{g g}^{-1}$) de Ca, K, Mg e Na em amostras coletadas no Estado da Bahia

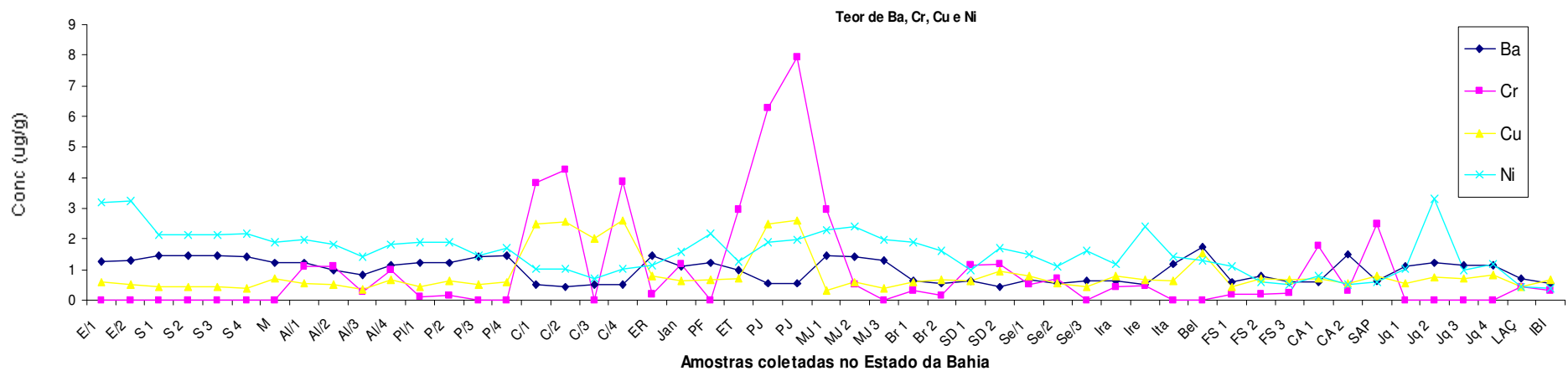


FIGURA 12: Teor ($\mu\text{g g}^{-1}$) de Ba, Cr, Cu e Ni em amostras coletadas no Estado da Bahia

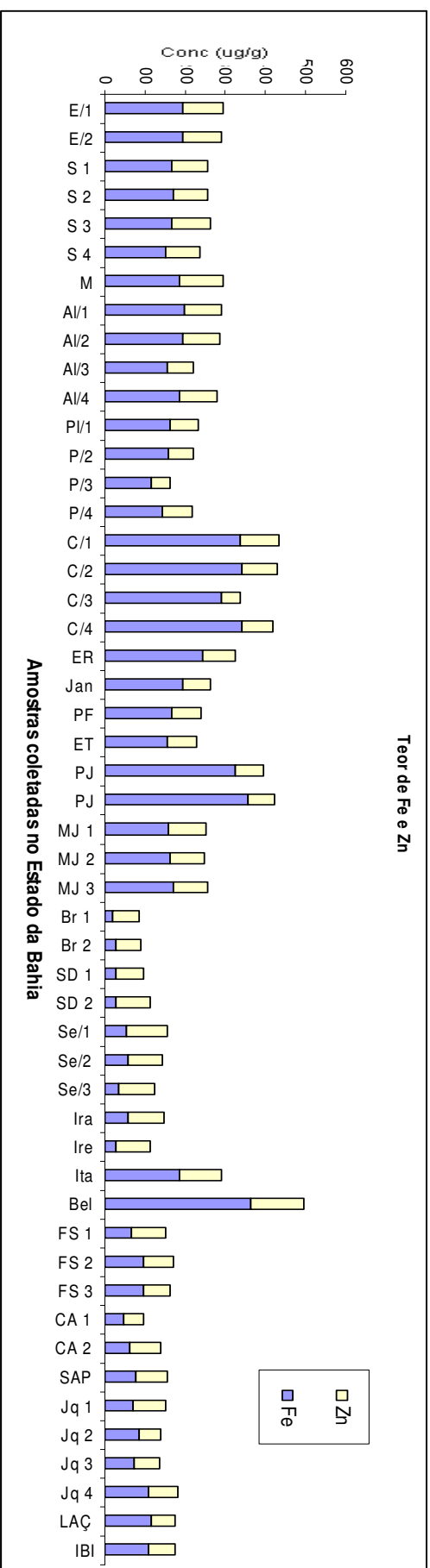


FIGURA 13: Teor de Fe e Zn em amostras coletadas no Estado da Bahia

4.9.0 Análise Quimiométrica.

A Quimiometria é utilizada para interpretação de dados obtidos por diferentes técnicas analíticas. É aplicada, também, para amostras de alimentos buscando obter o máximo de informações dos dados analíticos. Uma série de métodos foi desenvolvida, visando à determinação do número de espécies presentes em misturas, à identificação e à estimativa da concentração dessas espécies. A aplicabilidade de cada método depende da informação experimental disponível e do objetivo da análise (SENA; COLLINS; KENETH, 2000). Deste modo foram feitas análises utilizando o método PCA e HCA para melhor interpretar os dados analíticos obtidos e avaliar semelhanças e ou diferenças entre um conjunto de amostras de própolis procedentes de apiários instalados em vários municípios do Estado da Bahia.

O método de análise de componentes principais (PCA) tem como princípio possibilitar a extração de informação a partir de dados multivariados complexos, difíceis de serem visualizados diretamente e como as concentrações das espécies nas amostras constituem dados multivariados, logo, foram interpretados utilizando PCA que permite dizer a que respeito uma amostra é diferente da outra, quais variáveis contribuem mais para estas diferenças, detectar padrões de amostras (agrupamentos). HCA possibilita verificar as semelhanças entre as amostras, através do cálculo do grau de similaridade.

Os dados utilizados para análise quimiométrica estão representados na Tabela 22, onde as amostras de própolis representam os objetos e as concentrações, em $\mu\text{g g}^{-1}$, as variáveis.

4.9.1 Análise por PCA para amostras de própolis da Região Econômica Litoral Norte

A primeira análise foi realizada com as variáveis Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn e utilizando somente valores de concentração das amostras de própolis provenientes de municípios do Litoral Norte do estado. A concentração das amostras foi disposta em linhas e as variáveis em colunas. Os dados foram pré-processados por auto-escalamento onde os dados são centrados na média e divide-se cada um pelo desvio padrão, fazendo com que todas as variáveis tenham o mesmo peso. Deste modo a matriz de dados iniciais apresentou a dimensão de 28 X 10.

Construiu-se um modelo com 5 PCs que explicam 90% da variância dos dados para as amostras de própolis do Litoral Norte. Nesta análise não ocorreu separação de classes significativa apenas uma tendência a separação. Avaliando o gráfico variável versus variável e avaliando os pesos, Cu, Ni e Zn foram os elementos que mais contribuíram para a tendência a separação de classes (Figura 15) e Ba e Ca os que menos contribuíram. As contribuições das informações dadas para cada PC foram 29%, 21%, 19%, 13% e 8% para PC1, PC2, PC3, PC4 e PC5, respectivamente.

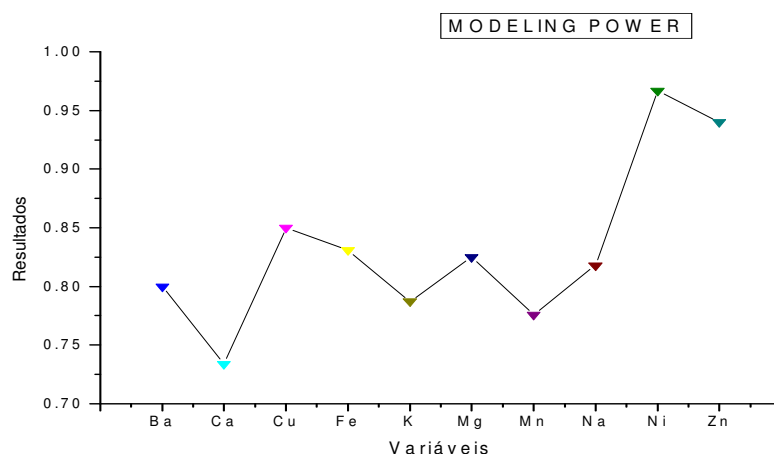


Figura 15: Modeling Power das variáveis.

Uma nova matriz de dados foi proposta de dimensão 28 X 8 (sem Ca e Ba). Analisando o gráfico de score, para esta matriz observa-se a tendência a separação de duas classes: (1) formado por Pojuca e Catú e o (2) formado por Sauípe, Esplanada, Mata de São João, Entre Rios, Alagoinhas, Massarandupio. O agrupamento das amostras, segundo o gráfico de score das duas primeiras componentes está representado na Figura 16.

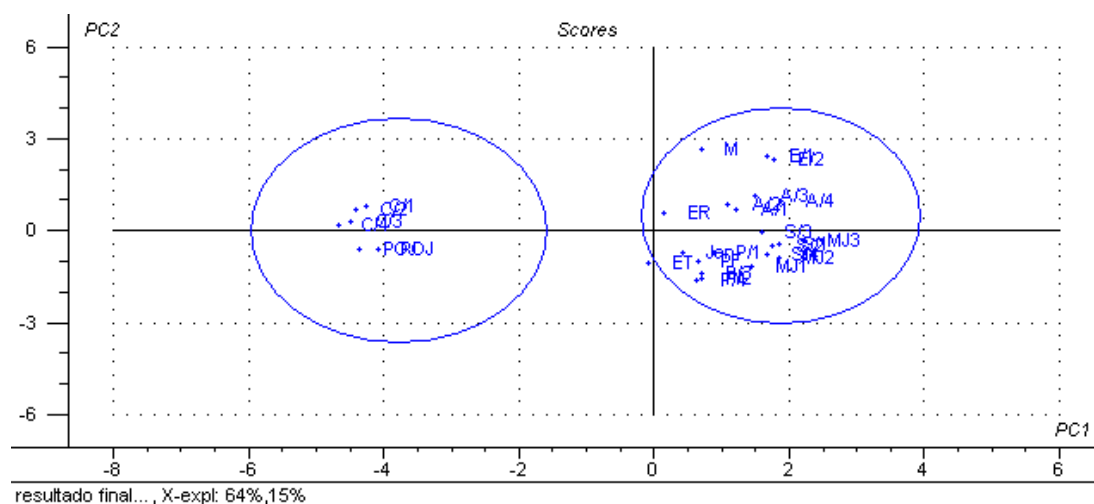


Figura 16: Gráfico de Scores correspondente a classificação de 28 amostras de própolis do Litoral Norte do Estado da Bahia.

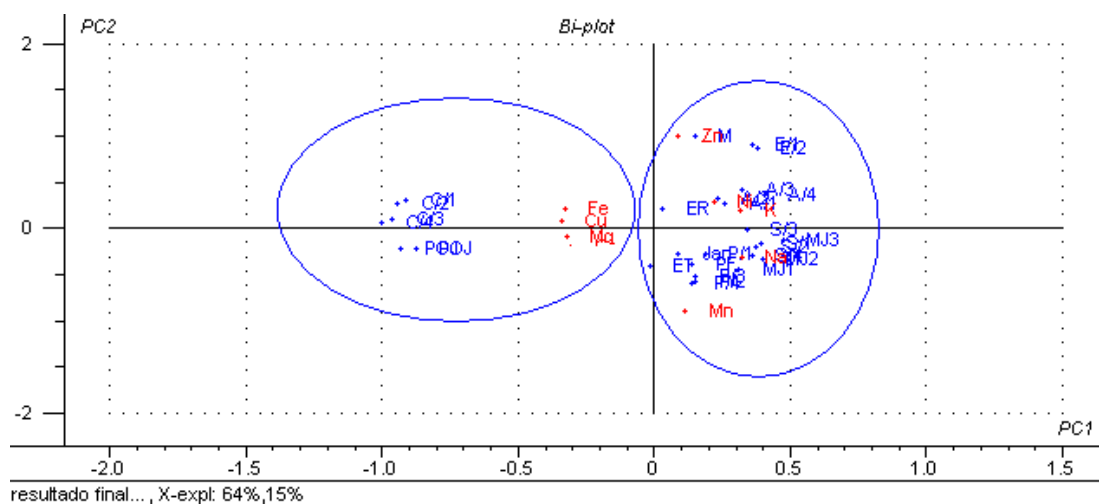


Figura 17: Gráfico de score e loadings para amostras procedentes do Litoral Norte da Bahia

Avaliando o gráfico score e loading, Fe e Cu são os elementos que mais respondem por PC1 e Mn e Zn por PC2. Na Tabela 23 está a variância acumulada. O gráfico de pesos, para PC1, mostrou que as concentrações dos analitos K, Na, Ni e Zn influenciaram de maneira positiva o PC1, que explica 64% da variância e é responsável pela distinção entre as amostras. Mn influencia negativamente o PC2 (Figura 18). A contribuição de cada PC esta relacionada na Tabela 23.

Tabela 23: Variância (%) e variância acumulada (%) porcentagem para cada PC , obtidos por PCA das amostras procedentes do litoral Norte do estado da Bahia.

PC	Variância (%)	Variância Acumulada (%)
1	64,00	64,00
2	15,19	79, 19
3	9,59	88, 77
4	7,86	96, 64
5	3,36	100.0

A separação destas classes pode ser explicada em parte pela proximidade das regiões onde foram coletadas as amostras, mas também, pela semelhança no ecossistema destas regiões. As cidades de Mata de São João, Sauípe, Praia do Forte, Alagoinhas, Palame e Massarandupió são próximas do litoral enquanto que Catú e Pojuca são cidades próximas entre si, porém mais distantes do litoral. As amostras de Pojuca e Catu apresentam a tendência de formar uma classe distinta, possivelmente devido alta concentração de Fe e Cu que estas amostras apresentam com relação as demais.

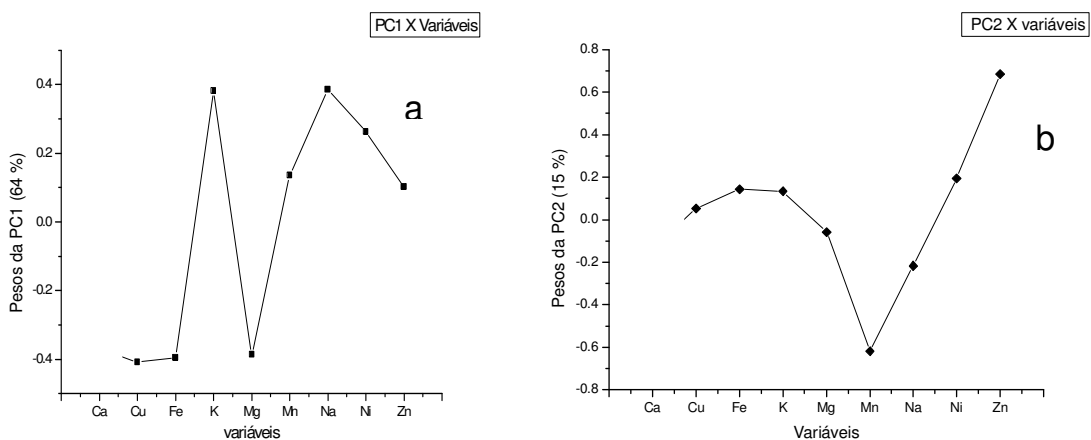


Figura 18: gráfico de pesos: (a) variáveis X PC1 e (b) variáveis X PC2.

4.9.2 Análise por PCA para amostras de Própolis do Estado da Bahia.

Visando obter uma melhor visualização e separação de classes entre as amostras do Estado da Bahia, uma matriz de dimensão matriz 48 x 8 foi proposta e o gráfico de score encontra-se abaixo (Figura 19). No gráfico de score visualiza-se a tendência a separação de três classes:

1. Classe 1, formada por amostras de Catu e Pojuca .
2. Classe 2, formada pelas demais amostras do litoral norte.
3. Classe 3, formada por amostras do interior do estado.

O comportamento observado nesta análise deve-se a composição das amostras ocorrendo a formação de classes que se relacionam principalmente com as variáveis (Figura 20) :

- a) Maiores concentrações de Cu e Fe, classe 1;
- b) Maiores concentrações de Na, K e Zn, classe 2.
- c) Maior concentração de Mn, classe 3.

A classe formada por Pojuca e Catu, foge aos padrões, pois, esperava-se que estas amostras agrupassem com as do litoral. Essa separação pode ser devido a produção de cromita que ocorre naquela região e possivelmente pode estar havendo contaminação por Fe, Cu e Cr.

A classe 3 formada por amostras coletadas em municípios do interior do estado: Oeste baiano (Barreiras e São Desidério), do Sudoeste (Jequié, Lacu e Ibicui), Recôncavo Sul (Feira de Santana, Cruz das Almas e Santo Amaro da Purificação) e Chapada Diamantina (Seabra, Iraquara e Irecê) apresentam menores concentrações de K e Na que as demais amostras.

Nesta análise a primeira, segunda, terceira e quarta PCs são responsáveis por 43%, 23%, 14% e 8% da variância. Os elementos químicos K, Na e Zn influenciam positivamente o PC 1, PC2 é influenciado positivamente por Fe, Cu e negativamente por Mn (Figura 20). Outra informação importante que pode ser extraída do gráfico de score é que a alta concentração de K é responsável pela classificação das amostras do litoral.

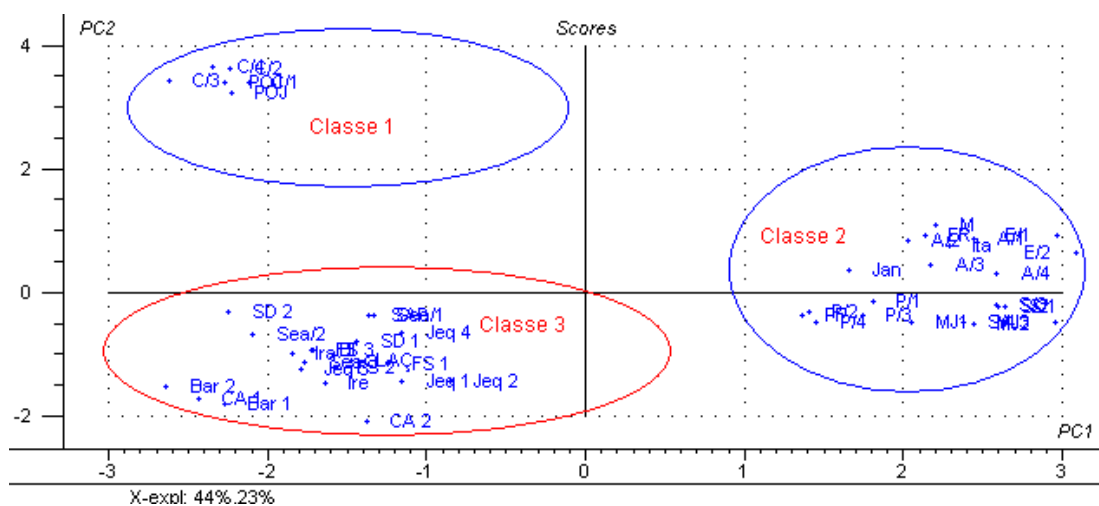


Figura 19: Gráfico de score: PC 2 x PC1 para todas as amostras coletadas no Estado da Bahia.

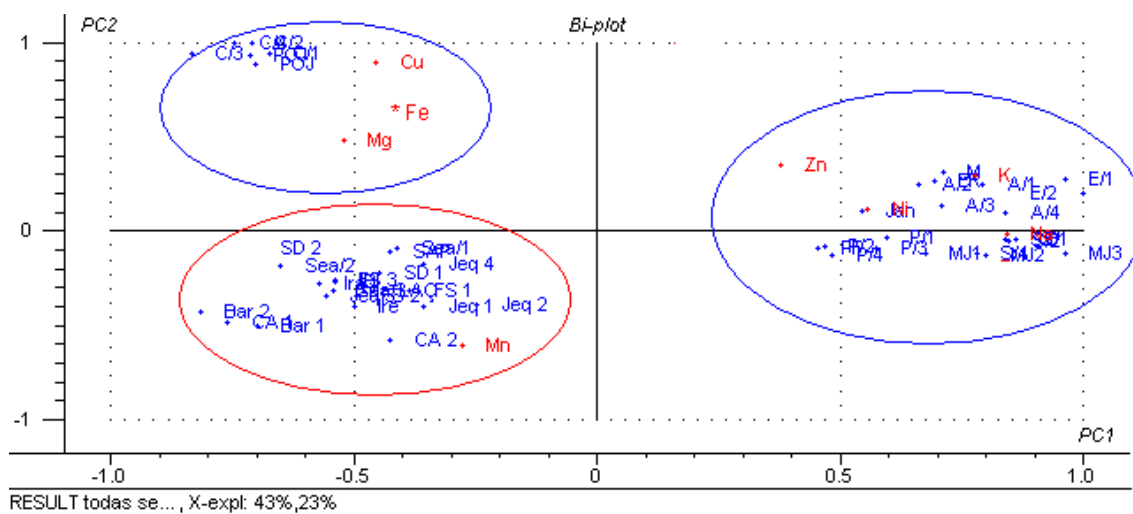


Figura 20: Gráfico de loading: PC 2 x PC1 para todas as amostras coletadas no Estado da Bahia.

Nesta etapa do trabalho optou-se por não trabalhar com HCA, considerando que mais de 80 % da separação foi definida com a utilização do PCA. Assim o uso do HCA não traria informações que possam complementar as já existentes.

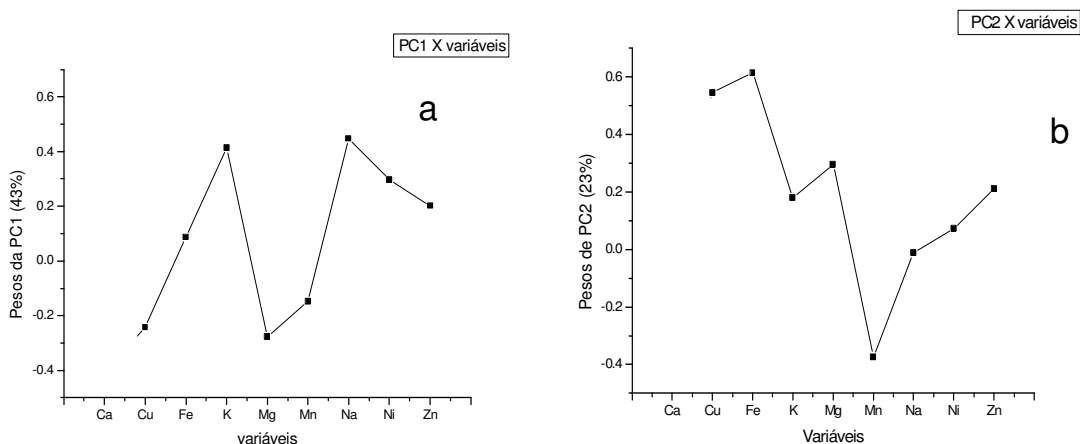


Figura 20 A: gráfico de pesos: (a) variáveis X PC 1 e (b) variáveis X PC2 para todas as amostras da Bahia.

4.10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos estabelecidos neste estudo demonstraram ser eficientes para a quantificação das espécies estudadas em própolis apresentando vantagens e desvantagens que são características de cada processo. De modo geral, os procedimentos são simples, não requerendo grande quantidade de ácidos e amostras para a execução. O procedimento em forno de micro-ondas apresentou vantagens como minimização de perdas de voláteis, menor volume de reagentes, o que gera menor quantidade de resíduos, menor risco de contaminação e menores limites de detecção. Além disso, apresenta menor teor de carbono residual e maior frequência analítica em comparação ao procedimento no bloco digestor. Entretanto, as amostras digeridas no forno de microondas apresentaram maior concentração ácida.

O sistema de digestão utilizando aquecimento condutivo, em bloco digestor, pode ser considerado uma alternativa de baixo custo para quantificação de macro e micro elementos em própolis. Os procedimentos PBD e PFM são precisos e apresentaram baixos valores LOD e LOQ, embora para PFM os LOQ foram menores que PBD. Uma desvantagem do PBD é o uso de grande quantidade de reagentes e

uma das principais vantagens é o fato de ser possível utilizar massas maiores de que 1,0 g, o que facilita a detecção e quantificação dos analitos.

Os procedimentos propostos contemplam características que são importantes na escolha de um método analítico: simplicidade, segurança, baixo custo, rapidez, minimização de perdas e menor impacto ambiental, pois, geram menos resíduos. Os procedimentos PFM e PBD não apresentaram efeitos de matriz para os elementos investigados. Assim, as curvas analíticas podem ser preparadas usando solução de ácido nítrico diluído (PFM) e de ácido sulfúrico diluído (PBD). Foram obtidas recuperações nas faixas de 94 a 100% e 91 a 112 % para PFM e PBD, respectivamente, o que mostra a aplicabilidade dos procedimentos propostos.

O emprego da técnica HR-CS FAAS mostrou-se ser uma excelente alternativa para determinação de Ca, K, Mg e Na em amostras de própolis digeridas usando procedimento com aquecimento em forno de micro-ondas com cavidade. Não há efeito de matriz e a faixa de recuperação dos analitos variou de 92 a 105%. Embora características como: menor frequência analítica, maior consumo de amostra representem uma desvantagem, mesmo assim, a técnica HR-CS FAAS apresenta-se como uma opção segura, precisa e confiável. Outra vantagem é a manutenção do equipamento, tipo de gás e reagentes utilizados para as análises o que diminuem o custo das análises quando comparado com ICP OES.

As amostras de própolis apresentaram elevados teores de Ca, K, Fe e Zn, o que destaca sua importância como fonte nutricional, pois, estes elementos desempenham funções importantes no metabolismo humano, daí a relevância destes nutrientes quando associados a dieta alimentar. Os testes estatísticos e os métodos quimiométricos demonstraram serem ferramentas úteis na comparação entre os resultados obtidos e na visualização das similaridades e/ou diferenças entre as amostras de própolis da Bahia. Não foi possível chegar a uma classificação conclusiva por região, porque o número de amostras foi relativamente pequeno, mas foi constatada uma tendência a formação de classes. Futuramente, a classificação quimiométrica poderá ser otimizada com maior número de amostras e variáveis.

Em suma, na realidade a escolha do método dependerá essencialmente, da precisão requerida para a análise e dos LOD e LOQ, mas deve-se considerar a etapa de otimização instrumental, considerando o teor das espécies nas amostras e o tipo e modelo de equipamento a ser utilizado, etapas críticas como pré-tratamento e preparo de amostra e o custo final das análises.

CAPITULO 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas técnicas. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaios e calibração. 2005

ALENCAR, S. DE MATIAS. **Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química do mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil.** Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos. Campinas – São Paulo, 2002

AMORIM FILHO, V. R.; GOMES NETO, J. A. Different lubricating oil treatments for the determination of Cu, Cr, Fe, Ni, Sb, Pb and Zn By HR-CS FAAS. **Analytical Letters**, v 41, p. 1555-1570, 2008.

AMORIM FILHO, V. R.; GOMES NETO, J. A. Evaluation of Lubricating Oil Preparation Procedures for the Determination of Al, Ba, Mo, Si and V by High-Resolution Continuum Source FAAS. **Analytical Science**, v 25, p. 95-100, 2009.

AOAC-Official Method 999.11, Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron and Zinc in Foods, Atomic Absorption Spectrometry after Dry Ashing, First Action, 1999.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; ISHII, E.; MIDORIKAWA, K.; KADOTA, S. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v. 8, n.1, p.16-23, 2001.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological and research of propolis. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 561-571, 2001.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; P RASAIN, J.K.; M ATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activity. **Journal of Natural Products**, v.61, p.896-900, 1998.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y. ADNYANA, I K.; ISHII, E.; MIDORIKAWA, K.; KADOTA, S. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian própolis, **Phytomedicine**, Vol. 8(1), p. 16–23, 2000.

BARALKIEWICZ, D.; MADEJCZYK, M. Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES. **analytica chimica acta**, p.11–17, 2001.

BASNET, P.; MATSUSHIGE, K.; HASE, K.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Four di-o-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. **Biol Pharm Bull**, Tokio, v.19, n.11, p.1479–1484, 1996.

BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B.; Chemometrics: **A Practical Guide**, John Wiley & Sons: New York, 1998.

BOA MORTE, E. S., **Estratégias para avaliação da composição mineral do leite comercializado em Salvador, Bahia**. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

BONVEHÍ, J. S., COLL, F. V. Phenolic composition of propolis from China and South America. **Zeitschrift fur Naturforsch**,Tubingen, v. 49c, p.712-718, 1994.

BORGES, D. L.G.;, CURTIUS,A. J.; WELZ, B. Fundamentos da Espectrometria de Absorção Atômica de Alta Resolução com Fonte Continua. **Revista Analytica**., V 18, p. 58-66, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 3 – Anexo VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 19 jan. 2001.

BRASIL - Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Visa Legis. Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de própolis. Disponível: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>. Acesso em: 09/04/09.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Defesa Animal. Legislações. Legislação por Assunto. Legislação de Produtos Apícolas e Derivados. Instrução Normativa n.11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel.

CADORE, S.; ARROMBA DE SOUSA, R.; NETO, B. W.; POPPI, R. J.; BACCAN, N. Classificação de Água de Coco processada e Natural por meio de HCA, PCA e teores de íons determinados por ICP OES, **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 654-656, 2006

CANALS, A.; HERNANDIS, V.; BROWNER, R. **Spectrichm.Acta**, p. 45-591,1990.

CARRILHO, E. V., NOGUEIRA, A. A., NÓBREGA, J. A., SOUZA, G. B., CRUZ, G. M., An attempt to correlate fat and protein content of biological samples with residual carbon after microwave-assisted digestion. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 371, n. 4, p. 536-540, 2001.

CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, s. 1, p. S1-S6, 2002.

CHENG, P. C., WONG, G. Honey bee propolis: Prospects in medicine. *Bee World*, Buckinghamshire, v. 77, p.8-15, 1996.

CHOPRA, S. Propolis protects against doxorubicin-induced myocardopathy in rats. **Exp Mol Pathol**, Orlando, v.62, n.3, p.190–198, 1995.

COBRE-2009. Cobre no Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria nº. 371, 1974.

CONAPIS – Cooperativa nacional de apicultura Ltda. **Própolis, poderoso antibiótico natural tem vários efeitos terapêuticos**. Disponível em: <http://www.conapis.com.br/propolis.htm>, acesso em 20-janeiro-2009.

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R. Geographical Characterization of Polyfloral and Acacia Honeys by Nuclear Magnetic Resonance and Chemometrics, **J. Agric. Food Chem**, v. 56, p. 6873–6880, 2008.

CONTI, M. E.; BOTRÈ, F. Honeybees and their products as potential bioindicators of Heavy metals contamination. **Environ. Monitory. Assess.** v. 69, n. 3, p. 267-82, 2001.

DENNAUD, J.; HOWES, A.; POUSSEL, E.; MERMET, J. M. Study of ionic-to-atomic line intensity ratios for two axial viewing-based inductively coupled plasma atomic emission spectrometers, **Spectrochimica Acta B**, v. 56, p. 101-112, 2001.

FERNANDES, K. G.; MORAES, M.; GOMES, J. A. N.; NÓBREGA, J. A.; OLIVEIRA, P. Padronização interna em espectrofotometria de absorção atômica, **Química Nova**, v.26, nº 2, p. 249-252, 2003.

FRANCA, A. S.; MANCHA AGRESTI, P. D. C.; OLIVEIRA, S. L. Discrimination between defective and non-defective Brazilian coffee beans by their volatile profile, **Food Chemistry**, v. 106, p. 787–796, 2008

FREITAS, T.F.M.; “**Determinação de espécies metálicas em mel de abelhas por ICP OES**” tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. Campinas, 2003.

FREIRE, U. C. **Origem da Própolis Verde e preta produzida em Minas Gerais**. Tese para obtenção do título de Magister scienc, p. 11–15, 2000.

FUKUDA, M.; OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. Studies on the constituents of the leaves of *Baccharis Dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Chem Pharm**, v. 54, p. 1465-1468, 2006.

GHISALBERTI, EL. Propolis: **A Review**; **Bee World**; v. 60, p. 59-84, 1999.

GOUVEIA, S. T.; SILVA, F. V.; COSTA, L. M.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, Determination of residual carbon by inductively coupled plasma atomic emission spectrometers with axial and radial view configuration, **Analytica Chimica Acta**, v. 445, p. 269 - 275, 2001.

GREENAWAY, W.; SCAYSBROOK, T.; WHATLEY, F. R. The composition and plant origin of propolis: a report of work at Oxford. **Bee World**, Buckinghamshire, v.71, p. 107-118, 1990.

GUMES, S. A. F.; BARBOSA, J. T. P.; SANTOS, G. L. dos; FERNANDES, A. P.; KORN, M. G. A.; GUIDA, M. A. B. Potencialidades da HR-CS FAAS para

determinação de Mn e Pb em diferentes extratos de solo. (Apresentação de Trabalho/Congresso) 2009.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (Eds) *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*. **McGraw-Hill**, p. 1301-1302, 2001.

HEITMANN U, SCHÜTZ M, BECKER-ROSS H, FLOREK S. Measurements on the Zeeman-splitting of analytical lines Referências by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear charge coupled device array. **Spectrochimica Acta Part B**, v.51, p.1095-1105,1996.

INGA-2009. Instituto de gestão de águas e clima. <http://www.inga.ba.gov.br>. Acesso 13 out. 2009.

IISKANDER, F.I. Assessment of Trace Elements in honey Produced on Uranium mining Reclaimed Land, **Tot. Environ**, 192, 1996, 119-122.

JÉANNE, F. La propolis et sa récolte par l'apiculteur. Bull.Tech. Apic. **Sainte-Gauburge**, v. 11, p. 45-46, 1984.

KOO, H. Effect of Apis mellifera propolis from two brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Res**, Basel, v.33, n.5, p.393-400, 1999.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre o preparo de amostras orgânicas e inorgânicas**: VI Workshop sobre preparpo de amostras, 6ª Edição, Santa Maria, p. 94, 200, 2006.

KRUG. Espectrometria de absorção atômica.[on-line]. 2004. Disponível em: <<http://web-.cena.usp.br/apostilas/krug/ETAAS FANII.pdf>>. Acesso em: 17 set. 2009.

KONIG, B. Plant sources of propolis. **Bee World**, Buckinghamshire, v. 66, n. 2, p.136-139, 1985.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y. BANKOVA, V. CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **J. ethnopharmacol.**, v. 64, p. 235-240, 1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chem**, v. 84, p. 329-339, 2004.

LACHMAN, J.; KOLIHova, D.; MIHOLOVA D.; KOSATA B.; TITERA, C. K. Analysis of minority honey componentes: Possible use for the evaluation of honey quality. **Food Chemistry** , v. 101, p. 973-979, 2007.

LEPRI F, G.; SILVA, A. F.; CURTIUS, A.J.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Method development for the determination of cadmium in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace AAS with solid sampling and iridium as permanent modifier. **Book of Abstracts** - Eighth Rio Symposium on Atomic Spectrometry, Paraty, RJ, 2004.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F. A.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H. M.; PAULINO, N. Phenolic compounds from brazilian propolis with pharmacological activities **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 105–112, 2000.

MATUSIEWICZ, H.; KRAWCZYK, M. Sequential Multi-Element Determination of Hydride-Forming Elements (As, Bi, Cd, In, Pb, Se, Te, Tl) by High-Resolution Continuum Source Atom Trapping-Flame Atomic Absorption Spectrometry, **Chemia Analytyczna**, v. 54, p. 949-973, 2009.

MENDES, T. M. F.; BACCAN, S. N.; CADORE, SOLANGE. Sample treatment procedures for the determination of mineral constituents in honey by Inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 1, p. 168-176, 2006.

MENEZES, H. Própolis: Uma revisão dos Recentes Estudos de Suas propriedades Farmacológicas, **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n. 3, p. 405-411, 2005

MENEZES, H.; ALVAREZ, J. M.; ALMEIDA, E. Mouse ear edema modulation by different propolis ethanol extracts. **Arzneimittel-Forschung**, v. 49, n. 8, p. 705-707, 1999.

MORENO, N.; ISLA, M. I. CUDMANI, N. G.; VATUONE M. A.; SAMPIETRO, A. R. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) propolis. **J. Ethnopharmacol**, v. 68, n.1-3, p. 97-102, 1999.

MUNN, P. Bees wax & Propolis, For Pleasure and Profit. **IBRA**, 30p, 1998.

NAGATA, N.; BUENO, M. I. M. S.; PERALTA-ZAMORA, P. G. Métodos matemáticos para correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raios-x, **Química Nova**, v.24, n.4, 2001.

NAGY, E.; PÁPAY, V.; LITKEY, G. et al. Investigation of the chemical constituents, particularly the flavonoid components, of propolis and *Populi Gemma* by the GC/MS method. **Elsevier**, v.23. p 223-232, 1985.

NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D.; REIS, D. C. Um marcador químico de fácil detecção para a própolis de Alecrim-do-Campo (*Baccharis dracunculifolia*), Revista Brasileira de Farmacognosia, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, p. 379-386, 2008.

NOBREGA, J. A.; COSTA, L.M.; SANTOS, D. M. Preparo de Amostra usando Forno de Microondas com Radiação Focalizada, **Revista Analítica**, no. 01, p 32-37, 2002
NOLT, J. ICP emission spectrometry. A practical Guida, Willey-VCR Weinheim, p. 267, 2003.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Elementos traço da nutrição e saúde humana; tradução Andréa Favaro, Roca, São Paulo, 296 p, 1998.

OTA, C.; URTERKIRCHER, C.; FANTINATO, V.; SHIMIZU, M. T. Antifungal activity

- of propolis on different species of candida. **Mycoses**, v. 44, p. 375-378, 2001.
- PARK, Y. K. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Curr Microbiol.** v. 36, n.1, p. 24–28, 1998.
- PARK, J. H.; LEE, J. K.; KIM, H. S.; CHUNG, S. T.; EOM, J. H.; KIM, K. A.; CHUNG, S. J.; PAIK, S. Y. Immunomodulatory effect of caffeic acid phenethyl ester in Balb/c mice. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 3, p. 429-436, 2004.
- POPRAVKO, S. A. Naturaleza química del propoleos. In: Simpósio, Internacional de Apiterapia. **Anais... Rumania**: Bucarest, p.188-189, 1976.
- PRÓPOLIS BRASILEIRA (2005): CONTROLE DE QUALIDADE E LEGISLAÇÃO. Osmar Malaspina e Mario Sergio Palma Centro de Estudos de Insetos Sociais/Depto de Biologia - Instituto de Biociências de Rio Claro, UNESP. Brasil. Email: ceis@rc.unesp.br
- RAMALHO, A. C. R. Farmacologia do cálcio, vitamina D, paratormônio, calcitonina e bifosfonatos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro, p. 737-745, 1998.
- SAIS-2008. Sais Minerais na Saúde:
<http://www.copacabanarunners.net/mineral.html>. Acesso em 02 jun.2008.
- SALES, A.; ALVAREZ, A.; AREAL, M. R.; MALDONADO, L. The effect of different propolis harvest method on its lead content determination by ET AAS and UV-visS **Journal of Hazardous Material** v. 137, p. 1352-1356, 2006.
- SANTANA, E. Q. **Determinação de macrominerais, oligoelementos e contaminantes metálicos em própolis por espectrometria de absorção atômica em chama e em forno de grafite**. Tese de Doutorado, Araraquara - São Paulo - p 70-95, 2003
- SANTANA, E. Q.; ALMEIDA, A. A.; JABOR, A.P.; ALMEIDA, A. E.; CHUNG, M. C., Determination of calcium and magnesium in hydroethanolic extracts of propolis by atomic absorption flame spectrophotometry **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences** v. 29, n.1, p. 77-80, 2008
- SANTOS, D.C.M., **Avaliação de sistema de Preparo de Amostras de Biodiesel Visando Determinação de Metais e Fósforo por ICP OES**. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2008.
- SANTOS, I. W. Use of propolis in the treatment of the cow endometritis. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 439-441, 1999.
- SEI-2009: [www. Sei.gov.br](http://www.sei.gov.br) visita dia 19/12/2009
- SFORCIN, J. M.; FERNANDES, A. JR.; LOPES, C. A.; BANKOVA, V.; FUNARI, SR. Season effect on brazilian própolis antibacterial activity. **J Venom Anim Toxins**, v. 73, p. 243-249, 2000.

- SILVA, C.; NÓBREGA, J. A.; BLANCO, T. **Quim. Nova**, v. 25, p. 1194, 2002.
- SILICI, S.; TUZEN, M. A.; MENDIL, D.; SOYLAK, C. Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. **Food Chemistry**, v. 103, p. 325–330, 2007.
- SILVA, A.F.; BORGES, D.L.G.; LEPRI, F. G.; CURTIUS, A. J.; WELZ, B.; HEITMANN, U. Determination of cadmium in coal using solid sampling graphite furnace high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, in press, 2005.
- SIRO, B. et al. Local treatment of rheumatic diseases with propolis compounds. **Orv Hetil**, Budapeste, v. 137, n. 25, p.1365-1370, 1996.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª edição. (Tradução Marco Grassi, revisão técnica Célio Pasquini). São Paulo: Thomson, p. 102, 166, 726, 2006
- SOUSA, J. P. B.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R.; SOARES, A. E. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil- Brazilian, **Journal of Pharmacognosy**, v. 17, p. 85-93, 2007.
- STANKOVSKA, E.; STAFILOV, T.; SAJN, R.; Monitoring of trace elements in honey from the Republic of Macedonia by atomic absorption spectrometry. *Environ Monit*, v. 142. p. 117–126, 2008.
- SZOBOSZLAI, NORBERT.; AJTONY, S.; BENCS, L.; HARASZI, R.; SZIGETI, J. Study on the simultaneous determination of some essential and toxic trace elements in honey by multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry, **Talanta** v.71, p. 683–690, 2007.
- TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; MEIRA, R. M. S. A.; SALATIN, A. Indicadores da origem Botânica da Própolis. Importância e perspectiva 1, **Revista Especializada**, p. 32-33, 2002.
- THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis - (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.
- TODOLÍ, J. L.; MERMET, J. M., Acid interferences in atomic spectrometry: analyte signal effects and subsequent reduction, **Spectrochimica Acta B**, v. 54, p. 895 - 929, 1999.
- TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCIA-VIGUERA, C.; VITOLIVER, P. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela. **Phytochemistry**, Oxford, v. 34, p. 91-196, 1993.

UESB - Série Apicultura. Produção e processamento de própolis e cera. Prof. Paulo Sérgio C. Costa, Centro de produções técnicas, p. 99-134, 2007.

VALE, M. G. R.; DAMIN, I. C. F.; KLASSEN, A.; SILVA, M. M. development for the determination of nickel in petroleum using line-source and high-resolution continuum-source graphite furnace atomic absorption, **Microchemical Journal**, v.77, p.131-140, 2004.

VILLANUEVA, O.; ABELLÁN, G. B.; RODRIGUES, E. G. Macroelements in dietetic products containing própolis, **Food Chemistry**, v. 66, p. 15-19, 1999.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G.; Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC/electrospray mass spectrometry. **J. Pharm. And Biomedical analysis** v. 42, p. 54-3671, 2006.

WELZ, B.; BECKER-ROSS, H.; FLOREK, S.; HEITMANN, U.; High Resolution Continuum Source AAS – The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry. Wiley-VCH, Weinheim, 2005.

WÜRFELS, M.; JACKWERTH, E.; STOEPLER, M. Residues from biological materials after pressure decomposition with nitric acid, carbon conversion during sample decomposition, **Analytica Chimica Acta**, v. 26, p.1-16, 1989.

ZSOLT, A. L., A. B.; HARASZI, R. A.; SZIGETI, J.; SZOBOSZLA, N. Study on the simultaneous determination of some essential and toxic trace elements in honey by multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Talanta**, v. 71, p. 683–690, 2007.