



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

MARCOS LEVI CAZAES MACHADO DOS REIS

**Desenvolvimento de métodos analíticos verdes para determinação
multielementar em amostras de produtos apícolas por técnicas
espectrométricas**

Salvador
2025

MARCOS LEVI CAZAES MACHADO DOS REIS

**Desenvolvimento de métodos analíticos verdes para determinação
multielementar em amostras de produtos apícolas por técnicas
espectrométricas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade
Federal da Bahia, como parte dos requisitos
para a obtenção do grau de Mestre em Química
Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Fabio de Souza Dias

Co-orientador: Prof. Dr. Leonardo S. G. Texeira

Salvador
2025



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



TERMO DE APROVAÇÃO

MARCOS LEVI CAZAES MACHADO DOS REIS

"Desenvolvimento de métodos analíticos verdes para a determinação multielementar em amostras de produtos apícolas por técnicas espectrométricas".

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

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIO DE SOUZA DIAS
Data: 25/02/2025 12:11:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Fabio de Souza Dias _____
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia, UFBA
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente
gov.br LEONARDO SENA GOMES TEIXEIRA
Data: 24/02/2025 19:23:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira _____
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia, UFBA
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente
gov.br RODOLFO DE MELO MAGALHAES SANTANA
Data: 19/02/2025 10:05:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rodolfo de Melo Magalhães Santana _____
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia, UFBA
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Guillermo Grindlay _____ **GRINDLAY LLEDO** _____
Doutorado em Química, Universidad de Alicante **GUILLERMO - 483483155** _____
Universidade de Alicante
Firmado digitalmente por
GRINDLAY LLEDO GUILLERMO -
483483155
Fecha: 2025.02.19 09:07:56 +01'00'

Salvador, 17 de fevereiro de 2025.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Ciências e Tecnologias Prof. Omar Catunda, SIBI – UFBA.

R375 Reis, Marcos Levi Cazaes Machado dos

Desenvolvimento de métodos analíticos verdes para
determinação multielementar em amostras de produtos
apícolas por técnicas espectrométricas / Marcos Levi Cazaes
Machado dos Reis – Salvador, 2025.

119 f.

Orientador: Prof. Dr. Fabio de Souza Dias

Coorientador: Prof. Dr. Leonardo S. G. Texeira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.
Programa de Pós-Graduação em Química, 2025.

1. Química Analítica verde. 2. Processos de oxidação
avançada. 3. Calibração de dois pontos por correspondência
de matriz. 4. Métricas verdes. I. Dias, Fabio de Souza. II.
Teixeira, Leonardo S. G. III. Universidade Federal da Bahia.
IV. Título.

CDU: 543

Dedico a meus avós. Aqueles que significam amor; Ceci, Lourdes e Bêl (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas grandes bênçãos que derramou sobre mim, minha família e aqueles que amo. Por ser minha força, guia e inspiração em cada passo dessa jornada acadêmica.

Agradeço profundamente ao meu orientador, Prof. Dr. Fabio de S. Dias, pela dedicação, paciência e sabedoria compartilhada ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho. Para além de meu orientador, Prof. Fabio é um exemplo e um amigo. Sou igualmente grato ao meu coorientador, Prof. Dr. Leonardo S. G. Teixeira, por suas valiosas contribuições, orientações e incentivo constante. O Prof. Léo foi fundamental para realização deste trabalho.

Aos professores que fizeram parte da minha trajetória, desde o ensino médio até a pós-graduação, o meu sincero reconhecimento por transmitirem conhecimento e paixão pela ciência.

À minha família, meu pilar de sustentação, dedico toda a minha gratidão. Ao meu pai, Marcos, e à minha mãe, Celiane, pelo amor incondicional, pelo indescritível suporte e por sempre acreditarem em mim. À minha avó Ceci, pelo suporte e carinho que sempre iluminaram o meu caminho. O amor que sinto é incondicional.

À minha namorada, Giovanna, agradeço por seu amor, apoio e por ser uma companheira inigualável, de vida e estudos. Gio é uma peça fundamental na minha caminhada, sei que sem ela as coisas seriam muito mais difíceis. Não tenho palavras que descrevam o amor que sinto. À sua família, especialmente à vovó Teté e ao seu Paulo, sou grato por me acolherem com tanto carinho.

Aos meus melhores amigos, Gabriel e Michel, que mesmo distantes, estão presentes no meu coração, obrigado pela amizade de tanto tempo e que tanto prezo. Aos meus parceiros de caminhada acadêmica, Vini, Duda, Kerol, Lucas, Lú e Sú, que tornaram essa jornada mais leve e inspiradora com sua amizade, companheirismo, fofocas e risadas. Sei que colhi amizades para o resto da vida.

Ao grupo de pesquisa IDEIA e ao GPQUAM, minha admiração e gratidão por todo o apoio intelectual e pelo ambiente acolhedor. É uma honra fazer parte destes grupos. Ao CIENAM e ao Caio Félix, responsável pelo ICP OES do CIENAM, obrigado pela assistência técnica essencial para este trabalho. Agradeço, também, a Thalia. Sua assistência foi extremamente essencial na realização deste trabalho.

À Universidade Federal da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFBA, meu agradecimento por me proporcionarem a estrutura e o suporte necessários para

desenvolver esta pesquisa. Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e FAPESB, registro minha gratidão pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste estudo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta etapa fosse concluída, o meu mais sincero agradecimento.

DOS REIS, Marcos Levi C. M. **Desenvolvimento de métodos analíticos verdes para determinação multielementar em amostras de produtos apícolas por técnicas espectrométricas**. Orientador: Fabio de Souza Dias. 2024. 119 p. il. Dissertação – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2024.

RESUMO

Ações antropogênicas são as maiores responsáveis pela deposição de elementos químicos potencialmente tóxicos no meio ambiente. Agentes polinizadores, como as abelhas, podem interagir com essas espécies químicas, levando a transferência destes poluentes para as abelhas e os produtos da colmeia como: mel, pólen, própolis, geleia real e cera. Neste sentido, são desenvolvidos três métodos verdes para análise de produtos apícolas, pólen e mel, e determinação multielementar por técnicas espectrométricas. O primeiro, é um método para a determinação de Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd em pólen de abelha usando espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF) após preparo de amostra por suspensão (pólen e solvente eutético profundo natural composto de ácido láctico, glicose e água (NADES LGH)). Os limites de detecção foram 0,24; 0,07; 0,003; 0,05; 0,03 e 0,02 mg kg⁻¹ para Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd, respectivamente. Testes de recuperação foram realizados em amostras de pólen enriquecidas com 67 e 667 mg kg⁻¹ dos analitos, e os resultados variaram de 80 a 120%. Ainda, são apresentados dois procedimentos analíticos de decomposição orgânica, baseados em reações de ativação de persulfato, para determinação de multielementar em amostras de mel por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Os limites de detecção foram 10, 30, 2, 30, 10, 60 e 30 µg kg⁻¹ para Zn, Co, Cd, Mn, Cr, Al e Cu, respectivamente, os quais são adequados para análise de alimentos de acordo com a legislação brasileira. A precisão foi avaliada pelo desvio padrão relativo (RSD) e foi menor ou igual a 3% para todos os analitos. Além disso, testes de recuperação foram realizados em amostras de mel enriquecidas com 0,5; 0,25; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 50 mg kg⁻¹ dos analitos, e os resultados variaram de 80% a 120%. Todos os métodos propostos foram avaliados como uma alternativa verde por meio de métricas sustentáveis. A pontuação final dessas métricas verdes garante que o método esteja alinhado com os critérios da química analítica verde (GAC).

Palavras chave: Processo de oxidação avançado, amostragem por suspensão, química analítica verde, métricas verdes, calibração de dois pontos por correspondência de matriz.

ABSTRACT

Anthropogenic actions are the main contributors to the deposition of potentially toxic chemical elements in the environment. Pollinating agents, such as bees, can interact with these chemical species, leading to the transfer of these pollutants to bees and hive products such as honey, pollen, propolis, royal jelly, and wax. In this context, three green methods were developed for the analysis of beekeeping products, pollen, and honey, as well as multielement determination using spectrometric techniques. The first is a method for the determination of Ca, Fe, Co, Ni, Zn, and Cd in bee pollen using energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF) after sample preparation by suspension (pollen and a natural deep eutectic solvent composed of lactic acid, glucose, and water (NADES LGH)). The detection limits were 0.24, 0.07, 0.003, 0.05, 0.03, and 0.02 mg kg⁻¹ for Ca, Fe, Co, Ni, Zn, and Cd, respectively. Recovery tests were performed on pollen samples spiked with 67 and 667 mg kg⁻¹ of the analytes, with results ranging from 80% to 120%. Additionally, two analytical decomposition procedures, based on activated persulfate reactions, were compared for multielement determination in honey samples using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). The detection limits were 10, 30, 2, 30, 10, 60, and 30 µg kg⁻¹ for Zn, Co, Cd, Mn, Cr, Al, and Cu, respectively, which are suitable for food analysis according to Brazilian regulations. Precision was evaluated through the relative standard deviation (RSD) and was ≤ 3% for all analytes. Furthermore, recovery tests were performed on honey samples spiked with 0.5, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, and 50 mg kg⁻¹ of the analytes, with results ranging from 80% to 120%. All the proposed methods were assessed as green alternatives using sustainable metrics. The final score of these green metrics ensures that the methods align with the criteria of Green Analytical Chemistry (GAC).

Keywords: Advanced oxidation process, slurry sampling, green analytical chemistry, green metrics, matrix-matching two-point calibration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de produtos apícolas -----	22
Figura 2. Número de trabalhos que apresentam a utilização de técnicas espectrométricas na análise de abelhas e produtos apícolas -----	26
Figura 3. Diagrama de fases dos NADES com ponto eutético -----	42
Figura 4. Espectros de FTIR para o NADES sintetizado e seus componentes: ácido láctico e glicose -----	54
Figura 5. Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial completo de 2^4 com efeitos de cada fator e suas interações-----	55
Figura 6. Avaliação da homogeneidade e estabilidade de suspensões de amostras de pólen preparadas em (▲) 65% NADES LGH, (■) 1% Triton X-100 e (●) água. A turbidez das suspensões foi monitorada pela medição dos sinais de absorbância a 550 nm -----	57
Figura 7. Suspensões de amostras de pólen preparadas em 65% de NADES LGH, 1% de Triton X-100 e água após 10 min de sonicação -----	58
Figura 8. Espectros de EDXRF para a solução S1 (A) e composta de 50% de pólen de abelha amostra 1 em NADES LGH + 1 mg L ⁻¹ Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd, e 50 mg L ⁻¹ Ga, Y, Ge, Se e In, e S2 (B) composta por 50% da amostra de pólen 1 em NADES LGH + 50% NADES LGH (Faixa 1: 40 kV, filtro Al 500 µm; Faixa 2: filtro Cu 50 kV 100 µm) -----	59
Figura 9. Gráficos obtidos para o planejamento de mistura restrita usado para a otimização da combinação de persulfato ativado por base e ativado por ferro para pré-tratamento de amostras de mel: (A) Superfície de resposta do modelo quadrático usando diferentes teores das soluções de KOH, APS e FAS; (B) Gráfico de contorno da desejabilidade global normalizada como uma função da proporção das soluções. FAS: sulfato de amônio ferroso, APS: persulfato de amônio -----	76
Figura 10. Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo 2^4 usado para avaliar a significância dos fatores na otimização da combinação sinérgica de persulfato ativado por ferro e ultrassonicação para pré-tratamento de amostras de mel: tempo de sonicação, concentrações da solução de sulfato de amônio ferroso (FAS), solução de HCl e solução de persulfato de amônio (APS) -----	78
Figura 11. Gráficos obtidos do delineamento da matriz de Doehlert para otimização da combinação sinérgica de persulfato ativado por ferro e ultrassonicação para pré-tratamento de amostras de mel -----	79

Figura 12. Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo 2^3 utilizado para avaliar a robustez do procedimento através da proporção dos componentes da mistura: hidróxido de potássio, sulfato ferroso de amônio (FAS) e persulfato de amônio (APS) com efeito de cada fator e suas interações -----88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Trabalhos que apresentam a utilização de técnicas espectrométricas na análise de abelhas e produtos apícolas -----	27
Tabela 2. Planejamento fatorial completo 2 ⁴ e resposta múltipla obtida para otimização do método proposto -----	56
Tabela 3. Determinação de Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd em amostra de pólen (Amostra 1) por EDXRF após preparo da amostra com solvente eutético profundo natural -----	50
Tabela 4. Determinação de Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd em uma amostra de pólen (Amostra 2 e 3) por espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de energia após preparação da amostra com solvente eutético profundo natural -----	62
Tabela 5. Parâmetros analíticos do método proposto para determinação de Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd em amostras de pólen por espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de energia após preparação da amostra com solvente eutético profundo natural -----	64
Tabela 6. Determinação de Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd em amostras de pólen pelo método proposto (A) e comparativo (B) (valor médio ± intervalo de confiança) -----	64
Tabela 7. Características de métodos que empregam espectrometria de fluorescência de raios X para análise de amostras de pólen -----	67
Tabela 8. Planejamento de mistura restrita para estudar a degradação química orgânica de amostras de mel usando combinação sinérgica de persulfato ativado por base e ferro com subsequente determinação de múltiplos elementos por ICP OES -----	75
Tabela 9. Planejamento fatorial completo (2 ⁴) para estudar a digestão de amostras de mel usando a combinação sinérgica de ultra-sonicação e persulfato ativado por ferro com subsequente determinação multielementar por ICP OES. APS: persulfato de amônio, FAS: sulfato de amônio ferroso -----	77
Tabela 10. Matriz de Doehlert com valores reais e desejabilidade global realizada para otimizar a degradação de amostras de mel usando a combinação sinérgica de ultrassonicação e persulfato ativado por ferro com subsequente determinação multielementar por ICP OES. FAS: sulfato de amônio ferroso, CP: ponto central -----	79
Tabela 11. Curvas analíticas para a determinação de Zn, Co, Cd, Mn, Cr, Al e Cu por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (mg kg ⁻¹) após digestão de amostras de mel usando reações de persulfato ativado -----	81
Tabela 12. Parâmetros analíticos para determinação multielementar em amostras de mel após digestão usando combinação sinérgica de persulfato ativado por base e ferro e combinação sinérgica de ultrassonicação e persulfato ativado por ferro com subsequente determinação por ICP OES -----	82

Tabela 13. Teste de recuperação aplicado em amostras de mel digeridas pela combinação sinérgica de persulfato ativado por base e ativado por ferro com posterior determinação multielementar por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (n= 3) -----	83
Tabela 14. Determinação de Zn, Co, Cd, Mn, Cr, Al e Cu em amostras de mel pelos sistemas APS/OH ⁻ e APS/H ⁺ e método comparativo (valor médio ± intervalo de confiança) -----	86
Tabela 15. Planejamento fatorial completo (2 ³) e desejabilidade global obtidos para teste de robustez -----	87
Tabela 16. Características de métodos que empregam espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado para análise de amostras de mel -----	92

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AAS do inglês: Atomic absorption spectrometry. Espectrometria de absorção atômica

AGREE do inglês: Analytical Greenness Calculator. Calculadora Analítica verde

AGREEprep do inglês: Analytical sample preparation greenness calculator. Calculadora Analítica verde de preparo de amostra

ANOVA do inglês: analysis of variance. Análise de variância

ANVISA agência reguladora sanitária brasileira

APS do inglês: Ammonium persulfate. Persulfato de amônio

APS/H⁺ método baseado combinação sinérgica de ativação de persulfato por ferro e ativação de persulfato por ultra-sonicação

APS/OH⁻ método baseado na combinação sinérgica de ativação de persulfato por base e ativação de persulfato por ferro

BAGI do inglês: Blue Applicability Grade Index. (Índice de Grau de Aplicabilidade Azul)

BEC do inglês: background equivalent concentration. (Concentração equivalente de fundo)

CHEMS-1 do inglês: Chemical Hazard Evaluation for Management Strategies. Avaliação de Riscos Químicos para Estratégias de Gestão

CID do inglês: charge injection device. Dispositivo de injeção de carga

CRM do inglês: Certified reference material. (Material de referência certificado)

CV AAS do inglês: Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry. (Espectrometria de absorção atômica por vapor frio)

CV AFS do inglês: Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometry. (Espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio)

D desejabilidade global

DES do inglês: Deep eutectic solvent. (Solvente eutético natural)

DMA do inglês: Direct Mercury analyzer. (Analisador direto de mercúrio)

Ec do inglês: Energy consupcion. (Consumo elétrico)

EDXRF do inglês: Energy dispersive X-ray fluorescence. Fluorescência de raios-X por energia dispersiva

ET AAS do inglês: electrothermal atomic absorption spectroscopy. (Espectrometria de absorção atômica eletrotérmica)

F AAS do inglês: flame atomic absorption spectrometry. (Espectrometria de absorção atômica com chama)

FAS do inglês: Ferrous ammonium sulfate. (Sulfato de amônio ferroso)

FTIR do inglês: Fourier Transform Infrared Spectroscopy. (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier)

GAC do inglês; Green analytical chemistry. (Química analítica verde)

GAPI do inglês: Green Analytical Procedure Index. (Índice de Procedimento Analítico Verde)

GF AAS do inglês: graphite furnace atomic absorption spectrometry. (Espectrometria de absorção atômica em forno de grafite)

GSP do inglês: Green sample preparation. Preparo de amostra verde

HBA do inglês: Hydrogen bond acceptor. Aceitador de ligações de hidrogênio

HBD do inglês: Hydrogen bond donator. Doador de ligação de hidrogênio

HG AAS do inglês: Hydride generation atomic absorption spectrometric. Espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos

ICP OES do inglês: Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente

ICP-MS do inglês: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado

IUPAC do inglês: International Union of Pure and Applied Chemistry. União Internacional de Química Pura e Aplicada

LD Limite de detecção

LQ Limite de quantificação

MIP OES do inglês: microwave induced plasma optical emission spectrometry. Espectrometria de emissão atômica com plasma de micro-ondas

NADES do inglês: Natural deep eutectic solvent. Solvente eutético profundo natural

NADES LGH do inglês: do inglês: Natural deep eutectic solvent composed by latic acid, glucose and water. Solvente eutético profundo natural formado por ácido láctico, glicose e água

NEMI do inglês: National Environmental Methods Index. Índice Nacional de Métodos Ambientais

PC ponto central

RM resposta múltipla

RSD do inglês: relative standard deviation. Desvio padrão relativo

RSN relação sinal-ruído

SA sinal analítico geral

SDA do inglês: do inglês standard dilution alnalysis. Análise de diluição padrão

SR-AOP do inglês: Sulfate radical advanced oxidation procedures. Processos de oxidação avançada baseados em radicais sulfato

WAC do inglês; White analytical chemistry. Química nalítica branca

XRF do inglês: X-ray fluorescence. Fluorescência de raios-X

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	18
CAPÍTULO I: TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS NA ANÁLISE DE ABELHAS E PRODUTOS APÍCOLAS PARA DETERMINAÇÃO ELEMENTAR	20
1.1 Introdução	21
1.2 Produtos apícolas e contaminação por metais e metalóides	22
1.3 Técnicas espectrométricas na análise de abelhas e produtos apícolas	25
1.4 Preparo de amostras de abelhas e produtos apícolas para análise por técnicas espectrométricas	35
1.5. Diferentes estratégias no preparo de amostras de produtos apícolas	38
1.6 Solventes eutéticos profundos naturais e reações de ativação de persulfato para análise de alimentos	40
 CAPÍTULO II: MÉTODO ANALÍTICO VERDE USANDO SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO NATURAL PARA PREPARAO DE AMOSTRAS DE PÓLEN DE ABELHA PARA DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR POR ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA	46
2.1 Introdução	47
2.2 Materiais e Métodos.....	49
2.2.1 Instrumentação	49
2.2.2 Reagentes, soluções e amostras	50
2.2.3 Procedimento para avaliação da estabilidade e homogeneidade da suspensão.....	51
2.2.4 Síntese do NADES	51
2.2.5 Procedimento de digestão das amostras de pólen	51
2.2.6 Planejamento fatorial completo de dois níveis	52
2.2.7 Procedimento experimental	52
2.2.8 Procedimento de calibração	53
2.3 Resultados e Discussão	53
2.3.1 Caracterização do NADES sintetizado	53
2.3.2 Determinação das condições experimentais para preparo da suspensão.....	54
2.3.3 Avaliação da estabilidade e homogeneidade da suspensão	57
2.3.4 Avaliação do uso de padrão interno.....	58

2.3.5 Performance analítica e aplicação	63
2.3.6 Avaliação do “greenness” e “whiteness” do método	65
2.4 Conclusão	68

CAPÍTULO III: COMPARAÇÃO DE PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS VERDES BASEADOS EM REAÇÕES DE ATIVAÇÃO DE PERSULFATO PARA DEGRADAÇÃO QUÍMICA ORGÂNICA PARA DETERMINAÇÃO DE MULTIELEMENTAR EM AMOSTRAS DE MEL POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO

.....	69
3.1 Introdução	70
3.2 Materiais e Métodos	72
3.2.1 Instrumentação	72
3.2.2 Reagentes, Soluções e Amostras	72
3.2.3 Procedimento Experimental.....	73
3.2.4 Procedimento de digestão por micro-ondas	73
3.2.5 Ferramentas estatísticas para otimização do pré-tratamento das amostras	73
3.3 Resultados e discussão	74
3.3.1 Otimização da combinação sinérgica de persulfato ativado por base e ativado por ferro para pré-tratamento de amostras de mel	74
3.3.2 Otimização da combinação sinérgica de persulfato ativado por ferro e ultrassonicação para pré-tratamento de amostras de mel	77
3.3.3 Avaliação do efeito de matriz	80
3.3.4 Performance analítica e aplicação	82
3.4 Avaliação da greenness do método	90
3.5 Conclusão	93
CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
4.1 Considerações finais	95
REFERÊNCIAS	97

INTRODUÇÃO GERAL

As ações antropológicas são a principal fonte de contaminação de espécies químicas potencialmente tóxicas para o meio ambiente (Storck, 2023). A avaliação da concentração dessas espécies pode auxiliar na compressão do impacto no meio ambiente e na saúde humana, bem como nos processos de bioacumulação desses contaminantes (Mishra, 2023). Nesta perspectiva, as abelhas e produtos apícolas têm recebido atenção entre os pesquisadores, por serem potenciais indicadores ambientais, servirem de insumos para produtos nas indústrias farmacêuticas e de alimentos, e por estarem presentes na dieta humana (El-Didamony, 2024).

Elementos essenciais são obrigatórios para os seres humanos, mas, se consumidos em excesso, podem causar problemas à saúde; esses elementos compreendem ferro, cromo, zinco, manganês, cobre, cálcio, cobalto, magnésio e sódio. Elementos potencialmente tóxicos (mesmo em quantidades muito pequenas) podem causar envenenamento; esses elementos compreendem níquel, chumbo, cádmio, alumínio, arsênio e mercúrio (Arabameri, 2024). Esses metais e não metais podem estar presentes em qualquer quantidade em amostras de abelhas, e, conseqüentemente, em produtos derivados das abelhas, como própolis, geleia real, mel e pólen.

A determinação de elementos traço muitas vezes está associada a dificuldades relacionadas a matriz desses tipos de amostras, as quais são sólidas ou viscosas, assim como a limitações ligadas a etapa de calibração do método analítico, muitas vezes necessitando da utilização de metodologias mais complexas de calibração, como calibração por adição de analito ou calibração por padrão interno (Pires, 2019). Estas dificuldades podem ser resolvidas utilizando uma etapa de preparo de amostras adequada e métodos de calibração menos difíceis.

Considerando que técnicas tradicionais de preparo de amostras (digestão por via seca ou úmida (Korn, 2008)) representam uma possível fonte de impacto negativo ao meio ambiente, no desenvolvimento de metodologias analíticas, aspectos relacionados à segurança do operador e ao impacto ambiental e humano gerados devem ser avaliados. Nessas circunstâncias, surge a química analítica verde (GAC) e a química analítica branca (WAC), as quais enfatizam a necessidade de solventes mais seguros e menos tóxicos, redução do consumo de energia, utilização de substâncias baseadas em fontes renováveis e eficiência analítica, emergindo como um caminho para se atingir a sustentabilidade (Armenta, 2008; Nowak, 2021).

Neste sentido, neste trabalho foram desenvolvidos procedimentos analíticos baseados nos princípios da GAC e WAC para determinação elementar por técnicas espectrométricas. No

primeiro capítulo apresenta-se uma revisão da literatura, na qual se é discutido a utilização de técnicas espectrométricas na análise de abelhas, geleia real, cera de abelha, pólen, beebread, mel, própolis e geoprópolis, bem como os métodos de preparo de amostra adotados na determinação de metais e metalóides neste tipo de amostras. No segundo capítulo é descrito o desenvolvimnto de um método para a determinação multielementar de Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd, utilizando um solvente eutético profundo natural (NADES) no preparo de uma suspensão de amostra de pólen de abelha, para posterior determinação por fluorescência de raios-X por energia dispersiva (EDXRF). Já no terceiro capítulo, são desenvolvidos e comparados dois procedimentos de decomposição diferentes, baseados em reações de persulfato ativado para degradação orgânica de amostras de mel com subsequente determinação de Zn, Cd, Co, Mn, Cr, Al e Cu por espectrometria de emissão atômica por plasma indutivamente acoplado (ICP OES): (i) combinação sinérgica de ativação de persulfato por base e ativação de persulfato por ferro (APS/OH⁻), e (ii) combinação sinérgica de ativação de persulfato por ferro e ativação de persulfato por sonicação (APS/H⁺).

CAPÍTULO I

TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS NA ANÁLISE DE ABELHAS E PRODUTOS APÍCOLAS PARA DETERMINAÇÃO ELEMENTAR

1.1 Introdução

As ações antropogênicas, como o descarte de resíduos urbanos e industriais, o garimpo e a mineração, podem ocasionar a liberação de elementos químicos potencialmente tóxicos no meio ambiente (Zhou, 2018; Zhai, 2023). A deposição dessas espécies químicas, pode levar ao acúmulo nas plantas, as quais podem ser vetores de contaminação indireta, devido a processos de bioacumulação, para alguns polinizadores, como as abelhas, e, consequentemente, em produtos derivados das abelhas, como própolis, geleia real, mel e pólen (Hassona, 2023).

Os elementos químicos potencialmente tóxicos, ainda, podem estar presentes na água, utilizada pelas abelhas para beber e resfriar a colmeia, como também, podem estar presentes na atmosfera, fazendo com que as abelhas os colem durante o voo por meio dos pelos no seu corpo, antenas e patas (Zarić, 2017; Fry, 2023). Assim, ao deixarem as colmeias, as abelhas ficam expostas a diferentes espécies químicas, como metais e metalóides (Zarić, 2022) e, por conta, do comportamento móbil das abelhas e o constante contato com diferentes superfícies e ambientes, elas carregam os contaminantes para a colmeia (Finger, 2014), refletindo na composição dos produtos apícolas (Tutun, 2022). Como resultado da contaminação e do transporte de espécies químicas para colmeia, as abelhas e os produtos apícolas podem ser propostos como substrato bioindicador, que são definidos como organismo vivo e seus produtos, com os quais se pode estimar a direção e a intensidade das mudanças em seu ambiente de vida (Bargańska, 2015).

É evidente que a determinação de metais e metalóides nas abelhas e seus produtos é fundamental para o monitoramento ambiental, e consequentemente para saúde humana (Pohl, 2009a). Em vista disso, técnicas espectrométricas são empregadas na análise de amostras de produtos apícolas, como: a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) (Pohl, 2009b; Madejczyk, 2008), espectrometria de absorção atômica eletrotérmica (ETAAS) (Conti, 2001; Lambert, 2012), espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) (Yücel, 2013; Zhu, 2013), espectrometria de emissão atômica com plasma de micro-ondas (MIP OES) (Varga, 2020), espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (Chudzinska, 2010; Chudzinska, 2012) e espectrometria de fluorescência de raios-X (XRF) (Khuder, 2010). Além disso, são utilizadas técnicas como analisador direto de mercúrio (DMA), espectrometria de absorção atômica por vapor frio (CV AAS) e espectrometria de fluorescência atômica por vapor frio (CV AFS) na determinação de

Hg (Vieira, 2014) e na determinação de As, Se, Sb, Cd e Pb, a espectrometria de absorção atômica por geração de hidretos (HG AAS) (Raeymaekers, 2006).

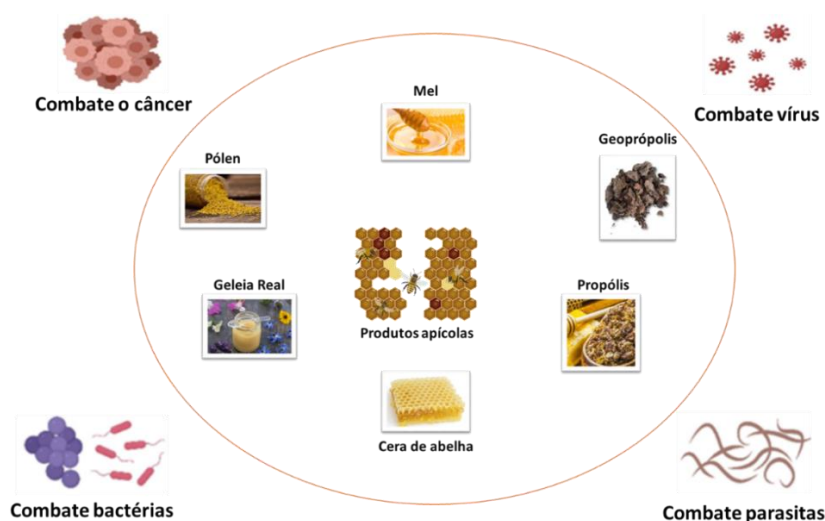
As abelhas e os produtos da colmeia, apresentam composição química variada devido a fatores relacionadas a origem e ao ambiente, com proporções e/ou presença dos seus diferentes constituintes, como: proteínas, açúcares, lipídios, fibras, aminoácidos, enzimas, vitaminas, compostos fenólicos e minerais (Dawish, 2023). Diante da complexidade da matriz desses produtos, com altos teores de carbono (Morgano, 2012), e com a possibilidade de apresentar problemas relacionados à heterogeneidade das amostras e a interferências químicas durante as análises (Pohl, 2009b), diferentes estratégias de preparo de amostra podem ser adotadas, a depender da técnica espectrométrica a ser utilizada.

Assim, neste capítulo são apresentadas e discutidas a utilização de técnicas espectrométricas na análise de abelhas, geleia real, cera de abelha, pólen, beebread, mel, própolis e geoprópolis, bem como os métodos de preparo de amostra adotados na determinação de metais e metaloides neste tipo de amostras.

1.2 Produtos apícolas e contaminação por metais e não-metals

Os produtos apícolas são substâncias naturais produzidas pelas abelhas, sendo secretadas naturalmente através de glândulas (geleia real e cera de abelha) ou obtidos através da coleta e processamento das abelhas (pólen, beebread, mel, própolis e geoprópolis) (Liu, 2023) (Figura 1).

Figura 1. Tipos de produtos apícolas.



Fonte: adaptado de Nainu, 2021.

O pólen é um produto granular produzido por plantas para fins reprodutivos (Pacini, 2020). Este produto apresenta propriedades organolépticas bem definidas, com cores variando entre branco, amarelo, laranja, vermelho e uma tonalidade mais escura, as quais dependem de fatores como origem botânica e composição química (Muradian, 2005). As abelhas, por sua vez, coletam o pólen das flores e o transportam para as colmeias, onde o armazenam e misturam com enzimas, mel ou secreção salivar e néctar (Fuente-Ballesteros, 2023). Esse pólen pode ser colhido das colmeias, produzindo o pólen apícola. Em termos de composição, o produto apresenta proteínas (5–60%), açúcares redutores e não redutores (13–55%), lipídios (4–7%), fibras brutas (0,3–20%), aminoácidos, além de ser uma fonte importante de vitaminas, compostos fenólicos bioativos e micronutrientes essenciais, como minerais (Fuente-Ballesteros, 2023; Sipos, 2020). Um produto diretamente obtido da fermentação do pólen, e da mistura salivar de abelha e néctar de flores, é o pão de abelha (Urcan, 2017). Este produto, é considerado funcional, possuindo várias virtudes nutricionais e diversas moléculas bioativas, bem como é um dos produtos mais ricos da colmeia em termos de macro e microelementos (Bakour, 2022).

O mel é um líquido viscoso e doce produzido por abelhas a partir da coleta de néctar das flores ou outras secreções naturais contendo açúcares (Sixto, 2024). Neste produto há a presença de uma alta concentração de glicose e frutose, bem como elementos essenciais e não essenciais, carboidratos, enzimas e aminoácidos, constituintes necessários para a manutenção do metabolismo humano, fazendo do mel um alimento básico na dieta humana (Melaku, 2022).

Outro produto advindo da coleta e processamento das abelhas, é a própolis. Este produto é uma mistura resinosa, coletada de fontes botânicas, como flores e exsudatos de plantas, a qual as abelhas mistura com secreções, cera e pólen (Ibáñez, 2023). Este produto apresenta uma ampla variedade de componentes, incluindo terpenos, polissacarídeos, ácidos aromáticos, polifenóis, ésteres de ácidos fenólicos, vitaminas, elementos essenciais e não essenciais, e aminoácidos (Huang, 2014), sendo associado a diversas propriedades medicinais, o que o faz ser utilizado por seus potenciais benefícios à saúde (Zulhandri, 2021). Quando as abelhas misturam o solo e própolis, obtém-se a geoprópolis, a qual apresenta fragmentos rígidos e grânulos de consistência heterogênea (Souza, 2013). Este produto tem uma matriz complexa, com terpenos, ácidos orgânicos, fenólicos e minerais, sendo amplamente utilizado em tratamentos medicinais (Cinegaglia, 2013).

Dos produtos que são secretados naturalmente pelas abelhas, tem-se a geleia real e a cera de abelha. A geleia real é secretada pelas glândulas hipofaríngeas e mandibulares das

abelhas. Apresenta cor amarelada, e é composta, em base de peso úmido, de 60–70% de água, 9–18% de proteínas, 3–8% de lipídios, 6–18% de hidrocarbonetos, 0,8–3,0% de minerais e pequenas quantidades de polifenóis e vitaminas (Hu, 2017). Este produto apresenta diversas propriedades funcionais, sendo amplamente promovida e comercialmente disponível como medicamento e alimento saudável (Hu, 2017; Park, 2020)

Diferente da geleia real, a cera de abelha é produzida por glândulas produtoras de cera no abdômen das abelhas operárias (Nong, 2023). A cera de abelha tende a ser branca em seu estado natural, mas amarelada após contato com mel e pólen, incluindo em sua composição hidrocarbonetos, ésteres de ácidos graxos, diésteres, ácidos livres, álcoois graxos, compostos exógenos, e elementos essenciais e não essenciais (Hosseini, 2023). Ela é principalmente usada pelas abelhas para construir células de favo de mel, podendo ser utilizadas como vernizes e polidores, e no desenvolvimento de medicamentos e cosméticos (Nong, 2023; Pérez, 2013).

Considerando que metais e metalóides ocorrem em níveis traço no ar, água, solo e plantas, através de ciclos geoquímicos, físicos e biológicos naturais (Silveira-Júnior, 2022), bem como devido a atividades humanas, como rejeitos de mineração, fundição, uso de agroquímicos, atividades industriais, tráfego rodoviário, entre outras (Hladun, 2016), as abelhas estão expostas a contaminação por esses elementos por meio de diversas rotas (Gekière, 2023).

O contato com elementos potencialmente tóxicos pode ocorrer por via oral (internamente) ou por via tópica (externamente). Independente do comportamento das diferentes espécies de abelhas, todas estão potencialmente expostas através dos seus alimentos e água, utilizada para se hidratar e resfriar a colmeia (Zarić, 2022). Considerando que as abelhas carecem de mecanismos seletivos de detecção da presença de metais em alimentos, como arsênio, chumbo ou zinco (Monchanin, 2022), elas podem entrar em contato por via oral enquanto forrageiam e consomem recursos, bem como na fase larval, quando se desenvolvem sobre provisões alimentares (Gekière, 2023).

Além da alimentação, as abelhas podem ser expostas a elementos potencialmente tóxicos através de materiais de nidificação; pedaços de folhas/pétalas ou lama (abelhas que nidificam em cavidades) ou solos (abelhas que nidificam no solo), bem como no ambiente que elas forrageiam, por adsorção na cutícula ou inalação através do sistema traqueal (Negri, 2015), ou durante o voo, ao carregarem esses elementos nos pelos do seu corpo, antenas e patas (Silveira-Júnior, 2022).

Outro fato que deve ser considerado, é a bioacumulação de metais e metaloides em plantas, principalmente as do tipo metalófitas (concentração de metais e metaloides mais alta que no solo), as quais há evidências que são utilizadas por abelhas para forrageamento e nidificação (Eskov, 2015). A bioacumulação de elementos potencialmente tóxicos por essas plantas, faz com que os recursos que são coletados pelas abelhas para produzir seus produtos, como pólen, néctar e resinas, também apresentam relevantes concentrações desses elementos.

A presença de metais e metaloides em produtos apícolas, tanto os naturalmente secretados pelas abelhas, quanto os advindos de processamentos e recursos coletados, está diretamente relacionado ao nível de exposição das abelhas a esses elementos, dependendo do comportamento de coleta da espécie (raio de coleta), bem como ao nível de contaminação por metais e metaloides da localidade que se encontra a colmeia (Xiao, 2022), o que leva a esses animais e seus produtos serem considerados bons bioindicadores.

1.3 Técnicas espectrométricas na análise de abelhas e produtos apícolas

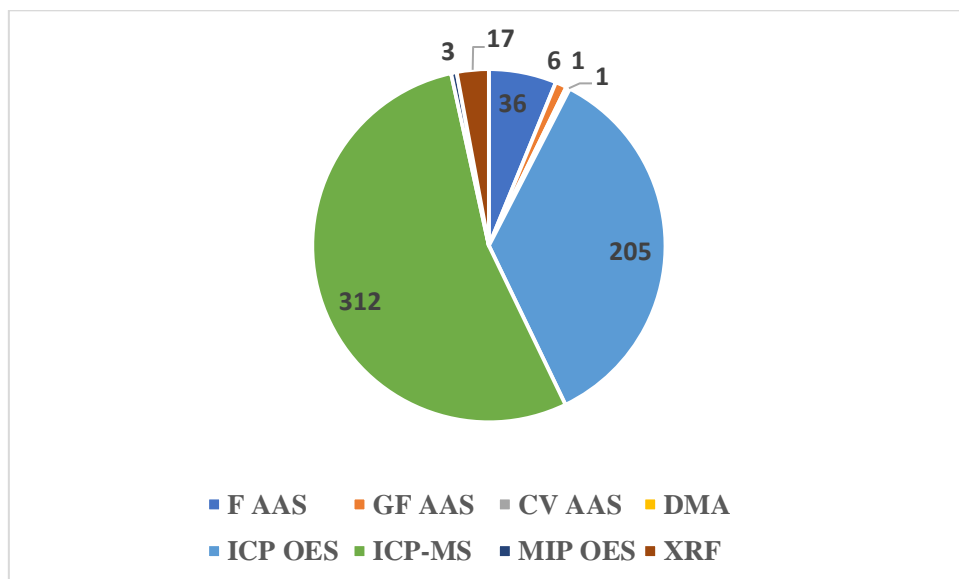
Dentre as diferentes técnicas espectrométricas que podem ser empregadas para determinação elementar em amostras de abelhas e derivados apícolas, tem-se as técnicas baseadas em absorção atômica, como: F AAS (Pereira, 2023; Pohl, 2020; Ploegaerts, 2023; Altunay, 2019; Gelaye, 2024; Beshaw, 2022; Pucholobek, 2021; Daşbaşı, 2016; Yavuz, 2018), ET AAS (Zergui, 2023; Andrade, 2014; Ng, 2023), CV AAS (Demková, 2024), HG AAS (Maragou, 2017) e DMA (Girolametti, 2023). Estas técnicas se baseiam na medida da absorção da radiação eletromagnética, vinda de uma fonte de radiação primária, por átomos gasosos no estado fundamental, se diferenciando nos processos de atomização utilizados.

Apesar do método de ET AAS apresentar a possibilidade de análise direta de amostras sólidas e viscosas, e ter sensibilidade maior que as outras técnicas (níveis de $\mu\text{g kg}^{-1}$), esta não é a técnica de absorção atômica mais utilizada, como representado na Figura 2. Isso está relacionado ao custo reduzido relacionado à aquisição, manutenção e operação, e praticidade na utilização do F AAS, bem como a necessidade de uma otimização eficiente do programa de temperatura e escolha de modificador químico quando se utiliza a técnica de ET AAS (Welz, 2014).

Algumas técnicas apresentam boa sensibilidade, mas tem seus usos restritos para poucos elementos, como é o caso das técnicas que utilizam vapor frio (tanto absorção atômica, quanto fluorescência atômica (Astolfi, 2021)) e a de análise direta de mercúrio (Ferreira, 2018), as

quais tem seu uso restrito para determinação de Hg, e a técnica que utiliza geração de hidretos, que tem seu específico para espécies químicas que formam hidretos em amostras de abelhas e produtos apícolas (Demková, 2024).

Figura 2. Número de trabalhos que apresentam a utilização de técnicas espectrométricas na análise de abelhas e produtos apícolas (web of Science, palavras chaves: *spectrometry and bee products*, 29 jan. 2025)



Fonte: autoria própria

A Tabela 1 apresenta alguns trabalhos que empregam técnicas espectrométricas para determinação de metais e metalóides em amostras de abelhas e produtos da colmeia. No emprego dessas técnicas é notório que as técnicas baseadas na utilização de plasma, ICP OES (Richter, 2024; Al-saidaa, 2022; Valverde, 2023; Farisi, 2023; Siqueira, 2022) e ICP-MS (Şeker, 2022; Gręda, 2024;; Bora, 2023;; Cauduro, 2024), são as mais utilizadas. Estas técnicas são baseadas na excitação de átomos no estado gasoso em um plasma gerado por descarga de radiofrequência, medindo-se a emissão de fótons na técnica de ICP OES, e o número de íons gerados e separados por um campo magnético de acordo com suas proporções massa/carga, na técnica de ICP-MS. A maior frequência de utilização das técnicas de ICP OES e ICP-MS, deve-se aos limites de detecção nas faixas de $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} , respectivamente (Girolametti, 2023; Siqueira, 2022), principalmente na determinação de elementos em nível traço ou que são classificados como microelementos (Scivikko, 2022; Conti, 2022). A capacidade multielementar dessas técnicas é outro fator que contribui para sua maior utilização, pois

impacta diretamente na frequência analítica, o que desfavorece técnicas como a F AAS, quando não são utilizadas metodologias sequenciais rápidas.

A técnica de MIP OES, aparece como uma alternativa recente tanto às técnicas de absorção atômica quanto as baseadas em plasma (Sajtos, 2019). Esta apresenta uma fonte de plasma de micro-ondas autossustentada em pressão atmosférica utilizando gás nitrogênio, com parâmetros analíticos semelhantes às do ICP OES, ao mesmo tempo que reduz os custos operacionais e aumenta a sustentabilidade (Balaram, 2020).

Tabela 1. Trabalhos que apresentam a utilização de técnicas espectrométricas na análise de abelhas e produtos apícolas

Amostra	Analitos	Técnica	Preparo da amostra	Limite de detecção	Desvio padrão relativo, %	Referência
Própolis	Ca, Fe, Mg e Mn	F AAS*	Digestão assistida por micro-ondas	0,1 – 3,82 mg kg ⁻¹	-	Pereira, 2023
Pólen	Ca, Cu, Fe, Mg, Mn e Zn	F AAS	Extração assistida por ultrassom	0,007 – 0,035 µg kg ⁻¹	< 5	Pohl, 2020
Mel	As, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Pd e Zn	F AAS, GF AAS** e ICP OES***	Apenas diluição, extração líquido-líquido, extração em fase sólida, digestão em bloco fechado e calcinação seca	9 – 600 µg L ⁻¹ (F AAS), 0,05 – 1 µg L ⁻¹ (GF AAS) e 0,5 – 4 µg L ⁻¹ (ICP OES)	1 a 34	Ploegaerts, 2023
Mel	Cu, Cd e Pb	F AAS	Microextração dispersiva líquido-líquido assistida por ultrassom após banho-maria	0,8 – 0,29 µg L ⁻¹	< 5	Altunay, 2019
Mel	Cr, Mn, Zn, Ni, Fe, Cu, Co, Cd e Pb	F AAS	Placa aquecida	0,00042 - 0,027 mg L ⁻¹	-	Gelaye, 2024
Mel	Zn, Cu, Mn, Cd, Cr e Pb	F AAS	Placa aquecida	0,00045 - 0,005 mg L ⁻¹	-	Beshaw, 2022
Mel	Fe, Mn, Mg e Ca	F AAS	Amostragem em suspensão	0,2 - 4,3 mg kg ⁻¹	< 5	Pucholobek, 2021
Mel	Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn	F AAS	Extração em fase sólida	0,9 - 2,2 µg L ⁻¹	≤ 2	Daşbaşı, 2016

Tabela 1. continuação

Mel	Cu	F AAS	Extração em fase sólida dispersiva após digestão em placa aquecida	0,22 mg L ⁻¹	3,7	Yavuz, 2018
Mel	Pb, Cd e As	GF AAS	Digestão assistida por micro-ondas	0,0008 – 0,003 mg kg ⁻¹	< 5	Zergui, 2023
Mel	Cr, Pb e Cd	ET AAS****	Amostragem em suspensão	0,6 – 2,8 µg kg ⁻¹	≤ 5	Andrade, 2014
Mel	Cr, Pb e Cd	GF AAS	Extração em fase sólida dispersiva	43,6 - 348,9 µg kg ⁻¹	≤ 11,5	Ng, 2023
Abelhas, pólen e mel	Hg	CV AAS***** (Analisador Avançado de Mercúrio)	Análise direta	0,001 mg kg ⁻¹	-	Demková, 2024
Abelhas, mel, própolis e pólen	As	HG AAS*****	Digestão assistida por micro-ondas	0,4 mg kg ⁻¹	≤ 17,6	Maragou, 2017
Mel	Hg	DMA*****	Análise direta	0,03 µg kg ⁻¹	< 5	Girolametti, 2023
Abelhas, cera, mel, pólen, própolis, e geleia real	Hg	CV AFS*****	Banho-maria	0,01 µg L ⁻¹	0,4 - 10	Astolfi, 2021
Abelhas, cera, mel, pólen, própolis e geleia real	Al, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Rb, Sb, Se, Si, Sn, Sr, Te, Ti, Tl, U, V e Zn	ICP OES e ICP-MS*****	Digestão assistida por micro-ondas e digestão em banho-maria	0,001 – 140 mg kg ⁻¹ (ICP OES) e 0,000007 – 14 mg kg ⁻¹ (ICP-MS)	0,5 – 25,5 (ICP OES) e 0,4 – 52,5 (ICP-MS)	Astolfi, 2020
Própolis, pólen, geleia real	Ag, Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, V, Zn	ICP-MS	Digestão assistida por micro-ondas	0,001 – 0,084 mg kg ⁻¹	< 15	Matuszewaska, 2021

Tabela 1. continuação

Pólen e mel	Sc, Y, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Dy, Ho, Er, Tm, Lu, Yb, As, Bi, Cd, Pb, Se, In	ICP-MS	Digestão assistida por micro-ondas	0,00041 - 10 µg L ⁻¹	< 5	Oliveira, 2017
Pólen	Li, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Cd, Ba, Pb	ICP-MS	Digestão assistida por micro-ondas	0,00001 – 0,2 mg kg ⁻¹	< 3	Şeker, 2022
Mel	B, Ba, Ca, Cd, Cs, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Sr, Tl, Zn	ICP-MS	Apenas diluição	0,0006 – 5 µg L ⁻¹	≤ 15	Gręda, 2024
Mel	Se, Mg, Ca, V, As, Al, P, Mn, Fe, Cr, Cu, Zn, Cd, Ba, Pb	ICP-MS	Digestão assistida por micro-ondas e blocos digestores	0,06 – 28,1 µg L ⁻¹	-	Leme, 2014
Mel	Ag, Al, Ba, Cd, Co, Cs, Cu, Fe, Ga, Li, Mg, Mn, Rb, Se, Sr, U, As, Be, Cd, Cr, Ni, Pb, Tl, V	ICP-MS	Digestão assistida por micro-ondas	0,005 – 29,99 µg L ⁻¹	6 a 40	Wetwitayaklung, 2018

Tabela 1. Continuação

Mel	Cu, Zn, Pb, Cr, Ni, Cd, Co, As, Hg	ICP-MS	Digestão assistida por micro-ondas	0,006 – 1,607 µg L ⁻¹	< 25	Bora, 2023
Mel	Br, I	ICP-MS	Combustão induzida por micro-ondas	34 e 0,6 mg kg ⁻¹	< 5	Costa, 2015
Mel	As, Cd, Hg, Pb	ICP-MS	Combustão induzida por micro-ondas	1,1 – 4,6 mg kg ⁻¹	< 5	Caudro, 2024
Mel	Na, Ca, Mg, K, Al, B, Ba, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Sr, Zn	MIP OES*****	Placa aquecedora	0,004 – 2,061 mg kg ⁻¹	-	Satjos, 2019
Mel	P, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Ni, Zn, Rb, Sr	EDXRF*****	Análise direta	0,048 – 3 mg kg ⁻¹	≤ 25	Ghidotti, 2021

F AAS*: espectrometria de absorção atômica por chama, GF AAS**: espectrometria de absorção atômica com forno de grafite, ICP OES***: espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente, ET AAS****: espectrometria de absorção atômica eletrotérmica, CV AAS*****: espectrometria de absorção atômica por vapor frio, HG AAS*****: espectrometria de absorção atômica com geração de hidretos, DMA*****: analisador direto de mercúrio, CV AFS*****: espectroscopia de fluorescência atômica de vapor frio, ICP-MS*****: espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, MIP OES*****: espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas, EDXRF*****: fluorescência de raios X por energia dispersiva.

Na análise de amostras de alimentos, diferentes estratégias de calibração são utilizadas para as técnicas baseadas em absorção e emissão atômica como: calibração por padrão externo (Farisi, 2023), por simulação de matriz (Sixto, 2025; Augusto, 2017), calibração por adição de analito (Sloop, 2021), calibração por padronização interna (Sixto, 2025; Mendes, 2006; Grêda, 2024), método padrão de interferência (Amais; Nóbrega; Donati, 2014), calibração multienergética (Higueira, 2019), calibração multiisótopo (Higuera, 2020), calibração multiespécies (Williams; Donati, 2018), bem como calibração por diluição de padrão (Jones, 2015) e calibração de dois pontos com correspondência de matriz (Sloop, 2021).

Calibração consiste em determinar uma função matemática que descreve a relação entre a concentração do analito e a resposta do instrumento, utilizando-se soluções padrão, sendo necessário realizar uma regressão, geralmente com o método dos mínimos quadrados, o qual que minimiza a soma dos quadrados das diferenças entre os dados experimentais e os valores calculados. Esses modelos de regressão linear são, então, utilizados para calcular a concentração do analito na amostra com base nas respostas das soluções padrão (Mermet, 2010). A falta de compatibilidade da matriz entre os padrões de calibração e as amostras pode comprometer a correlação dos sinais analíticos com as concentrações dos elementos (Castro, 2020).

Na calibração por padrão externo, soluções padrão com concentrações conhecidas dos analitos em uma matriz limpa (sem amostra), são preparadas e analisadas no instrumento. Uma curva de calibração é construída a partir dos sinais medidos e das concentrações conhecidas. Sob as mesmas condições instrumentais, a amostra é analisada e seus sinais medidos são comparados ao modelo de regressão linear obtido da curva de calibração, resultando na determinação da concentração. Este método é eficaz (dentro de uma faixa de erro quantitativo de geralmente $\pm 10\%$) (Sloop, 2019), pois tanto as soluções de calibração quanto as de amostra são preparadas na mesma matriz. Contudo, na maioria das aplicações práticas, isso não ocorre, já que a amostra analisada normalmente não está na mesma matriz que as soluções padrão, o que pode comprometer a precisão dos resultados (Sloop, 2019; Castro, 2020).

A calibração por padronização interna, é utilizada para minimizar os efeitos das flutuações dos sinais analíticos devido aos fatores relacionados a parâmetros instrumentais como: nebulização (para técnicas as quais é necessário), intensidade da fonte de radiação e posição da amostra (Carter, 2018; Barnett; Fassel; Kniseley, 1968), além de ser eficaz na minimização dos efeitos da matriz em amostras com matrizes menos complexas (Carter, 2018; Machado, 2020). Quando o padrão interno não é eficiente o suficiente para corrigir efeitos severos da matriz, o método de calibração com adição de analito é a alternativa mais utilizada (Bader, 1980; Kelly, 2011).

A calibração com adição de analito envolve o preparo de soluções padrão diretamente na amostra. Alíquotas da amostra são retiradas, adicionadas com quantidades crescentes do analito de interesse, e essas soluções são analisadas no instrumento. Como as soluções padrão de calibração são preparadas na própria matriz da amostra, elas garantem que o comportamento da amostra e da calibração seja o mesmo. A concentração do analito na amostra original é

determinada por extrapolação do gráfico, onde a concentração é obtida ao resolver a interceptação no eixo x (com $y = 0$ no modelo de regressão linear). Embora a calibração por adição de analito seja eficaz para amostras com efeitos severos de matriz (Brown, 2012), o método tem limitações, especialmente no que se refere frequência analítica, já que cada amostra requer a sua própria curva de calibração, o que implica em alto consumo de soluções padrão e amostras, gerando consideráveis quantidades de resíduos.

Devido as limitações das técnicas de calibração por padrão externo, padronização interna e adição de analito, estratégias de calibração não convencionais foram desenvolvidas, como: calibração por método padrão de interferência, calibração multienergética, calibração multiisótopo, calibração multiespécies e calibração por diluição de padrão. O método padrão de interferência explora a característica das técnicas baseadas em ICP, de formação de espécies naturais em um plasma de Ar. Nesta estratégia, objetiva-se corrigir variações no sinal interferente, permitindo minimizar os desvios causados por íons e espécies poliatômicas naturalmente presentes no plasma, através da razão de sinal entre o analito e as espécies interferentes durante a calibração (Donati; Amais; Nóbrega, 2011), corrigindo assim interferências espectrais.

A calibração multienergética aproveita a capacidade dos analitos gerarem sinais analíticos em múltiplos comprimentos de onda diferentes. Neste método, utiliza-se uma concentração fixa de analito e múltiplas energias de transição (Virgilio, 2017), sendo preparadas, para cada amostra, duas soluções. A primeira solução, contendo amostra e solução padrão com analitos, e a segunda contendo amostra e branco analítico. Analisa-se cada solução separadamente, e monitora-se os sinais de vários comprimentos de onda para cada analito. Os sinais obtidos para os analitos na primeira solução e na segunda solução, são então plotados nos eixos x e y, respectivamente, e a concentração de analito na amostra é calculada a partir da inclinação da curva de calibração resultante (Virgilio, 2017). A calibração multienegética tem se mostrado uma boa alternativa quando se analisa amostras complexas (Virgilio, 2017; Machado, 2018).

As estratégias de calibração multiisótopo e calibração multiespécies se baseiam na capacidade de monitoração simultânea ou sequenciais rápidas das técnicas espectrométricas (Carter, 2018). Como na calibração multienergética, os gráficos de calibração são construídos com os sinais medidos para duas soluções, e cada ponto corresponde a um isótopo diferente (calibração multiisótopo) ou íon molecular (calibração multiespécies) do mesmo analito.

Outra estratégia de calibração não convencional é a calibração por método de análise de diluição padrão, proposta por Jones, 2015. Trata-se de um método que integra as teorias de calibração por adição de analito e por padronização interna. Nesta estratégia, os dados são obtidos a partir de uma mistura composta por 50% de amostra e 50% de uma solução padrão contendo os analitos e um padrão interno (Solução 1). Com o detector registrando continuamente os sinais analíticos, uma segunda mistura, composta por 50% de amostra e 50% de branco (Solução 2), é adicionada ao mesmo recipiente da Solução 1. À medida que as duas soluções se misturam, vários pontos de calibração são gerados enquanto as soluções padrão contendo analitos e padrão interno vão ficando progressivamente diluídas. Como ambas as soluções (Solução 1 e Solução 2) contêm a mesma quantidade de amostra, não há alteração na composição da matriz durante a mistura, o que elimina os efeitos de matriz.

Esta metodologia apresenta limitações, relacionadas a automação e o processamento de dados relativamente complexo (Sloop, 2019; Jones, 2020). Para superar essa limitação, se é incorporado uma segunda espécie de padrão interno na Solução 2, e são utilizadas uma câmara de mistura de 3 portas ou uma válvula de comutação, para automatizar a mistura das soluções 1 e 2. Afim de simplificar ainda mais esta metodologia, uma outra estratégia de calibração utilizando duas soluções, foi proposta por Sloop, 2021, a calibração de dois pontos por correspondência de matriz. Nesta estratégia, ao contrário do método de análise de diluição de padrão, não é necessário utilizar uma segunda espécie de padrão interno nem realizar a mistura das duas, e para empregá-la, a Equação 1 deve ser considerada (Sloop, 2021). Nesta equação, S_{std} e S_{IS} são o sinal analítico para o analito e a espécie padrão interna, respectivamente (ambos presentes em S1). O sinal analítico geral (SA) pode ser representado pela Equação 2, onde S_{am} é o sinal analítico da amostra. Reelaborando a Equação 1 e substituindo na Equação 2, outra equação pode ser escrita (Equação 3).

$$A = \frac{S_{std}}{S_{IS}} \quad \text{Equação 1}$$

$$SA = S_{std} + S_{am} \quad \text{Equação 2}$$

$$SA = AS_{IS} + S_{am} \quad \text{Equação 3}$$

Ao plotar SIS no eixo x e SA no eixo y, a inclinação (a) e a interceptação (b) desse gráfico, de acordo com a Equação 3, podem ser representadas pelas Equações 4 e 5 (Sloop, 2021; Jones, 2015). Essas equações podem ser combinadas na Equação 6.

$$a = A = \frac{S_{std}}{S_{IS}} \quad \text{Equação 4}$$

$$b = S_{am} \quad \text{Equação 5}$$

$$\frac{b}{a} = \frac{S_{am}}{\frac{S_{std}}{S_{IS}}} = S_{am} \times \frac{S_{IS}}{S_{std}} \quad \text{Equação 6}$$

Se S_{std} e S_{am} forem determinados como kC_{std} e kC_{am} , respectivamente, a Equação 6 pode ser reescrita na Equação 7, onde C_{std} e C_{am} representam a concentração do analito no padrão adicionado a S1 e na amostra, respectivamente, e k é uma constante de proporcionalidade (que é a mesma para amostra e padrão, pois eles existem na mesma matriz). A Equação 7 pode ser reorganizada na Equação 8.

$$\frac{b}{a} = \frac{SA_{sam}}{\frac{SA_{std}}{S_{IS}}} = kC_{am} \times \frac{S_{IS}}{kC_{std}} \quad \text{Equação 7}$$

$$C_{am} = \frac{b}{a} \times \frac{C_{std}}{S_{IS}} \quad \text{Equação 8}$$

em que C_{am} é a concentração do analito na amostra, b é o intercepto da equação analítica, a é a inclinação da equação analítica, C_{std} é a concentração do analito na solução padrão e S_{IS} é o sinal analítico do padrão interno em S1. Estudos anteriores usando o método de calibração de análise de diluição padrão (Jones, 2015; Jones, 2020), comprovam a relação linear entre o analito e os sinais do padrão interno, justificando o uso de sinais coletados das soluções S1 e S2 não misturadas para construir a curva de calibração (Sloop, 2021).

Apesar da possibilidade de análise direta, não destrutiva e multielementar, técnicas baseadas na emissão de raios-X (Ghidotti, 2021) aparecem com pouca ocorrência na determinação elementar em amostras de abelhas e produtos apícolas. Isso se deve, principalmente, a dificuldades relacionadas à etapa de calibração, a qual, para amostras sólidas, pode ser realizada utilizando material de referência certificado (CRM) como padrões de calibração (Sverchkov, 2023), o que aumenta o custo do método e não há CRMs disponíveis

com uma ampla faixa de concentração para todos os tipos de amostras, bem como pode ser realizada usando amostras previamente analisadas por método de referência como padrões de calibração (Oliveira, 2020), necessitando de um método de referência disponível, e gerando dificuldade na seleção de amostras com uma ampla faixa de concentração dos analitos. Ainda há alternativa de utilizar a calibração por adição de analito, porém este método consome mais tempo, reagentes e maior quantidade de amostras (Sloop, 2021).

1.4 Preparo de amostras de abelhas e produtos apícolas para análise por técnicas espectrométricas

Produtos apícolas são matrizes complexas, com composição química e proporções de espécies químicas orgânicas e inorgânicas variadas, devido a fatores relacionadas a origem e ao ambiente. Logo, o preparo de amostra é uma etapa indispensável para se obter amostras em condições passíveis de se realizar a determinação dos analitos (Zhong, 2022).

Dentre as estratégias de preparo de amostra para análise de abelhas e produtos apícolas, têm-se a decomposição por via seca e por via úmida. Mehmeti, 2021 descreveu um procedimento de digestão por via seca de amostra de mel, no qual 10 g de amostra foi utilizado para determinação de Cu, Cd, Pb e Zn por F AAS. Este processo foi descrito em três etapas de decomposição: aquecimento das amostras em bico de Bunsen, mineralização em forno mufla à 700 °C, resfriamento, diluição com HNO₃, aquecimento em bico de Bunsen novamente e diluição com água deionizada. A digestão por via seca, apresenta como vantagem a maior flexibilidade de massa de amostra utilizada, porém os procedimentos de mineralização demandam muito tempo de aquecimento no forno (Winiarska-Mieczan, 2021).

Na decomposição por via úmida, sistemas assistidos por radiação micro-ondas são descritos para amostras de abelha e produtos apícolas com mais frequência (Pereira, 2023; Zergui, 2023; Maraou, 2017; Astolfi, 2020; Richter, 2024; Ferreira, 2020; Valverde, 2023; Siqueira, 2022; Soós, 2021, Sadowska, 2021; Ćirić, 2021, Matuszewska, 2021, Oliveira, 2017; Şeker, 2022; Leme, 2014; Wetwitayaklung, 2018; Nikolov, 2019; Bora, 2023). Nestes métodos, se é utilizado um ácido mineral, normalmente HNO₃ e um agente oxidante auxiliar, normalmente H₂O₂, para decomposição de matéria orgânica, sendo a massa de amostra utilizada, normalmente, menor do que a utilizada para o método de digestão por via seca.

Dentre os parâmetros que podem ser otimizados nestes processos, estão; o tipo do ácido mineral utilizado, concentração dos reagentes e potência (ou temperatura) do equipamento.

Leme, 2014 estudou diferentes concentrações da solução de HNO_3 (2; 3,8; 8,0; 12,2 e 14,0 mol L^{-1}) e diferentes potências do forno de micro-ondas (500, 573, 750, 927 e 1000 W) na digestão de amostras de mel, a fim de minimizar a acidez final e o teor de carbono residual. Os autores, experimentalmente, observaram que quando as potências de 750, 927 e 1000 W foram utilizadas, a temperatura de 150 °C (estabelecida como temperatura máxima) foi atingida em todas as digestões, o que propiciou condições termodinâmicas favoráveis à oxidação da matéria orgânica, sendo as combinações de potência de 750 e 1000 W com concentração de ácido 2,0 mol L^{-1} as que geraram maiores sinais analíticos, e baixas concentrações carbono residual e acidez final.

Astolfi, 2020 por sua vez, estudou a digestão assistida por radiação microondas para cera de abelha, mel, pólen, própolis e geleia real, variando os reagentes utilizados no procedimento. Primeiro utilizou-se HNO_3 a 67% m m⁻¹, H_2O_2 a 30% m m⁻¹ e água deionizada, depois adicionou mais H_2O_2 a 30% m m⁻¹ e água régia, e, por fim, 40% HF e água régia. Os autores, concluíram que cada elemento de uma dada matriz responde de forma diferente aos procedimentos de tratamento da amostra. O método com apenas HNO_3 e H_2O_2 apresentou precisão aceitável para todos os elementos analisados e baixos níveis de detecção para oligoelementos incluindo Pb, porém para se ter níveis totais de recuperação de alguns elementos (Ba, P e Ti em cera de abelha; Al e Ba em mel; Al, B, Ba, Cr, Cu, Fe, Na, S, Si e Ti no pólen; Al, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Li, Mg, Si, Sn, Ti, V, Zn, e Zr na própolis; Na e P na geleia real) foi necessário o emprego de água régia. Assim, nota-se que diferentes abordagens, em termos de reagentes, podem ser consideradas para digerir matrizes similares e determinar os mesmos analitos.

Ainda, utilizando radiação de micro-ondas, Costa, 2015 e Cauduro, 2024 propuseram sistemas baseados em combustão para decomposição de matéria orgânica. Costa, 2015, misturou as amostras de mel com celulose microcristalina e solução de 6 mol L^{-1} de nitrato de amônio. Essa mistura foi selada com filme de polietileno e colocada junto com um disco de papel de filtro na base de um suporte de quartzo contendo 6 mL de nitrato de amônio. O sistema foi pressurizado com 20 bar de oxigênio e um programa de aquecimento por microondas (1400 W por 50 s, 0 W por 3 min, 1400 W por 5 min e 0 W por 20 min para resfriamento) foi aplicado, sendo as amostras diluídas após o processo.

Este método foi utilizado para determinação de Br e I por ICP-MS, e se mostrou capaz de decompor até 1000 mg de amostra, permitindo a determinação de elementos em níveis

ultra-raços. Este fato está diretamente relacionado ao uso de celulose microcristalina como auxiliar de combustão, pois somente utilizando a celulose foi possível controlar o processo de combustão e evitar a projeção da amostra durante o procedimento. Cauduro, 2024 utilizou o procedimento proposto por Costa, 2015, porém substituiu o reagente absorvente (nitrato de amônio) por HNO_3 . O método foi eficiente na decomposição de mel e determinação de As, Cd, Hg e Pb por ICP-MS, permitindo o uso de uma alta massa de amostra (0,8 g de mel) e obtendo-se uma concentração residual de carbono desprezível ($< 25,0 \text{ mg L}^{-1}$).

Sistemas abertos de decomposição por via úmida, também, são reportados para digestão de amostras de derivados apícolas. Astolfi, 2020 além de descrever um processo de digestão assistida por micro-ondas, ainda, apresenta uma digestão assistida por banho maria em recipiente aberto para cera de abelha, mel, pólen, própolis e geleia real. Nesse processo, foi usada uma massa de 0,2 g de amostra, 1 mL de HNO_3 concentrado e 0,5 mL 30% m m⁻¹ de H_2O_2 . A mistura foi aquecida a $95 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ em banho maria por 30 min. Este método se apresentou como uma boa alternativa em comparação à digestão ácida assistida por micro-ondas, com precisão aceitável e baixos limites de detecção para elementos traços.

Recipientes abertos e aquecidos em placa de aquecimento foram utilizados como sistemas abertos de decomposição por via úmida para amostras de produtos apícolas e determinação por AAS (Daşbaşı, 2016; Yavuz, 2018) e ICP OES (Altundag, 2016; Tasic, 2017). Nestes procedimentos, se é misturado a amostra com HNO_3 e H_2O_2 , e a mistura é levada para aquecimento até completa evaporação dos reagentes (em temperaturas que variam de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ à $150 \text{ }^\circ\text{C}$). Tasic, 2017, Daşbaşı, 2016 e Yavuz, 2018 descrevem procedimentos que utilizam de 20, 20 e 30 mL de HNO_3 e 1,0; 2,0 e 4,0 mL de H_2O_2 , respectivamente. Assim, mesmo o procedimento em placa de aquecimento com recipientes abertos ser um processo simples, altos volumes de reagentes oxidantes são utilizados. Ainda, Daşbaşı, 2016 e Yavuz, 2018 após digestão de amostras de mel, aplicaram um método de extração dispersiva em fase sólida para pré-concentração de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb e Zn, e Cu, respectivamente, e determinação por F AAS, dado que esta técnica não apresenta sensibilidade suficiente para determinação deste elemento, o qual aparece em baixos níveis em amostras de mel.

Outros sistemas de decomposição por via úmida descritos na literatura são; bloco digestor com recipientes abertos para determinação com ICP-MS (Leme, 2014) e bloco digestor de dedo frio e sistema de refluxo para determinação por ICP OES (Oliveira, 2019). Neste procedimento, Leme, 2014, dilui as amostras de mel em 4,0 mL de HNO_3 nas concentrações de

2; 3,8; 8,0; 12,2 e 14,0 mol L⁻¹, deixando-a em recipiente fechado por 8 horas. Depois adicionou-se 1,0 mL de H₂O₂ (30% m m⁻¹), deixando a mistura em pré-digestão durante a noite e aquecendo-a em bloco digestor à 90 °C por 3 h. Para este procedimento, os autores concluíram que quando o teor de carbono residual era baixo, a acidez era muito elevada e vice-versa, já que a maior concentração de ácido apresenta maior poder oxidante, oxidando mais facilmente as espécies químicas, o que reduz o teor de carbono residual. Já Oliveira, 2019 avaliou o perfil mineral em termos de elementos essenciais e potencialmente tóxicos (As, B, Ca, Cd, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Se, Sr e Zn) em amostras de mel. O procedimento consistiu em uma massa de aproximadamente 0,5g de amostra digerida com 1,6 mL de HNO₃ concentrado e 0,64 mL de 30% m m⁻¹ H₂O₂ durante 46 minutos por 150°C. Os autores concluíram que este método foi satisfatório na digestão das amostras de méis.

Em análises de produtos apícolas por técnicas que permitem análise direta: DMA (Girolametti, 2023), CV AAS (Advanced Mercury Analyzer) (Demková, 2024) e EDXRF (Ghidotti, 2021), as amostras mel foram adicionadas diretamente nos suportes e levadas para análise, e amostras de abelhas e polén foram secadas e homogeneizadas antes de serem levadas para os equipamentos.

1.5 Diferentes estratégias no preparo de amostras de produtos apícolas

Como uma alternativa a combustão induzida por micro-ondas, Muller, 2017 utilizou a metodologia de digestão úmida assistida por micro-ondas com H₂O₂ em meio alcalino em câmara de reação única. Nesse processo, amostras de mel foram misturadas a 50% (m m⁻¹) H₂O₂ e 28% (m m⁻¹) NH₄OH e posicionadas dentro do sistema com uma única câmara de reação, previamente preenchido com água e H₂SO₄. O sistema foi pressurizado com 40 bar de argônio e foi aplicado o programa: 10 minutos de rampa e manutenção por 20 minutos a temperaturas variando de 190 a 270°C. As amostras foram diluídas e Cl foi determinado por ICP OES, e Br e I por ICP-MS. Os autores concluíram que o método proposto é mais simples que a combustão induzida por micro-ondas, apresentando menor risco de contaminação, já que são utilizados menos reagentes. Além disso, com este método há a produção de água como um dos produtos da digestão e o pH alcalino final minimiza os efeitos de memória durante a análise por técnicas baseadas em plasma. Entretanto, esse tipo de degradação de espécies orgânicas é realizado com o uso de instrumentação cara e específica (Magalhães, 2021).

Outras alternativas descritas na literatura estão os métodos que utilizam diluição das amostras e procedimentos de extração dos analitos. Nesse contexto, em análises de amostras de produtos apícolas, Pucholobek, 2022; Andrade, 2014a; Andrade, 2014b e Pucholobek, 2021 propuseram misturas de reagentes para dissolução de amostras de mel, e Pohl, 2020 propôs um método de extração assistida por ultrassom para amostras de pólen. No trabalho desenvolvido por Andrade, 2014b, é utilizado o processo descrito por de Andrade, 2014a, no qual foram preparadas suspensões de 70 g L⁻¹ de mel em solução de 0,1 mol L⁻¹ de HNO₃ e 3 % m m⁻¹ de H₂O₂ para Cd e Pb ou 10% m m⁻¹ H₂O₂ para Cr, sendo todas sonicadas por 10 min para garantir a homogeneização das soluções. Tais suspensões foram diretamente injetadas nos instrumentos de espectrometria de absorção atômica em forno de grafite (GF AAS) e os metais foram determinados com limites de quantificação em níveis de ng g⁻¹.

Pucholobek, 2021, por sua vez, apresentou três soluções diferentes para dissolução de mel e análise F AAS, sendo elas: apenas HNO₃ concentrado; HNO₃ concentrado e 30% m m⁻¹ H₂O₂, e apenas água. Os diferentes procedimentos foram avaliados a partir do percentual de extração obtido para Fe, Mn, Mg e Ca, e, assim, observou-se que as maiores taxas de extração foram para o método com HNO₃ e H₂O₂, com percentuais superiores a 80%. O processo otimizado foi reproduzido por Pucholobek, 2022; para determinar Fe, Mn, Mg e Ca em méis brasileiros por F AAS. Pohl, 2020 utilizou solução de HNO₃ com concentração entre 0,9 e 1,1 mol L⁻¹ e sonicação por 15 minutos. Os autores concluíram que este método permitiu, de maneira mais simples, rápida e verde do que métodos convencionais de digestão por via úmida, preparar pólen para análise por F AAS, com boa exatidão e precisão.

Em análise de produtos apícolas por técnicas baseadas em plasma, as alternativas se concentram nos métodos descritos por Farisi, 2023 e Gręda, 2024. No trabalho desenvolvido por Farisi, 2023, descreve-se um método de extração líquido-líquido homogênea combinado com a microextração líquido-líquido dispersiva utilizando um solvente eutético profundo para a extração de Co, Zn, Ni, Cu, Pb e Tl de amostras determinar as concentrações dos analitos em nível de ng g⁻¹ em amostras de mel. Por outro lado, Gręda, 2024 propôs a determinação de 18 elementos apenas diluindo mel a 1% em solução de 0,1 mol L⁻¹ HNO₃ por ICP-MS. Neste procedimento foi utilizado a calibração com padrão interno (Be, Y e Eu) para corrigir os efeitos da matriz, e este tipo de análise ofereceu, em média, limites de detecção dos elementos três vezes mais baixos do que os obtidos em amostras digeridas por micro-ondas.

1.6 Solventes eutéticos profundo naturais e processos avançados de ativação de persulfato para análise de alimentos

As estratégias usuais de preparo de amostras de alimentos, incluem as técnicas de digestão por via seca, as quais utilizam um excesso de quatro a dez vezes de reagentes oxidantes: hidróxidos, carbonatos ou boratos alcalinos de metal, como metaborato de lítio, nitrato e óxido de magnésio, e as técnicas de decomposição por via úmida com uso de agentes oxidantes (normalmente, peróxido de hidrogênio) e ácidos minerais, ou mistura de ácidos minerais, como ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorídrico ou, ácido fluorídrico (Galuszka, 2023). Estas estratégias podem ser demoradas, bem como requerem grandes quantidades de reagentes, os quais são caros, podem contaminar a amostra, sendo fonte de erros experimentais, e geram resíduos perigosos (Viana, 2021).

Considerando que o preparo de amostras representa uma possível fonte de impacto negativo ao meio ambiente, aspectos relacionados à segurança do operador e ao impacto ambiental e humano gerados pelos métodos, devem ser avaliados (Armenta, 2008). Nessas circunstâncias, surge a química analítica verde (GAC) e a química analítica branca (WAC). A GAC baseia-se em 12 principais princípios, descritos por Gałuszka et al., 2013, que enfatizam a necessidade de solventes mais seguros e menos tóxicos, redução do consumo de energia e utilização de substâncias baseadas em fontes renováveis (Plotka-Wasyłka, 2021). A WAC, por sua vez, pressupõe que o desenvolvimento sustentável deve incluir um compromisso entre sustentabilidade e utilidade, ou seja, um bom equilíbrio entre os princípios da GAC, eficiência analítica e critérios práticos/econômicos (Nowak, 2021).

O uso inadequado de solventes é uma das preocupações do desenvolvimento sustentável baseado na GAC e na WAC, já que representa uma possibilidade de perda de massa e contaminação advinda de sínteses (Sahoo, 2020) e procedimentos de extração (Zhu, 2016; Farajzadeh, 2018), logo busca-se a utilização de solventes mais verdes (Devi, 2020). A fim de atingir este objetivo, duas estratégias são comumente adotadas: a substituição de solventes derivados do petróleo por solventes advindos de recursos renováveis (Hu, 2021; Pasupuleti, 2022) e a substituição de solventes tóxicos pelo que apresentam melhores propriedades ambientais, de saúde e de segurança (Moaaz, 2021; Jesus, 2022).

Neste sentido, foram desenvolvidos os solventes eutéticos profundos (DES) (Abbott, 2003), os quais são misturas homogêneas de duas ou mais substâncias sólidas à temperatura ambiente, mas que quando combinadas em proporções fixadas, mudam para líquido à

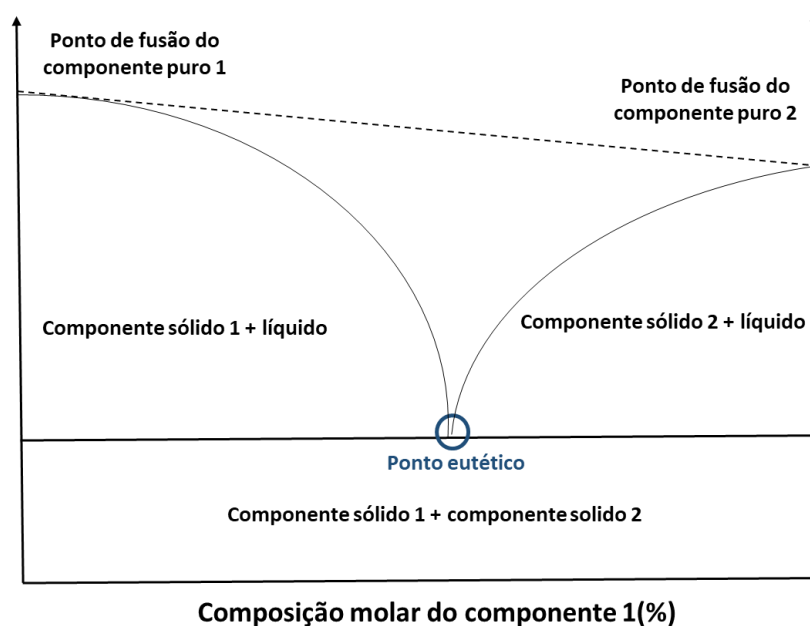
temperatura ambiente, por conta do abaixamento na temperatura de fusão, gerando um ponto eutético (Surya, 2024). Os DES podem ser facilmente sintetizados pela mistura de dois componentes: os aceitadores de ligações de hidrogênio (HBA), como sais de haleto de amônio quaternário e sais de haleto de fosfônio, e os doadores de ligações de hidrogênio (HBD), como ácidos carboxílicos, álcoois e amidas que se associam através da interação de ligações de hidrogênio e outras interações intermoleculares, como van der Waals e forças eletrostáticas (Sekharan, 2021). Tais solventes são amplamente empregados em procedimentos de preparo de amostra para determinação de metais por técnicas espectrométricas como: FAAS (Habla, 2022; Kiliç, 2023), GFAAS (Chaikhan, 2023; Ahmadi-Jouibari, 2023), ICP OES (Shisov, 2021; Zhao, 2023), ICP-MS (Santana, 2020; Niciejewska, 2022) e XRF (Shishov, 2023).

Quando compostos naturais são utilizados como precursores do DES, eles são chamados de solventes eutéticos profundos naturais (NADES), assim, os NADES são misturas formadas por constituintes celulares como açúcares, álcoois, aminoácidos, ácidos orgânicos e derivados de colina (Dai, 2013). Primeiramente descritos por Choi, 2011, estes tipos de solvente representam plenamente os princípios da GAC e WAC, justamente por apresentar componentes prontamente disponíveis, preparação simples, biodegradabilidade, segurança, reutilização e baixo custo, sendo assim um ótimo candidato a aplicações em química analítica (Frnández, 2018; Ferreira, 2022).

Os NADES apresentam uma forte contribuição das ligações de hidrogênio (Osowska, 2019), apresentando-se como uma mistura líquida binária em sua composição eutética, na qual o ponto de fusão mínimo é considerado baixo (Figura 3), o que ocorre por conta à baixa energia da rede causada pela assimetria das suas grandes moléculas (Lai, 2023). Os NADES têm uma variedade de propriedades, como baixa volatilidade, viscosidade ajustável e miscibilidade em água (Silva, 2022), mas o maior potencial do NADES é a sua aplicação como solventes de design, ou seja, como um sistema cujas propriedades podem ser adaptadas de acordo com a aplicação (Kovács, 2020).

No NADES, a rede de ligações de hidrogênio define em grande parte o seu comportamento, logo as propriedades físico-químicas, como comportamento de fase, densidade, viscosidade, condutividade, tensão superficial e polaridade, podem ser alteradas mudando-se os componentes e a sua proporção molar, o que garante um grande número de possíveis aplicações, dada a grande variedade de possíveis compostos formadores de NADES.

Figura 3. Diagrama de fases dos NADES com ponto eutético



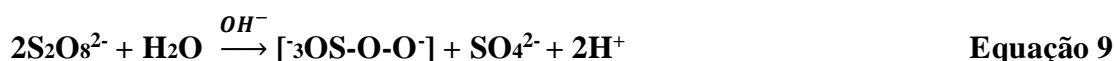
Fonte: autoria própria

Levando em conta as propriedades dos NADESs e a possibilidade de alterá-las, estes solventes podem ser considerados eficazes para a dissolução e extração de uma ampla gama de compostos polares, apolares, bem como extração de metais (Silva, 2022). Por mais que ainda não tenha sido tão explorado em preparo de amostra como o DES, a utilização de NADES em procedimentos analíticos é uma área em crescimento.

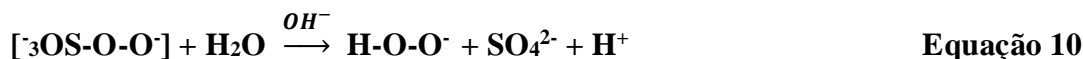
Em análises de amostras de produtos apícolas tem-se dois trabalhos utilizando solventes eutéticos profundos. Farisi, 2023, utilizou um NADES (cloreto de colina: mentol: p-aminofenol) como um solvente extrator em um procedimento de extração líquido-líquido homogênea combinado com a microextração líquido-líquido dispersiva para a extração de Co, Zn, Ni, Cu, Pb e Tl de amostras de mel. Já Altunay, 2019, procedeu um procedimento de digestão assistida por banho maria à 50-55 °C. Após esse processo, utilizou o método de microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom para utilizando um NADES (ácido cítrico: sacarose) para pré-concentração de Cu, Cd and Pb em amostras de mel e análise por F AAS, considerando que a técnica apresenta limite de detecção insuficiente para determinar elementos em níveis traço.

Uma outra alternativa para o preparo de amostras de alimento é a utilização de sais de persulfato, o qual apresenta propriedades oxidantes e pode atuar na decomposição de matéria orgânica. Este reagente tem potencial redox semelhante (2,5–3,1 eV) e meia-vida mais longa em comparação com $\bullet\text{OH}$ (Xu, 2020), estabilidade em água e menor energia de ligação para clivagem do grupo peroxo (Kordestani, 2019; Khakyzadeh, 2020). O persulfato pode ser clivado usando processos de oxidação avançada baseados em radicais sulfato (SR-AOPs) que produzem um radical sulfato reativo ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-} + \text{ativador} \rightarrow 2\text{SO}_4^{\bullet-}$ ou $\text{SO}_4^{\bullet-} + \text{SO}_4^{2-}$) por meio de calor, reações com metais de transição, luz ultravioleta e outros meios, como eletroquímica e ultrassonicação (Matzek, 2016).

A ativação do persulfato por base é realizada utilizando bases fortes, hidróxido de sódio ou potássio, os quais possibilitam a hidrólise de uma molécula de persulfato, formando o intermediário hidroperóxido (HO_2^-), que reage com outra espécie de persulfato em uma transferência de um elétron gerando um radical sulfato, que, por sua vez, gera radicais hidroxila reagindo com íons hidroxila (Kovács, 2020). O mecanismo de ativação do persulfato por base foi proposto por Furman, 2010 e consiste, primeiramente, na hidrólise catalisada por base do persulfato para formação do peroxomonossulfato (SO_5^{2-}) e sulfato (SO_4^{2-}), como representado na equação 9.



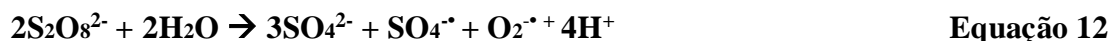
Após a primeira etapa, o persulfato forma um complexo ativado com o hidróxido e a ligação S-O é enfraquecida. Como resultado, a ligação S-O sofre fissão. Uma fissão semelhante da ligação S-O restante no peroxomonossulfato resulta na formação de sulfato e hidroperóxido (HO_2^-), a base conjugada do peróxido de hidrogênio, segundo equação 10.



Ainda, neste mecanismo o hidroperóxido formado reduz outra molécula de persulfato, gerando radical sulfato ($\text{SO}_4^{\bullet-}$) e ânion sulfato, enquanto o hidroperóxido é oxidado a superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), como representado na equação 11.



A soma das reações produz a seguinte reação líquida para ativação de persulfato sob condições básicas (Equação 12):



Além disso, em condições altamente alcalinas, o radical sulfato reage com o hidróxido para formar a radical hidroxila (OH^{\bullet}), segundo a equação 13.



A ativação do persulfato também pode ser realizada usando um íon de metal de transição por meio de uma reação de transferência de um elétron (Kovács, 2020). Os sais de ferro são amplamente utilizados neste tipo de abordagem devido ao baixo preço e alta eficiência catalítica (Karim, 2021). O íon de ferro (II) reage com o persulfato produzindo SO_4^{2-} e $\text{SO}_4^{\bullet-}$, logo possibilitando a formação do radical sulfato através da equação 14 (Oh, 2009).



Outra maneira de realizar a ativação do sulfato é através de sonicação, calor ou luz UV. No mecanismo da reação com sonicação, o persulfato forma dois radicais sulfato através da cisão da ligação peróxido, uma vez que com a ultrassonicação são produzidas altas temperaturas e pressões localizadas, resultando em cavitação e homólise da ligação O-O (Kovács, 2020) como é mostrado na equação 15, onde)) significa irradiação ultrassônica.



Neste sentido, técnicas analíticas que utilizam reações baseadas na formação de radicais sulfato reativos podem ser propostas para reduzir as etapas de preparo de amostras, consequentemente, o tempo de análise e mitigar a geração de resíduos perigosos, o que faz com que métodos utilizando essa estratégia esteja mais próximo dos princípios destacados pelas GAC e WAC. Reações baseadas na formação de radicais sulfato reativos ainda não foram abordadas em análises de amostras de produtos apícolas.

Uma das abordagens da GAC é a avaliação do quão “verdes” são os métodos analíticos, o que possibilita a seleção da opção mais verde (Tobiszewski, 2015). Assim, inúmeras métricas para avaliar se o procedimento químico se enquadra melhor no conceito de química analítica verde ou sustentável foram desenvolvidas, levando em consideração parâmetros relacionados

ao tipo e volume de reagentes, geração de resíduos, número de etapas do procedimento, miniaturização e automação e consumo de energia (Pena-Pereira, 2020).

Como exemplo de métricas, tem-se: consumo elétrico (Ec) e emissão de CO₂ (Kusuma, 2019), Chemical Hazard Evaluation for Management Strategies (CHEMS-1) (Kang, 2022), National Environmental Methods Index (NEMI) (Ferreira, 2022), Analytical Eco-scale (Chandrasekaram, 2022), Green Analytical Procedure Index (GAPI) (Azooz, 2023), HEXAGON (Ballester-Caudet, 2019), Analytical Greenness Calculator (AGREE) e AGREEprep (Dominik, 2024), Blue Applicability Grade Index (BAGI) (Manousi, 2014) e RGB 12 algorithm (Angyus, 2023). Este último leva em consideração os princípios da WAC.

Neste contexto, levando em conta que as abelhas e derivados apícolas podem apresentar diferentes concentrações de espécie químicas potencialmente tóxicas, a avaliação de contaminantes inorgânicos em amostras de abelhas torna-se relevante, pois oferece um monitoramento que gera uma resposta crucial tanto no contexto econômico quanto, principalmente, na saúde pública. Diversas técnicas espectrométricas são exploradas na determinação de elementos em análises de amostras de abelhas e produtos apícolas, sendo o preparo de amostras por decomposição úmida com ácido mineral, o tipo de estratégia mais utilizado. Alguns métodos de preparo de amostra são utilizados, porém pouco são explorados métodos que levam em conta os princípios sustentáveis da GAC e WAC. Dessa forma, no presente trabalho, objetiva-se o desenvolvimento de procedimentos analíticos baseados nos princípios da GAC e WAC para determinação elementar por técnicas espectrométricas, utilizando um solvente eutético profundo natural (NADES) no preparo de uma suspensão de amostra de pólen de abelha, para posterior determinação por fluorescência de raios-X por energia dispersiva (EDXRF), e utilizando reações de ativação de persulfato para decomposição de amostras de mel com subsequente determinação por ICP OES.

CAPÍTULO II

***MÉTODO ANALÍTICO VERDE USANDO
SOLVENTE EUTÉTICO PROFUNDO
NATURAL PARA PREPARO DE AMOSTRAS
DE PÓLEN DE ABELHA PARA
DETERMINAÇÃO MULTIELEMENTAR POR
ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA
DE RAIOS X POR ENERGIA DISPERSIVA***

2.1 Introdução

A contaminação causada pela deposição e aumento da concentração de elementos tóxicos é um dos maiores problemas relacionados à poluição do solo, da água e do ar, que pode ter origem em fontes naturais ou antropogênicas, como atividades industriais e agrícolas (Lishchuk, 2023; Atanasov, 2023). A poluição ambiental também tem impacto nos alimentos, levando ao acúmulo de elementos potencialmente tóxicos nas plantas. Dependendo da forma química ou concentração, esses elementos podem ter efeitos nocivos à saúde humana, causando diferentes doenças (Hassona, 2023). Além disso, plantas contaminadas podem ser vetores de contaminação indireta por meio do impacto sobre alguns polinizadores, como as abelhas, e consequentemente sobre os produtos derivados das abelhas, como néctar, mel e pólen (Atanasov, 2023).

O pólen é um produto natural granular produzido por plantas, tanto gimnospermas quanto angiospermas, para fins reprodutivos (Pacini, 2020). As abelhas, por sua vez, coletam pólen das flores e o transportam para as colmeias para armazená-lo e misturá-lo com enzimas, mel ou secreção salivar e néctar (Fuente-Ballesteros, 2023). Este pólen pode ser colhido das colmeias, produzindo pólen apícola. Estima-se que a produção global de pólen apícola seja de cerca de 1.500 toneladas, consumido como ingrediente alimentar ou suplemento dietético (Sipos, 2020). Este produto contém proteínas (5–60%), açúcares redutores e não redutores (13–55%), lipídios (4–7%), fibras brutas (0,3–20%), aminoácidos, além de ser importante fonte de vitaminas, compostos fenólicos bioativos e micronutrientes essenciais, como minerais (Fuente-Ballesteros, 2023; Sipos, 2020).

Técnicas espectrométricas são comumente utilizadas na determinação de metais e metaloides em amostras de alimentos e ambientais. A espectrometria de absorção atômica com chama (F AAS) é uma técnica de baixo custo que pode ser utilizada para esse propósito, no entanto, as determinações são geralmente para um único elemento e têm baixa sensibilidade (Kilinç, 2024; Elik, 2024). A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) é uma técnica mais sensível que a F AAS permitindo análise direta de amostras de alimentos, no entanto, geralmente tem um sistema para determinação de um único elemento e custos operacionais mais elevados (Chaikhan, 2023; de la Calle, 2016). Para determinações multielementar, a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) tem sido utilizada em análises de alimentos (Dado, 2023; Valverde, 2023), mas a possibilidade de interferências químicas e espectrais deve ser considerada. A espectrometria de

massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) também permite a determinação multielementar com baixos limites de detecção em amostras de alimentos, mas é uma técnica dispendiosa que apresenta efeitos de matriz devido à presença frequente de íons poliatômicos com a mesma massa nominal do analito (Escudero, 2022; Şeker, 2022).

A espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de energia (EDXRF) é uma técnica amplamente utilizada para determinação de elementos químicos em níveis de traços, oferecendo vantagens como a possibilidade de determinação multielementar e simultânea de forma não destrutiva, por meio de análise direta de amostras sólidas ou com preparação mínima (Guimarães, 2023; Souza, 2021). Apesar das vantagens da análise direta de amostras sólidas, como a minimização dos riscos de contaminação e perdas do analito, há dificuldades relacionadas a baixa sensibilidade da técnica e à etapa de calibração.

A calibração externa para medições analíticas diretamente em amostras sólidas pode ser realizada usando material de referência certificado (CRM) como padrões de calibração (Xue, 2022; Sverchkov, 2023). Apesar de sua simplicidade, esse procedimento aumenta o custo do método, e não há CRMs disponíveis com uma ampla faixa de concentração para todos os tipos de amostras. A calibração externa para determinação de EDXRF também pode ser feita usando amostras previamente analisadas por um método de referência para serem utilizadas como padrões de calibração (Oliveira, 2020). Nesse caso, além da necessidade de um método de referência estar disponível, pode haver dificuldade em selecionar amostras com uma ampla faixa de concentração para os analitos. Mesmo consumindo mais tempo, reagentes e quantidade de amostras, uma alternativa à calibração externa é a calibração por adição de analito (Milnea, 2010). No entanto, empregar a calibração por adição de analito quando se faz medições em amostras sólidas não é uma tarefa fácil, considerando a dificuldade de mistura e homogeneização entre amostra e padrão.

Uma maneira de superar a dificuldade de preparar padrões usando amostras sólidas com baixa solubilidade em meios aquosos é preparar uma suspensão de uma amostra sólida em pó e a solução padrão do analito, desde que a estabilidade e a homogeneidade sejam garantidas (Cerqueira, 2023; Alov, 2018; Gomez-Nieto, 2022). A estratégia de preparação de amostras usando suspensões com amostras sólidas pode ser explorada para medidas de fluorescência de raios X (Marguí, 2022; De La Calle, 2013). Diferentes tipos de preparo de suspensões foram descritos para esta finalidade usando soluções aquosas na presença de ácidos, solventes e surfactantes (García-Florentino, 2018; Takahashi, 2019; Chubarov, 2023; Milnea, 2010). No

entanto, o uso de solvente eutético profundo natural (NADES) para preparar uma suspensão de amostra e padrões para construir curvas de calibração por um método de calibração de dois pontos de correspondência de matriz ainda não foi descrito na literatura.

Recentemente, os NADES surgiram como opções menos agressivas ao meio ambiente em comparação aos solventes convencionais (Silva, 2022). Eles são caracterizados como combinações de compostos naturais como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e bases orgânicas (Vanda, 2018). A combinação dessas substâncias forma uma mistura eutética por meio de fortes interações secundárias, promovendo uma rede intermolecular de ligações de hidrogênio, acompanhada de deslocalização de carga no sistema, estabilizando o estado líquido da mistura em temperaturas mais baixas e diminuindo o ponto de fusão (Kovács, 2022). Os NADES apresentam propriedades como baixa volatilidade, viscosidade ajustável, miscibilidade em água e biodegradabilidade.

Neste capítulo, o uso de NADES é proposto para a preparação de uma suspensão de amostra de pólen de abelha para a determinação multielementar de Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd. Após a amostragem da suspensão na célula de medição do EDXRF, o filme fino e homogêneo formado provou ser um substrato adequado para a realização das medições. Para obter medições precisas e exatas, as estratégias de adição de analito e adição de padrão interno foram combinadas, explorando a calibração de dois pontos de dois pontos de correspondência de matriz.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Equipamentos

Os analitos foram determinados usando um espectrômetro de fluorescência de raios X por dispersão de energia (S2 Ranger, Bruker, Billerica, MA, EUA) com um tubo de raios X alvo de paládio. Um disco de cobre (diâmetro de 40 mm) foi usado para calibrar o equipamento. Após preparar a suspensão da amostra, uma alíquota dela foi colocada no centro de uma célula de copo de polietileno selada (diâmetro de 10 mm) com filme Mylar® para medições. Foram utilizadas condições instrumentais padrão do equipamento da seguinte forma: tempo de irradiação, 100 s; tensão do tubo, 40 kV (para Ca, Zn, Ni, Co, Fe, Ga, Y, Ge e Se) e 50 kV (para In e Cd); corrente do tubo, 2 mA; e sob atmosfera de vácuo. As linhas analíticas utilizadas foram: Ca 3,69 keV ($K\alpha$), Fe 6,40 keV ($K\alpha$), Co 6,93 keV ($K\alpha$), Ni 7,48 keV ($K\alpha$), Zn 8,64

keV ($K\alpha$), Cd 23,17 keV ($K\alpha$), Y 14,96 keV ($K\alpha$), Ga 9,25 keV ($K\alpha$), Ge 9,89 keV ($K\alpha$), Se 11,22 keV ($K\alpha$) e In 24,21 keV ($K\alpha$).

Para fins de comparação, amostras de pólen de abelha foram digeridas usando um forno de micro-ondas Multiwave PRO (Anton Paar GmbH, Graz, Áustria), seguido pela determinação dos analitos por ICP OES, usando um espectrômetro de visão axial e radial (iCAPPRO10928, Thermo Scientific), com potência de medição de 1250 W, um gerador de radiofrequência de 27 MHz, detector de dispositivo de injeção de carga (CID), diâmetro do tubo da tocha central de 2,0 mm, faixa de comprimento de onda entre 167 e 852 nm, tempo de medição de 5 s, câmara de nebulização ciclônica, nebulizador concêntrico, fluxo de gás auxiliar de 0,5 L min⁻¹, fluxo de gás de plasma de 13,5 L min⁻¹ e fluxo de gás de nebulização de 0,5 L min⁻¹. As linhas de emissão empregadas foram: Ca (315,887 nm), Cd (226,502 nm), Co (230,786 nm), Fe (259,940 nm), Ni (216,555 nm) e Zn (202,548 nm).

As amostras de pólen de abelha foram moídas usando um moinho de bolas planetário, modelo PM 100 (Retsch, Düsseldorf, Alemanha) com uma velocidade máxima de 650 rpm e tamanho de alimentação de até 10 mm e finura final de 0,1 μ m. As massas foram medidas em uma balança analítica (modelo TE214 S, Sartorius, Göttingen, Alemanha) com uma precisão de $\pm 0,1$ mg. Um agitador magnético com aquecimento, C-MAG HS 7 (IKA, Alemanha), foi usado na síntese de NADES. Os experimentos foram conduzidos em tubos de centrífuga cônicos com capacidade interna de 15 mL. Um banho ultrassônico (Cristofoli, Campo Mourão, Brasil) foi usado para sonicação da amostra. Um espectrofotômetro UV-2450 (Shimadzu, Japão) foi utilizado para análise turbidimétrica das suspensões e um viscosímetro SVM 3000 (Anton Paar, Áustria) foi usado para obter a viscosidade dos solventes.

2.2.2 Reagentes, soluções e amostras

Todos os reagentes químicos utilizados nos experimentos foram de grau analítico. A água utilizada foi ultrapura, com resistividade específica maior que 18 M Ω cm, obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q® (Millipore, Bedford, EUA). Vidrarias e garrafas foram imersas em uma solução de ácido nítrico a 10% (v v⁻¹) (Merck, Darmstadt, Alemanha) por pelo menos 24 h e enxaguadas com água ultrapura antes do uso. Soluções de trabalho padrão multielementares com concentração de 1,0 mg L⁻¹ para Ca (II), Fe (III), Co (II), Ni (II), Zn (II) e Cd (II) e 50 mg L⁻¹ para Y (III), Ga (III), Ge (II), In (III) e Se (IV) foram preparadas diluindo soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ (Specsol Quimlab, Brasil) de cada elemento em água. Ácido

nítrico 65% ($v\ v^{-1}$) e peróxido de hidrogênio 30% ($v\ v^{-1}$) (ambos Merck, Darmstadt, Alemanha) foram usados no processo de digestão da amostra para comparação de métodos. Uma solução de 1% ($m\ v^{-1}$) de Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Alemanha) foi usada em testes para preparação da suspensão da amostra. Na preparação da solução de NADES, foram usados glicose PA (Synth, Brasil) e ácido láctico 85% (Synth, Brasil).

Três amostras diferentes de pólen de abelha foram compradas em supermercados na cidade de Salvador, Brasil, armazenadas em frascos de polietileno de alta densidade e mantidas refrigeradas a 4°C até a análise. Todas as amostras foram moídas em um moinho de bolas planetário a 200 rpm por 5 min e peneiradas em uma malha de náilon com tamanho de partícula de 15 μm . As bolas usadas para moer as amostras foram feitas de material de ágata, minimizando o risco de contaminação da amostra.

2.2.3 Procedimento para avaliação da homogeneidade da suspensão

A avaliação turbidimétrica das suspensões consistiu no preparo de uma suspensão de amostras de pólen com concentração de 10 $m\ v^{-1}$, utilizando diferentes solventes. Os solventes utilizados foram NADES LGH, solução 1% $m\ v^{-1}$ Triton X-100, e água. As suspensões preparadas foram submetidas à análise espectrofotométrica, para a medida da absorbância em modo cinético em comprimento de onda de 550 nm (Borque, 1999). O monitoramento foi realizado ao longo de 33 minutos, permitindo a obtenção de dados dinâmicos da variação da absorbância ao longo do tempo, fornecendo informações sobre as características de interação entre o pólen e os diferentes solventes em questão.

2.2.4 Síntese do NADES

O solvente eutético profundo natural sintetizado foi o NADES LGH (ácido láctico-glicose-água), conforme descrito em estudo anterior (Dai, 2013). Nesta preparação, ácido láctico, glicose e água, na proporção molar de 5:1:3, foram misturados e aquecidos sob agitação em temperaturas abaixo de 50°C até a formação de um líquido transparente.

2.2.5 Procedimento de digestão das amostras de pólen

Com o propósito de comparar os resultados da concentração de analito, as amostras de pólen de abelha foram digeridas e determinadas por ICP OES. Após as amostras serem moídas e peneiradas, aproximadamente 0,2 g de cada amostra de pólen de abelha foi pesada e

transferida para um recipiente de forno de micro-ondas. Em seguida, 3,0 mL de ácido nítrico concentrado, 1,5 mL de peróxido de hidrogênio e 5,5 mL de água deionizada foram adicionados a cada recipiente. As amostras foram digeridas usando o seguinte programa de temperatura: (I) aquecimento por 10 minutos até 200 °C, (II) manutenção a 200 °C por 15 minutos e (III) resfriamento a 55 °C por 30 minutos. A solução digerida foi transferida para um balão volumétrico, com o volume final ajustado para 20,0 mL com água. Posteriormente, as amostras foram analisadas para analitos por ICP OES (Valverde, 2023). Em cada procedimento de digestão, três brancos foram preparados usando apenas 3,0 mL de ácido nítrico, 1,5 mL de peróxido de hidrogênio e 5,5 mL de água deionizada.

2.2.6 Planejamento fatorial completo de dois níveis

Um planejamento fatorial completo de dois níveis com quatro fatores (2^4) foi empregado para obter um sistema que fornecesse os melhores sinais analíticos. Os seguintes fatores foram estudados: a razão entre a massa da amostra e o volume de NADES (% $m v^{-1}$), tempo de sonicação (min), volume da amostra colocada na célula de medição e concentração de NADES LGH. Dezenove experimentos foram realizados no âmbito do planejamento fatorial completo, e triplicatas de cada ponto experimental foram realizadas para calcular a variância. A resposta múltipla (RM) foi utilizada como uma resposta quimiométrica, e as intensidades de fluorescência normalizadas para cada analito (Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd) foram usadas para obter a RM. A RM foi calculada como mostrada na Equação 16:

$$RM = (AS_{Ca}/AS_{maxCa}) + AS_{Fe}/AS_{maxFe}) + (AS_{Co}/AS_{maxCo}) + (AS_{Ni}/AS_{maxNi}) + (AS_{Zn}/AS_{maxZn}) + (AS_{Cd}/AS_{maxCd})$$

Equação 16

na qual (AS_{Ca}) , (AS_{Fe}) , (AS_{Co}) , (AS_{Ni}) , (AS_{Zn}) e (AS_{Cd}) são os sinais analíticos obtidos para cada íon metálico em cada experimento do projeto de matriz gerado; e $(AS_{max,Ca})$, $(AS_{max,Fe})$, $(AS_{max,Co})$, $(AS_{max,Ni})$, $(AS_{max,Zn})$ e $(AS_{max,Cd})$ são os valores máximos de sinal analítico obtidos para cada íon metálico em cada experimento do projeto de matriz gerado para a aplicação da abordagem quimiométrica. O programa Statistica 6.0® (StatSoft, Inc., Tulsa, EUA) foi empregado para auxiliar na aplicação estatística.

2.2.7 Procedimento experimental

No preparo das amostras, 15 mg de cada amostra de pólen de abelha, 650 µL de NADES

e 350 μL de água foram misturados e sonificados por 10 min. Após a sonicação, uma alíquota de 30 μL da suspensão formada foi coletada e aplicada ao suporte de amostra (10 mm de diâmetro) selado com filme Mylar®, formando um filme de amostra fino e uniforme adequado para análise por EDXRF.

2.2.8 Procedimento de calibração

As espécies químicas Y, Ga, Ge, In e Se foram estudadas como potenciais padrões internos na etapa de calibração. Uma solução padrão composta por 1,0 mg L^{-1} dos analitos Ca, Fe, Co, Ni, Zn, Cd e 50 mg L^{-1} do padrão interno Y, Ga, Ge, In e Se, e uma solução em branco (65% NADES LGH) foram preparadas para produzir duas soluções: S1 (50% de suspensão de pólen de abelha em NADES + 50% de solução padrão) e S2 (50% de suspensão de pólen de abelha em NADES + 50% em branco). Para S1, 1,0 mL de suspensão de pólen de NADES e 1,0 mL de solução padrão foram misturados; e para S2, 1,0 mL de suspensão de pólen de NADES e 1,0 mL de NADES foram misturados. Ambas as soluções foram sonificadas por 10 min e usadas para o método de calibração de dois pontos.

2.3. Resultados e discussão

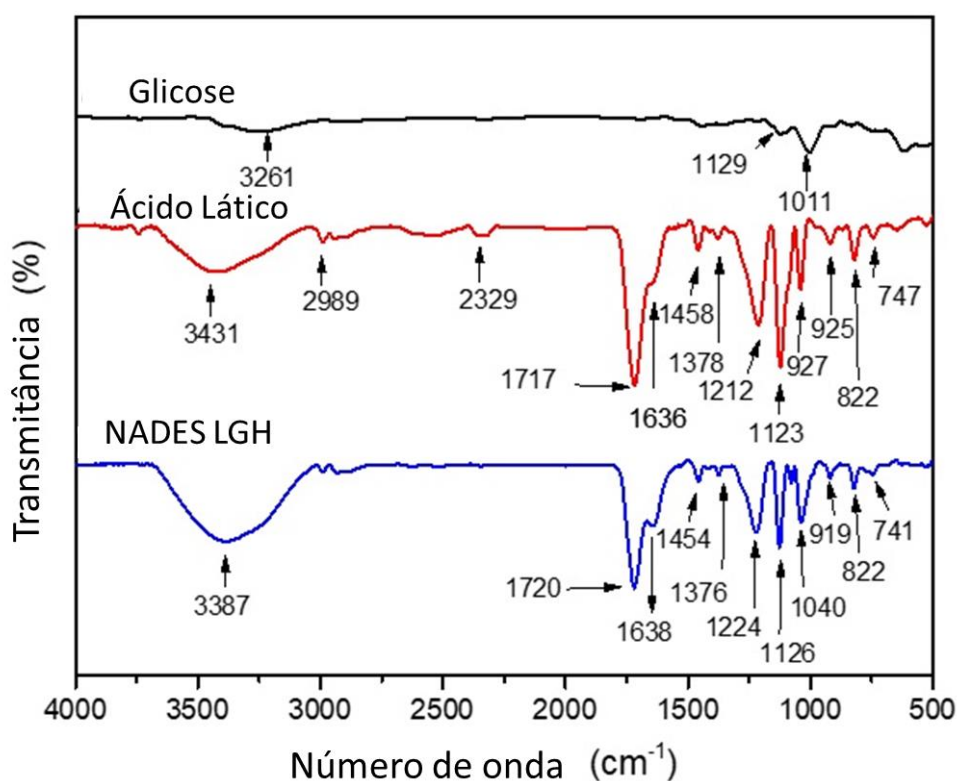
2.3.1 Caracterização do NADES sintetizado

A técnica de Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi usada para caracterizar o NADES sintetizado. Para isso, foram obtidos espectros para os componentes do solvente: ácido láctico e glicose, bem como para o solvente NADES LGH. Na Figura 4, podem ser observadas bandas características da glicose, como uma banda em 3361 cm^{-1} , indicativa de alongamento O-H, bem como bandas em 1129 cm^{-1} e 1011 cm^{-1} atribuídas ao alongamento C-O e C-OH. Para o ácido láctico, uma banda em 2989 cm^{-1} corresponde ao alongamento C-H, uma banda em 1723 cm^{-1} é atribuída ao alongamento C=O e uma banda em 1373 cm^{-1} representa a flexão C-H.

O NADES LGH sintetizado mostra bandas em 1720 cm^{-1} , 1476 cm^{-1} e 1224 cm^{-1} , indicando interações entre seus componentes que afetam as frequências vibracionais dos grupos funcionais. A presença de bandas em regiões semelhantes ao ácido láctico e à glicose sugere que estes são componentes do solvente sintetizado. As mudanças observadas indicam novas interações intermoleculares, conforme previsto por Dai et al. 2013, uma vez que os NADES

alteram as propriedades físico-químicas de componentes individuais, criando sistemas mais estáveis e eficientes baseados em ligações de hidrogênio.

Figura 4. Espectros de FTIR para o NADES sintetizado e seus componentes: ácido láctico e glicose.

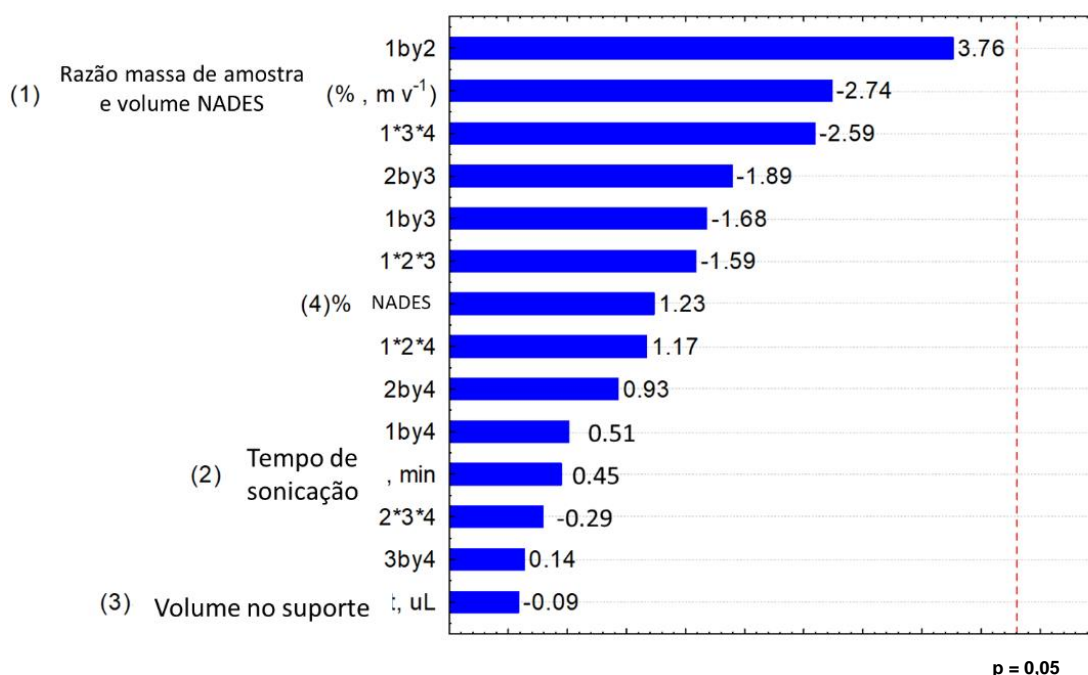


2.3.2 Determinação das condições experimentais para preparo da suspensão

A influência da razão massa-volume da amostra para solução na formação da suspensão, tempo de sonicação, volume da suspensão na célula de medição e concentração de NADES LGH, nas intensidades dos sinais obtidos por EDXRF foram estudadas usando um planejamento fatorial completo 2⁴ (Tabela 2). Os parâmetros e intervalos estudados foram baseados em trabalhos anteriores que usaram preparação de amostra por suspensão para análise de fluorescência de raios-X (Bilo, 2019; Dalipi, 2017). Os resultados deste planejamento foram normalizados considerando as massas de amostra usadas em cada experimento. A resposta múltipla (RM), obtida pela soma das intensidades dos sinais analíticos normalizados para cada analito, foi usada como resposta para avaliação (Ferreira, 2018).

A significância de cada variável foi avaliada via análise de variância (ANOVA) via níveis de significância de p -valor, gerando um gráfico de Pareto com efeitos de cada fator e suas interações (Figura 5). Os resultados do planejamento experimental revelaram que nenhuma das variáveis estudadas foi significativa, conforme mostrado no gráfico de Pareto, indicando estabilidade e homogeneidade da suspensão nas condições estudadas. A viscosidade e a presença de ligação de hidrogênio entre os componentes do NADES e as espécies químicas doadoras de hidrogênio presentes no pólen ajudam a formar um sistema de suspensão estável (Ayres, 2023; Thakur, 2020). Portanto, dentro do domínio experimental estudado, qualquer condição fornece resultados estatisticamente semelhantes (Anunciação, 2021).

Figura 5. Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento fatorial completo de 2^4 com efeitos de cada fator e suas interações.



As condições experimentais escolhidas foram: razão massa-volume de 15% ($m v^{-1}$) entre a amostra e o NADES, 10 min de sonicação, volume de amostra de 30 μL no suporte de amostra (10 mm de diâmetro) e concentração de 65% de NADES. O uso de 1,0 mL de solução contendo 65% de NADES com 15 mg de amostra permitiu a formação de uma suspensão estável, conforme observado em estudos anteriores (Bilo, 2019; Marguí, 2022). Além disso, o uso de 30 μL de suspensão de amostra permitiu a formação de uma camada com espessura adequada para medições no EDXRF (Dalipi, 2017)

Tabela 2. Planejamento fatorial completo 2⁴ e resposta múltipla obtida para otimização do método proposto.

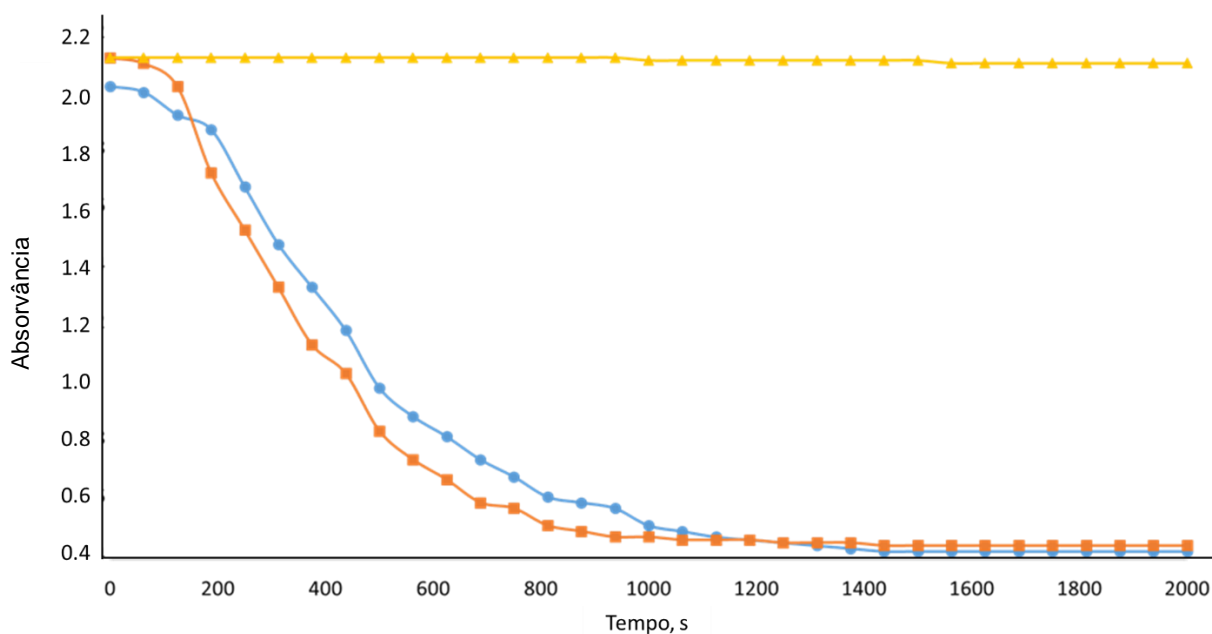
Experimentos	Razão massa de amostra e volume de NADES (% _v , m v ⁻¹)	Tempo de sonicação, min	Volume da amostra no suporte, µL	NADES, %	Resposta múltipla
1	20 (+)	15 (+)	10 (-)	100 (+)	3,93
2	20 (+)	15 (+)	10 (-)	30 (-)	1,49
3	20 (+)	15 (+)	50 (+)	100 (+)	1,08
4	20 (+)	15 (+)	50 (+)	30 (-)	1,29
5	20 (+)	5 (-)	10 (-)	100 (+)	0,48
6	20 (+)	5 (-)	10 (-)	30 (-)	0,48
7	20 (+)	5 (-)	50 (+)	100 (+)	0,87
8	20 (+)	5 (-)	50 (+)	30 (-)	1,08
9	10 (-)	15 (+)	10 (-)	100 (+)	0,92
10	10 (-)	15 (+)	10 (-)	30 (-)	2,01
11	10 (-)	15 (+)	50 (+)	100 (+)	2,52
12	10 (-)	15 (+)	50 (+)	30 (-)	1,15
13	10 (-)	5 (-)	10 (-)	100 (+)	2,30
14	10 (-)	5 (-)	10 (-)	30 (-)	2,38
15	10 (-)	5 (-)	50 (+)	100 (+)	3,21
16	10 (-)	5 (-)	50 (+)	30 (-)	2,57
17 (PC*)	15 (0)	10 (0)	30 (0)	65 (0)	2,65
18 (PC)	15 (0)	10 (0)	30 (0)	65 (0)	3,81
19 (PC)	15 (0)	10 (0)	30 (0)	65 (0)	3,23

PC*: Ponto central

2.3.3 Avaliação da estabilidade e homogeneidade da suspensão

A homogeneidade e estabilidade de três suspensões preparadas com amostras de pólen de abelha foram avaliadas usando turbidimetria, monitorando sinais de absorvância a 550 nm (Borque, 1999). As suspensões foram preparadas em: (a) 65% NADES LGH; (b) 1% m v⁻¹ Triton X-100; e (c) água, com as suspensões (b) e (c) sendo amplamente utilizadas para determinações multielementares com fluorescência de raios X (Bilo, 2019; Allegreta, 2019; Natali, 2016). As variações nos sinais de absorvância ao longo de um período de 33 min são mostradas na Figura 6.

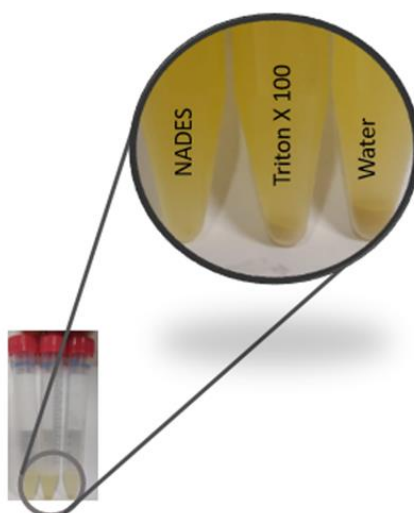
Figura 6. Avaliação da homogeneidade e estabilidade de suspensões de amostras de pólen preparadas em (amarelo) 65% NADES LGH, (laranja) 1% Triton X-100 e (azul) água. A turbidez das suspensões foi monitorada pela medição dos sinais de absorvância a 550 nm.



Pode-se observar que os sinais de absorvância para as suspensões preparadas em Triton X-100 e água diminuíram após 3 minutos, indicando sedimentação de partículas de pólen. Por outro lado, a suspensão preparada com NADES apresentou sinais de absorvância com pouca variação ao longo de todo o período estudado, indicando que a turbidez não se alterou, pois, as partículas de pólen foram estabilizadas no sistema, sem que ocorresse sedimentação

significativa durante 33 min. A análise turbidimétrica confirmou a inspeção visual apresentada na Figura 7, que indicou que as suspensões em água e Triton X-100 apresentaram sedimentação, enquanto a suspensão com NADES LGH não apresentou sedimentação. A viscosidade dos três solventes: (a) 65% NADES LGH, (b) 1% Triton X-100 e (c) água foram medidas usando um viscosímetro à temperatura ambiente. Os resultados obtidos foram $6,164 \pm 0,004$, $0,914 \pm 0,001$ e $0,893 \pm 0,001$ mPa s, para (a), (b) e (c), respectivamente. Estes resultados confirmam os dados obtidos através da análise turbidimétrica, indicando que as partículas de pólen têm mais dificuldade de sedimentar no solvente NADES LGH devido à viscosidade do que na água e Triton X-100.

Figura 7. Suspensões de amostras de pólen preparadas em 65% de NADES LGH, 1% de Triton X-100 e água após 10 min de sonicação.

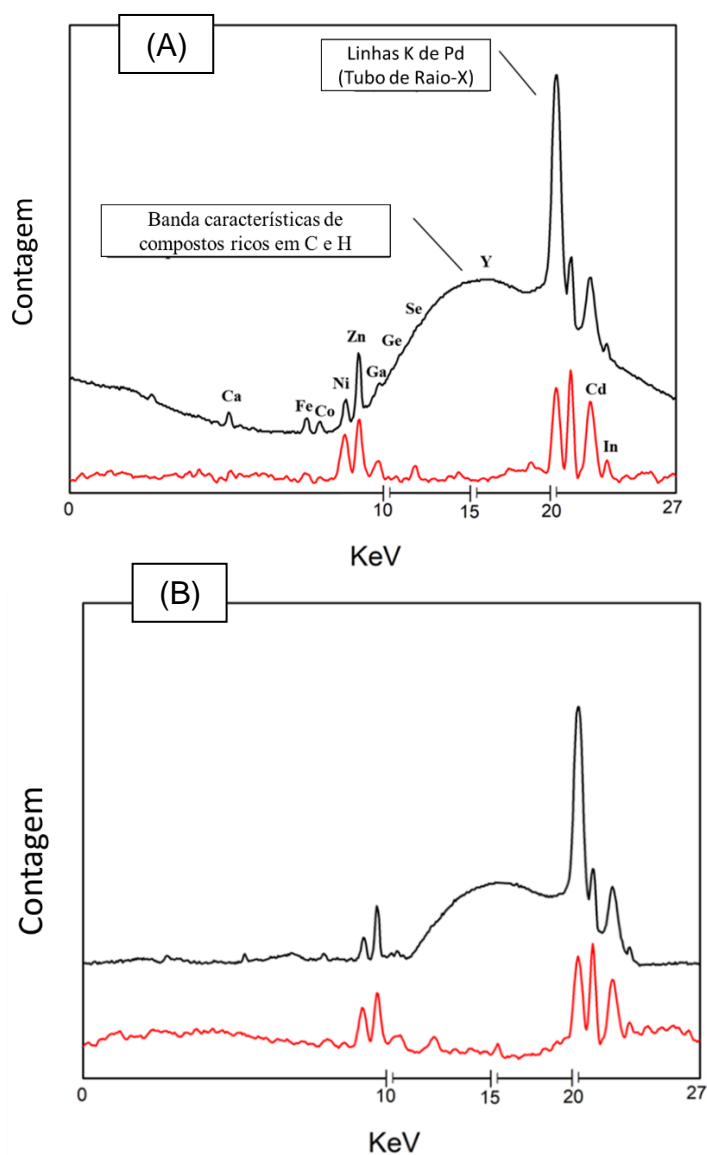


2.3.4 Avaliação do uso de padrão interno

O método de calibração de dois pontos de correspondência de matriz foi empregado para corrigir erros potenciais relacionados a sinais de fundo, flutuações em sinais analíticos e melhorar a precisão e o desempenho do método (Sloop, 2021). Esta estratégia é baseada em uma estratégia de calibração conhecida como análise de diluição padrão (SDA, do inglês standard dilution analysis) (Jones, 2015), que combina duas estratégias de calibração, calibração com padrão interno e calibração de adição de analito, e requer apenas duas soluções de calibração por amostra. Na estratégia adotada, a calibração exigiu duas soluções: S1 (50%

de suspensão de pólen de abelha em NADES + 50% de solução padrão), onde a solução padrão continha os analitos e o padrão interno; e S2 (50% de suspensão de pólen de abelha em NADES + 50% em branco), onde a solução em branco era uma solução NADES. A Figura 8, mostra espectros típicos obtidos das soluções S1 e S2.

Figura 8. Espectros de EDXRF para a solução S1 (A) e composta de 50% de pólen de abelha amostra 1 em NADES LGH + 1 mg L⁻¹ Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd, e 50 mg L⁻¹ Ga, Y, Ge, Se e In, e S2 (B) composta por 50% da amostra de pólen 1 em NADES LGH + 50% Branco (NADES LGH) (Faixa 1: 40 kV, filtro Al 500 µm; Faixa 2: filtro Cu 50 kV 100 µm).



A partir dos sinais analíticos obtidos para cada analito e o padrão interno, uma equação foi plotada com o sinal do padrão interno no eixo x e o sinal do analito no eixo y. A Equação 12 foi usada para os cálculos das concentrações de cada analito nas amostras.

Para que um elemento seja utilizado como padrão interno, ele precisa estar ausente nas amostras e não deve apresentar linhas de interferência espectral com os elementos a serem determinados (Chiweshe, 2016; Pires, 2019). Nesse sentido, Y, Ga, Ge, In e Se foram avaliados como padrões internos, considerando estudos anteriores e a adequação bem estabelecida desses elementos como padrões internos em análises espectrométricas atômicas (Natali, 2016; Musielak, 2022; Turnau, 2010; Tsuji, 2023; Gama, 2017; Ghosh, 2017).

Testes de recuperação com três amostras diferentes foram conduzidos para comparar o desempenho dos cinco padrões internos testados, adicionando 67 mg kg⁻¹ e 667 mg kg⁻¹ dos analitos Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd às amostras. Os sinais analíticos dos padrões internos presentes na solução de calibração S1 foram utilizados na Equação 2 para obter a concentração dos analitos. Os resultados de recuperação (%R) foram obtidos usando a Equação 17, onde C_{encontrado} é a concentração encontrada para a amostra após centrifugação do analito, C_{analito} é a concentração encontrada para a amostra sem adição de analitos e C_{adicionado} é a concentração adicionada de analito. Os resultados obtidos para uma das amostras são apresentados na Tabela 3.

$$\%R = \frac{(C_{\text{encontrado}} - C_{\text{analito}})}{C_{\text{adicionado}}} \times 100 \quad \text{Equação 17}$$

Tabela 3. Determinação de Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd em amostra de pólen (Amostra 1) por EDXRF após preparo da amostra com solvente eutético profundo natural.

Padrão interno	Analitos	Método proposto, mg kg ⁻¹	Adicionado, mg kg ⁻¹	Encontrado, mg kg ⁻¹	Recuperação, %
Ga	Ca	1038 ± 117	67	1113 ± 114	112
			667	1785 ± 130	112
	Fe	59 ± 11	67	140 ± 26	120
			667	820 ± 132	114
	Co	< 0.01	67	80 ± 11	120
			667	640 ± 84	96
	Ni	15 ± 6	67	80 ± 24	97
			667	547 ± 87	80

Tabela 3. continuação					
Y	Zn	35 ± 6	67	107 ± 12	107
			667	707 ± 41	101
	Cd	< 0.08	67	67 ± 11	93
			667	640 ± 102	95
	Ca	1119 ± 81	67	1164 ± 37	67
			667	1824 ± 143	106
	Fe	42 ± 14	67	130 ± 16	131
			667	818 ± 177	116
	Co	< 0.01	67	66 ± 10	99
			667	648 ± 86	97
	Ni	13 ± 6	67	77 ± 6	96
			667	604 ± 78	87
Ge	Zn	31 ± 4	67	68 ± 7	55
			667	639 ± 72	91
	Cd	< 0,08	67	73 ± 13	109
			667	657 ± 115	99
	Ca	<0,79	67	82 ± 8	122
			667	915 ± 155	137
	Fe	<0,24	67	85 ± 15	127
			667	770 ± 37	115
	Co	< 0,01	67	41 ± 16	61
			667	512 ± 76	77
	Ni	<0,15	67	78 ± 34	116
			667	575 ± 69	86
In	Zn	<0,09	67	75 ± 21	112
			667	576 ± 78	86
	Cd	< 0,08	67	44 ± 12	66
			667	461 ± 112	69
	Ca	1043 ± 118	67	1116 ± 57	109
			667	1746 ± 131	105
	Fe	32 ± 8	67	102 ± 46	104
			667	753 ± 130	108
	Co	< 0,01	67	84 ± 11	125
			667	666 ± 67	100
	Ni	13 ± 4	67	80 ± 25	100
			667	519 ± 137	76
	Zn	30 ± 6	67	120 ± 26	134
			667	701 ± 45	101
	Cd	< 0,08	67	67 ± 14	100
			667	645 ± 100	97

Tabela 3. continuação					
Se	Ca	<0,79	67	71 ± 81	106
			667	703 ± 157	105
	Fe	<0,24	67	30 ± 12	45
			667	495 ± 133	74
	Co	< 0,01	67	96 ± 12	143
			667	772 ± 85	116
	Ni	<0,15	67	90 ± 24	134
			667	489 ± 185	73
	Zn	<0,09	67	80 ± 5	119
			667	454 ± 67	68
	Cd	< 0,08	67	48 ± 27	72
			667	434 ± 119	65

Além disso, os resultados para mais duas amostras de pólen de abelha são fornecidos na Tabela 4. Os resultados de recuperação obtidos para todos os analitos com o padrão interno Ga em todas as amostras variaram de 80 a 120%, enquanto com os outros padrões internos as recuperações estiveram entre 45 e 144 %, assim Ga foi escolhido como o padrão interno para cálculos posteriores, pois o utilizando os resultados foram satisfatórios e o seu uso é bem estabelecido como um padrão interno em medições de fluorescência de raios X (Ghosh, 2022; Ghosh, 2017).

Tabela 4. Determinação de Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd em uma amostra de pólen (Amostra 2 e 3) por espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de energia após preparação da amostra com solvente eutético profundo natural.

Amostra 2													
Padrão interno	Adicionado, mg kg ⁻¹	Encontrado, mg kg ⁻¹						Recuperação, %					
		Ca	Fe	Co	Ni	Zn	Cd	Ca	Fe	Co	Ni	Zn	Cd
Ga	0	606	30	<0,01	51	35	<0,08						
	67	660	100	80	130	100	67	81	104	119	118	97	99
	667	1376	627	567	607	587	700	115	89	85	83	83	105
Y	0	513	31	<0,01	50	20	<0,08						
	67	566	97	77	107	85	69	79	99	115	85	97	103
	667	1375	739	546	604	529	836	129	106	82	83	76	125
Ge	0	<0,79	<0,24	<0,01	<0,15	<0,09	<0,08						
	67	61	64	51	55	67	49	90	95	76	82	100	73
	667	646	769	364	670	409	564	97	115	55	100	61	85
In	0	542	28	<0,01	52	34	<0,08						
	67	635	99	66	135	100	64	139	106	98	124	99	95
	667	1418	723	468	610	602	796	131	104	70	84	85	119

Tabela 4. continuação

Se	0	<0,79	<0,24	<0,01	<0,15	<0,09	<0,08						
	67	68	67	72	70	57	66	100	100	107	104	85	98
	667	666	641	510	664	361	592	99	96	76	100	54	89
Amostra 3													
Ga	0	163	28	<0,01	15	73	<0,08						
	67	240	87	93	93	140	60	115	88	90	117	100	85
	667	785	593	813	553	607	673	93	85	117	81	80	101
Y	0	146	29	<0,01	15	64	<0,08						
	67	215	72	88	77	115	63	103	64	131	93	76	94
	667	863	541	963	479	607	544	107	77	144	70	81	82
Ge	0	<0,79	<0,24	<0,01	<0,15	<0,09	<0,08						
	67	60	55	42	53	96	81	90	82	63	79	143	121
	667	947	648	512	516	759	731	142	97	77	77	114	110
In	0	150	27	<0,01	14	62	<0,08						
	67	239	89	62	69	138	56	133	93	93	82	113	84
	667	806	546	666	626	667	725	98	78	100	92	91	109
Se	0	<0,79	<0,24	<0,01	<0,15	<0,09	<0,08						
	67	57	68	87	58	55	50	85	101	130	87	82	75
	667	591	663	745	589	606	539	89	99	112	112	91	81

2.3.5 Performance analítica e aplicação

A curva analítica foi construída usando os sinais analíticos obtidos para as soluções S1 e S2, considerando a relação linear entre os sinais dos analitos e o padrão interno (Sloop, 2021). Os sinais do padrão interno foram plotados no eixo x, e os sinais para cada analito no eixo y. A solução S1 continha 50% da solução padrão com 67 mg kg⁻¹ de Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd, e 667 mg kg⁻¹ de Ga, e 50% da amostra. Enquanto isso, a solução S2 continha 50% da amostra e 50% da solução NADES LGH.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados como 3 e 10 vezes o desvio padrão de dez medições dos brancos analíticos, respectivamente. Para o cálculo, foram considerados os erros do tipo α e β , bem como a propagação de incertezas na inclinação e intercepto da curva de calibração (Sloop, 2021; Olivieri, 2014). A precisão foi estimada pela avaliação do desvio padrão relativo (%RSD) de dez medições repetidas realizadas em uma amostra de pólen de abelha com adições de 67 e 667 mg kg⁻¹ dos analitos. Todos os valores de %RSD encontrados foram abaixo de 5% para todos os seis analitos em ambas as concentrações. Os parâmetros analíticos do método proposto estão listados na Tabela 5.

Tabela 5. Parâmetros analíticos do método proposto para determinação de Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd em amostras de pólen por espectrometria de fluorescência de raios X por dispersão de energia após preparação da amostra com solvente eutético profundo natural.

Parâmetros	Ca	Fe	Co	Ni	Zn	Cd
LD, mg kg ⁻¹	0,24	0,07	0,003	0,04	0,025	0,02
LQ, mg kg ⁻¹	0,79	0,24	0,01	0,15	0,09	0,08
RSD, % (67 mg kg ⁻¹)	4,2	4,9	5,0	4,1	3,4	3,0
RSD, % (667 mg kg ⁻¹)	2,2	1,9	3,0	3,0	2,9	1,7

Os resultados obtidos pela aplicação do método proposto na análise de três amostras de pólen apícola foram comparados aos resultados obtidos pela digestão seguida da determinação por ICP OES (Valverde, 2023) (Table 6). Foram aplicados os testes t de student e F para variância (95% de confiança), com valores de p variando de 0,22 a 0,65, e 0,21 a 0,87, respectivamente. Assim, não foram observadas diferenças significativas entre os resultados, demonstrando a boa exatidão do método proposto para a determinação desses elementos em amostras de pólen apícola.

Tabela 6. Determinação de Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd em amostras de pólen pelo método proposto (A) e comparativo (B) (valor médio \pm intervalo de confiança).

Amostras	Concentração, mg kg ⁻¹											
	Ca		Fe		Co		Ni		Zn		Cd	
	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
1	1038 \pm 117	1088 \pm 134	59 \pm 11	74 \pm 14	<0,01	<0,01	15 \pm 6	26 \pm 11	35 \pm 6	48 \pm 14	<0,08	<0,06
2	606 \pm 131	609 \pm 150	30 \pm 5	29 \pm 5	<0,01	<0,01	51 \pm 6	51 \pm 7	35 \pm 12	36 \pm 9	<0,08	<0,06
3	163 \pm 42	161 \pm 62	28 \pm 3	36 \pm 10	<0,01	<0,01	15 \pm 1	16 \pm 4	73 \pm 4	79 \pm 8	<0,08	<0,06

(A) Método proposto: Suspensão (NADES) + EDXRF, (B) Método comparativo: Digestão + ICP OES.

Os resultados para as amostras analisadas apresentam variações na concentração de Ca, Fe, Ni e Zn variando de 163 a 1038, 28 a 59, 15 a 51 e 35 a 73 mg kg⁻¹, respectivamente, enquanto as concentrações de Co e Cd ficaram abaixo do limite de quantificação. Os resultados

obtidos para Ca mostram níveis abaixo dos encontrados para pólen de abelha na Polônia (3050-5770 mg kg⁻¹) e Filipinas (Belina-Aldemita, 2019) (3780–5187 mg kg⁻¹), porém próximos de alguns resultados obtidos no Brasil (Morgano, 2012; Carpes, 2009) (828-4670 mg kg⁻¹) e Turquia ((Kalaycıoğlu, 2017) 909-2380 mg kg⁻¹). Os níveis de Fe estão abaixo dos encontrados em amostras das Filipinas (Belina-Aldemita, 2019) (70-142 mg kg⁻¹), mas próximos de algumas amostras do Brasil (Morgano, 2012; Morgano, 2010) (11-552 e 57-87 mg kg⁻¹) e da Turquia (Kalaycıoğlu, 2017) (45-161 mg kg⁻¹).

As concentrações encontradas para Ni foram maiores que as encontradas na Jordânia (Aldgini, 2019) (<0,01-1,60 mg kg⁻¹), sudeste do Brasil (Morgano, 2010) (0,12-6,85 mg kg⁻¹), Turquia (Kalaycıoğlu, 2017) (0,9-2,6 mg kg⁻¹) e Eslovênia (Kump, 1996) (2,5-3,1 mg kg⁻¹). As concentrações de Zn foram semelhantes às encontradas nas Filipinas (45-56 mg kg⁻¹) (Belina-Aldemita, 2019), Turquia (26-50 mg kg⁻¹) (Kalaycıoğlu, 2017), sul do Brasil (45-55 mg kg⁻¹) (Carpes, 2009) e Jordânia (25-77 mg kg⁻¹) (Aldgini, 2019), e maiores que os níveis encontrados em amostras da Polônia (27-48 mg kg⁻¹) (Pohl, 2020). Os resultados obtidos para Cd foram consistentes com resultados de algumas amostras do sudeste do Brasil (<0,001-0,233 mg kg⁻¹), e da Itália (Conti, 2001) (<15–90,1 µg kg⁻¹), pois ficaram abaixo de 0,076 mg kg⁻¹. Enquanto isso, os resultados encontrados para Co foram menores do que aqueles encontrados em amostras do sudeste do Brasil (Morgano, 2010) (0,3-0,8 mg kg⁻¹).

Tais resultados demonstram que as concentrações de metais no pólen podem variar dependendo da amostra analisada, situação que pode estar ligada a fatores relacionados à origem e ao ambiente (condições climáticas e ambientais) de onde o pólen foi coletado. Pólen apícola de diferentes regiões ou diferentes colônias de abelhas pode apresentar diferenças nas concentrações de seus vários constituintes (Baky, 2023; Darwish, 2023). Os tipos de flores, a composição genética das espécies vegetais e os processos agrícolas (como a fertilização) também podem impactar essa composição (Darwish, 2023).




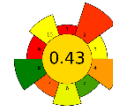

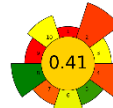


2.3.6 Avaliação da greenness e whiteness

A técnica espectrométrica foi usada anteriormente na análise de pólen (Dima, 2012), como F AAS (Maragoou, 2017), ICP OES (Valverde, 2023), ICP-MS (Erdoğan, 2023). No entanto, o preparo de amostras via suspensão e calibração de dois pontos Matrix-Matching para analisar pólen ainda não havia sido explorada.

A conformidade do método proposto com os 12 princípios da química analítica verde (GAC) e química analítica branca (WAC) foi avaliada usando o software AGREE (Pena-Pereira, 2020), AGREEprep (Wojnowski, 2022) e algoritmo RGB 12 (Nowak, 2021). A métrica AGREE apresenta critérios de entrada referentes aos 12 princípios de significância da GAC, onde cada uma das 12 variáveis é transformada em uma escala que varia de 0 a 1, recebendo pesos diferentes. No software AGREEprep, os critérios de avaliação são baseados nos dez princípios do preparo de amostras verdes (GSP), que são recalculados e, após avaliação quantitativa, refletidos como uma pontuação de impacto em uma escala de 0 (não cumprido) a 1 (cumprido). Enquanto isso, o algoritmo RGB 12 é baseado no conceito de WAC, que propõe 12 princípios alternativos aos 12 princípios do GAC, levando em consideração a qualidade do método, aspectos analíticos (vermelho) e práticos (azul), demonstrando a coerência e sinergia dos atributos analíticos, ecológicos e práticos. Neste caso, a brancura é quantificada entre 0 e 100, com base na avaliação de princípios individuais, como um parâmetro conveniente útil em comparações e na seleção do método ideal. Cálculos foram aplicados usando esses diferentes critérios para avaliar a coerência com os princípios do GAC do método proposto e métodos descritos na literatura para análise de pólen usando técnicas de espectrometria (Tabela 7). As métricas foram preenchidas com as informações fornecidas em cada manuscrito.

A pontuação final das avaliações do algoritmo AGREE, AGREEprep e RGB 12 destaca a maior natureza verde e sustentável do método proposto. O método de preparação e calibração da amostra em poucas etapas, resultando em menos manipulação e menor tempo de análise, menor massa da amostra e não uso de reagentes tóxicos, contribuiu para esse resultado. Além disso, o uso de NADES, que é um solvente verde, deve ser enfatizado. Essas vantagens resultam em uma melhora notável na pontuação associada aos 2º, 4º, 10º, 11º e 12º princípios do AGREE e aos 3º, 4º, 5º, 8º e 10º princípios do AGREEprep. A alta pontuação obtida no algoritmo RGB 12 está relacionada principalmente aos princípios de toxicidade de reagentes, número e quantidade de reagentes e resíduos, impactos diretos, precisão, exatidão, custo-eficiência, requisitos e simplicidade operacional, todos os quais são atendidos pelo método proposto e garantem que o método esteja alinhado com os critérios do GAC.

Tabela 7. Características de métodos que empregam espectrometria de fluorescência de raios X para análise de amostras de pólen.

Analitos	Preparo da amostra	Método de calibração	Massa da amostra, g	Técnica espectrométrica	LD, $\mu\text{g g}^{-1}$	RSD, %	AGREE	AGREEprep	RGB, %	Referência
As(III)	Digestão úmida assistida por micro-ondas e redução de As(V)	Calibração externa	0,1–1	F AAS	0,2	5,6			62,2	Baky, 2023
Al, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Zn, P, Se and As	Digestão úmida assistida por micro-ondas	Caibração externa	0,2	ICP OES	0,2 – 2,4	≤ 15			76,4	Darwish, 2023
Mn, Fe, Zn, Se, Cr, Cu, Mg, Ca, Na, Pb, Cd, Ni and As	Digestão úmida assistida por micro-ondas	Calibração externa	0,25	ICP-MS	0,00001 – 0,09	-			70,6	Dima, 2012
Ca, Fe, Co, Ni, Zn, and Cd	Sonicação + NADES LGH	Calibração de dois pontos por correspondência de matriz	0,015	EDXRF	2,3 – 157,8	≤ 5			88,3	Esse trabalho

2.4 Conclusão

O uso do preparo de amostra de pólen de abelha via suspensão com NADES LGH permitiu a determinação multielementar de Ca, Fe, Co, Ni, Zn e Cd por EDXRF usando a estratégia de calibração de dois pontos por correspondência de matriz como método de calibração. O método desenvolvido é rápido, simples, de baixo custo e apresenta parâmetros analíticos adequados, com bons limites de detecção e quantificação, precisão e extensão. O método proposto oferece baixo risco de contaminação da amostra, minimizando o consumo de energia, pois não requer aquecimento por longos períodos, e do uso de ácidos concentrados para pré-tratamento da amostra. Além disso, o método obteve bom desempenho em métricas de avaliação de sustentabilidade, demonstrando que pode ser considerado como uma alternativa verde para análise de pólen de abelha.

Capítulo III

***COMPARAÇÃO DE PROCEDIMENTOS
ANALÍTICOS VERDES BASEADOS EM REAÇÕES
DE ATIVAÇÃO DE PERSULFATO PARA
DECOMPOSIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DE
MULTIELEMENTAR EM AMOSTRAS DE MEL
POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA
COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO***

3.1 Introdução

A presença de elementos tóxicos no solo, na água e no ar pode ter origem em fontes naturais ou antropogênicas, como atividades industriais, e é um dos problemas relacionados à poluição ambiental (Lishchuk, 2023; Atanasov, 2023). Esse problema também pode levar ao acúmulo de elementos potencialmente tóxicos nas plantas, o que pode ser uma fonte de contaminação à saúde humana, causando diferentes doenças (Hassona, 2023; Aramaberi, 2024). Além disso, plantas contaminadas podem ser vetores de contaminação indireta em polinizadores, como abelhas, e consequentemente em produtos apícolas derivados, como néctar, pólen e mel (Atanasov, 2023). Os efeitos adversos à saúde, causados pela presença de elementos potencialmente tóxicos, como cádmio, cromo e alumínio, incluem toxicidade renal, complicações neurológicas, hepatotoxicidade, efeitos gastrointestinais e efeitos pulmonares (Kargarghomsheh, 2024; Farhadiyan, 2024; Farsani, 2024). Por outro lado, a presença de elementos essenciais para o metabolismo humano, como zinco, cobalto, manganês e cobre, também precisa de atenção, considerando que ingestões excessivas podem levar a intoxicação (Kargarghomsheh, 2023).

O mel é um semilíquido doce e viscoso produzido por abelhas por meio da coleta de néctar de flores ou outras secreções naturais contendo açúcar (Sixto, 2024). É caracterizado por uma alta concentração de glicose e frutose, bem como elementos essenciais e não essenciais, carboidratos, enzimas e aminoácidos, constituintes necessários para a manutenção do metabolismo humano. As características nutricionais fazem do mel um alimento básico para humanos (Melaku, 2022), com produção mundial estimada em 1,8 bilhão de toneladas (FAOSTAT, 2022).

Várias técnicas analíticas estão disponíveis para determinar elementos traço em amostras de mel, como espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) (Demaku, 2023; Silva, 2024). Esta técnica apresenta alta sensibilidade, consequentemente limites mais baixos de detecção e quantificações, robustez e velocidade de análise para determinação de multielementos (Tannus, 2021). No entanto, geralmente, a digestão da amostra é necessária para permitir a introdução da amostra no equipamento e superar interferências da matriz.

A digestão da amostra pode ser dividida em técnicas por via seca e ou via úmida (incluindo técnicas assistidas por micro-ondas e ultrassom). As técnicas por via seca precisam utilizar uma grande quantidade de reagentes oxidantes, como hidróxidos de metais alcalinos,

carbonatos ou boratos, e alta massa de amostras (Mehmeti, 2021). Procedimentos de decomposição úmida são descritos na literatura envolvendo o uso de agentes oxidantes (tipicamente peróxido de hidrogênio) e ácidos minerais, ou uma mistura de ácidos minerais, como ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido clorídrico ou, dependendo do método, ácido fluorídrico (Sneddon, 2006; Korn, 2008). Ambos os procedimentos podem visar decompor matéria orgânica para obter soluções aquosas; no entanto, eles consomem muito tempo, envolvem alta demanda de energia e também requerem altos volumes de reagentes (Astolfi, 2020; Leme, 2014), o que pode ser caro e gerar resíduos perigosos para o meio ambiente e a saúde humana (Korn, 2008).

Uma alternativa para o pré-tratamento de amostras para determinações elementares é o uso de sais de persulfato. O persulfato tem sido usado como reagente para procedimentos de preparação de amostras com a intenção de decomposição de matéria orgânica devido às suas propriedades oxidantes. Este reagente tem potencial redox semelhante (2,5–3,1 eV) e meia-vida mais longa em comparação com $\bullet\text{OH}$ (Xu, 2020), estabilidade em água e menor energia de ligação para clivagem do grupo peroxo (Kordestani, 2019; Khakyzadeh, 2020; Matzek, 2016). O persulfato pode ser ativado usando processos de oxidação avançada baseados em radicais sulfato (SR-AOPs) que produzem um radical sulfato reativo ($\text{S}_2\text{O}_8^{2-} + \text{ativador} \rightarrow 2\text{SO}_4\bullet$ or $\text{SO}_4\bullet + \text{SO}_4^{2-}$) por meio de calor, reações com metais de transição, luz ultravioleta e outros meios, como eletroquímica e ultrassonicação (Matzek, 2016). Nesse sentido, é importante desenvolver procedimentos de pré-tratamento de amostras utilizando reações baseadas na formação de radicais sulfato reativos para reduzir as etapas de preparação da amostra e, conseqüentemente, o tempo de análise e mitigar a geração de resíduos perigosos.

Este trabalho compara dois procedimentos de digestão diferentes baseados em reações de persulfato ativado para degradação química orgânica de amostras de mel com subsequente determinação de Zn, Cd, Co, Mn, Cr, Al e Cu por ICP OES: (i) combinação sinérgica de persulfato ativado por base e ferro-ativado (APS/OH^-), que usa uma alta concentração de solução de hidróxido de potássio e baixas concentrações de solução de sulfato de amônio ferroso para evitar a precipitação de íons férricos como hidróxido (Husain, 2012); e (ii) combinação sinérgica de persulfato ativado por ferro e ativação por ultra-sonicação (APS/H^+), uma vez que o Fe^{2+} pode atuar diminuindo a quantidade de radicais sulfato produzindo SO_4^{2-} (Karim, 2021), reduzindo a presença de $\text{SO}_4\bullet$ e a eficiência da degradação química orgânica.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Instrumentação

Os analitos foram determinados por ICP OES com um espectrômetro de visão axial e radial (iCAPPRO10928, Thermo Scientific). As condições operacionais incluíram uma potência de medição de 1250 W, um gerador de radiofrequência de 27 MHz, detector de dispositivo de injeção de carga (CID), diâmetro do tubo da tocha central de 2,0 mm, faixa de comprimento de onda entre 167 e 852 nm, tempo de medição de 5 s, câmara de nebulização ciclônica, nebulizador concêntrico, fluxo de gás auxiliar de 0,5 L min⁻¹, fluxo de gás de plasma de 13,5 L min⁻¹ e fluxo de gás de nebulização de 0,5 L min⁻¹. As linhas de emissão para análise foram escolhidas de acordo com estudos de interferência anteriores. As linhas de emissão empregadas foram: Zn (I), 206,200 nm; Cd (II), 226,502 nm; Co (II), 228,616 nm; Mn (II), 260,569 nm; Cr (IV), 284,325 nm; Al (I), 308,215 nm; Cu (II), 327,396 nm, Mg (II) 280,270 nm; e Mg (I) 285,213 nm.

As massas das amostras foram medidas usando uma balança analítica (modelo TE214 S, Sartorius, Göttingen, Alemanha) com precisão de $\pm 0,1$ mg. Os experimentos foram conduzidos em tubos cônicos de centrífuga com capacidade interna de 15 mL. Um banho de limpeza ultrassônica (Cristofoli, Campo Mourão, Brasil) foi usado para sonicação das amostras. Para fins de comparação, as amostras de mel foram digeridas usando um forno de micro-ondas Multiwave PRO (Anton Paar GmbH, Graz, Áustria).

3.2.2 Reagentes, soluções e amostras

Todos os reagentes químicos usados nos experimentos eram de grau analítico. A água usada era ultrapura, com resistividade específica maior que 18 M Ω cm, obtida de um sistema de purificação de água Milli-Q® (Millipore, Bedford, EUA). Vidrarias e garrafas foram imersas em uma solução de ácido nítrico a 10% (v v⁻¹) (Merck, Darmstadt, Alemanha) por pelo menos 24 h e enxaguadas com água ultrapura antes do uso. Soluções de trabalho padrão multielementares com concentração de 50 mg L⁻¹ para Zn, Cd, Co, Mn, Cr, Al e Cu foram preparadas diluindo soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ (Specsol Quimlab, Brasil) de cada elemento em ácido nítrico a 10% (v v⁻¹) (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Soluções de cloreto de hidrogênio 1,0 mol L⁻¹ foram preparadas por diluição direta da solução concentrada (Merck, Darmstadt, Alemanha). Soluções de sulfato de amônio ferroso

(Synth, Brasil), persulfato de amônio (Dinamica, Brasil) e hidróxido de potássio foram preparadas por diluição em água a partir de reagentes P.A.

As amostras de mel foram compradas em supermercados em Salvador, Brasil, armazenadas em garrafas de polietileno de alta densidade e mantidas em temperatura ambiente até a análise.

3.2.3 Procedimento experimental

O procedimento foi baseado na ativação de persulfato à base de ferro para degradação química orgânica. Uma massa de 0,2 g de cada amostra de mel foi pesada em um tubo de centrífuga de 15 mL. Os procedimentos foram realizados em temperatura ambiente (22 ± 2 °C). No procedimento APS/OH⁻, 0,25 mL de sulfato de amônio ferroso (FAS) 0,03 mol L⁻¹, 0,75 mL de KOH 3,0 mol L⁻¹ e 9,0 mL de persulfato de amônio (APS) 0,5 mol L⁻¹ foram adicionados à amostra. O tubo foi fechado e após agitação manual por 30 s, a amostra estava pronta para análise por ICP OES.

No procedimento APS/H⁺, além da adição de 0,35 mL de APS 0,5 mol L⁻¹, 0,60 mL de FAS 1,0 mol L⁻¹ e 5,0 mL de HCl 1,0 mol L⁻¹, a amostra foi sonicada por 10 min. Após a diluição para 10,0 mL com água, as soluções foram analisadas por ICP OES.

3.2.4 Procedimento de digestão por micro-ondas

Para fins de comparação, as amostras foram digeridas com o auxílio de um forno de micro-ondas. Aproximadamente 0,2 g de cada amostra foi pesada e transferida para um recipiente de digestão. Em seguida, 4,0 mL de ácido nítrico concentrado, 1,0 mL de peróxido de hidrogênio e 3,0 mL de água deionizada foram adicionados a cada recipiente. As amostras foram digeridas usando o seguinte programa de temperatura: (I) aquecimento por 5 min até 150 °C, (II) manutenção a 150 °C por 10 min e (III) resfriamento a 55 °C por 30 min. A solução digerida foi filtrada através de um papel de filtro quantitativo e transferida para um balão volumétrico, com o volume final ajustado para 20 mL com água. Posteriormente, as amostras foram analisadas por ICP OES (Leme, 2014). Em cada procedimento de digestão, três brancos foram preparados usando 4,0 mL de ácido nítrico concentrado, 1,0 mL de peróxido de hidrogênio e 3,0 mL de água deionizada.

3.2.5 Ferramentas estatísticas para otimização do pré-tratamento das amostras

Diferentes estratégias de otimização foram realizadas, considerando as particularidades dos dois procedimentos de digestão. Para o procedimento APS/OH⁻, a concentração de cada reagente presente no processo foi assumida como a principal variável de digestão. Assim, um

planejamento simplex centroide (com restrição de misturas) foi empregado para otimizar as proporções dos componentes da mistura, utilizando combinações de soluções APS, FAS e KOH.

Para o procedimento APS/H⁺, o tempo de sonicação foi introduzido como uma variável experimental e um projeto fatorial completo de dois níveis (2⁴) foi empregado para identificar as variáveis significativas na resposta analítica. Os seguintes fatores foram estudados: concentração da solução FAS, concentração da solução HCl, concentração da solução APS e tempo de sonicação. As variáveis significativas foram otimizadas usando a matriz de Doehlert como metodologia de superfície de resposta.

Triplicatas do ponto central (PC) em cada projeto foram realizadas para calcular a variância. A função de desejabilidade foi utilizada como uma resposta quimiométrica, e os sinais analíticos normalizados para cada analito (Zn, Cd, Co, Mn, Cr, Al e Cu) foram usados para obter a desejabilidade global (D) (Candioti, 2014). O D foi calculado usando a Equação 18:

$$di(\hat{y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{if } \hat{y}_i(x) = Li \\ \frac{(\hat{y}_i(x) - Li)}{Ui - Li} & \text{if } Li < \hat{y}_i(x) < Ui \\ 1 & \text{if } \hat{y}_i(x) = Ui \end{cases} \quad \text{Equação 18}$$

onde Ui é o maior sinal analítico obtido em cada experimento do delineamento da matriz, Li é o menor sinal analítico obtido em cada experimento da matriz gerada para aplicação da abordagem quimiométrica. O di(\hat{y}_i) é uma função de desejabilidade individual para cada resposta $\hat{y}_i(x)$, assumindo valores entre 0 e 1, onde di(\hat{y}_i) = 0 é a resposta indesejável, e di(\hat{y}_i) = 1 é um valor desejável. Dado que cada resposta em cada experimento é transformada em funções de desejabilidade, elas foram combinadas em uma função única (D) para descobrir as melhores respostas conjuntas usando uma função média geométrica. O programa Statistica 6.0® (StatSoft, Inc., Tulsa, EUA) foi empregado para auxiliar a aplicação estatística.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Otimização da combinação de persulfato ativado por base e ferro para pré-tratamento de amostras de mel

Um centroide simplex foi realizado para otimizar o procedimento APS/OH⁻. Os experimentos foram realizados de acordo com planejamento de mistura com restrição mostrado

na Tabela 8. Um modelo quadrático foi utilizado para obter a descrição da superfície ótima experimental. A análise de variância (ANOVA) foi usada para avaliar o modelo quadrático, que não apresentou falta de ajuste ($p = 0,13 > 0,05$). O modelo quadrático é descrito pela Equação 19:

$$SA = 0,659_{(\pm 0,041)} (\%, APS) + 0,087_{(\pm 0,048)} (\%, FAS) - 0,014_{(\pm 0,048)} (\%, KOH) - 0,666_{(\pm 0,018)} (\%, APS) (\%, FAS) + 0,495_{(\pm 0,022)} (\%, APS) (\%, KOH) + 0,882_{(\pm 0,021)} (\%, KOH) (\%, FAS) \quad \text{Equação 19}$$

onde SA é o sinal analítico.

Tabela 8. Planejamento de mistura com restrição para estudar a decomposição de amostras de mel usando combinação sinérgica de persulfato ativado por base e ferro com subsequente determinação multielementar por ICP OES.

Experimento	0,5 mol L ⁻¹ APS, %	0,03 mol L ⁻¹ FAS, %	3 mol L ⁻¹ KOH, %	Desajabilidade Global
1	100 (8 mL)	0 (1 mL)	0 (1 mL)	0,72
2	0 (1 mL)	100 (3 mL)	0 (6 mL)	0,12
3	0 (1 mL)	0 (1 mL)	100 (8mL)	0,00
4	0 (1 mL)	50 (2 mL)	50 (7 mL)	0,00
5	50 (4.5 mL)	0 (1 mL)	50 (4.5 mL)	0,22
6	50 (4.5 mL)	50 (2 mL)	0 (3.5 mL)	0,00
7	66,66 (5,6 mL)	16,66 (1,3 mL)	16,66 (3,1 mL)	0,46
8	16,66 (2,1 mL)	66,66 (2,3 mL)	16,66 (5,6 mL)	0,28
9	16,66 (2,1 mL)	16,66 (1,3 mL)	66,66 (6,6 mL)	0,40
10 (PC)	33,33 (3,3 mL)	33,33 (1,6 mL)	33,33 (5,1 mL)	0,46
11 (PC)	33,33 (3,3 mL)	33,33 (1,6 mL)	33,33 (5,1 mL)	0,34
12 (PC)	33,33 (3,3 mL)	33,33 (1,6 mL)	33,33 (5,1 mL)	0,52

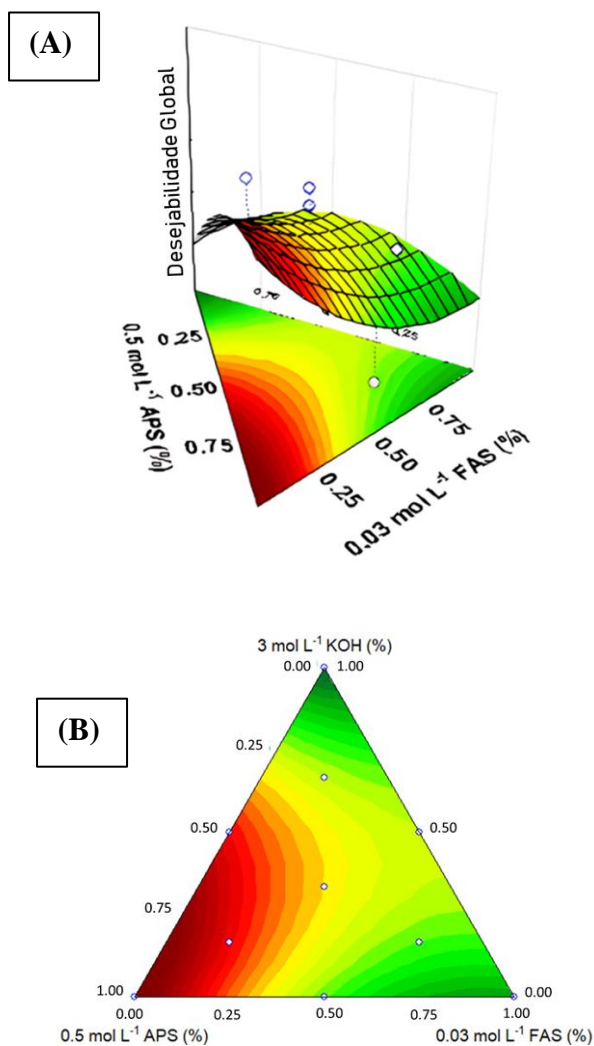
APS: persulfato de amônio, FAS: sulfato de amônio ferroso, PC: ponto central

As Figuras 9A e 9B mostram a superfície de resposta ajustada e o gráfico de contorno obtido para os sinais analíticos normalizados em função da proporção dos componentes da mistura apresentados na Tabela 8. Considerando que a superfície de resposta exibiu um ponto de sela, suas coordenadas não devem ser utilizadas para a otimização. Portanto, uma inspeção visual foi realizada para determinar as melhores condições (Dias, 2019).

As condições estabelecidas para este sistema foram: 90% de 0,5 mol L⁻¹ APS, 2,5% de 0,03 mol L⁻¹ FAS, e 7.5% de 3,0 mol L⁻¹ KOH. Os resultados obtidos na otimização foram consistentes com o mecanismo de ativação do persulfato e decomposição da matéria orgânica.

Uma maior concentração de base leva ao aumento da eficiência na produção de radicais hidroxila, que atuam sinergicamente com íons sulfato na degradação da matéria orgânica (Matzek, 2016). Por outro lado, uma menor concentração de íons ferrosos diminui o efeito de eliminação do Fe (II) e reduz a probabilidade de precipitação de íons férricos como hidróxido (Karim, 2021).

Figure 9. Gráficos obtidos para o planejamento de mistura restrita usado para a otimização da combinação de persulfato ativado por base e ativado por ferro para pré-tratamento de amostras de mel: (A) Superfície de resposta do modelo quadrático usando diferentes teores das soluções de KOH, APS e FAS; (B) Gráfico de contorno da desejabilidade global normalizada como uma função da proporção das soluções. FAS: sulfato de amônio ferroso, APS: persulfato de amônio.



3.3.2 Otimização da combinação sinérgica de persulfato ativado por ferro e ultra-sonicação para pré-tratamento de amostras de mel

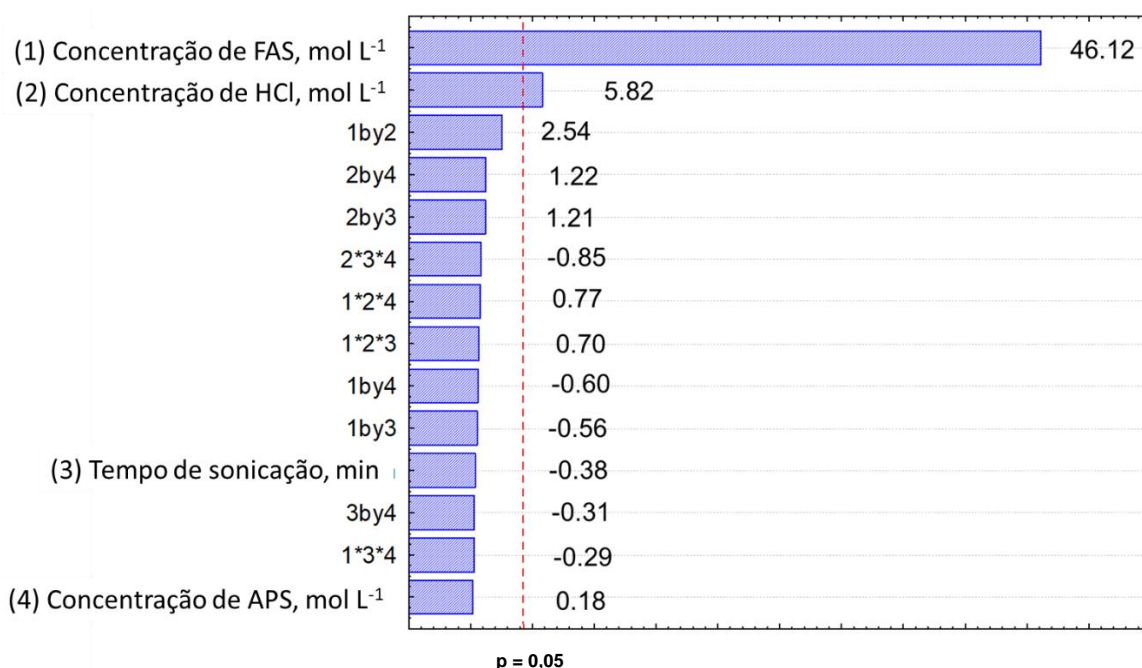
A otimização do APS/H⁺ foi realizada em duas etapas. Primeiramente, um planejamento fatorial completo de dois níveis (2⁴) foi realizado para avaliar a significância da concentração da solução de FAS, concentração da solução de HCl, concentração da solução de APS e tempo de sonicação. Posteriormente, uma matriz de Doehlert foi usada para otimizar as variáveis de significância e determinar as condições ótimas. O planejamento fatorial completo de dois níveis e os dados de desejabilidade global são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Planejamento fatorial completo (2⁴) para estudar a digestão de amostras de mel usando a combinação sinérgica de ultra-sonicação e persulfato ativado por ferro com subsequente determinação multielementar por ICP OES. APS: persulfato de amônio, FAS: sulfato de amônio ferroso.

Experimentos	Concentração de FAS, mol L ⁻¹	Concentração de HCl, mol L ⁻¹	Concentração de APS, mol L ⁻¹	Tempo de sonicação, min	Desejabilidade Global
1	0,003 (-)	0,1 (-)	0,01 (-)	0 (-)	0,00
2	0,1 (+)	0,1 (-)	0,01 (-)	0 (-)	0,80
3	0,003 (-)	1 (+)	0,01 (-)	0 (-)	0,05
4	0,1 (+)	1 (+)	0,01 (-)	0 (-)	0,84
5	0,003 (-)	0,1 (-)	0,01 (-)	10 (+)	0,00
6	0,1 (+)	0,1 (-)	0,01 (-)	10 (+)	0,73
7	0,003 (-)	1 (+)	0,01 (-)	10 (+)	0,05
8	0,1 (+)	1 (+)	0,01 (-)	10 (+)	0,91
9	0,003 (-)	0,1 (-)	0,025 (+)	0 (-)	0,02
10	0,1 (+)	0,1 (-)	0,025 (+)	0 (-)	0,74
11	0,003 (-)	1 (+)	0,025 (+)	0 (-)	0,06
12	0,1 (+)	1 (+)	0,025 (+)	0 (-)	0,92
13	0,003 (-)	0,1 (-)	0,025 (+)	10 (+)	0,00
14	0,1 (+)	0,1 (-)	0,025 (+)	10 (+)	0,72
15	0,003 (-)	1 (+)	0,025 (+)	10 (+)	0,08
16	0,1 (+)	1 (+)	0,025 (+)	10 (+)	0,89
17	0,0515 (0)	0,55 (0)	0,0175 (0)	5 (0)	0,83
18	0,0515 (0)	0,55 (0)	0,0175 (0)	5 (0)	0,89
19	0,0515 (0)	0,55 (0)	0,0175 (0)	5 (0)	0,87

Os resultados do planejamento experimental revelaram que apenas as concentrações da solução de FAS e da solução de HCl foram significativas, conforme mostrado no gráfico de Pareto (Figura 10). Portanto, qualquer concentração de APS e tempo de sonicação na faixa experimental estudada poderia ser usada para obter sinais analíticos mais altos. Nos níveis estudados, os valores positivos para concentração da solução de FAS e concentração da solução de HCl indicaram que os sinais analíticos aumentaram conforme esses fatores aumentaram.

Figura 10. Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo 2^4 usado para avaliar a significância dos fatores na otimização da combinação sinérgica de persulfato ativado por ferro e ultrassonicação para pré-tratamento de amostras de mel: tempo de sonicação, concentrações da solução de sulfato de amônio ferroso (FAS), solução de HCl e solução de persulfato de amônio (APS).



Em relação aos resultados obtidos a partir do gráfico de Pareto, foi realizada uma matriz de Doehlert como a matriz apresentada na Tabela 10, utilizando 0,0175 mol L⁻¹ de APS. Esta solução foi escolhida porque altos sinais analíticos foram obtidos nos experimentos realizados com esta concentração na primeira etapa da otimização. O tempo de sonicação de 10 min foi usado para garantir a degradação espécies orgânicas.

Tabela 10. Matriz de Doehlert com valores reais e desejabilidade global realizada para otimizar a degradação de amostras de mel usando a combinação sinérgica de ultrassonicação e persulfato ativado por ferro com subsequente determinação multielementar por ICP OES. FAS: sulfato de amônio ferroso, PC: ponto central.

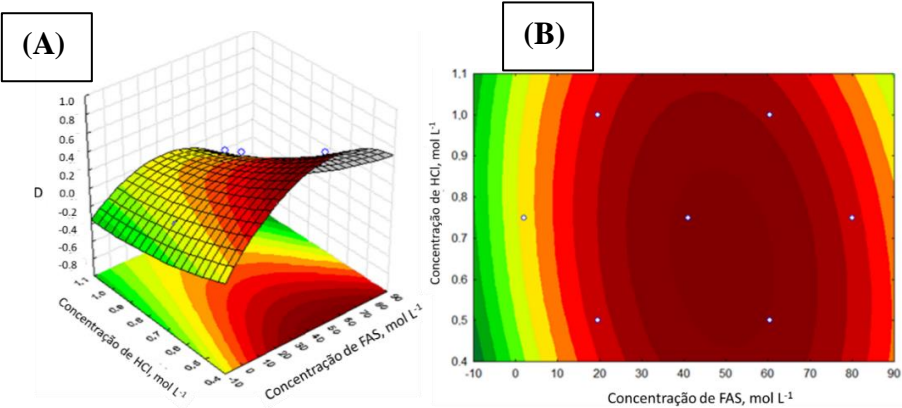
Experimentos	Concentração de FAS, mol L ⁻¹	Concentração de HCl, mol L ⁻¹	Desejabilidade Global
1	0,041 (PC)	0,75 (PC)	0,00
2	0,041 (PC)	0,75 (PC)	0,49
3	0,041 (PC)	0,75 (PC)	0,45
4	0,080	0,75	0,00
5	0,061	1,00	0,00
6	0,002	0,75	0,00
7	0,020	0,50	0,43
8	0,061	0,50	0,68
9	0,020	1,00	0,00

A superfície de resposta obtida a partir desta matriz indicou que o ponto crítico é um ponto de sela (Figura 11A). Assim, uma inspeção visual do gráfico de contorno foi realizada para determinar as melhores condições operacionais (Figura 11B). As condições estabelecidas foram: 0,06 mol L⁻¹ de FAS e 0,5 mol L⁻¹ de HCl, o que garante que o meio seja suficientemente ácido para evitar a precipitação de íons férricos na forma de hidróxidos (Khakyzadeh, 2020), ao mesmo tempo em que garante a formação de radicais hidroxila, já que em qualquer pH o radical sulfato pode reagir para formar adicais hidroxila, a partir da Equação 16 (Matzek, 2016):

$$\text{SO}_4^{\bullet-} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{SO}_4^{2-} + \text{OH}^{\bullet} + \text{H}_3\text{O}^+$$

Equação 16

Figure 11. Gráficos obtidos do delineamento da matriz de Doehlert para otimização da combinação sinérgica de persulfato ativado por ferro e ultrassonicação para pré-tratamento de amostras de mel.



3.3.3 Avaliação do efeito de matriz

Dada a natureza complexa das amostras de mel, estudos do efeito matriz foram conduzidos. Curvas analíticas foram construídas usando calibração externa, empregando soluções aquosas padrão dos analitos preparadas em HNO_3 10% (v v⁻¹). Adicionalmente, a calibração foi realizada adicionando soluções padrão dos analitos e da amostra aos sistemas APS/H^+ e APS/OH^- . A inclinação e o intercepto obtidos das curvas de calibração construídas usando os procedimentos de digestão APS/OH^- e APS/H^+ são mostrados na Tabela 11. A avaliação do efeito matriz foi realizada através da avaliação da razão entre os coeficientes angulares das curvas de calibração. Quando esta razão tendeu a se aproximar de 1, significando que não há efeito matriz (Pires, 2019). Considerando uma variação de 15% da unidade como aceitável (Guedes, 2016; Azevedo, 2009; Ahumada, 2013; Correia, 2004), foi definido que, para a razão obtida dentro da faixa de 0,85 a 1,15, não houve efeito matriz.

As razões entre as inclinações da calibração usando calibração de adição padrão para o procedimento APS/OH^- e calibração externa foram 0,92; 0,90; 0,85; 0,89; 0,95; 0,87 e 0,94 para Zn, Co, Cd, Mn, Cr, Al e Cu, respectivamente. Esses resultados indicaram a possibilidade de determinação dos analitos em amostras de mel usando calibração externa com soluções aquosas padrão. Por outro lado, as razões entre as inclinações da calibração usando calibração de adição padrão para o procedimento APS/H^+ e calibração externa estavam fora do intervalo de 0,85 – 1,15 para todos os analitos estudados. Os resultados obtidos para a avaliação do efeito matriz sugerem que a decomposição de matéria orgânica através de APS/H^+ é menos eficaz em comparação com APS/OH^- . Essa diferença surge porque na metodologia de APS/OH^- as reações ocorrem em meio alcalino, no qual o radical sulfato apresenta maior potencial de redução, sendo assim, oxidantes mais energéticos (Matzek, 2016; Furman, 2010). Portanto, a decomposição sinérgica de matéria orgânica por radicais hidroxila e persulfato suporta o processo de forma mais eficaz.

A robustez do plasma também foi avaliada. Para isso, três amostras diferentes foram preparadas utilizando as melhores condições experimentais e levadas para análise por ICP OES. Assim, foi avaliada a razão entre as intensidades de emissão geradas para as linhas iônica (280,270) e atômica (285,213) de magnésio, $\text{Mg II}/\text{Mg I}$, com subsequente multiplicação pelo fator de correção 1,8 (da Silva, 2021; Dennaud, 2001). Os resultados para razão entre as linhas iônica e atômica do Mg foram superiores a 13, portanto, pode-se garantir que há robustez no plasma.

Tabela 11. Curvas analíticas para a determinação de Zn, Co, Cd, Mn, Cr, Al e Cu por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (mg kg^{-1}) após digestão de amostras de mel usando reações de persulfato ativado.

Procedimento de decomposição	Parâmetros da equação de calibração	Zn	Co	Cd	Mn	Cr	Al	Cu
Calibração por adição de analito usando APS/OH ⁻	Coefficiente angular	4898	4327	14271	25113	9750	2241	7388
	Coefficiente linear	3446	19	922	275929	31	328	39
	R ²	0,997	0,998	0,999	0,994	0,999	0,999	0,999
Calibração externa	Coefficiente angular	5330	4830	16755	28129	10235	2577	7855
	Coefficiente linear	133	60	198	6722	155	29	98
	R ²	0,999	0,998	0,998	0,999	0,999	0,996	0,999
Calibração por adição de analito usando APS/H ⁺	Coefficiente angular	4151	3179	13406	13172	8099	3372	9699
	Coefficiente linear	5707	255	2243	84796	348	358	597
	R ²	0,999	0,999	0,998	0,999	0,999	0,999	0,999

APS/OH⁻: combinação sinérgica de sistema de persulfato ativado por base e ativado por ferro; APS/H⁺: combinação sinérgica de sistema de persulfato ativado por ferro e ativação por ultrassonicação; R²: coeficiente de determinação.

3.3.4 Performance analítica

A curva analítica foi construída usando o procedimento de diluição ácida e calibração externa para o procedimento APS/OH⁻. As faixas lineares das curvas analíticas de calibração foram de 0,04 a 1,75 mg kg⁻¹ para Zn, 0,08 a 0,50 mg kg⁻¹ para Co, 0,008 a 0,500 mg kg⁻¹ para Cd, 0,02 a 0,50 mg kg⁻¹ para Cr, 0,2 a 0,5 mg kg⁻¹ para Al, 0,1 a 0,5 mg kg⁻¹ Cu e 0,08 a 75 mg Kg⁻¹ para Mn. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) para cada analito foram calculados como 3,3 e 10 vezes o desvio padrão de dez medições dos brancos analíticos divididos pela inclinação da curva de calibração, respectivamente, levando em consideração erros do tipo α e β , bem como a propagação de incertezas na inclinação e intercepto da curva de calibração (Olivieri, 2014). A concentração equivalente de fundo (BEC, do inglês backgorund equivalent concentration) também foi avaliada considerando a concentração do analito que gera um sinal equivalente à intensidade de emissão de fundo no comprimento de onda especificado (Santana, 2022) conforme recomendado pelas diretrizes estabelecidas pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). O BEC e a relação sinal-ruído (RSN) foram derivados usando as seguintes equações: $BEC = C_{\text{padrão}}/RSN$ e $RSN = (I_{\text{padrão}} - I_{\text{branco}}) / I_{\text{branco}}$. Aqui, $I_{\text{padrão}}$ e I_{branco} representam as intensidades de emissão do elemento de referência e da solução em branco, respectivamente, no comprimento de onda escolhido, enquanto $C_{\text{padrão}}$ denota a concentração do elemento de referência na solução (Lovaković, 2018). A precisão analítica foi estimada pela avaliação do desvio padrão relativo (RSD) a partir dos resultados de dez medidas repetidas realizadas nas amostras com adições de 0,015 e 0,1 mg kg⁻¹ dos analitos. Os parâmetros analíticos são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12. Parâmetros analíticos para determinação multielementar em amostras de mel após digestão usando combinação sinérgica de persulfato ativado por base e ferro e combinação sinérgica de ultrassonicação e persulfato ativado por ferro com subsequente determinação por ICP OES.

Procedimento de deomposição	Parâmetros analitos	Zn	Co	Cd	Mn	Cr	Al	Cu
APS/OH ⁻	Efeito de matriz	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
	Limite de detecção (LD), $\mu\text{g kg}^{-1}$	10	30	2	30	10	60	30
	Limite de quantificação (LQ), $\mu\text{g kg}^{-1}$	40	80	8	80	20	200	100
	Concentração equivalente de fundo (BEC), $\mu\text{g kg}^{-1}$	265	1109	85	319	703	3064	616

	Limite de detecção (LD) usando BEC, $\mu\text{g kg}^{-1}$	19	34	15	65	9	134	33
	Limite de quantificação (LQ) usando BEC, $\mu\text{g kg}^{-1}$	58	104	45	196	28	407	101
	RSD (0,015 mg kg^{-1}), %	2	2	3	3	2	2	2
	RSD (0,1 mg kg^{-1}), %	3	2	3	2	2	2	2
APS/H+	Efeito de matriz	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	Limite de detecção (LD), $\mu\text{g kg}^{-1}$	78	316	20	1372	36	46	90
	Limite de quantificação (LQ), $\mu\text{g kg}^{-1}$	235	959	63	4158	108	1383	273
	Concentração equivalente de fundo (BEC), $\mu\text{g kg}^{-1}$	642	3366	531	2843 5	920	3733	826
	Limite de detecção (LD) usando BEC, $\mu\text{g kg}^{-1}$	413	1880	107	1027 92	53	1149	144
	Limite de quantificação (LQ) usando BEC, $\mu\text{g kg}^{-1}$	1252	5697	324	3114 91	161	3482	437
	RSD (0,015 mg kg^{-1}), %	17	2	2	31	2	3	3
	RSD (0,1 mg kg^{-1}), %	5	2	2	39	3	2	2

Testes de recuperação foram realizados, adicionando os analitos em duas amostras de mel diferentes em concentrações diferentes: 2,5 e 5,0 mg kg^{-1} de Zn, 1,0 e 2,5 mg kg^{-1} de Cd, Co, Cr, Al e Cu, e 5,0 e 50 mg kg^{-1} para Mn. Os resultados de recuperação variaram de 80 a 120% (Tabela 13).

Tabela 13. Teste de recuperação aplicado em amostras de mel digeridas pela combinação sinérgica de persulfato ativado por base e ativado por ferro com posterior determinação multielementar por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (n=3).

Amostras	Analitos	Concentração encontrada, mg kg^{-1}	Concentração adicionada, mg kg^{-1}	Concentração encontrada, mg kg^{-1}	Recuperação, %
H3	Zn	0,18 \pm 0,06	0,1	0,29 \pm 0,01	109 \pm 5
			0,25	0,44 \pm 0,05	104 \pm 5
			0,5	0,78 \pm 0,06	120 \pm 12
			2,5	2,6 \pm 0,3	95 \pm 10
			5	5,7 \pm 0,4	109 \pm 7
	Cd	<0,008	0,1	0,089 \pm 0,002	81 \pm 6
			0,25	0,24 \pm 0,04	97 \pm 16
			0,5	0,44 \pm 0,02	86 \pm 4
			1,0	0,9 \pm 0,1	94 \pm 4
			2,5	2,4 \pm 0,3	97 \pm 10
	Co	<0,08	0,1	0,17 \pm 0,01	91 \pm 9
			0,25	0,28 \pm 0,01	80 \pm 4
			0,5	0,48 \pm 0,04	80 \pm 8
			1,0	0,9 \pm 0,1	89 \pm 9
			2,5	2,2 \pm 0,3	89 \pm 8
	Mn	1,2 \pm 0,4	0,1	1,28 \pm 0,06	80 \pm 10

			Tabela 13. continuação		
			0,25	1,44 ± 0,07	96 ± 17
			0,5	1,6 ± 0,2	82 ± 2
			5	5,8 ± 0,6	93 ± 4
			50	43,2 ± 3,2	84 ± 7
	Cr	0,12 ± 0,02	0,1	0,204 ± 0,004	84 ± 4
			0,25	0,389 ± 0,007	108 ± 2
			0,5	0,53 ± 0,04	82 ± 9
			1,0	0,9 ± 0,1	80 ± 8
			2,5	2,4 ± 0,2	91 ± 10
	Al	0,30 ± 0,06	0,1	0,38 ± 0,01	80 ± 9
			0,25	0,51 ± 0,01	84 ± 4
			0,5	0,71 ± 0,02	82 ± 5
			1,0	1,0 ± 0,2	80 ± 10
			2,5	2,4 ± 0,3	88 ± 10
	Cu	0,19 ± 0,05	0,1	0,31 ± 0,02	120 ± 20
			0,25	0,49 ± 0,01	120 ± 4
			0,5	0,61 ± 0,02	84 ± 5
			1,0	1,0 ± 0,4	84 ± 3
			2,5	2,4 ± 0,1	88 ± 2
H4	Zn	< 0.04	0.1	0.139 ± 0.006	105 ± 6
			0.25	0.31 ± 0.05	110 ± 10
			0.5	0.58 ± 0.01	108 ± 2
			2.5	2.7 ± 1.4	107 ± 8
			5	5.6 ± 0.1	112 ± 2
	Cd	<0,008	0,1	0,11 ± 0,02	103 ± 15
			0,25	0,23 ± 0,01	89 ± 4
			0,5	0,56 ± 0,05	110 ± 10
			1,0	1,0 ± 0,4	97 ± 4
			2,5	2,4 ± 0,2	95 ± 8
	Co	<0,08	0,1	0,15 ± 0,01	80 ± 4
			0,25	0,33 ± 0,02	102 ± 8
			0,5	0,48 ± 0,02	81 ± 4
			1,0	0,8 ± 0,3	80 ± 3
			2,5	2,2 ± 0,2	87 ± 9
	Mn	1,4 ± 0,1	0,1	1,48 ± 0,02	80 ± 10
			0,25	1,68 ± 0,02	112 ± 8
			0,5	1,86 ± 0,03	92 ± 5
			5	6,0 ± 2,2	94 ± 10
			50	45,9 ± 0,3	89 ± 1
	Cr	0,13 ± 0,01	0,1	0,23 ± 0,01	100 ± 10
			0,25	0,36 ± 0,01	92 ± 4
			0,5	0,53 ± 0,03	80 ± 6
			1,0	0,9 ± 0,1	82 ± 9
			2,5	2,4 ± 0,2	90 ± 8
	Al	0,21 ± 0,03	0,1	0,29 ± 0,01	80 ± 10

		Tabela 13. continuação		
		0,25	$0,51 \pm 0,02$	120 ± 8
		0,5	$0,81 \pm 0,02$	120 ± 2
		1,0	$1,1 \pm 0,8$	80 ± 9
		2,5	$2,5 \pm 0,5$	87 ± 7
Cu	$0,20 \pm 0,06$	0,1	$0,30 \pm 0,01$	100 ± 10
		0,25	$0,47 \pm 0,02$	108 ± 8
		0,5	$0,73 \pm 0,03$	106 ± 6
		1,0	$1,0 \pm 0,1$	84 ± 5
		2,5	$2,3 \pm 0,9$	86 ± 6

APS/OH⁻: combinação sinérgica de sistema de persulfato ativado por base e ativado por ferro

Os resultados obtidos pela aplicação do procedimento de digestão APS/OH⁻ e APS/H⁺ foram comparados aos resultados obtidos usando a digestão assistida por forno de micro-ondas (Azevedo, 2009) (Table 14).

Tabela 14. Determinação de Zn, Co, Cd, Mn, Cr, Al e Cu em amostras de mel pelos sistemas APS/OH⁻ e APS/H⁺ e método comparativo (valor médio ± intervalo de confiança).

Amostras		Analitos, mg kg ⁻¹												
		Zn		Cd		Co		Mn		Cr		Al		Cu
	APS/OH ⁻	Método de comparação	APS/OH ⁻	Método de comparação	APS/OH ⁻	Método de comparação	APS/OH ⁻	Método de comparação	APS/OH ⁻	Método de comparação	APS/OH ⁻	Método de comparação	APS/OH ⁻	Método de comparação
H1	0,23 ± 0,04	0,19 ± 0,13	<0,008	0,012 ± 0,001	<0,08	<0,08	1,6 ± 0,3	2,4 ± 0,8	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,03	0,41 ± 0,07	0,34 ± 0,13	0,25 ± 0,02	0,21 ± 0,04
H2	<0,04	<0,06	<0,008	0,012 ± 0,001	<0,08	<0,08	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,1	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,02	<0,20	0,22 ± 0,01	0,20 ± 0,02
H3	0,18 ± 0,06	0,16 ± 0,05	<0,008	0,010 ± 0,004	<0,08	0,09 ± 0,05	1,2 ± 0,4	1,4 ± 0,9	0,12 ± 0,02	0,11 ± 0,05	0,30 ± 0,02	0,45 ± 0,31	0,19 ± 0,02	0,18 ± 0,03
H4	<0,04	0,08 ± 0,04	<0,008	0,010 ± 0,003	<0,08	<0,08	1,4 ± 0,1	1,8 ± 0,2	0,13 ± 0,01	0,16 ± 0,08	0,21 ± 0,01	<0,20	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,01
H1	APS/H ⁺		APS/H ⁺		APS/H ⁺		APS/H ⁺		APS/H ⁺		APS/H ⁺		APS/H ⁺	
H2	<0,24		<0,06		<0,96		<4,2		<0,11		<1,4		0,50 ± 0,02	
H2	<0,24		<0,06		<0,96		<4,2		<0,11		<1,4		<0,27	

APS/OH⁻: combinação sinérgica de sistema de persulfato ativado por base e ativado por ferro; APS/H⁺: combinação sinérgica de sistema de persulfato ativado por ferro e ativação por ultrassonicação.

O teste t de student e o teste F para variância (95% de confiança) foram aplicados, e não foram observadas diferenças significativas, demonstrando a boa exatidão do procedimento APS/OH⁻ para a determinação de Zn, Co, Cd, Mn, Cr, Al e Cu em amostras de mel. Por outro lado, o APS/H⁺ apresentou diferenças significativas quando os testes estatísticos foram aplicados, indicando a necessidade de calibração por adição de analito, para Cd, Co, Cr e Cu.

Também é importante destacar as diferenças no tempo de preparo da amostra. A digestão por via úmida por micro-ondas relatada apresentou um tempo de digestão de 30 min (Leme, 2014). No procedimento proposto APS/OH⁻, não houve necessidade de sonicação ou calor; portanto, as amostras estavam prontas para serem analisadas por ICP OES após a adição dos reagentes e agitação. No procedimento APS/H⁺, a solução da amostra precisa ser sonicada por 10 min. Após a sonicação, as soluções das amostras foram diluídas e estavam prontas para serem analisadas por ICP OES. Ambos os métodos propostos consomem menos tempo do que a digestão úmida por micro-ondas.

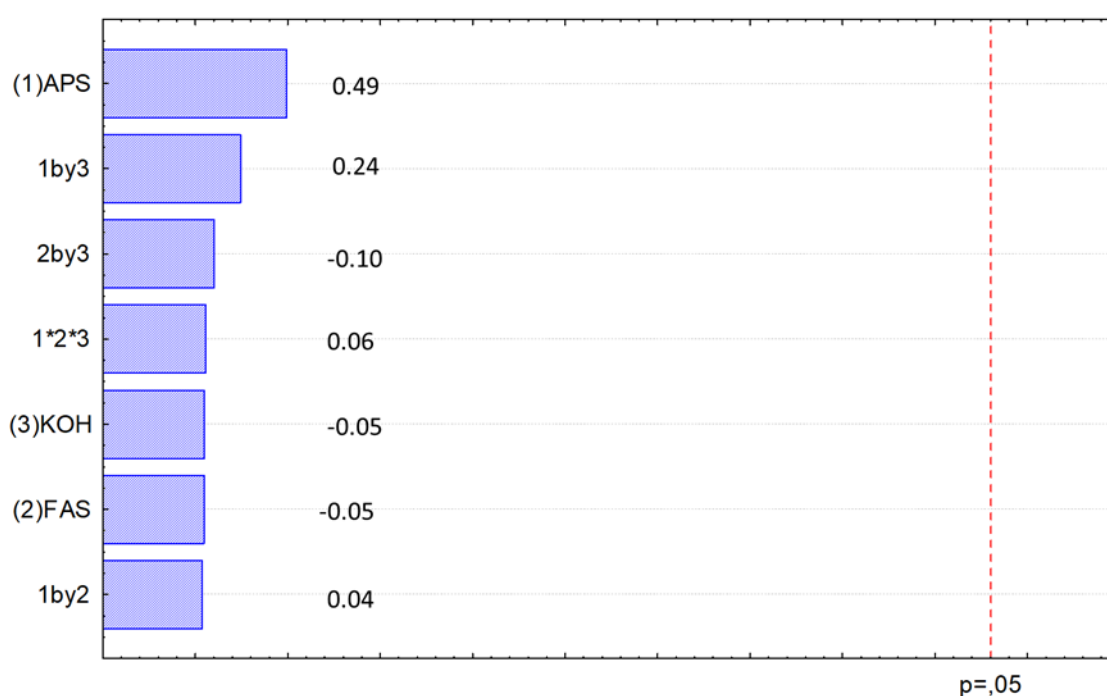
Considerando as desvantagens do método de calibração por adição padrão relacionadas à frequência analítica, consumo de reagentes e amostra e produção de resíduos, uma vez que cada amostra analisada requer sua própria curva de calibração, para considerações e análises posteriores, apenas o método APS/OH⁻ foi utilizado. Este estudo também verificou a robustez do método por meio de um planejamento fatorial completo de dois níveis (Tabela 15).

Tabela 15. Planejamento fatorial completo (2³) e desejabilidade global obtidos para teste de robustez.

Experimentos	0,5 mol L ⁻¹ APS, %	0,03 mol L ⁻¹ FAS, %	3 mol L ⁻¹ KOH, %	Desejabilidade Global
1	2,75 (+)	8,25 (+)	99 (+)	0,92
2	2,75 (+)	8,25 (+)	81 (-)	0,87
3	2,75 (+)	6,75 (-)	99 (+)	0,94
4	2,75 (+)	6,75 (-)	81 (-)	0,86
5	2,25 (-)	8,25 (+)	99 (+)	0,63
6	2,25 (-)	8,25 (+)	81 (-)	0,79
7	2,25 (-)	6,75 (-)	99 (+)	0,72
8	2,25 (-)	6,75 (-)	81 (-)	0,76
9	2,5 (0)	7,5 (0)	90 (0)	0,87
10	2,5 (0)	7,5 (0)	90 (0)	0,81
11	2,5 (0)	7,5 (0)	90 (0)	0,00

O teste de robustez considerou as condições operacionais ótimas para APS/OH⁻ (90% de 0,5 mol L⁻¹ APS, 2,5% de 0,03 mol L⁻¹ FAS e 7,5% de 3,0 mol L⁻¹ KOH) com uma variação de $\pm 10\%$. Os dados foram analisados usando ANOVA e, de acordo com os resultados obtidos, o método é robusto a variações de 10% (Figura 12).

Figura 12. Gráfico de Pareto para o planejamento fatorial completo 2³ utilizado para avaliar a robustez do procedimento através da proporção dos componentes da mistura: hidróxido de potássio, sulfato ferroso de amônio (FAS) e persulfato de amônio (APS) com efeito de cada fator e suas interações.



Os resultados da determinação de Zn, Co, Cd, Mn, Cr, Al e Cu em amostras de mel usando o método APS/OH⁻ são demonstrados na Tabela 14 e variaram de abaixo do limite de quantificação a 0,23; 1,2 a 1,6; 0,12 a 0,13; 0,17 a 0,41 e 0,19 a 0,25 mg kg⁻¹, respectivamente. Para Co e Cd, as concentrações estavam abaixo do limite de quantificação para todas as amostras. Os resultados obtidos para Zn em amostras de mel foram inferiores aos obtidos para este elemento na Hungria (3,4 e 2,0 mg kg⁻¹, de diferentes origens botânicas) (Czipa, 2015), Marrocos (1,4 - 4,3 mg kg⁻¹) (El-Haskoury, 2018) e Kosovo (8,7 - 9,8 mg kg⁻¹) (Demaku, 2023), mas semelhantes às concentrações de zinco encontradas em amostras do Egito (0,035 e 0,28 mg kg⁻¹, de diferentes origens botânicas) (Ragaba, 2020), Grécia (0,3 - 7,0 mg kg⁻¹)

(Louppis, 2017), Croácia (0,5 – 14,0 mg kg⁻¹) (Lovaković, 2018), Macedônia do Norte (0,3 – 15,0 mg kg⁻¹) (Stankovska, 2008) e Montenegro (0,5 – 4,1 mg kg⁻¹) (Vukašinović-Pešić, 2020).

As concentrações de manganês nas amostras de mel analisadas foram inferiores às encontradas no Kosovo (5,6 – 5,7 mg kg⁻¹) (Demaku, 2023) mas estão de acordo com as amostras sérvias (0,2 – 8,0 mg kg⁻¹) (Mračević, 2020), croatas (0,1 – 27,2 mg kg⁻¹) (Lovaković, 2018), húngaras (1,1 mg kg⁻¹) (Czipa, 2015), romenas (0,5 – 8,6 mg kg⁻¹) (Oroian, 2016) e etíopes (0,8 – 1,0 mg kg⁻¹) (Tibebe, 2022). As concentrações de cromo foram maiores do que as encontradas em algumas províncias da Tailândia (média 0,048 mg kg⁻¹) (Saksangawong, 2020) e Lituânia (0,019 – 0,051 mg kg⁻¹) (Šerevičienė, 2022), menores do que na Etiópia (1,20 – 4,33 mg kg⁻¹) (Weldegabriel, 2018) e 0,25 – 0,45 mg kg⁻¹ (Tibebe, 2022), mas comparáveis são as encontradas em amostras de mel de Siam, lichia e longan colhidas na Tailândia (média de 0,12 mg kg⁻¹) (Wetwitayaklung, 2017), no sul da Itália (0,020 - 2,040 mg kg⁻¹) (Perna, 2014) e Irã (0,172–1,22 mg kg⁻¹) (Aghamirlou, 2015). O teor de alumínio foi próximo ao que foi relatado na Sérvia (0,29 – 4,77 mg kg⁻¹) (Mračević, 2020) e abaixo na Croácia (1,21–20,5 mg kg⁻¹) (Bilandžić, 2017) e Grécia (média 0,91 mg kg⁻¹) (Karabagias, 2017). Os resultados para Cu estavam em boa conformidade com as concentrações na Grécia e Marrocos (média de 0,21 e 0,29 mg kg⁻¹) (Karabagias, 2017), Sérvia (<0,001 – 1,60 mg kg⁻¹) (Mračević, 2020) and média de 0,19 mg kg⁻¹ (Spirić, 2019)), Lituânia (0,024 – 0,262 mg kg⁻¹) (Šerevičienė, 2022) e Etiópia (0,09–0,4676 mg kg⁻¹) (Weldegabriel, 2018). Cádmio e cobalto apresentaram concentrações menores que 0,01 e 0,08 mg kg⁻¹, respectivamente. De forma geral, pode-se observar que os elementos determinados (Zn, Co, Cd, Mn, Cr, Al e Cu) estão entre os mais estudados na análise de amostras de mel e que os resultados encontrados são consistentes com aqueles obtidos em trabalhos anteriores.

As concentrações obtidas para os analitos estudados e a comparação com as concentrações relatadas mostraram uma estreita relação entre a concentração dos elementos nos produtos da colmeia e fatores relacionados à origem botânica e geográfica, e às espécies de abelhas produtoras, uma vez que a composição do mel é influenciada pela vegetação, clima, comportamentos específicos da espécie de abelha, nível de contaminação do solo, água, ar e fonte botânica (Silveira-Júnior, 2020; Oroian, 2016; Mduda, 2023). Em relação às normas regulatórias, para o mel, a agência reguladora sanitária brasileira (ANVISA) estabeleceu os limites máximos tolerados para Cd (0,1 mg kg⁻¹) e Cu (10 mg kg⁻¹) entre os analitos estudados

(Brasil, 2021). Os LDs e os resultados das concentrações atendem à segurança alimentar do mel de acordo com a legislação brasileira.

3.4 Avaliação da greeness do método













A técnica ICP OES tem sido usada para determinação multielementar em amostras de mel utilizando diferentes procedimentos de preparo de amostra, como digestão úmida assistida por micro-ondas (Júnior, 2020), digestão à seco (Winiarska-Mieczan, 2021; Ibourki, 2022), aquecimento em recipiente aberto (Manickavasagam, 2023) e digestão úmida em digestor de bloco (Silva, 2024). Considerando a tendência global de desenvolvimento sustentável (He, 2007), que exige que a química, e consequentemente, a química analítica, seja “limpa” ou “verde”, duas métricas verdes foram aplicadas, AGREE (Pena-Pereira, 2020) e AGREEprep (Wojnowski, 2022), a fim de verificar a concordância do método proposto e dos métodos descritos na literatura para análise de mel por ICP OES (Tabela 16) com os 12 princípios da Química Analítica Verde (GAC). A GAC enfatiza a necessidade de solventes mais seguros e menos tóxicos, menor consumo de energia e a utilização de substâncias de fontes renováveis surgindo como um caminho para alcançar a sustentabilidade (Płotka-Wasyłka, 2021).

A métrica AGREE apresenta critérios de entrada referentes aos 12 princípios de significância da GAC que são transformados em uma escala que varia de 0 a 1, recebendo diferentes pesos para cálculo. Para AGREEprep, a avaliação é baseada nos dez princípios de preparação de amostra verde (GSP) que recebem pontuações em uma escala de 0 a 1, que vai de 0 (não cumprido) a 1 (cumprido) (López-Lorente, 2022). A avaliação de verdura foi realizada mantendo os mesmos pesos para todos os critérios na métrica AGREE (Pena-Pereira, 2020), e as funções logarítmicas padrão para os critérios 2, 4, 5, 6 e 8 para AGREEprep (Wojnowski, 2022).

A pontuação obtida mostrou que o sistema proposto, baseado na oxidação avançada baseada em radicais sulfato, tem boa greeness e natureza sustentável. A pequena quantidade de amostra (0,2 g enquanto outros estudos usaram uma faixa de 0,5 a 1,0 g), as poucas etapas distintas no procedimento de preparação da amostra (apenas 3 etapas enquanto outros estudos usaram 4 ou mais etapas) e a ausência de reagentes tóxicos são as principais características que levam a esse resultado. A pontuação baixa associada ao 3º, 5º e 10º princípios foi observada para todos os métodos de comparação, e está relacionada ao posicionamento do dispositivo

analítico, automação e tipo de reagentes utilizados. Uma melhora notável na pontuação associada ao 4º e 11º princípios do AGREE e ao 4º e 5º princípios do AGREEprep é apresentada. Esses resultados garantem o alinhamento com os princípios do GAC e asseguram a natureza verde do método.

Tabela 16. Características de métodos que empregam ICP OES em análises de mel.

Analitos	Preparo de amostra	Massa de amostra, g	LD, $\mu\text{g g}^{-1}$	RSD, %	AGREE	AGREEprep	Referência
Al, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Se, V, and Zn	Digestão assistida por microondas	0,5	0,001 – 3,906	All < 10			Júnior, 2020
Cd and Pb	Digestão à seco	1,0	0,004 – 0,005	-			Winiarska-Mieczan, 2021
Zn, Cu, Fe, K, Mg, Na, Mn, P, and Ca	Digestão à seco	1,0	0,0026 – 0,15	-			Ibourki, 2022
Na, Al, Ca, Mg, Fe, Al, Cu, Zn, Cd, Mn, Ni, and As	Aquecimento em recipiente aberto	1,0	0,5– 8,5	-			Manickavasagam, 2023
Al, Ca, Cu, Fe, Li, K, Mg, Mn, Na, and Zn	Digestão em bloco digestor	0,5	0,0003 - 0,4	8 – 207			. Silva, 2024
Zn, Cd, Co, Mn, Cr, Al, and Cu	Procedimento baseado em reações de ativação de persulfato	0,2	0,008 – 0,2	All < 4			Este trabalho

3.5 Conclusão

Dois métodos analíticos diferentes baseados em reações de persulfato ativado para degradação química orgânica para determinação de Zn, Co, Cd, Mn, Cr, Al e Cu por ICP OES em amostras de mel foram comparados. O APS/OH⁻, baseado em reação de persulfato ativado por base e persulfato ativado por ferro, foi otimizado utilizando planejamento simplex centroide com restrição de mistura, apresentando bom desempenho analítico, como precisão, exatidão e robustez, sem efeito de matriz. Além disso, este método proposto obteve bom desempenho em métricas de avaliação de sustentabilidade. Por outro lado, o sistema, baseado em reação de persulfato ativado por ferro e ativação de persulfato por ultra-sonicação, foi otimizado por planejamento fatorial completo de dois níveis e matriz de Doehlert, mas apresentou efeito de matriz significativo, sugerindo que a decomposição de matéria orgânica através do procedimento APS/H⁺ é menos eficaz em comparação ao procedimento APS/OH⁻. Embora ambos os métodos possam ser usados eficientemente para a degradação de matéria orgânica em amostras de mel para subsequente determinação multielementar por ICP OES, é importante mencionar que com os métodos propostos, a determinação de ferro não é possível. Isso se deve ao uso de sulfato ferroso de amônio na formação de radicais sulfato.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

4.1 Considerações finais

Esse trabalho buscou desenvolver e validar métodos analíticos verde para amostras de produtos apícola. Em um dos métodos foi utilizando um NADES composto de ácido láctico, glicose e água, para o preparo de uma suspensão e determinação multielementar por EDXRF. Na aplicação deste método, foram estudadas as variáveis que influenciam o procedimento de preparo da suspensão e aquisição dos sinais analíticos. Como estratégia de calibração, foi utilizado a metodologia de calibração de dois pontos por correspondência de matriz, sendo que esta se mostrou eficiente para medidas analíticas utilizando amostragem por suspensão e análise por EDXRF.

A utilização dessa estratégia de calibração, junto a amostragem por suspensão, é descrita pela primeira vez para análise de amostras de pólen de abelha, e o método desenvolvido permite análises rápidas, precisas, exatas, sem a necessidade de utilização de CRMs, e sem um alto consumo de reagentes e quantidade de amostras. A utilização do NADES garantiu o preparo da suspensão, já que este solvente apresenta viscosidade adequada para manter as amostras de pólen suspensas e com homogeneidade apropriada para análise com a técnica de EDXRF. Ainda, este método foi avaliado como uma alternativa sustentável para análise de pólen, e apresentou bom desempenho nas métricas de avaliação de sustentabilidade, por apresentar poucas etapas no preparo da amostra e na calibração, resultando em menos manipulação e menor tempo de análise, ainda, neste método são utilizadas uma baixa massa de amostra e um solvente verde, NADES, o que contribui para um bom desempenho na avaliação de greeness.

Os outros dois métodos analíticos verdes desenvolvidos foram comparados entre si, pois basearam-se no mesmo mecanismo de degradação química orgânica, o qual utiliza de reações de ativação de persulfato. Ambos os métodos foram desenvolvidos para de amostras de mel e determinação multielementar por ICP OES, e apresentaram boa precisão, exatidão, robustez, rapidez, baixa demanda de energia e volumes de reagentes. O método baseado em reação de ativação de persulfato por base e por ferro, apresentou bom desempenho analítico e nenhum efeito de matriz. Por outro lado, o sistema baseado em reação de ativação de persulfato por ferro e por ultra-sonicação, apresentou efeito de matriz significativo. Assim, pode-se considerar que a decomposição de matéria orgânica através do procedimento com ferro e ultra-sonicação é menos eficaz em comparação ao procedimento de ativação de persulfato por base. Ainda, se faz necessário mencionar que a determinação de ferro não é possível, para ambos os métodos,

já que foi utilizado sulfato ferroso amoniacal na formação de radicais sulfato. Assim, metodologias que utilizam reações de ativação de persulfato, podem ser desenvolvidas para análise de mel, explorando outros mecanismos de decomposição orgânica, que permitam a análise de ferro.

Estes métodos foram avaliados por métricas de avaliação de sustentabilidade e apresentou bom desempenho, já que uma pequena quantidade de amostra (0,2 g) é utilizada, bem como apresenta poucas etapas distintas no procedimento de preparação da amostra e ausência de reagentes tóxicos.

O primeiro capítulo desta dissertação resultou um artigo de revisão intitulado *Spectrometric techniques in honeybees and beehive products analysis for elemental determination and their use as environmental indicators*, submetido no periódico *Applied Spectroscopy Reviews*. O capítulo II originou o artigo *A green analytical method using natural eutectic deep solvent for bee pollen samples preparation for multielement determination by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry* submetido na *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*. Já o terceiro capítulo resultou no artigo *Comparison of green analytical procedures based on activated persulfate reactions for organic chemical degradation for multi-element determination in honey samples by ICP OES*, publicado na revista *Microchemical journal*.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A.P., et al. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures, **Chemical Communications**, v. 9, p. 70-71, 2003.
- AGHAMIRLOU, H. M. et al. Heavy metals determination in honey samples using inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Journal of environmental health science & engineering**, v. 13, n. 1, 2015.
- AHMADI-JOUBARI, T. et al. Assessment of potentially toxic elements in vegetables and soil samples irrigated with treated sewage and human health risk assessment. **International journal of environmental analytical chemistry**, v. 103, n. 10, p. 2351–2367, 2023.
- AHUMADA, D. A.; ARIAS, L. A.; BOJACÁ, C. R. Multiresidue determination and uncertainty analysis of pesticides in soil by ultrafast liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2013.
- ALDGINI, H. M. M. et al. Determination of metals as bio indicators in some selected bee pollen samples from Jordan. **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, n. 7, p. 1418–1422, 2019.
- ALLEGRETTA, I. et al. Rapid multi-element characterization of microgreens via total-reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. **Food chemistry**, v. 296, p. 86–93, 2019.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B. et al. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of food composition and analysis**, v. 18, n. 1, p. 105–111, 2005.
- AL-SAIDA, B.; ABU-NAMEH, E. S.; AL-ABBADI, A. A. Determination and classification of Jordanian Propolis samples according to their elemental profile. **Jordan journal of chemistry**, v. 17, n. 3, p. 151–159, 2022.
- ALTUNAY, N.; ELIK, A.; GÜRKAN, R. Monitoring of some trace metals in honeys by flame atomic absorption spectrometry after ultrasound assisted-dispersive liquid liquid microextraction using natural deep eutectic solvent. **Microchemical journal**, v. 147, p. 49–59, 2019.
- ALTUNDAG, H.; BINA, E.; ALTINTIG, E. The levels of trace elements in honey and molasses samples that were determined by ICP-OES after microwave digestion method. **Biological trace element research**, v. 170, n. 2, p. 508–514, 2016.
- AMAI, R. S.; NÓBREGA, J. A.; DONATI, G. L. The interference standard method: evidence of principle, potentialities and limitations. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 7, p. 1258–1264, 2014.

ANGYUS, S. B. et al. In-situ Diffusive Gradients in thin-films passive sampling coupled with ex-situ small-sized electrothermal vaporization capacitively coupled plasma microtorch optical emission spectrometry as green and white method for the simultaneous determination of labile species of toxic elements in surface water. **Talanta**, v. 259, n. 124551, p. 124551, 2023.

ANUNCIACÃO, T. A. et al. Evaluation of slurry sampling preparation of enteral nutrition formulations for multielement determination using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Food chemistry**, v. 365, n. 130474, p. 130474, 2021.

ARABAMERI, M. et al. Analysis of elements and physicochemical and microbial properties of Iranian honeys. **Biological trace element research**, v. 202, n. 9, p. 4279–4287, 2024.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green Analytical Chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 497–511, 2008;

ASTOLFI, M. L. et al. An analytical method for the biomonitoring of mercury in bees and beehive products by cold vapor atomic fluorescence spectrometry. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 4878, 2021.

ASTOLFI, M. L. et al. Effectiveness of different sample treatments for the elemental characterization of bees and beehive products. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4263, 2020.

ATANASOV, A. et al. Assessment of heavy metals in soil, oilseed rape (*Brassica napus* L.) and honey, **Plant Soil Environment**, v. 69, p. 403-407, 2023.

AUGUSTO, A. DOS S. et al. Nutrient and contaminant quantification in solid and liquid food samples using laser-ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS): Discussion of calibration strategies. **Food analytical methods**, v. 10, n. 5, p. 1515–1522, 2017.

AYRES, L. B. et al. Big data for a deep problem: Understanding the formation of NADES through comprehensive chemical analysis and RDKit. **Journal of molecular liquids**, v. 389, n. 122891, p. 122891, 2023.

AZOOZ, E. A.; TUZEN, M.; MORTADA, W. I. Green microextraction approach focuses on air-assisted dispersive liquid–liquid with solidified floating organic drop for preconcentration and determination of toxic metals in water and wastewater samples. **Chemical papers**, v. 77, n. 6, p. 3427–3438, 2023.

BABOS, D. V. et al. Calibration strategies to overcome matrix effects in laser-induced breakdown spectroscopy: Direct calcium and phosphorus determination in solid mineral supplements. **Spectrochimica acta. Part B: Atomic spectroscopy**, v. 155, p. 90–98, 2019.

BADER, M. A systematic approach to standard addition methods in instrumental analysis. **Journal of Chemical Education**, v. 57, n. 10, p. 703, 1980.

BAKOUR, M. et al. Bee bread as a promising source of bioactive molecules and functional properties: An up-to-date review. **Antibiotics**, v. 11, n. 2, p. 203, 2022.

BAKY, M. H. et al. Bee pollen and bread as a super-food: A comparative review of their metabolome composition and quality assessment in the context of best recovery conditions. **Molecules**, v. 28, n. 2, p. 715, 2023.

BALARAM, V. Microwave plasma atomic emission spectrometry (MP-AES) and its applications – A critical review. **Microchemical journal**, v. 159, n. 105483, p. 105483, 2020.

BALLESTER-CAUDET, A. et al. A new tool for evaluating and/or selecting analytical methods: Summarizing the information in a hexagon. **Trends in analytical chemistry**, v. 118, p. 538–547, 2019.

BARGAŃSKA, Ż.; ŚLEBIODA, M.; NAMIEŚNIK, J. Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination. **Critical reviews in environmental science and technology**, v. 46, n. 3, p. 235–248, 2016.

BARNETT, W. B.; FASSEL, V. A.; KNISELEY, R. N. Theoretical principles of internal standardization in analytical emission spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 23, n. 10, p. 643–664, 1968.

BELINA-ALDEMITA, M. D. et al. Nutritional composition of pot-pollen produced by stingless bees (*Tetragonula biroi* Friese) from the Philippines. **Journal of food composition and analysis**, v. 82, n. 103215, p. 103215, 2019.

BESHAW, T.; DEMSSIE, K.; LEKA, I. Levels and health risk assessment of trace metals in honey from different districts of Bench Sheko Zone, Southwest Ethiopia. **Heliyon**, v. 8, n. 9, p. e10535, 2022.

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

BILO, F. et al. Evaluation of different quantification modes for a simple and reliable determination of Pb, Zn and Cd in soil suspensions by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 34, n. 5, p. 930–939, 2019.

BIZZI, C. A. et al. Microwave-assisted oxidation of organic matter using diluted HNO₃ under O₂ pressure: Rationalization of the temperature gradient effect for acid regeneration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2017.

BLAIMER, D.; LEOPOLD, K. Greenness of analytical methods for the study of metal-containing nanoparticles in biomedical samples, personal care products and food. **Trends in analytical chemistry**, v. 170, n. 117433, p. 117433, 2024.

BORA, F. D. et al. Unravelling heavy metal dynamics in soil and honey: A case study from Maramureş region, Romania. **Foods**, v. 12, n. 19, p. 3577, 2023.

BORQUE, L., et al. Development of an Automated Immunoturbidimetric Ferritin Assay. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.37, n. 9, p. 899, 1999.

Brasil (2021). Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instrução Normativa -IN nº 88, de 26 de março de 2021. Estabelece os limites máximos tolerados (LMT) de contaminantes em alimentos. Diário Oficial da União. 31 mar 2021;61(Seção 1):226. <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-88-de-26-de-marco-de-2021-311655598>. Accessed 23 December 2024

BROWN, R. J. C.; GILLAM, T. P. S. Comparison of quantification strategies for one-point standard addition calibration: The homoscedastic case. **Analytica chimica acta**, v. 716, p. 108–111, 2012.

CARPES, S.T. et al. Palynological and physicochemical characterization of Apis mellifera L. bee pollen in the Southern region of Brazil, **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 7, p. 667-673, 2009.

CARTER, J. A. et al. Traditional Calibration Methods in Atomic Spectrometry and New Calibration Strategies for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, 13, 2018.

CASTRO, J. P. et al. Neodymium determination in hard drive disks magnets using different calibration approaches for wavelength dispersive X-ray fluorescence. **Spectrochimica acta. Part B: Atomic spectroscopy**, v. 164, n. 105763, p. 105763, 2020.

CAUDURO, V. H. et al. Microwave-induced combustion for further determination of potentially toxic elements in honey by ICP-MS. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 416, n. 11, p. 2859–2870, 2024.

CERQUEIRA, U. M. F. M. et al. New approaches of slurry sampling as an alternative technique of sample preparing for elemental analysis. **Trends in analytical chemistry**, v. 167, n. 117277, p. 117277, 2023.

CHAIKHAN, P. et al. Deep eutectic solvent-based electromembrane hollow fiber liquid phase microextraction for determining Pb in water and food samples. **Journal of food composition and analysis**, v. 118, n. 105214, p. 105214, 2023.

CHANDRASEKARAM, K.; ALIAS, Y.; MOHAMAD, S. Dispersive membrane microextraction of substituted phenols from honey samples and a brief outlook on its sustainability using Analytical Eco-Scale and Analytical GREENness Metric approach. **Membranes**, v. 12, n. 7, p. 649, 2022.

CHOI, Y. H. et al. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? **Plant physiology**, v. 156, n. 4, p. 1701–1705, 2011.

CHUBAROV, V. M. et al. Investigation of snow cover solid phase using total-reflection x-ray fluorescence method for an assessment of the environmental pollution. **X-ray spectrometry: XRS**, v. 53, n. 5, p. 374–381, 2024.

CHUDZINSKA, M.; BARALKIEWICZ, D. Estimation of honey authenticity by multielements characteristics using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) combined with chemometrics. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 1, p. 284–290, 2010.

CHUDZINSKA, M.; DEBSKA, A.; BARALKIEWICZ, D. Method validation for determination of 13 elements in honey samples by ICP-MS. **Accreditation and quality assurance**, v. 17, n. 1, p. 65–73, 2012.

CINEGAGLIA, N. C. et al. Anticancer effects of geopropolis produced by stingless bees on canine osteosarcoma cells *in vitro*. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2013, p. 1–6, 2013.

ĆIRIĆ, J. et al. Honey bees and their products as indicators of environmental element deposition. **Biological trace element research**, v. 199, n. 6, p. 2312–2319, 2021.

CONTI, M. E. et al. Performance of bees and beehive products as indicators of elemental tracers of atmospheric pollution in sites of the Rome province (Italy). **Ecological indicators**, v. 140, n. 109061, p. 109061, 2022.

CONTI, M. E.; BOTRÈ, F. **Environmental monitoring and assessment**, v. 69, n. 3, p. 267–282, 2001.

CORREIA, P. R. M. et al. Silver as internal standard for simultaneous determination of Cd and Pb in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 19, n. 7, p. 917–922, 2004.

COSTA, V. C. et al. Feasibility of ultra-trace determination of bromine and iodine in honey by ICP-MS using high sample mass in microwave-induced combustion. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 26, p. 7957–7964, 2015.

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

DA CRUZ FERREIRA, R. et al. Essential and potentially toxic elements from Brazilian geopropolis produced by the stingless bee *Melipona quadrifasciata anthidioides* using ICP OES. **Biological trace element research**, 2020.

DA SILVA, V. H. et al. Development of a Simple and Fast Procedure Based on Acid Dilution for Determination of Macro and Microelements in Guarana-Based Beverages by ICP OES. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 7, p. 1467–1475, 2021.

SILVA, R. F. et al. Sustainable extraction bioactive compounds procedures in medicinal plants based on the principles of green analytical chemistry: A review. **Microchemical journal**, v. 175, n. 107184, p. 107184, 2022.

DAI, Y. et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica chimica acta**, v. 766, p. 61–68, 2013.

DALIPI, R. et al. Multi-element analysis of vegetal foodstuff by means of low power total reflection X-ray fluorescence (TXRF) spectrometry. **Food chemistry**, v. 218, p. 348–355, 2017.

DARWISH, A. et al. Chemical profiling and nutritional evaluation of bee pollen, bee bread, and royal jelly and their role in functional fermented dairy products. **Molecules**, v. 28, n. 1, p. 227, 2022.

DAŞBAŞI, T. et al. A new synthesis, characterization and application chelating resin for determination of some trace metals in honey samples by FAAS. **Food chemistry**, v. 203, p. 283–291, 2016.

DENNAUD, J et al. Study of ionic-to-atomic line intensity ratios for two axial viewing-based inductively coupled plasma atomic emission spectrometers. **Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy**, v. 56, n. 1, p. 101–112, 2001.

DE ANDRADE, C. K. et al. Direct determination of Cd, Pb and Cr in honey by slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometry. **Food chemistry**, v. 146, p. 166–173, 2014a.

DE ANDRADE, C. K. et al. Relationship between geographical origin and contents of Pb, Cd, and Cr in honey samples from the state of Paraná (Brazil) with chemometric approach. **Environmental science and pollution research international**, v. 21, n. 21, p. 12372–12381, 2014b.

DE ARAGÃO TANNUS, C. et al. Multielement Determination in Medicinal Plants and Herbal Medicines Containing *Cynara scolymus* L., *Harpagophytum procumbens* D.C., and *Maytenus ilifolia* (Mart.) ex Reiss from Brazil Using ICP OES. **Biological trace element research**, v. 199, n. 6, p. 2330–2341, 2021.

DE AZEVEDO, L. C. et al. A liquid chromatographic method optimization for the assessment of low and high molar mass carbonyl compounds in wines. **Journal of separation science**, v. 32, n. 20, p. 3432–3440, 2009.

DE JESUS, S. S.; MACIEL FILHO, R. Are ionic liquids eco-friendly? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 157, p. 112039, 2022;

DE LA CALLE, I. et al. Liquid-phase microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry: A review. **Analytica chimica acta**, v. 936, p. 12–39, 2016.

DE LA CALLE, I. et al. Sample pretreatment strategies for total reflection X-ray fluorescence analysis: A tutorial review. **Spectrochimica acta. Part B: Atomic spectroscopy**, v. 90, p. 23–54, 2013.

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

DE S. DIAS, F. et al. Optimization of magnetic solid phase microextraction with CoFe₂O₄ nanoparticles unmodified for preconcentration of cadmium in environmental samples by flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical journal**, v. 146, p. 1095–1101, 2019.

DE SOUZA, S. A. et al. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (jandaíra) bees. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2013, p. 1–5, 2013.

DEMAKU, S. et al. Determination of heavy metals in bee honey as a bioindicator in the istog, drenas and Kastriot regions. **Inżynieria Ekologiczna**, v. 24, n. 5, p. 191–200, 2023.

DEM KOVÁ, L. et al. Comprehensive assessment of mercury contamination in bees, bee products and moss and lichen bags. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 285, n. 117132, p. 117132, 2024.

DEVI, B. K. et al. Green Chemistry and Green Solvents: An Overview. **Current Green Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 314–325, 2020.

DIMA, G. et al. **Heavy metals in pollen samples collected from the dambovită county analysed by edxrf method**. Disponível em: <https://rjp.nipne.ro/2012_57_9-10/RomJPhys.57.p1411.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2025.

DOGO MRAČEVIĆ, S. et al. Comparative study of the chemical composition and biological potential of honey from different regions of Serbia. **Microchemical journal**, v. 152, n. 104420, p. 104420, 2020.

DONATI, G. L.; AMAIS, R. S.; NÓBREGA, J. A. Interference standard: a new approach to minimizing spectral interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 26, n. 9, p. 1827–1827, 2011.

DOS SANTOS SILVA, A. et al. Evaluation of the content of macro and trace elements and the geographic origin of honey in North Brazil through statistical and machine learning techniques. **Journal of food composition and analysis**, v. 128, n. 106050, p. 106050, 2024.

EL-DIDAMONY, S. E. et al. Bee products: An overview of sources, biological activities and advanced approaches used in apitherapy application. **Biotechnology reports**, v. 44, n. e00862, p. e00862, 2024.

EL-HASKOURY, R. et al. Ceratonia siliqua honeys from Morocco: Physicochemical properties, mineral contents, and antioxidant activities. **Journal of food and drug analysis**, v. 26, n. 1, p. 67–73, 2018.

ELIK, A.; GÜRSOY, N.; ALTUNAY, N. Sustainable vortex assisted liquid phase microextraction based on fatty acid switchable solvent for selective and accurate analysis of manganese in food samples. **Chemical papers**, v. 78, n. 5, p. 3261–3272, 2024.

ERDOĞAN, A.; ŞEKER, M. E.; KAHRAMAN, S. D. Evaluation of environmental and nutritional aspects of bee pollen samples collected from east black sea region, turkey, via

elemental analysis by ICP-MS. **Biological trace element research**, v. 201, n. 3, p. 1488–1502, 2023.

ESCUADERO, D. R. et al. Speciation analysis of atmospheric arsenic adsorbed on pollen and aerobiological samples before and during COVID-19 pandemic period. **International journal of environmental analytical chemistry**, v. 104, n. 17, p. 5761–5772, 2024.

ESKOV, E. K. et al. Content of heavy metals in melliferous vegetation, bee bodies, and beekeeping production. **Russian agricultural sciences**, v. 41, n. 5, p. 396–398, 2015.

FAOSTAT, 2022. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>, accessed: 16th may 2024

FARAJZADEH, M. A.; ABBASPOUR, M. Development of new extraction method based on liquid–liquid–liquid extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of three tricyclic antidepressants in plasma samples. **Biomedical chromatography: BMC**, v. 32, n. 8, 2018.

FARHADIYAN, S. et al. Assessment of trace elements in Iranian kefir samples by using ICP-OES technique. **International journal of environmental analytical chemistry**, p. 1–10, 2024.

FARISI, P. et al. Development of salt-induced homogenous liquid-liquid extraction based on ternary deep eutectic solvent coupled with dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of heavy metals in honey. **Journal of food composition and analysis**, v. 117, n. 105107, p. 105107, 2023.

FARSANI, G. M. et al. Determination of trace elements content of fruits from Tehran's market using ICP- OES method: a risk assessment study. **Environmental monitoring and assessment**, v. 196, n. 9, 2024.

FERNÁNDEZ, M. DE LOS Á. et al. Natural deep eutectic solvents-mediated extractions: The way forward for sustainable analytical developments. **Analytica Chimica Acta**, v. 1038, p. 1–10, 2018.

FERREIRA, S. B. et al. Greenness of procedures using NADES in the preparation of vegetal samples: Comparison of five green metrics. **Talanta Open**, v. 6, p. 100131–100131, 2022

FERREIRA, S. L. C. et al. Atomic absorption spectrometry – A multi element technique. **Trends in analytical chemistry**, v. 100, p. 1–6, 2018a.

FERREIRA, S. L. C. et al. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. **Microchemical journal**, v. 140, p. 176–182, 2018b.

FERREIRA, S. S. et al. Greenness of procedures using NADES in the preparation of vegetal samples: Comparison of five green metrics. **Talanta Open**, v. 6, n. 100131, p. 100131, 2022.

FINGER, D. et al. Propolis as an indicator of environmental contamination by metals. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 92, n. 3, p. 259–264, 2014.

FRY, K. L. et al. Tracing the sources and prevalence of class 1 integrons, antimicrobial resistance, and trace elements using European honey bees. **Environmental science & technology**, v. 57, n. 29, p. 10582–10590, 2023.

FUENTE-BALLESTEROS, A. et al. Green sample preparation methods for the analysis of bioactive compounds in bee products: A review. **Advances in Sample Preparation**, v. 6, n. 100060, p. 100060, 2023.

FURMAN, O. S.; TEEL, A. L.; WATTS, R. J. Mechanism of base activation of persulfate. **Environmental science & technology**, v. 44, n. 16, p. 6423–6428, 2010.

GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 78–84, 2013;

GAMA, E. M. et al. A simple method for the multi-elemental analysis of beer using total reflection X-ray fluorescence. **Talanta**, v. 174, p. 274–278, 2017.

GARCÍA-FLORENTINO, C. et al. Development of Total Reflection X-ray fluorescence spectrometry quantitative methodologies for elemental characterization of building materials and their degradation products. **Spectrochimica acta. Part B: Atomic spectroscopy**, v. 143, p. 18–25, 2018.

GEKIÈRE, A.; VANDERPLANCK, M.; MICHEZ, D. Trace metals with heavy consequences on bees: A comprehensive review. **The Science of the total environment**, v. 895, n. 165084, p. 165084, 2023.

GELAYE, G.; EZEZ, D.; TEFERA, M. Distribution, pollution status of metals and human health risk evaluation in honey: Chemometric approach. **Environmental Challenges**, v. 16, n. 100958, p. 100958, 2024.

GHIDOTTI, M. et al. Use of elemental profiles to verify geographical origin and botanical variety of Spanish honeys with a protected denomination of origin. **Food chemistry**, v. 342, n. 128350, p. 128350, 2021.

GHOSH, M. et al. Determination of impurities in graphite using synchrotron radiation based X-ray fluorescence spectrometry. **Applied radiation and isotopes**, v. 128, p. 210–215, 2017.

GHOSH, M.; BISWAS, S.; SWAIN, K. K. X-ray fluorescence analysis of air particulate matter generated at a welding site. **Spectrochimica acta. Part B: Atomic spectroscopy**, v. 187, n. 106328, p. 106328, 2022.

GIROLAMETTI, F. et al. Mercury in honey from the Marche region (central Italy). Risk assessment from human consumption and its use as bioindicator of environmental pollution. **Heliyon**, v. 9, n. 10, p. e20502, 2023.

GÓMEZ-NIETO, B. et al. Direct solid sampling of biological species for the rapid determination of selenium by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 1202, n. 339637, p. 339637, 2022.

GRĘDA, K. et al. Analysis of diluted honey samples from the province of Lower Silesia (Poland) by inductively coupled plasma mass spectrometry. **Spectrochimica acta. Part B: Atomic spectroscopy**, v. 217, n. 106978, p. 106978, 2024.

GUEDES, J. A. C. et al. Matrix effect in guava multiresidue analysis by QuEChERS method and gas chromatography coupled to quadrupole mass spectrometry. **Food chemistry**, v. 199, p. 380–386, 2016.

GUIMARÃES, L. B. et al. Solid phase extraction combined with energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry for multielement determination. **Applied spectroscopy reviews**, v. 58, n. 8, p. 545–561, 2023.

HABILA, M. A. et al. Thiomalic acid/ferric chloride-based deep eutectic solvent for microextraction of chromium in natural water samples prior to FAAS analysis. **International journal of environmental analytical chemistry**, v. 102, n. 8, p. 1825–1833, 2022.

HASSONA, N. M.; EL-WAHED, A. A. A. Heavy metal concentrations of beeswax (*Apis mellifera* L.) at different ages. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 111, n. 3, 2023.

HE, Y. et al. Spectroscopy: The best way toward green analytical chemistry? **Applied spectroscopy reviews**, v. 42, n. 2, p. 119–138, 2007.

HIGUERA, J. M. et al. Multi-elemental determination in meat samples using multi-isotope calibration strategy by ICP-MS. **Food Chemistry**, v. 303, p. 125395, 15 jan. 2020.

HIGUERA, J.; SILVA, A. B.; NOGUEIRA, A. R. Multi-energy calibration: A practical method for determination of macro and micro nutrients in meat by ICP OES. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2019.

HLADUN, K. R. et al. Metal contaminant accumulation in the hive: Consequences for whole-colony health and brood production in the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Environmental toxicology and chemistry**, v. 35, n. 2, p. 322–329, 2015.

HOSSEINI, S. F.; MOUSAVI, Z.; MCCLEMENTS, D. J. Beeswax: A review on the recent progress in the development of superhydrophobic films/coatings and their applications in fruits preservation. **Food chemistry**, v. 424, n. 136404, p. 136404, 2023.

HU, F.-L. et al. Standard methods for *Apis mellifera* royal jelly research. **Journal of apicultural research**, v. 58, n. 2, p. 1–68, 2019a.

HU, H. et al. In-depth proteome of the hypopharyngeal glands of honeybee workers reveals highly activated protein and energy metabolism in priming the secretion of royal jelly. **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 18, n. 4, p. 606–621, 2019b.

HU, Y. et al. Simple and eco-friendly synthesis of crude orange-peel-derived carbon nanoparticles for detection of Fe³⁺ and ascorbic acid. **Luminescence**, v. 36, n. 6, p. 1385–1394, 2021;

HUANG, S. et al. Recent advances in the chemical composition of Propolis. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19610–19632, 2014.

HUSSAIN, I. et al. Degradation of p-chloroaniline by persulfate activated with zero-valent iron. **Chemical engineering journal**, v. 203, p. 269–276, 2012.

IBÁÑEZ, B. et al. Radioprotective effects from Propolis: A review. **Molecules**, v. 28, n. 15, p. 5842, 2023.

IBOURKI, M. et al. Elemental profiling and geographical differentiation of saffron (*Crocus sativus* L.) using inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES) and principal component analysis. **Chemical data collections**, v. 41, n. 100937, p. 100937, 2022.

JONES, W. B. et al. Automated standard dilution analysis. **Journal of analytical atomic spectrometry**, v. 35, n. 1, p. 178–187, 2020.

JONES, W. B. et al. Standard dilution analysis. **Analytical chemistry**, v. 87, n. 4, p. 2321–2327, 2015.

JÚNIOR, A. D. E. F. S. et al. Multi-element composition, physicochemical and pollen attributes of honeys from the Paraguaçu River (Bahia, Brazil) by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP OES). **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 92, n. 3, 2020.

KALAYCIOĞLU, Z. et al. Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. **Food science and technology**, v. 84, p. 402–408, 2017.

KANG, Y. et al. Identification of regional industrial priority pollutants in surface water: A field study in Taihu Lake Basin. **Frontiers in environmental science**, v. 10, 2022.

KARABAGIAS, I. K. et al. Characterization and geographical discrimination of commercial Citrus spp. honeys produced in different Mediterranean countries based on minerals, volatile compounds and physicochemical parameters, using chemometrics. **Food chemistry**, v. 217, p. 445–455, 2017.

KARGARGHOMSHEH, P. et al. Evaluation of elements in Persian tahini (ardeb) using ICP-OES (inductively coupled plasma optical emission spectroscopy) method. **International journal of environmental analytical chemistry**, p. 1–15, 2023.

KARGARGHOMSHEH, P. et al. Evaluation of trace elements in coffee and mixed coffee samples using ICP-OES method. **Biological trace element research**, v. 202, n. 5, p. 2338–2346, 2024.

KARIM, A. V. et al. Iron-based persulfate activation process for environmental decontamination in water and soil. **Chemosphere**, v. 265, n. 129057, p. 129057, 2021.

KELLY, W. R. et al. Origin and early history of Die Methode des Eichzusatzes or The Method of Standard Addition with primary emphasis on its origin, early design, dissemination, and usage of terms. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 6, p. 1805–1812, 2011.

KHAKYZADEH, V. Evaluation of the performance of a hybrid advanced oxidation process for degradation of organic pollutants in aqueous media. **International journal of environmental analytical chemistry**, v. 104, n. 5, p. 1062–1071, 2024.

KHUDER, A. et al. Improvement of X-ray fluorescence sensitivity by dry ashing method for elemental analysis of bee honey. **Microchemical journal**, v. 95, n. 2, p. 152–157, 2010.

KILINÇ, Y. et al. Dual techniques for trace copper determination: DES/Dithizone based liquid phase microextraction-flame atomic absorption spectrophotometry and digital image based colorimetric probe. **Food chemistry**, v. 432, n. 137244, p. 137244, 2024.

KILINÇ, Y., ÖZDOĞAN, N. Remediation of Wastewater for Nickel Using Copper Nanoflowers with Detection by Flame Atomic Absorption Spectrometry (FAAS), **Analytical Letters**, v. 57, p. 866-875, 2024.

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

KOVÁCS, A. et al. Effect of natural deep eutectic solvents of non-eutectic compositions on enzyme stability. **Journal of molecular liquids**, v. 366, n. 120180, p. 120180, 2022.

KOVÁCS, A. et al. Modeling the physicochemical properties of natural deep eutectic solvents. **ChemSusChem**, v. 13, n. 15, p. 3789–3804, 2020.

KUMP, P.; NEČEMER, M.; ŠNAJDER, J. Determination of trace elements in bee honey, pollen and tissue by total reflection and radioisotope X-ray fluorescence spectrometry. **Spectrochimica acta. Part B: Atomic spectroscopy**, v. 51, n. 5, p. 499–507, 1996.

KUSUMA, H.S., et al. Comparison of microwave hydrodistillation and solvent-free microwave extraction for extraction of agarwood oil, Chiang Mai. **Journal of Science**, v. 46, p. 741-755, 2019.

LAI, Z. Y. et al. A review on natural based deep eutectic solvents (NADESs): fundamentals and potential applications in removing heavy metals from soil. **Environmental science and pollution research international**, v. 30, n. 55, p. 116878–116905, 2023.

- LAMBERT, O. et al. Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination. **Environmental pollution**, v. 170, p. 254–259, 2012.
- LEME, A. B. P. et al. Optimization of sample preparation in the determination of minerals and trace elements in honey by ICP-MS. **Food analytical methods**, v. 7, n. 5, p. 1009–1015, 2014.
- LISHCHUK, A. et al. Bioindication for detecting environmental risks in agrocenoses contaminated with heavy metals. **Inżynieria Ekologiczna**, v. 24, n. 8, p. 175–182, 2023.
- LIU, Y.; JIANG, B.; WANG, K. A review of fermented bee products: Sources, nutritional values, and health benefits. **Food research international**, v. 174, n. 113506, p. 113506, 2023.
- LÓPEZ-LORENTE, Á. I. et al. The ten principles of green sample preparation. **Trends in analytical chemistry**, v. 148, n. 116530, p. 116530, 2022.
- LOUPPIS, A. P. et al. Botanical discrimination of Greek unifloral honeys based on mineral content in combination with physicochemical parameter analysis, using a validated chemometric approach. **Microchemical journal**, v. 135, p. 180–189, 2017.
- LOVAKOVIĆ, B. T. et al. Multi-elemental composition and antioxidant properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey from the coastal region of Croatia: Risk-benefit analysis. **Journal of trace elements in medicine and biology**, v. 45, p. 85–92, 2018.
- MACHADO, R. C. et al. Internal standardization as a strategy to overcome non-spectral interferences in the determination of As, Cd and Pb in mineral fertilizers by synchronous vertical dual view (SVDV) ICP OES. **Analytical Methods**, v. 12, n. 1, p. 39–45, 2020.
- MACHADO, R. C. et al. Multi-energy calibration as a strategy for elemental analysis of fertilizers by microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 7, p. 1168–1172, 2018.
- MADEJCZYK, M.; BARALKIEWICZ, D. Characterization of Polish rape and honeydew honey according to their mineral contents using ICP-MS and F-AAS/AES. **Analytica chimica acta**, v. 617, n. 1–2, p. 11–17, 2008.
- MANICKAVASAGAM, G. et al. Topographical discrimination of *Heterotrigona itama* honey by their major-to-trace elements analysis using ICP-OES employed with chemometrics. **Chemical papers**, v. 77, n. 10, p. 5859–5871, 2023.
- MANOUSHI, N.; PŁOTKA-WASYLKA, J.; SAMANIDOU, V. Novel sorptive extraction techniques in bioanalysis evaluated by Blue Applicability Grade Index: The paradigm of fabric phase sorptive extraction and capsule phase microextraction. **Trends in analytical chemistry: TRAC**, v. 172, n. 117586, p. 117586, 2024.
- MARAGOU, N. C. et al. Determination of arsenic in honey, Propolis, pollen, and honey bees by microwave digestion and hydride generation flame atomic absorption. **Analytical letters**, v. 50, n. 11, p. 1831–1838, 2017.

MARGUÍ, E. et al. Analytical potential of total reflection X-ray fluorescence (TXRF) instrumentation for simple determination of major and trace elements in milk powder samples. **Food chemistry**, v. 383, n. 132590, p. 132590, 2022.

MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; DE ALMEIDA, E. X-ray fluorescence spectrometry for environmental analysis: Basic principles, instrumentation, applications and recent trends. **Chemosphere**, v. 303, n. 135006, p. 135006, 2022.

MATUSZEWSKA, E. et al. Multielemental analysis of bee pollen, Propolis, and royal jelly collected in west-central Poland. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2415, 2021.

MATZEK, L. W.; CARTER, K. E. Activated persulfate for organic chemical degradation: A review. **Chemosphere**, v. 151, p. 178–188, 2016.

MDUDA, C. A.; HUSSEIN, J. M.; MURUKE, M. H. Discrimination of honeys produced by Tanzanian stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) based on physicochemical properties and sugar profiles. **Journal of agriculture and food research**, v. 14, n. 100803, p. 100803, 2023.

MEHMETI, A. et al. Determination of heavy metals in honey by Atomic Absorption Spectrometry. **Fresenius environmental bulletin**, v. 30, p. 825-8328, 2021.

MELAKU, M.; TEFERA, W. Physicochemical properties, mineral and heavy metal contents of honey in Eastern Amhara Region, Ethiopia. **Journal of food composition and analysis**, v. 114, n. 104829, p. 104829, 2022.

MENDES, T. M. F. F.; BACCAN, S. N.; CADORE, S. Sample treatment procedures for the determination of mineral constituents in honey by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 168–176, 2006.

MERMET, J.-M. Calibration in atomic spectrometry: A tutorial review dealing with quality criteria, weighting procedures and possible curvatures. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 65, n. 7, p. 509–523, 2010.

MILNE, A. et al. Determination of Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in seawater using high resolution magnetic sector inductively coupled mass spectrometry (HR-ICP-MS). **Analytica chimica acta**, v. 665, n. 2, p. 200–207, 2010.

MISHRA, S. SUNDARAM, B. Fate, transport, and toxicity of nanoparticles: An emerging pollutant on biotic factors, **Process Safety and Environmental Protection**, v. 174, p. 595-607, 2023.

MOAAZ, E. M. et al. Eco-Friendly Chromatographic Methods for Determination of Acemetacin and Indomethacin; Greenness Profile Assessment. **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 104, n. 6, p. 1485–1491, 2021;

- MONCHANIN, C. et al. Honey bees cannot sense harmful concentrations of metal pollutants in food. **Chemosphere**, v. 297, n. 134089, p. 134089, 2022.
- MORGANO, M. A. et al. A comprehensive investigation of the mineral composition of brazilian bee pollen: geographic and seasonal variations and contribution to human diet. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2012.
- MORGANO, M. A. et al. Inorganic contaminants in bee pollen from southeastern Brazil. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 11, p. 6876–6883, 2010.
- MULLER, E. I. et al. Determination of Br, Cl and I in honey using ICP-based techniques following microwave-assisted wet digestion with alkaline H₂O₂ in a single reaction chamber. **Analytical methods**, v. 9, n. 4, p. 649–654, 2017.
- MUSIELAK, M.; SERDA, M.; SITKO, R. Ultrasensitive and selective determination of mercury in water, beverages and food samples by EDXRF and TXRF using graphene oxide modified with thiosemicarbazide. **Food chemistry**, v. 390, n. 133136, p. 133136, 2022.
- NAINU, F. et al. Pharmaceutical Prospects of Bee Products: Special Focus on Anticancer, Antibacterial, Antiviral, and Antiparasitic Properties. **Antibiotics**, v. 10, n. 7, p. 822, 2021.
- NATALI, M. et al. Assessment of trace metal air pollution in Paris using slurry-TXRF analysis on cemetery mosses. **Environmental science and pollution research international**, v. 23, n. 23, p. 23496–23510, 2016.
- NEGRI, I. et al. Honey bees (*Apis mellifera*, L.) as active samplers of airborne particulate matter. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132491, 2015.
- NG, N. et al. Amino-functionalised chrysin as adsorbent in dispersive micro-solid phase extraction of selected heavy metal ions from stingless bee honey. **Journal of food composition and analysis**, v. 123, n. 105561, p. 105561, 2023.
- NICIEJEWSKA, A. Possibility of obtaining lanthanum doped nickel coatings from baths based on deep eutectic solvents. **Ochrona Przed Korozja**, v. 1, n. 11, p. 10–15, 2022.
- NIKOLOV, B. et al. Trace element content of polyfloral honey and beeswax from the vicinity of non-ferrous metal plant. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine**, v. 76, n. 2, p. 125–131, 2019.
- NONG, Y. et al. A review of the use of beeswax in skincare. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 22, n. 8, p. 2166–2173, 2023.
- NOWAK, P. M.; WIETECH-POSŁUSZNY, R.; PAWLISZYN, J. White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. **Trends in analytical chemistry: TRAC**, v. 138, n. 116223, p. 116223, 2021.
- OH, S.-Y., et al. Oxidation of polyvinyl alcohol by persulfate activated with heat, Fe²⁺, and zero-valent iron. **Journal of hazardous materials**, v. 168, n. 1, p. 346–351, 2009.

OLIVEIRA, L. B. et al. Direct analysis of cocoa powder, chocolate powder, and powdered chocolate drink for multi-element determination by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry. **Food analytical methods**, v. 13, n. 1, p. 195–202, 2020.

OLIVEIRA, S. S. et al. Determination of essential and potentially toxic elements and their estimation of bioaccessibility in honeys. **Microchemical journal**, v. 151, n. 104221, p. 104221, 2019.

OLIVIERI, A. C. Analytical figures of merit: From univariate to multiway calibration. **Chemical reviews**, v. 114, n. 10, p. 5358–5378, 2014.

OROIAN, M. et al. Heavy metals profile in honey as a potential indicator of botanical and geographical origin. **International journal of food properties**, v. 19, n. 8, p. 1825–1836, 2016.

OSOWSKA, N.; RUZIK, L. New potentials in the extraction of trace metal using natural deep eutectic solvents (NADES). **Food analytical methods**, v. 12, n. 4, p. 926–935, 2019.

PACINI, E.; FRANCHI, G. G. Pollen biodiversity – why are pollen grains different despite having the same function? A review. **Botanical journal of the Linnean Society**, v. 193, n. 2, p. 141–164, 2020.

PARK, M. J. et al. Antioxidant capacity of major royal jelly proteins of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. **Journal of Asia-Pacific entomology**, v. 23, n. 2, p. 445–448, 2020.

PASUPULETI, R. R. et al. Eco-friendly magnetic Solid-Phase extraction and deep eutectic solvent for the separation and detection of parabens from the environmental water and urine samples. **Microchemical Journal**, v. 178, p. 107330, 2022.

PENA-PEREIRA, F.; WOJNOWSKI, W.; TOBISZEWSKI, M. AGREE—analytical GREEnness metric approach and software. **Analytical chemistry**, v. 92, n. 14, p. 10076–10082, 2020.

PEREIRA, L.; BRITO, R.; DANTAS, K. Bioaccessibility of Ca, Fe, mg, and Mn in Brazilian Propolis. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, 2023.

PÉREZ, Y. et al. Protective effect of D-002, a mixture of beeswax alcohols, against indomethacin-induced gastric ulcers and mechanism of action. **Journal of natural medicines**, v. 67, n. 1, p. 182–189, 2013.

PERNA, A. et al. Metals in honeys from different areas of southern Italy. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 92, n. 3, p. 253–258, 2014.

PIRES, L. N.; DE S. DIAS, F.; TEIXEIRA, L. S. G. Assessing the internal standardization of the direct multi-element determination in beer samples through microwave-induced plasma optical emission spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 1090, p. 31–38, 2019.

PLOEGAERTS, G. et al. Determination of metals and metalloids in traces in honey: Evaluation of different sample preparation methods and assay techniques. **Journal of Trace Elements and Minerals**, v. 4, n. 100070, p. 100070, 2023.

PŁOTKA-WASYLKA, J. et al. Green analytical chemistry as an integral part of sustainable education development. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 31, p. 100508, 2021;

POHL, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. **Trends in analytical chemistry** v. 28, n. 1, p. 117–128, 2009.

POHL, P. et al. Multivariable optimization of ultrasound-assisted solvent extraction of bee pollen prior to its element analysis by FAAS. **Microchemical journal**, v. 157, n. 105009, p. 105009, 2020a.

POHL, P. et al. Room temperature solvent extraction for simple and fast determination of total concentration of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, and Zn in bee pollen by FAAS along with assessment of the bioaccessible fraction of these elements using in vitro gastrointestinal digestion. **Journal of trace elements in medicine and biology**, v. 60, n. 126479, p. 126479, 2020b.

POHL, P.; SERGIEL, I.; STECKA, H. Determination and fractionation of metals in honey. **Critical reviews in analytical chemistry**, v. 39, n. 4, p. 276–288, 2009.

PUCHOLOBEK, G. et al. Determination of the Ca, Mn, Mg and Fe in honey from multiple species of stingless bee produced in Brazil. **Food chemistry**, v. 367, n. 130652, p. 130652, 2022.

PUCHOLOBEK, G.; ANDRADE, C. K.; QUINÁIA, S. P. Development of an analytical method for rapid metal determination in stingless bee honey. **Orbital - The Electronic Journal of Chemistry**, v. 13, n. 2, 2021.

RAEYMAEKERS, B. A prospective biomonitoring campaign with honey bees in a district of upper-Bavaria (Germany). **Environmental monitoring and assessment**, v. 116, n. 1–3, p. 233–243, 2006.

RAGAB, M. A. A.; EL-YAZBI, A. F.; EL-HAWIET, A. Fast economic electrochemical assay for vitamins and heavy mineral components in honey samples of different botanical origin. **Microchemical journal**, v. 155, n. 104770, p. 104770, 2020.

RICHTER, A. et al. ICP-OES analysis of Lithium in honey, royal jelly, bee bread, propolis, and bees following microwave-assisted sample preparation. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 455–460, 2024.

SADOWSKA, M. et al. Statistical evaluation of the effect of sample preparation procedure on the results of determinations of selected elements in environmental samples. Honey bees as a case study. **Chemosphere**, v. 279, n. 130572, p. 130572, 2021.

SAHOO, T. et al. Green solvent: Green shadow on chemical synthesis. **Current organic synthesis**, v. 17, n. 6, p. 426–439, 2020.

SAJTOS, Z. et al. Elemental analysis of Hungarian honey samples and bee products by MP-AES method. **Microchemical journal**, v. 149, n. 103968, p. 103968, 2019.

SAKSANGAWONG, C. et al. Heavy Metals in Thai Honey, **Suranaree Journal of Science and Technology**, v. 27, 2020.

SANTANA BONSUCESSO, J. et al. Efficiency of two digestion methods in determining the presence of metals (Cd, Cu, Cr, Pb and Zn) in geopropolis produced by *Melipona scutellaris*. **Revista colombiana de química**, v. 50, n. 2, p. 24–29, 2021.

SANTANA, A. P. R. et al. Synthesis of natural deep eutectic solvents using a mixture design for extraction of animal and plant samples prior to ICP-MS analysis. **Talanta**, v. 216, n. 120956, p. 120956, 2020.

SANTANA, C. M. et al. Multielement determination (essential and potentially toxic elements) in eye shadows exposed to consumption in Brazil using ICP OES. **Biometals**, v. 35, n. 6, p. 1281–1297, 2022.

SCIVICCO, M. et al. Dietary exposure to heavy metals through polyfloral honey from Campania region (Italy). **Journal of food composition and analysis**, v. 114, n. 104748, p. 104748, 2022.

ŞEKER, M. E. et al. Bee pollens as biological indicators: An ecological assessment of pollution in Northern Turkey via ICP-MS and XPS analyses. **Environmental science and pollution research international**, v. 29, n. 24, p. 36161–36169, 2022.

SEKHARAN, T. R., et al. Deep Eutectic Solvents as an Alternate to Other Harmful Solvents. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 847–860, 2021.

ŠEREVIČIENĖ, V.; ZIGMONTIENĖ, A.; PALIULIS, D. Heavy metals in honey collected from contaminated locations: A case of Lithuania. **Sustainability**, v. 14, n. 15, p. 9196, 2022.

SHARANOV, P. Y.; ALOV, N. V. Total reflection X-ray fluorescence analysis of solid metallurgical samples. **Journal of analytical chemistry**, v. 73, n. 11, p. 1085–1092, 2018.

SHISHOV, A.; GERASIMOV, A.; BULATOV, A. Deep eutectic solvents based on carboxylic acids for metals separation from plant samples: Elemental analysis by ICP-OES. **Food chemistry**, v. 366, n. 130634, p. 130634, 2022.

SHISHOV, A.; MELESOVA, M.; BULATOV, A. Three-component deep eutectic solvent-based microextraction approach for biodiesel quality control: Determination of water and metals. **Analytica chimica acta**, v. 1277, n. 341658, p. 341658, 2023.

SILVEIRA-JÚNIOR, C. E. A. et al. Botanical sources and heavy metals contents of honey produced by *Apis mellifera* in an ecotone region of the state of Bahia, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 94, n. suppl 4, 2022.

SILVEIRA-JÚNIOR, C. E. A. et al. Evaluation of honey quality of Northeast of Brazil: botanical origin and heavy metals content. **Journal of apicultural research**, v. 59, n. 4, p. 362–377, 2020.

SIPOS, L. et al. Classification of bee pollen and prediction of sensory and colorimetric attributes—A sensometric fusion approach by e-nose, e-tongue and NIR. **Sensors**, v. 20, n. 23, p. 6768, 2020.

SIQUEIRA, J. S. et al. Determination of inorganic elements in geopropolis samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Journal of apicultural research**, v. 61, n. 3, p. 400–407, 2022.

SIXTO, A. et al. Latest trends in honey contaminant analysis, challenges, and opportunities for green chemistry development. **Reviews in analytical chemistry**, v. 43, n. 1, 2024.

SIXTO, A.; MOLLO, A. Honey: Overcoming matrix complexity for direct lead determination. **Journal of food composition and analysis**, v. 139, n. 107072, p. 107072, 2025.

SLOOP, J. T. et al. Automated matrix-matching calibration using standard dilution analysis with two internal standards and a simple three-port mixing chamber. **Talanta**, v. 205, p. 120160, 2019.

SLOOP, J. T. et al. Evaluation of different approaches to applying the standard additions calibration method. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 413, n. 5, p. 1293–1302, 2021.

SLOOP, J. T. et al. Matrix-matched two-point calibration based on the standard dilution analysis method. **Microchemical journal**, v. 160, n. 105740, p. 105740, 2021.

SNEDDON, J. et al. Sample preparation of solid samples for metal determination by atomic spectroscopy—an overview and selected recent applications. **Applied spectroscopy reviews**, v. 41, n. 1, p. 1–14, 2006.

SOÓS, Á. et al. Microwave-assisted sample preparation of Hungarian raw propolis in quartz vessels and element analysis by ICP-OES and ICP-MS for geographical identification. **Talanta**, v. 233, n. 122613, p. 122613, 2021.

SOUZA, S. et al. Direct solid sample analysis of medicinal herbs for determination of Ba, Cu, Ni, V and Zn by EDXRF. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020.

SPIRIĆ, D. et al. Toxic and essential element concentrations in different honey types. **International journal of environmental analytical chemistry**, v. 99, n. 5, p. 474–485, 2019.

STANKOVSKA, E.; STAFILOV, T.; ŠAJN, R. Monitoring of trace elements in honey from the Republic of Macedonia by atomic absorption spectrometry. **Environmental monitoring and assessment**, v. 142, n. 1–3, p. 117–126, 2008.

StatSoft, Inc. 1984–2004, Tusla, EUA

STORCK, T.R., et al. Toxicity evaluation of landfill leachate after treatment by simple distillation using Danio rerio biomarkers, **Process Safety and Environmental Protection**, v. 174, p. 243–252, 2023.

SURYA, H. Deep Eutectic Solvents. **Resonance**, v. 28, n. 12, p. 1865–1874, 2024;

SVERCHKOV, I. P. et al. Method of reference samples preparation for X-ray fluorescence analysis. **Talanta**, v. 252, n. 123820, p. 123820, 2023.

T. CHIWESHE, T.; PURCELL, W.; A. VENTER, J. Evaluation of different internal standards for precious metals quantification. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 30, n. 1, p. 55, 2016.

TAKAHASHI, H. et al. Trace determination of uranium preconcentrated using graphene oxide by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. **X-ray spectrometry**, v. 48, n. 5, p. 366–374, 2019.

THAKUR, M.; NANDA, V. Composition and functionality of bee pollen: A review. **Trends in food science & technology**, v. 98, p. 82–106, 2020.

TIBEBE, D. et al. Assessment of selected heavy metals in honey samples using flame atomic absorption spectroscopy (FAAS), Ethiopia. **BMC chemistry**, v. 16, n. 1, 2022.

TOBISZEWSKI, M. et al. Green Chemistry Metrics with Special Reference to Green Analytical Chemistry, **Molecules**, v. 20, p. 10928–10946, 2015.

TOSIC, S. et al. Mineral composition of selected Serbian Propolis samples. **Journal of Apicultural Science**, v. 61, n. 1, p. 5–15, 2017.

TSUJI, K. et al. Evaluation of analysis volume in total reflection X-ray fluorescence analysis. **X-ray spectrometry: XRS**, v. 52, n. 6, p. 357–363, 2023.

TURNAU, K. et al. Metal uptake by xerothermic plants introduced into Zn-Pb industrial wastes. **Plant and soil**, v. 337, n. 1–2, p. 299–311, 2010.

TUTUN, H. et al. The content and health risk assessment of selected elements in bee pollen and propolis from Turkey. **Journal of food composition and analysis**, v. 105, n. 104234, p. 104234, 2022.

URCAN, A. C. et al. Chemical composition and biological activities of beebread – review. **Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca**, v. 74, n. 1, p. 6, 2017.

VALVERDE, S. et al. Mineral composition of bee pollen and its relationship with botanical origin and harvesting period. **Journal of food composition and analysis**, v. 119, n. 105235, p. 105235, 2023.

VANDA, H. et al. Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. **Comptes rendus. Chimie**, v. 21, n. 6, p. 628–638, 2018.

VARGA, T. et al. Honey as an indicator of long-term environmental changes: MP-AES analysis coupled with ¹⁴C-based age determination of Hungarian honey samples. **The Science of the total environment**, v. 736, n. 139686, p. 139686, 2020.

VERA CANDIOTI, L. et al. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123–138, 2014.

VIANA, J. L. M.; MENEGÁRIO, A. A.; FOSTIER, A. H. Preparation of environmental samples for chemical speciation of metal/metalloids: A review of extraction techniques. **Talanta**, v. 226, n. 122119, p. 122119, 2021.

VIEIRA, H. P.; NASCENTES, C. C.; WINDMÖLLER, C. C. Development and comparison of two analytical methods to quantify the mercury content in honey. **Journal of food composition and analysis**, v. 34, n. 1, p. 1–6, 2014.

VIRGILIO, A. et al. Multi-energy calibration applied to atomic spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 982, p. 31–36, ago. 2017.

VUKAŠINOVIĆ-PEŠIĆ, V. et al. Using chemometric analyses for tracing the regional origin of multifloral honeys of Montenegro. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 210, 2020.

WELDEGABRIEL, Y., CHANDRAVANSI, B.S., MOGES, G. Assessment of trace metals and physicochemical parameters of commercially available honey in Ethiopia. **Chemie International**, v. 4, p. 91-101, 2018.

WELZ, B. et al. Continuum source atomic absorption spectrometry: Past, present and future aspects - A critical review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2014.

WETWITAYAKLUNG, P., WANGWATTANA, B. NARAKORNWIT, W. Determination of trace-elements and toxic heavy minerals in Thai longan, litchi and Siam weed honeys using ICP-MS, **International Food Research Journal**, v. 25, p. 1464-1473, 2017.

WILLIAMS, C. B.; DONATI, G. Multispecies calibration: a novel application for inductively coupled plasma tandem mass spectrometry. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 33, n. 5, p. 762–767, 2018.

WINIARSKA-MIECZAN, A. et al. Evaluation of consumer safety of Polish honey—the content of Cd and Pb in multifloral, monofloral and honeydew honeys. **Biological trace element research**, v. 199, n. 11, p. 4370–4383, 2021.

WOJNOWSKI, W. et al. AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. **Trends in analytical chemistry: TRAC**, v. 149, n. 116553, p. 116553, 2022.

XIAO, J. et al. Analysis of honey bee exposure to multiple pesticide residues in the hive environment. **The Science of the total environment**, v. 805, n. 150292, p. 150292, 2022.

XU, H. et al. Improving PMS oxidation of organic pollutants by single cobalt atom catalyst through hybrid radical and non-radical pathways. **Applied catalysis. B, Environmental**, v. 263, n. 118350, p. 118350, 2020.

XUE, D.-S. et al. Quantitative verification of 1:35 diluted fused glass disks with 10 mg sample sizes for the wavelength-dispersive X-ray fluorescence analysis of the whole-rock major elements of precious geological specimens. **Spectrochimica acta. Part B: Atomic spectroscopy**, v. 193, n. 106433, p. 106433, 2022.

YAVUZ, E.; TOKALIOĞLU, Ş.; PATAT, Ş. Core-shell Fe₃O₄ polydopamine nanoparticles as sorbent for magnetic dispersive solid-phase extraction of copper from food samples. **Food chemistry**, v. 263, p. 232–239, 2018.

YÜCEL, Y.; SULTANOĞLU, P. Characterization of Hatay honeys according to their multi-element analysis using ICP-OES combined with chemometrics. **Food chemistry**, v. 140, n. 1–2, p. 231–237, 2013.

ZARIĆ, N. M. et al. Use of honeybees (*Apis mellifera* L.) as bioindicators for assessment and source appointment of metal pollution. **Environmental science and pollution research international**, v. 24, n. 33, p. 25828–25838, 2017.

ZARIĆ, N. M.; BRODSCHNEIDER, R.; GOESSLER, W. Honey bees as biomonitors – Variability in the elemental composition of individual bees. **Environmental research**, v. 204, n. 112237, p. 112237, 2022.

ZERGUI, A.; BOUDALIA, S.; JOSEPH, M. L. Heavy metals in honey and poultry eggs as indicators of environmental pollution and potential risks to human health. **Journal of food composition and analysis**, v. 119, n. 105255, p. 105255, 2023.

ZHAI, M. et al. Simultaneous removal of pharmaceuticals and heavy metals from aqueous phase via adsorptive strategy: A critical review. **Water research**, v. 236, n. 119924, p. 119924, 2023.

ZHAO, W. et al. Deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted extraction in soil samples preparation and elemental determination by ICP-OES. **Analytical sciences**, v. 40, n. 2, p. 263–270, 2024.

ZHONG, Y. et al. Progress of environmental sample preparation for elemental analysis. **Journal of chromatography A**, v. 1681, n. 463458, p. 463458, 2022.

ZHOU, J. et al. Jujube honey from China: Physicochemical characteristics and mineral contents. **Journal of food science**, v. 78, n. 3, 2013.

ZHOU, X.; TAYLOR, M. P.; DAVIES, P. J. Tracing natural and industrial contamination and lead isotopic compositions in an Australian native bee species. **Environmental pollution**, v. 242, p. 54–62, 2018.

ZHU, L. et al. Liquid–liquid equilibria of ternary systems of 1-hexene/hexane and extraction solvents. **Chemical papers**, v. 0, n. 0, 2016.

ZULHENDRI, F. et al. Antiviral, antibacterial, antifungal, and antiparasitic properties of Propolis: A review. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1360, 2021.