



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO  
PARA DETERMINAÇÃO DE SACAROSE EM MEL POR  
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE INTERAÇÃO HIDROFÍLICA  
ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

**LEANDRO ANTUNES DE SÁ PLOÊNCIO**

Florianópolis  
Dezembro/2016

**Leandro Antunes de Sá Ploêncio**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA  
DETERMINAÇÃO DE SACAROSE EM MEL POR CROMATOGRAFIA  
LÍQUIDA DE INTERAÇÃO HIDROFÍLICA ACOPLADA À  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Relatório apresentado ao Departamento de Química  
da Universidade Federal de Santa Catarina,  
como requisito parcial da disciplina de  
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

**ORIENTADOR: Prof. Dr. GUSTAVO AMADEU MICKE**

**COORIENTADOR: Dr. HEITOR DAGUER**

Florianópolis  
Dezembro/2016

**Leandro Antunes de Sá Ploêncio**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA  
DETERMINAÇÃO DE SACAROSE EM MEL POR CROMATOGRAFIA  
LÍQUIDA DE INTERAÇÃO HIDROFÍLICA ACOPLADA A  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

---

Prof. Dr. Luciano Vitali  
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke  
Orientador

---

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

---

Dra. Jessee Severo Azevedo Silva

Florianópolis  
Dezembro/2016

## **AGRADECIMENTOS**

A conclusão deste trabalho não seria possível sem a colaboração de algumas pessoas e instituições, assim:

Agradeço ao LANAGRO por permitir que pudesse realizar este projeto dentro de suas dependências. Também à equipe da Seção Laboratorial Avançada de São José, pelo apoio e incentivo, em especial ao meu co-orientador, Dr. Heitor Daguer, e ao colega M.Sc. Luciano Molognoni pelos conselhos e dedicação para que fosse realizada a conclusão deste estudo.

Ao meu professor e orientador, Dr. Gustavo Micke, pela confiança e suporte prestados na elaboração desse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (FAPESC) pela concessão da bolsa de estudos.

À minha família e namorada que foram pessoas fundamentais não só no período de elaboração deste trabalho, como também em toda minha graduação.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	12
<b>2.1. Mel</b> .....	12
<b>2.2. Açúcar</b> .....	12
<b>2.2.1. Sacarose</b> .....	13
<b>2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)</b> .....	14
<b>2.4. Cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC)</b> .....	15
<b>2.5. Espectrometria de massas (MS)</b> .....	15
<b>2.6. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)</b> .....	17
<b>2.7. Validação analítica</b> .....	17
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>3.1. Objetivo geral</b> .....	19
<b>3.2. Objetivos específicos</b> .....	19
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	20
<b>4.1. Solventes e padrão</b> .....	20
<b>4.2. Preparo das amostras</b> .....	20
<b>4.3. Instrumentação</b> .....	21
<b>4.3.1. Espectrometria de massas</b> .....	21
<b>4.3.2. Cromatografia líquida</b> .....	21
<b>4.4. Desempenho do método</b> .....	22
<b>4.4.1. Linearidade/faixa de trabalho</b> .....	22

4.4.2. Seletividade .....	23
4.4.3. Efeito de matriz.....	23
4.4.4. Recuperação/precisão.....	23
4.4.5. Limites de detecção e quantificação.....	24
4.5. Aplicação do método .....	24
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
5.1. Desenvolvimento do método.....	25
5.2. Desempenho do método.....	30
5.2.1. Linearidade/faixa de trabalho .....	30
5.2.2. Seletividade .....	31
5.2.3. Efeito de matriz.....	32
5.2.4. Recuperação/precisão.....	33
5.2.5. Limites de detecção e quantificação.....	34
5.2.6. Aplicação do método.....	34
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>37</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema da formação da molécula de sacarose.....	13
<b>Figura 2.</b> Esquema de um cromatógrafo líquido.....	14
<b>Figura 3.</b> Esquema de uma fonte de ionização ESI.....	16
<b>Figura 4.</b> Espectro de massas da molécula da sacarose no Q2.....	25
<b>Figura 5.</b> Representação das quebras no Q2.....	26
<b>Figura 6.</b> Otimização da energia de colisão .....	26
<b>Figura 7.</b> Comparação das colunas cromatográficas .....	27
<b>Figura 8.</b> Comparação de cromatogramas de fase móvel e padrão de sacarose ....	29
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas de uma amostra de mel e amostra de mel fortificada .....	31
<b>Figura 10.</b> Estudo do efeito de matriz para sacarose em mel.....	32

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Propriedades físico-químicas da sacarose. ....	14
<b>Tabela 2.</b> Definições de alguns parâmetros de validação importantes .....	18
<b>Tabela 3.</b> Níveis de fortificação do padrão para avaliação da precisão e recuperação .....	24
<b>Tabela 4.</b> Condições otimizadas da espectrometria de massas .....	27
<b>Tabela 5.</b> Condições otimizadas da cromatografia líquida para análise de sacarose.....	28
<b>Tabela 6.</b> Resultado das curvas de calibração construídas em matriz .....	30
<b>Tabela 7.</b> Resultados do estudo de precisão e recuperação .....	33
<b>Tabela 8.</b> Resultados das concentrações de sacarose nas amostras analisadas ....	34



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABNT** - Associação Brasileira de Normas Técnicas

**ACN** – Acetonitrila

**AF** – Ácido fórmico

**APCI** - ionização química a pressão atmosférica

**APPI** - fotoionização a pressão atmosférica (do inglês, *atmospheric pressure photospray ionization*)

**CV** - Coeficiente de variação

**Cps** – Contagens por segundo (do inglês, *counts per second*)

**DP** - Desvio Padrão

**DPR** - Desvio Padrão Relativo

**EC** - Comissão Europeia

**ESI** – ionização eletrospray (do inglês, *electrospray ionization*)

**FD** – Fator de diluição

**HILIC** – Cromatografia líquida de interação hidrofílica (do inglês, *hydrophilic interaction liquid chromatography*)

**HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *high performance liquid chromatography*)

**HPLC-ELSD** - Cromatografia líquida de alta eficiência com detector evaporativo com espalhamento de luz (do inglês, *High performance liquid chromatography - evaporative light scattering detector*)

**INMETRO** - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade

**LANAGRO** - Laboratório Nacional Agropecuário

**LC-MS** - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês, *mass spectrometry by liquid chromatography*)

**LOD** - Limite de detecção (do inglês, *limit of detection*)

**LOQ** - Limite de quantificação (do inglês, *limit of quantification*)

**m/z** – Razão massa carga

**MAPA** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

**MeOH** - Metanol

**MMR** - Monitoramento múltiplo de reação (do inglês, *multiple reaction monitoring*)

**MS/MS** - Analisador de massas em sequência, modo *tandem*

**Q** - Quadrupolo

**R<sup>2</sup>** - Coeficiente correlação da reta

**REC** - Recuperação

**SLAV** - Seção Laboratorial Avançada de Santa Catarina

**TOF** – Tempo de voo (do inglês, *time of flight*)

**TR** – Tempo de retenção

## RESUMO

Assim como diversos outros alimentos, no mel também ocorrem fraudes com intuito de aumentar a produção. Uma delas é a adição de sacarose, durante ou após sua produção, sendo necessário um método para determinar a concentração de sacarose em mel, verificando assim se este se encontra de acordo com a legislação vigente. Métodos clássicos utilizam reagentes perigosos e muitas vezes são demorados. Este trabalho propôs o desenvolvimento de uma metodologia, para determinação de sacarose em mel, rápida e confiável. Tendo seu desempenho avaliado com parâmetros experimentais. A técnica escolhida foi a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS), técnica essa conhecida pela alta sensibilidade e seletividade. O modo de separação escolhido foi a interação hidrofílica (HILIC) uma vez que a sacarose é uma molécula bastante hidrofílica. A coluna utilizada é revestida com grupo amino ( $\text{NH}_2$ ), com dimensões 150 x 2.0 mm e 3 $\mu$ , e a fase móvel é composta por solvente orgânico com pequena proporção de água (80% de ACN e 20% de  $\text{H}_2\text{O}$ ). O volume de injeção utilizado foi de 10  $\mu\text{L}$ , o fluxo foi de 250  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  com um tempo total de análise de 15 minutos. As transições de quantificação e confirmação foram 340,91/179,00 e 340,91/119,10 m/z, respectivamente. A faixa de trabalho foi de 10 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  sendo essa linear. O método não apresentou efeito de matriz e os parâmetros de seletividade, recuperação e precisão se mostraram dentro da faixa aceitável proposta. O LOQ obtido foi de 10,0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  e o LOD foi de 5,0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . O preparo de amostra foi apenas a diluição do mel com solução de acetonitrila e água, utilizando fatores de diluição de 10 mil e 50 mil. Foram encontradas concentrações que variam de 0,8 a 11% de sacarose no mel, provando a existência de não-conformidade em relação ao analito em estudo, uma vez que o limite máximo estipulado pela legislação vigente é de 6%. Dessa forma, fica evidente que é necessário controle rigoroso pelos órgãos responsáveis, garantindo a qualidade do mel.

*Palavras-chave: Mel, sacarose, HPLC-MS, HILIC*

## 1. INTRODUÇÃO

O mel é um alimento altamente consumido, merecendo assim ter sua qualidade comprovada com análises laboratoriais para comprovar sua identidade e qualidade e garantir que não haja adulterações em sua composição.

Uma das adulterações realizadas no mel, a adição direta de sacarose no produto final ou durante o processo de produção, com intuito de aumentar a quantidade produzida, interfere diretamente na sua qualidade.

Diversos ensaios podem ser realizados para comprovar a qualidade do mel como: umidade, acidez, minerais, sólidos insolúveis, açúcares redutores, açúcares totais. Grande parte dos métodos utilizados para determinação dos açúcares redutores e totais se baseia em técnicas clássicas, como volumetria ou reação com reagentes específicos. Muitas vezes esses métodos envolvem o uso de substâncias insalubres e perigosas, além de serem morosos, de difícil execução e gerarem grandes volumes de resíduos químicos.

Portanto, é desejável que haja um método rápido, com baixo consumo de reagentes, confiável e reprodutivo para uma rotina de análises, utilizando uma técnica moderna e conhecida pela sua precisão e seletividade, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Assim, este trabalho busca desenvolver, com auxílio de estudos existentes na literatura, um método capaz de quantificar a concentração de sacarose presente no mel e também comprovar sua eficiência com testes experimentais, para que possíveis adulterações no produto sejam detectadas.

Este trabalho foi desenvolvido na Seção Laboratorial Avançada (SLAV), sendo esta uma unidade avançada do Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS), pertencente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizada no município de São José, estado de Santa Catarina.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. Mel**

É um alimento natural produzido por abelhas melíferas, principalmente, a partir do néctar de diversas espécies de flores. De acordo com a regulamentação brasileira, o mel pode ser classificado de acordo com sua origem: mel floral, obtido dos néctares das flores; melato ou mel de melato, obtido principalmente a partir de secreções das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas.<sup>1</sup>

Trata-se de uma solução composta, principalmente de carboidratos, contendo também, em menor quantidade, uma complexa mistura de minerais, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonoides, ácidos fenólicos e enzimas.<sup>2</sup>

Seu consumo como alimento vem crescendo como uma alternativa natural ao açúcar refinado. Vem crescendo também seu uso na medicina popular sob diversas formas fitoterápicas, devido às suas inúmeras propriedades terapêuticas já comprovadas.<sup>3</sup>

No mel, cerca de 75% dos açúcares são representados por monossacarídeos. Em torno de 10 a 15% são dissacarídeos, havendo ainda pequenas quantidades de outros açúcares. Os açúcares presentes no mel são responsáveis por propriedades como valor energético, viscosidade, higroscopicidade e granulação. Os monossacarídeos estão representados pela frutose (em média 38,5%) e glicose (em média 31,0%). Já os dissacarídeos estão representados, principalmente, pela sacarose (em média 2,3%) e maltose (em média 7,3%). Porém, esses níveis variam consideravelmente de acordo com a fonte do qual o néctar é extraído.<sup>4</sup>

A legislação brasileira estabelece limites mínimos de açúcares redutores como 65,0% para mel floral e 60,0% para melato. Também são estabelecidos limites máximos para sacarose, sendo 6,0% para mel floral e 15,0% para melato.<sup>1</sup>

### **2.2. Açúcar**

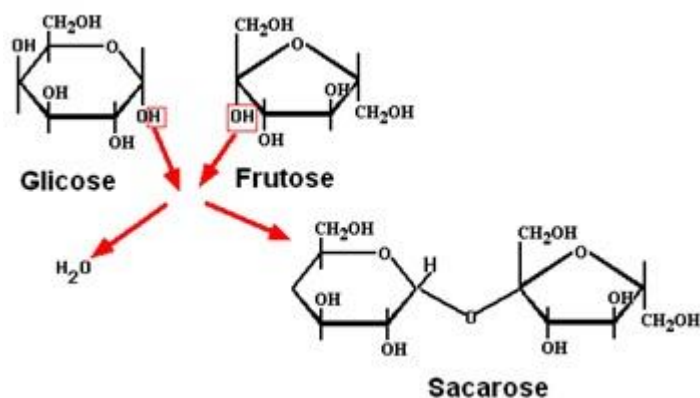
Açúcar é o nome comumente relacionado aos carboidratos mais simples como, por exemplo, a glicose (principal açúcar do sangue), a frutose (açúcar das frutas e do mel) e a sacarose (conhecido como açúcar comum ou refinado).

Os carboidratos mais simples, aqueles que não sofrem hidrólise, são chamados de monossacarídeos. Já aqueles que sofrem hidrólise produzindo duas moléculas de monossacarídeos são os chamados dissacarídeos. <sup>5,6</sup>

### 2.2.1. Sacarose

Um dos açúcares mais conhecidos e utilizados é a sacarose. É obtida, principalmente, da cana-de-açúcar e da beterraba. É o dissacarídeo mais abundante, sendo encontrada em todos os vegetais fotossintéticos. É formada por uma molécula de glicose e uma molécula de frutose, nesse processo de formação ocorre a liberação de uma molécula de água, como representado na figura 1. Assim, frutose e glicose se ligam em uma ligação chamada glicosídica, formando a molécula de sacarose. Por não possuir um grupo aldeído ou cetona livre, uma vez que as duas hexoses apresentam uma união glicosídica envolvendo os carbonos ligados à carbonila, é considerada um açúcar não-redutor. <sup>6,7</sup>

**Figura 1.** Esquema da formação da molécula de sacarose



Fonte: Próprio autor

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas da sacarose.

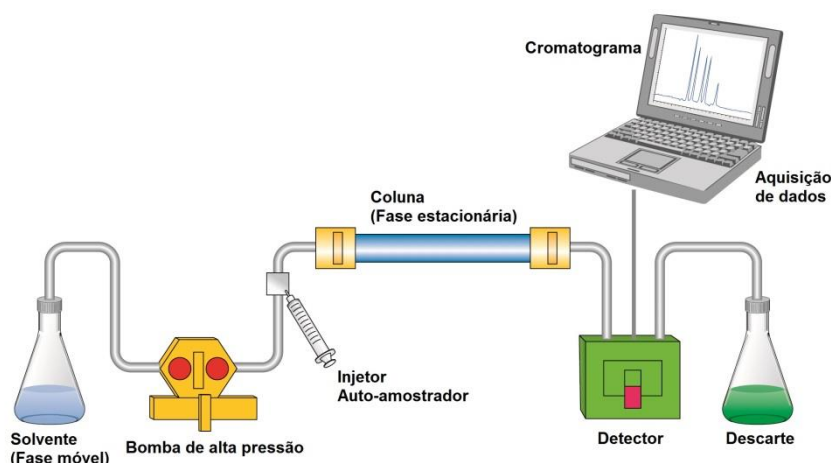
Fórmula química	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>
Massa molar	342,29 g.mol <sup>-1</sup>
Densidade	1,587 g/cm <sup>3</sup>
Ponto de fusão	185,0°C
Solubilidade em água	1,79 g/mL

### 2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A mais utilizada das técnicas de separação é a cromatografia líquida. Entre as razões para sua popularidade estão a sua capacidade de adaptação às determinações quantitativas com exatidão, a sua adequação para separação de compostos não voláteis e, acima de tudo, a sua ampla aplicação a substâncias de interesse para indústria e pesquisas científicas.<sup>8</sup>

A separação da amostra se dá quando o solvente, também denominado eluente ou fase móvel, é impulsionado, por uma bomba de alta pressão em direção à coluna. No caminho, a amostra é introduzida na fase móvel, por meio de uma válvula de injeção de amostra, sendo arrastada para a coluna, na qual ocorre a separação. O eluente da coluna é direcionado para um detector, que acusa a presença dos analitos eluídos da mesma. Como pode ser visto no esquema da figura 2.<sup>9</sup>

**Figura 2.** Esquema de um cromatógrafo líquido



Fonte: *G.I.T. Laboratory Journal*\*

\* Disponível em: <http://www.laboratory-journal.com/applications/analytics/hplc-analysis>. Acesso em setembro de 2016.

Dois tipos de cromatografia podem ser distinguidos com base nas polaridades relativas das fases móvel e estacionária. Por ter sido utilizada primeiro, denominou-se cromatografia em fase normal aquela onde as fases estacionárias são altamente polares e as fases móveis relativamente apolares, assim o componente menos polar é eluído primeiro. Já na cromatografia em fase reversa, a fase

estacionária é apolar e a fase móvel é um solvente relativamente polar, fazendo com que o componente mais polar elua primeiro.<sup>9</sup>

#### **2.4. Cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC)**

Cromatografia líquida de interação hidrofílica vem sendo um modo utilizado como uma alternativa para separação de compostos polares. Seu uso vem crescendo nos últimos anos, especialmente com o desenvolvimento de colunas mais estáveis e apropriadas para uso nesse modo.<sup>10</sup>

Trata-se de uma forma de cromatografia líquida que utiliza uma separação do tipo fase normal, especialmente a fase estacionária, porém com elementos de fase reversa, em especial a fase móvel. Sendo assim, utiliza como fase estacionária colunas polares, como por exemplo sílica e amino. Como fase móvel se utilizam solventes orgânicos, como por exemplo acetonitrila e metanol, com pequena proporção de água. Portanto, quanto maior a polaridade do soluto, maior será a retenção na fase estacionária.<sup>11</sup>

#### **2.5. Espectrometria de massas (MS)**

Os princípios fundamentais da técnica datam do fim do século XIX, quando J.J. Thomson determinou a razão massa/carga do elétron. A introdução de instrumentos comerciais baratos e de fácil manutenção que oferecem alta resolução tornou a espectrometria de massas uma técnica indispensável em vários campos de aplicação.<sup>8</sup>

Um espectrômetro de massas pode ser dividido em cinco componentes básicos. O primeiro é a unidade de *entrada da amostra* (somente amostras ionizáveis podem ser analisadas), trazendo a amostra da pressão atmosférica para pressão mais baixa, utilizada no equipamento, e também levando ao segundo componente, a *fonte de ionização*, onde a amostra é transformada em íons na fase gasosa. Em seguida, o *analisador de massas* separa os íons da amostra baseado em sua razão massa/carga ( $m/z$ ). O íons são contados pelo *detector* tendo sinal registrado e processado pelo *sistema de dados* (computador).<sup>12</sup>

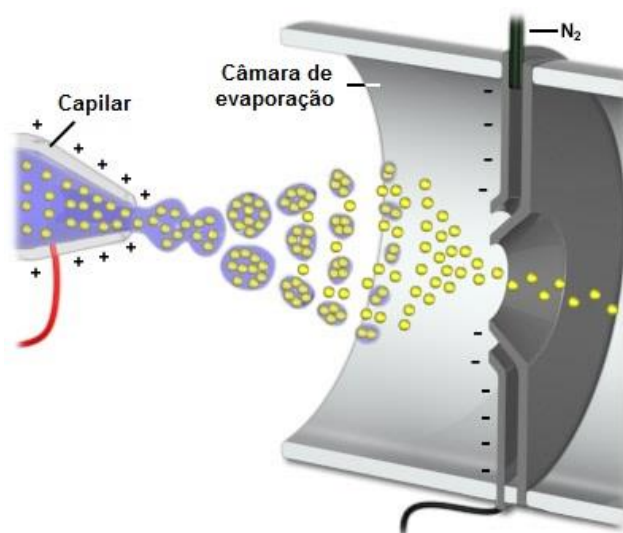
Três tipos de fonte de ionização são comumente acoplados a um espectrômetro de massas, são eles: ionização por eletro-spray (ESI, do inglês *electrospray ionization*), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e



fotoionização a pressão atmosférica (APPI, do inglês *atmospheric pressure photospray ionization*).<sup>13</sup>

A fonte de ionização mais utilizada e estudada é a ESI, por ser ideal para compostos polares, iônicos e de alto peso molecular. Nela formam-se íons através de um tubo capilar, que borrifa as moléculas em uma câmara aquecida e de alta voltagem. As gotículas tornam-se então carregadas e recebem um gás de secagem no contra fluxo, que evapora as moléculas de solvente (geralmente MeOH ou ACN). Como pode ser visualizado no esquema da figura 3. Esse método de ionização permite a formação de íons positivos ou negativos, de acordo com a seletividade da molécula no ensaio.<sup>14,15</sup>

**Figura 3.** Esquema de uma fonte de ionização ESI



Fonte: *The National High Magnetic Field Laboratory*\*

\* Disponível em: <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/esi>. Acesso em setembro de 2016.

Entre os analisadores de massas os mais populares são o aprisionador de íons, tempo de voo (TOF) e o quadrupolo (Q). Sendo o quadrupolo mais utilizado, é composto de quatro barras sólidas paralelas na direção do feixe de íons. Estão disponíveis equipamentos que contêm de forma sequencial, dois ou mais analisadores de massa, chamados de MS/MS ou em Tandem. Em um equipamento com três quadrupolos, a seletividade aumenta consideravelmente, pois no Q1 o analito é filtrado com a massa molar selecionada; no Q2, ocorrerá a quebra da molécula e, no Q3, filtra-se a massa de um fragmento específico.<sup>8,9</sup>

## 2.6. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS)

A popularização das duas técnicas mostrou aos usuários o que cada uma delas tem de melhor: a cromatografia como uma técnica de separação e a espectrometria de massas, como uma técnica de identificação.<sup>9</sup>

Ao unir um sistema de separação robusto e eficiente com um sistema de detecção de alta seletividade e sensibilidade, aumentamos a possibilidade de uma identificação inequívoca dos analitos presentes nas amostras ao utilizarmos os parâmetros de tempo de retenção, da cromatografia líquida, e espectro de massas.<sup>16</sup>

Atualmente, a maior utilização da espectrometria de massas é acoplada a um equipamento de cromatografia. O sucesso das técnicas em conjunto pode ser compreendida analisando os três passos principais: primeiro, os componentes da amostra são separados no sistema de cromatografia. Em seguida, os íons gerados são separados de acordo com a sua razão  $m/z$  no analisador de massas e finalmente a abundância de cada íon é medida. Esses passos são para equipamentos dotados de apenas um analisador de massa, porém quando estes são colocados de forma sequencial, gera-se um aumento significativo na sensibilidade e seletividade da técnica.<sup>17</sup>

## 2.7. Validação analítica

A validação de um procedimento analítico visa demonstrar que o mesmo é adequado aos objetivos propostos, ou seja, que os parâmetros de desempenho avaliados atendem aos critérios de aceitação estabelecidos. Visa também garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, conferindo-lhes rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade para a tomada de decisões.<sup>18</sup>

De acordo com o documento da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) denominado ABNT NBR ISO/IEC 17025<sup>19</sup>, que traz como definição de validação: “a confirmação por exame e fornecimento de evidências objetivas de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos”. Já segundo EURACHEM<sup>20</sup>, um método deve ser validado quando é necessário verificar se os desempenhos dos parâmetros estão adequados para situações particulares, como na criação e desenvolvimento de um método pelo próprio laboratório.

Uma validação analítica se faz necessária sempre que forem implementados métodos criados ou desenvolvidos no laboratório, métodos normalizados, métodos

normalizados usados fora dos escopos para os quais foram concebidos e ampliações e modificações de métodos normalizados.<sup>21</sup>

Na tabela 2 estão definidos os parâmetros de validação utilizados neste estudo:

**Tabela 2.** Definições de alguns parâmetros de validação importantes

Linearidade	Capacidade do método produzir resultados diretamente proporcionais às concentrações na faixa de interesse.
Seletividade/especificidade	Capacidade de distinguir a substância a analisar de outras substâncias interferentes.
Efeito de matriz	Tem por objetivo detectar possíveis interferências causadas pelas diversas substâncias que compõem a matriz.
Precisão	Estimativa da dispersão de resultados entre ensaios independentes, podendo ser avaliada repetindo sistematicamente a análise (repetitividade) ou aplicando variações no processo de medição (reprodutibilidade).
Recuperação (exatidão)	Grau de concordância entre o valor médio de uma série de resultados de ensaio e um valor de referência
Limite de detecção (LOD)	Menor quantidade do analito presente na amostra que possa ser detectado
Limite de quantificação (LOQ)	Menor quantidade de analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis.

Fonte: (BRASIL 2011; E.C., 2002).<sup>18,22</sup>

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Desenvolver e validar um método para determinação de sacarose em mel, utilizando a técnica de cromatografia líquida de interação hidrofílica acoplada à espectrometria de massas.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Otimizar as condições de cromatografia e encontrar os parâmetros ideais no espectrômetro de massas, visando à correta identificação do analito;
- Validar o método desenvolvido, através de parâmetros experimentais, para que o método atenda as exigências necessárias garantindo a confiabilidade dos resultados;
- Aplicação do método na rotina laboratorial.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Solventes e padrão

Todos os solventes utilizados neste estudo foram de grau cromatográfico, acetonitrila e metanol, obtidos de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Ácido fórmico de grau analítico também foi obtido de J.T. Baker. Toda água ultrapura utilizada foi obtida de um sistema purificador Mega Purity (Billerica, MA, USA).

Padrão de sacarose, com pureza  $\geq 99,5\%$ , foi obtido de Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Alemanha). Solução-estoque desse padrão foi preparada na concentração de  $1.000,0 \text{ mg.L}^{-1}$  em 50% de acetonitrila e 50% de água ultrapura. As soluções de trabalho ( $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foram preparadas pela diluição dessa solução-estoque também em acetonitrila 50%. Ambas as soluções estoque e de trabalho foram armazenadas a  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2. Preparo das amostras

Neste trabalho foram utilizados cinco tipos de mel distintos, tanto para o desenvolvimento do método quanto para estudo de aplicabilidade do método: mel orgânico, mel de florada de eucalipto, mel de florada silvestre, mel de flor da vassoura e mel de flor de laranjeira.

Tendo como base as metodologias de preparo de amostra descritas originalmente por Valse et al., (2016)<sup>23</sup> para análise de alcaloides pirrolizidínicos, e por Rizelio et al., (2012)<sup>24</sup> para análise de carboidratos por eletroforese capilar, foram testadas principalmente as diluições necessárias para análise de sacarose utilizando a técnica de LC-MS.

Assim, as amostras após homogeneizadas foram pesadas (0,5 g) em tubos de centrifugação de 50 mL tipo falcon, adicionando 10,0 mL de uma solução com 80% de acetonitrila e 20% de água ultrapura e agitadas em agitador vortex por 40 segundos. Em seguida, foram levadas à mesa agitadora (Thermo Fisher modelo MaxQ 3000) por 10 minutos e depois centrifugadas (Thermo Fisher modelo Megafure 40R) por 10 minutos à temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  e 4000 rotações por minuto. Um volume de  $10 \text{ }\mu\text{L}$  do sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 mL de polipropileno tipo eppendorf e o volume foi completado para  $1000 \text{ }\mu\text{L}$  com fase móvel (acetonitrila

80%). Procedeu-se novamente à centrifugação (Thermo Fisher modelo Heraeus Fresco 17) por 5 minutos à temperatura de 4°C e 14000 rotações por minuto. Por fim, 20 µL foram transferidos para frascos de vidro tipo vial contendo 980 µL de fase móvel e injetados no sistema LC-MS/MS.

Com intuito de encontrar a diluição ideal, foram alterados os volumes na última etapa de diluição, utilizando-se fatores de diluição de 1000 a 100 mil.

### **4.3. Instrumentação**

A cromatografia líquida foi realizada em um sistema 1290 Infinity da Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA, EUA), com bomba binária, degaseificador, auto-amostrador refrigerado e aquecedor de coluna. A espectrometria de massas foi realizada em espectrômetro triplo quadrupolo linear híbrido com armadilha de íons (5500 QTrap), fabricado pela Sciex (Framingham, MA, EUA), equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI), trabalhando no modo negativo (ESI<sup>-</sup>) e modo de monitoramento múltiplo de razões (MMR).

#### **4.3.1. Espectrometria de massas**

Como suporte, foram considerados os estudos descritos por Leung *et al.* (2011)<sup>25</sup>; Liu e Rochfort (2015)<sup>26</sup>; Zhou *et al.* (2016)<sup>27</sup>, os quais descrevem métodos para determinação de carboidratos utilizando espectrometria de massas.

A partir da solução de trabalho foi preparada uma solução de 20 µg.L<sup>-1</sup> de sacarose com intuito de realizar a infusão do analito diretamente no espectrômetro de massas, para que fosse identificada a sua presença a partir do seu número de massa, bem como identificar duas quebras estáveis (uma transição utilizada para confirmação e outra para quantificação) e definir as melhores condições para cada parâmetro.

As condições do equipamento otimizadas foram a temperatura da fonte, energia de colisão, potencial de entrada, potencial de saída da célula de colisão e pressão de gás (N<sub>2</sub>). Foi escolhido como valor de cada parâmetro aquele que apresentava maior intensidade de sinal.

#### **4.3.2. Cromatografia líquida**

A partir dos estudos propostos por Ma *et al.* (2014)<sup>28</sup>, Filip *et.al* (2016)<sup>29</sup> e Zheng *et al.* (2016)<sup>30</sup>, que descrevem métodos para determinação de carboidratos

utilizando cromatografia líquida, foram definidos os parâmetros cromatográficos otimizados nesta pesquisa. Utilizou-se uma solução padrão de sacarose de  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$  em todas as análises. Somente após os parâmetros terem sido otimizados, foram analisadas amostras da matriz em estudo, com intuito de confirmar as condições determinadas.

Foram testadas duas colunas cromatográficas: coluna aminada ( $\text{NH}_2$ ) da marca Nucleosil – Phenomenex com dimensões de  $250 \times 4,6 \text{ mm}$ , poro  $5 \mu\text{m}$  de diâmetro de partícula e tamanho do poro de  $100 \text{ \AA}$ ; coluna aminada ( $\text{NH}_2$ ) da marca Luna – Phenomenex com dimensões de  $150 \times 2,0 \text{ mm}$ , poro  $3 \mu\text{m}$  de diâmetro de partícula e tamanho do poro de  $100 \text{ \AA}$ .

Com relação às fases móveis, duas combinações foram testadas: solvente A ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e solvente B (ACN), e também  $\text{H}_2\text{O}$  e ACN, ambas com 0,1% de ácido fórmico, trabalhando em modo isocrático. Foram testadas as proporções de: 90%, 80%, 70% e 60% de fase móvel B.

O volume de injeção utilizado foi de  $10 \mu\text{L}$ , o fluxo da fase móvel foi de  $250 \mu\text{L.min}^{-1}$  com temperatura de  $30^\circ\text{C}$  para forno da coluna.

#### **4.4. Desempenho do método**

Os parâmetros de validação avaliados de acordo com a Decisão da Comissão 2002/657/CE<sup>22</sup> foram linearidade/faixa de trabalho, seletividade/especificidade, efeito de matriz, precisão e recuperação. Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram determinados de acordo com MAPA<sup>18</sup>.

##### **4.4.1. Linearidade/faixa de trabalho**

Para encontrar uma faixa de trabalho compatível com as diluições necessárias, foram analisados padrões de sacarose nas seguintes concentrações: 5, 10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 e  $600 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Para avaliar a linearidade do método, foram construídas curvas de calibração com seis níveis de concentração (incluindo ponto zero), em triplicata e diferentes dias. A curva foi construída plotando a área do pico versus sua concentração. O critério de aceitação será de que o coeficiente de regressão ( $r^2$ ) deveria ser maior que 0,98. <sup>34</sup>

#### 4.4.2. Seletividade

Foram analisadas amostras de mel com a finalidade de avaliar a seletividade, analisando a presença de possíveis interferentes no tempo de retenção e transição do analito. Sendo comparados os resultados de uma amostra com uma amostra fortificada.

#### 4.4.3. Efeito de matriz

Com o intuito de avaliar o efeito de matriz, duas curvas de calibração, com os mesmos níveis de concentração, foram construídas: curva I, preparada diluindo o padrão do analito na fase móvel (curva em solvente) e curva II, preparada fortificando uma amostra no início do processo de preparo da amostra (curva em matriz). Seguindo o estudo proposto por Hoff *et al.* (2015)<sup>31</sup>, o efeito de matriz foi avaliado por meio da divisão dos valores do coeficiente de inclinação da curva II pela curva I. O resultado deve estar entre 0,9 e 1,2 para que não fosse constatado efeito de matriz.

#### 4.4.4. Recuperação/precisão

A recuperação e precisão foram avaliadas analisando 18 amostras fortificadas em três níveis de concentração, calculando a taxa de recuperação, desvio padrão e coeficiente de variação para os três níveis. A avaliação da recuperação foi realizada através da taxa de recuperação com limites aceitos, levando em consideração a faixa de concentração trabalhada ( $\leq 1000 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ), de 70 % a 110 %. A precisão foi avaliada em termos de repetitividade, precisão intralaboratorial, realizando seis ensaios independentes, em cada nível de fortificação, sob condições sem variáveis de medição. O resultado foi considerado aceitável quando o coeficiente de variação foi  $\leq 16\%$ , segundo MAPA (Brasil, 2011).<sup>18</sup>

Na tabela 3 são apresentadas as concentrações de sacarose utilizadas na fortificação das amostras de mel para realização do estudo de precisão e recuperação.



**Tabela 3.** Níveis de fortificação do padrão para avaliação da precisão e recuperação.

Analito	Nível de fortificação ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )		
	*C <sub>2</sub>	*C <sub>3</sub>	*C <sub>4</sub>
Sacarose	25	50	75

\*C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub> são respectivamente a segunda, terceira e quarta concentração da curva de calibração.

A recuperação foi calculada utilizando a equação 1:

$$Rec. (\%) = \frac{\text{valor experimental}}{\text{valor de referência}} \cdot 100 \quad 1$$

O coeficiente de variação foi calculado utilizando a equação 2:

$$CV(\%) = \frac{\text{desvio pad.}}{\text{média}} \cdot 100 \quad 2$$

#### 4.4.5. Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção (LOD) foi determinado sendo a concentração do analito onde o sinal era três vezes superior a relação sinal/ruído. Já o limite de quantificação (LOQ) foi determinado como sendo o primeiro ponto da curva de calibração, com o sinal pelo menos dez vezes superior a razão sinal/ruído. Utilizando amostras de mel fortificadas com padrão de sacarose.

#### 4.5. Aplicação do método

Foram analisados cinco diferentes tipos de méis comerciais, com intuito de quantificar as concentrações de sacarose verificando assim se estão de acordo com a legislação vigente, que prevê um máximo de 6 gramas de sacarose por 100 gramas de mel.

Essas amostras foram analisadas em triplicata, tendo seu resultado expresso em porcentagem, pela média das três análises. Foi realizado o teste de Grubbs entre os resultados das triplicatas com o intuito de avaliar a presença de valores extremos ao nível de significância de 5%, porém nenhum valor foi descartado.

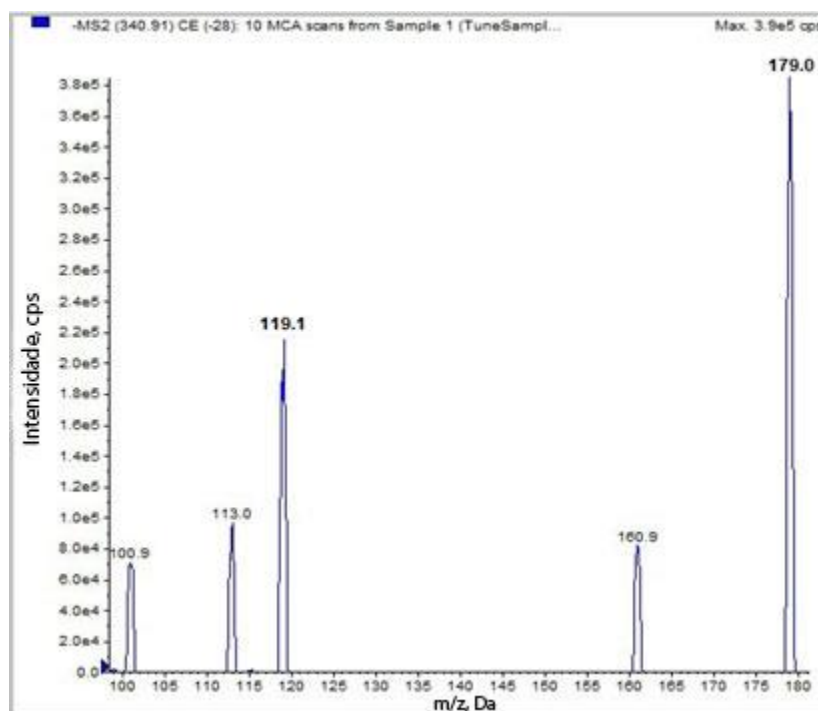
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Desenvolvimento do método

O primeiro passo do processo de desenvolvimento do método foi o de encontrar o íon precursor, no espectrômetro de massas, para a molécula de sacarose. Assim como nos estudos que foram considerados, a fonte de ionização está trabalhando em modo negativo, portanto o precursor ficou definido como sendo a massa da molécula menos um próton  $[M-H]^-$  tendo uma razão massa carga igual a 340,91.

Em seguida foram selecionadas as transições que se mostraram reprodutíveis e que apresentaram maior intensidade, sendo selecionada como transição de quantificação a com maior intensidade 340,91/179,00 m/z e como transição de confirmação 340,91/119,10 m/z, como pode ser verificado na figura 4.

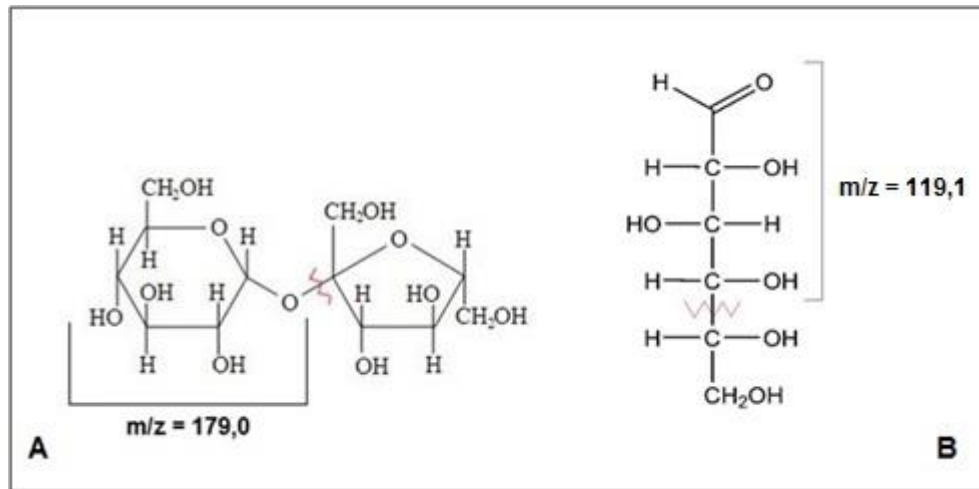
**Figura 4.** Espectro de massas da molécula da sacarose no Q2.



Fonte: Próprio autor

A transição de quantificação já era esperada, uma vez que resulta exatamente em uma molécula de glicose, a quebra ocorre na ligação glicosídica que une as moléculas. Já a transição de confirmação pode ser comprovada teoricamente na figura 5.

**Figura 5.** Representação das quebras no Q2



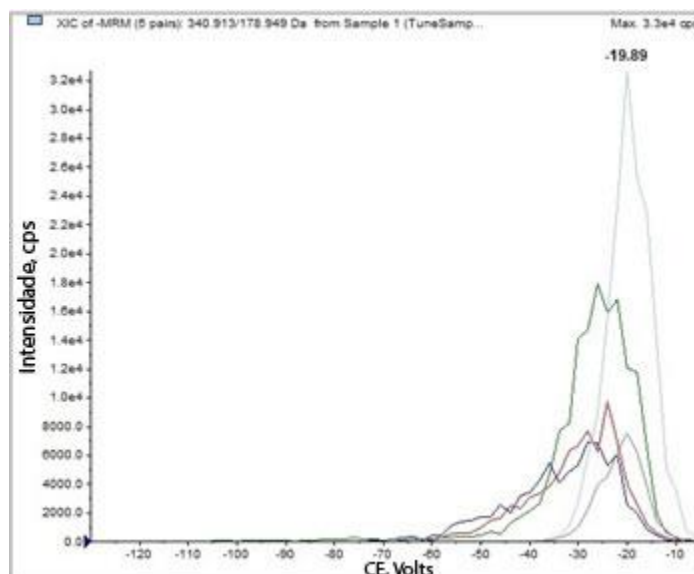
**A** - Representação da quebra na molécula de sacarose, representando a transição de quantificação.

**B** - Representação da quebra na molécula de glicose, representando a transição de confirmação.

Fonte: Próprio autor.

Com o íon precursor e as transições definidas, foi necessário otimizar os parâmetros do espectrômetro de massas. Então foram mantidos fixos os valores de todos os parâmetros, sendo variada apenas a energia de colisão. Acompanhando a intensidade do seu sinal, a escolha do valor ideal foi a que apresentou maior intensidade, como pode ser observado na figura 6.

**Figura 6.** Otimização da energia de colisão.



Fonte: Próprio autor

Para todos os demais parâmetros, o mesmo procedimento foi adotado. As condições finais estão relacionadas na tabela 4.

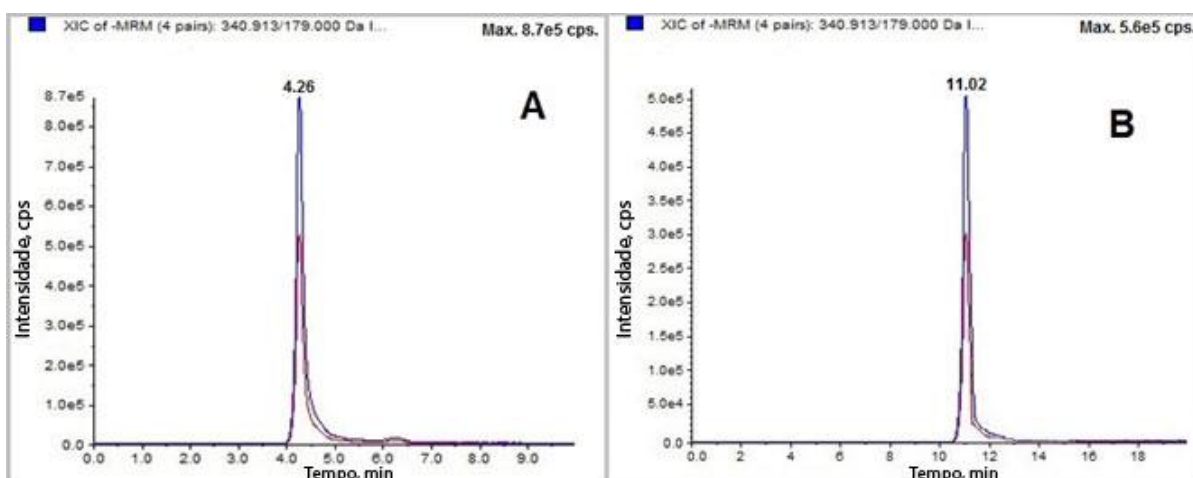
**Tabela 4.** Condições otimizadas da espectrometria de massas

	Precursor [M-H] <sup>-</sup>	Fragmentos (m/z)	CE (V)	EP (V)	CXP (V)
Sacarose	340,91 m/z	179,0	-20,0	-10,0	-11,0
		119,1	-24,0	-10,0	-5,0
Temperatura da fonte		650°C			
Pressão de gás		45 psi			

CE: energia de colisão (do inglês *collision energy*); EP: potencial de entrada (do inglês *entrance potencial*); CXP: potencial de saída da célula de colisão (do inglês *Collision Cell Exit Potential*).

Com as condições do espectrômetro de massa devidamente estipuladas, foram necessários realizar experimentos a fim de estipular também as condições cromatográficas. O primeiro passo foi estipular a coluna que seria utilizada no método. Para isso, duas colunas foram testadas, ambas com fase amino (NH<sub>2</sub>), porém com dimensões distintas e diâmetro do poro diferentes. Uma solução de 100 µg.kg<sup>-1</sup> de sacarose foi injetada em cada coluna.

**Figura 7.** Comparação das colunas cromatográficas.



**A-** Coluna Luna (150 x 2,0 mm, poro 3 µm); **B-** Coluna Nucleosil (250 x 4,6 mm, poro 5 µm)

Fonte: Próprio autor.

Ambas as colunas se mostraram eficientes para a determinação de sacarose, como pode ser visto na figura 7, porém a coluna escolhida para o método foi a Luna, por apresentar menor comprimento e diâmetro resultando em um menor tempo de análise, além da redução no gasto de fase móvel.

O modo de trabalho escolhido foi o isocrático, mistura de solventes de composição constante. Como no estudo realizado por Dolzan et al. (2014)<sup>32</sup>, que também utilizou a técnica HILIC, a composição da fase móvel se deu por alta proporção de solvente orgânico (ACN) com pequena proporção de água. Foi percebido que, com o aumento da proporção de água na fase móvel, ocorria a diminuição do tempo de retenção, porém a simetria do pico também diminuía. Assim, a proporção que apresentou melhor relação foi a de 80% de acetonitrila.

Com a adição de 0,1% de ácido fórmico nas fases móveis, houve diminuição na intensidade do sinal. Já que o aumento da concentração de H<sup>+</sup>, provocado pela presença do ácido, prejudica a ionização em modo negativo. A realização desse teste tem como base o estudo proposto por Liu e Rochfort (2013)<sup>33</sup> que utilizou ácido fórmico nas fases móvel para determinação de carboidratos por LC-MS.

Na tabela 5 são apresentadas as condições otimizadas da cromatografia líquida para análise de sacarose.

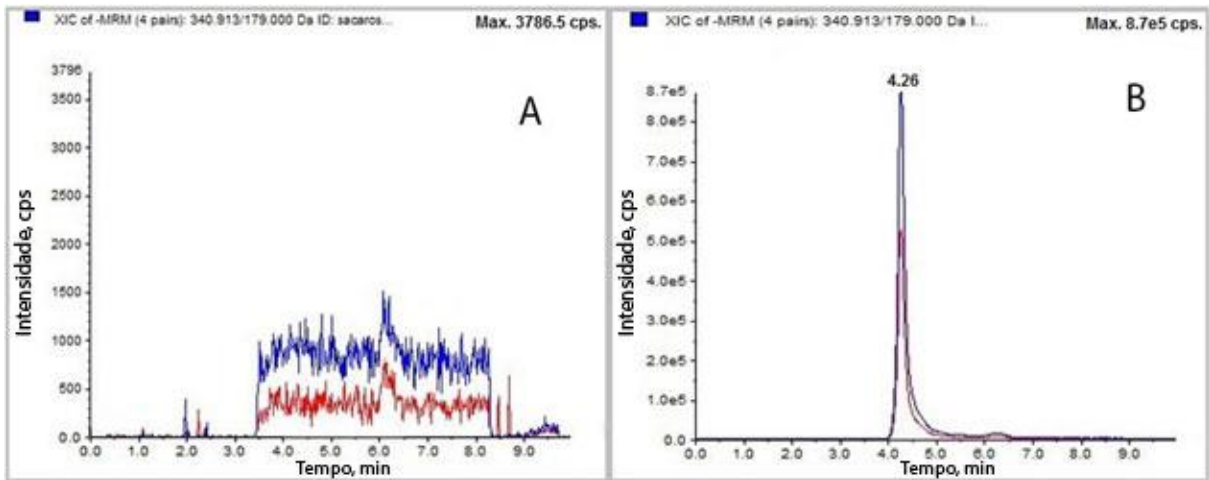
**Tabela 5.** Condições otimizadas da cromatografia líquida para análise de sacarose.

	<b>Tempo total</b>	<b>Fase móvel A<sup>a</sup></b>	<b>Fase móvel B<sup>b</sup></b>
<b>Modo isocrático</b>	10 minutos	20 %	80 %
<b>Equilíbrio</b>	5 minutos	20 %	80 %
<b>Coluna</b>	Phenomenex - Luna 3 $\mu$ NH <sub>2</sub> 100 Å (250 mm x 4.60 mm)		
<b>Temp. da coluna</b>	30°C		
<b>Fluxo</b>	250 $\mu$ L.min <sup>-1</sup>		
<b>Volume de injeção</b>	10 $\mu$ L		
<b>Tempo de retenção</b>	4,1 minutos		
<b>Controle do sistema</b>	Sciex - Analyst software		

a Fase móvel A: H<sub>2</sub>O; b Fase móvel B: ACN; c Tempo de retenção.

Os fatores de diluição utilizados foram estipulados entre 10 e 50 mil. Fatores maiores que estes não apresentaram sinal significativo. E fatores abaixo de 10 mil apresentaram sinais muito elevados, podendo ocorrer contaminação das amostras seguintes, assim o tempo de equilíbrio do sistema e tempo de lavagem do injetor precisariam ser maiores para que houvesse a limpeza necessária.

**Figura 8.** Comparação de cromatogramas de fase móvel e padrão de sacarose.



**A-** Cromatograma da fase móvel (20% da fase móvel A e 80% da fase móvel B).

**B-** Cromatograma de um padrão de sacarose nas condições estipuladas (100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ).

Fonte: Próprio autor

Com a injeção de apenas fase móvel (cromatograma A), não houve obtenção de sinal, como pode ser visto na figura 8, demonstrando que não há resíduos de análises anteriores no detector e que o tempo de limpeza e equilíbrio são suficientes para garantir que não haja contaminação das amostras seguintes. Observando o cromatograma B comprova-se a correta escolha das transições de quantificação e confirmação, uma vez que as duas transições apresentam um sinal alto na concentração de 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

## 5.2. Desempenho do método

### 5.2.1. Linearidade/faixa de trabalho

A primeira etapa para avaliação do desempenho do método desenvolvido foi determinar a faixa de trabalho que seria utilizada durante todo o processo de experimentos de validação analítica.

Interpolando os resultados das áreas dos picos pela concentração de sacarose, temos uma faixa linear de 10 a 600  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Porém, como sugerido por INMETRO (2010)<sup>21</sup> a faixa de trabalho estipulada deve ser a mais próxima possível da rotina laboratorial. Então, a faixa utilizada durante todo processo foi a de 10 a 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , já que, levando em consideração os fatores de diluição adotados, nenhuma das amostras testadas ultrapassou o valor de 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ .

**Tabela 6.** Resultado das curvas de calibração construídas em matriz.

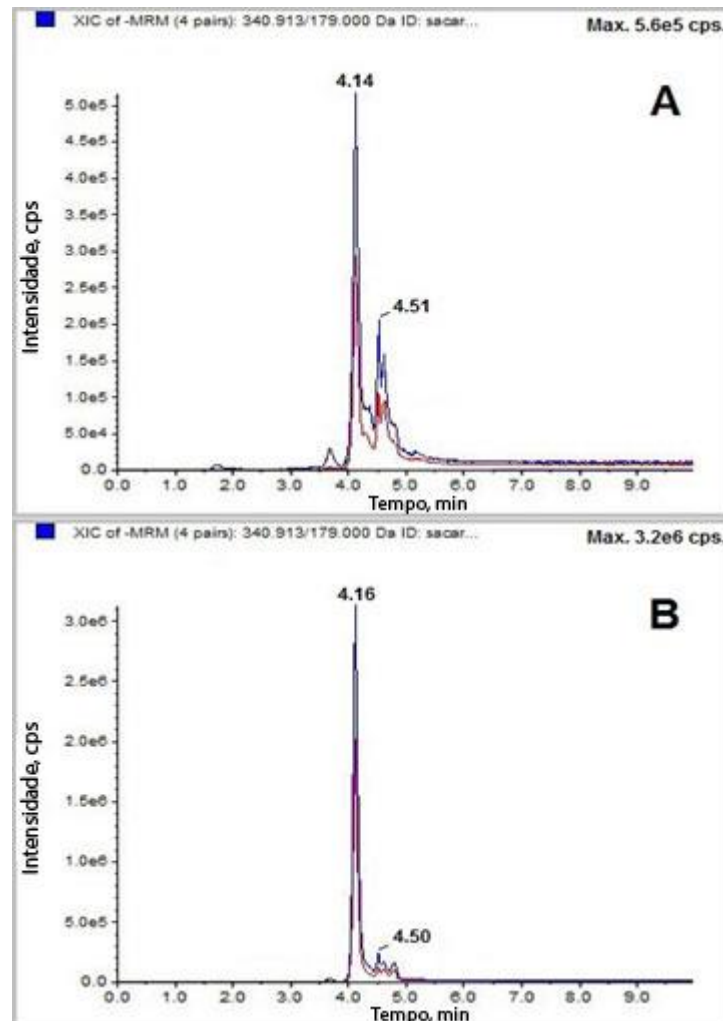
	<b>Equação</b>	<b>Coefficiente determinação (R<sup>2</sup>)</b>	<b>Parâmetro <math>\geq 0,98</math></b>
<b>Curva 1</b>	$y = 7654x + 3457$	0,9951	Conforme
<b>Curva 2</b>	$y = 7254x + 4126$	0,9887	Conforme
<b>Curva 3</b>	$y = 7787x + 4581$	0,9935	Conforme

Conforme sugerido por MAPA (2011)<sup>18</sup>, a curva de calibração deve conter pelo menos seis níveis de concentração equidistantes, então as concentrações adotadas para construção de todas as curvas de calibração foram: 0, 10, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . As curvas de calibração apresentaram a linearidade adequada na faixa de trabalho escolhida, uma vez que seus coeficientes de determinação resultaram e valores maiores que o parâmetro mínimo aceitável de 0,98, de acordo com LANAGRO (2014)<sup>34</sup>. Tais valores já eram esperados, uma vez que, em uma faixa ainda maior de concentração de sacarose também foi obtido linearidade.

### 5.2.2. Seletividade

Observando os cromatogramas da figura 9 torna-se evidente que não há interferentes no tempo de retenção da sacarose e nas transições escolhidas, uma vez que ocorre o aumento da intensidade do pico com tempo de retenção de 4,16 minutos quando o padrão de sacarose é adicionado. Um possível interferente seria o pico observado no cromatograma A no tempo de retenção de 4,51 minutos, porém como observado no cromatograma B, após a adição do padrão de sacarose, o pico mantém exatamente a mesma intensidade, mostrando assim que não é um interferente e que as transições escolhidas apresentam seletividade satisfatória.

**Figura 9.** Cromatogramas de uma amostra de mel e amostra de mel fortificada



**A** - Cromatograma de uma amostra de mel;

**B** - Cromatograma de uma amostra de mel fortificada com  $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de sacarose.

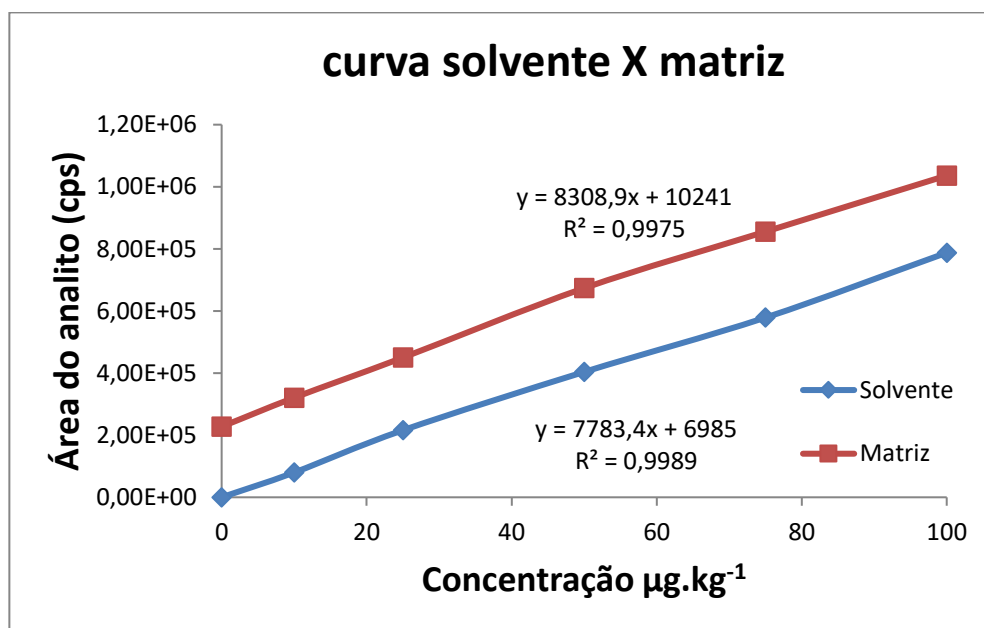
Fonte: Próprio autor



Este estudo foi realizado com outras amostras de mel e apresentou resultados semelhantes ao apresentado na figura 9. Esse critério foi observado ao longo de todo processo e se manteve semelhante em todas as análises.

### 5.2.3. Efeito de matriz

**Figura 10.** Estudo do efeito de matriz para sacarose em mel



Fonte: Próprio autor

O cálculo da razão entre os coeficientes angulares resultou em 1,067 ficando entre a taxa de aceitação proposta por Hoff et al. (2015). Portanto, observa-se que não há efeito de matriz significativo para análise de sacarose em mel por LC-MS/MS. Se o resultado dessa razão estivesse abaixo de 0,9, demonstraria que há uma supressão do sinal causada pelas substâncias que compõem a matriz, e a razão acima de 1,1 implicaria que a matriz causa um aumento do sinal.

Como o fator de diluição estipulado para as amostras é consideravelmente elevado (entre 10 mil a 50 mil vezes), não há grande representatividade de outras substâncias interferentes presentes na matriz, sem ser a do analito em estudo. Assim, apenas com alto índice de diluição pode-se eliminar o efeito de matriz, sem que fosse necessário fazer processos elaborados de limpeza ou filtração na amostra, o que geraria um custo maior para análise, uma vez que técnicas sofisticadas de preparo de amostra apresentam maior custo e grau de complexidade.

Valese *et al.*, (2016)<sup>23</sup> também não constataram efeito de matriz representativo na análise de alcalóides pirrolizidínicos em mel, mesmo com um preparo de amostra simples e alto fator de diluição. Nesta pesquisa para determinação de sacarose, mesmo não apresentando efeito de matriz significativo, todas as curvas de calibração utilizadas para calcular os resultados das amostras analisadas foram realizadas com curvas em matriz, já que o resultado observado da razão dos coeficientes está próximo de apresentar um ganho de sinal. Assim, garantindo maior confiabilidade dos resultados, caso seja realizada a análise de alguma amostra que apresente significativo ganho de sinal, uma vez que os níveis de sacarose variam de acordo com diversos fatores, evitando que ocorra a expressão superestimada do resultado da concentração de sacarose. Esse fato poderia implicar na reprovação dessa amostra, pois de acordo com a legislação vigente, o mel apresenta um valor máximo de sacarose.

#### 5.2.4. Recuperação/precisão

A tabela 7 foi construída a partir dos resultados das dezoito amostras fortificadas analisadas, sendo seis amostras fortificadas em cada nível (C2, C3 e C4), com os resultados esperados de 25,00; 50,00 e 75,00  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabela 7.** Resultados do estudo de precisão e recuperação

	Nível de fortificação ( $\mu\text{g.kg}^{-1}$ )					
	C2	REC. <sup>a</sup> (%)	C3	Rec. (%)	C4	Rec. (%)
Ponto 1	25,34	101,37	50,92	101,83	71,91	95,87
Ponto 2	23,07	92,27	41,24	82,48	78,86	105,14
Ponto 3	23,01	92,06	49,14	98,28	66,35	88,47
Ponto 4	23,99	95,95	43,38	86,75	67,87	90,49
Ponto 5	23,60	94,39	50,47	100,94	71,21	94,94
Ponto 6	22,06	88,24	44,47	88,94	73,01	97,35
<b>Média</b>	<b>23,51</b>	<b>94,05</b>	<b>46,60</b>	<b>93,21</b>	<b>71,54</b>	<b>95,38</b>
<b>DP<sup>b</sup></b>	<b>1,10</b>		<b>4,09</b>		<b>4,39</b>	
<b>CV<sup>c</sup> (%)</b>	<b>3,40</b>		<b>7,67</b>		<b>4,28</b>	

a; Recuperação; b Desvio padrão; c Coeficiente de variação

Toda as taxas de recuperação das dezoito amostras fortificadas nos três níveis de recuperação se mantiveram dentro do índice aceito (70 % a + 110 %), demonstrando assim um grau de concordância entre os valores médios da série de resultados e os valores de referência.

Como no estudo da recuperação, os valores dos coeficientes de variação ficaram dentro da faixa aceitável ( $\leq 16\%$ ) nos três níveis de fortificação, demonstrando que não houve dispersão nos ensaios realizados.

### **5.2.5. Limites de detecção e quantificação**

O LOQ ficou determinado em  $10,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$  sendo este o primeiro ponto da curva de calibração, apresentando um sinal superior a 10 vezes a relação sinal/ruído. Já o LOD ficou estipulado em  $5,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$ , este também resultou em um sinal superior a 10 vezes a relação sinal/ruído, sendo necessário ser apenas 3 vezes superior. Assim, os limites definidos já são inferiores aos apresentados por Ma et al. (2014)<sup>28</sup>, onde utiliza a técnica de HPLC-ELSD, sendo este detector menos sensível que o utilizado neste estudo. Já em comparação ao trabalho apresentado por Liu e Rochfort (2013)<sup>33</sup>, onde também utilizaram espectrômetro de massas como detector, os LOQ e LOD alcançados neste estudo ficaram bem próximos.

Com estudos adicionais, os limites definidos poderiam ser baixados ainda mais, porém para a matriz mel não havia essa necessidade, pois os fatores de diluição precisariam ser aumentados ainda mais. Com estes valores de LOQ e LOD já é possível, com os estudos necessários, a inclusão de novas matrizes alimentícias, pois estas geralmente apresentam concentrações elevadas de sacarose.

### **5.2.6. Aplicação do método**

Com os parâmetros do método devidamente estipulados e com a avaliação de desempenho realizada foram analisadas, em triplicata, amostras de cinco tipos de méis, para avaliação do teor de sacarose.

**Tabela 8.** Resultados das concentrações de sacarose nas amostras analisadas.

Tipo de mel	Fator de diluição utilizado	Concentração de sacarose (%)*
Mel orgânico	10.000	3,041
Mel de florada de eucalipto	10.000	3,188
Mel de florada silvestre	10.000	0,870
Mel de flor da vassoura	50.000	11,35
Mel de flor de laranjeira	50.000	5,127

\* Resultado é a média das triplicatas analisadas

Sabendo que a legislação brasileira vigente permite um máximo de 6,0 % de sacarose em mel, nota-se que a amostra de mel de flor da vassoura não está conforme, pois o valor de sacarose encontrado ultrapassa o limite máximo estipula pela legislação brasileira. Ressaltando que se faz necessária a análise de sacarose em mel, pois o consumidor tem o direito de adquirir um produto com qualidade comprovada e livre de fraudes.

## 6. CONCLUSÃO

Após todo o processo de desenvolvimento e validação do método, foi combinada a eficiência da separação por cromatografia líquida à identificação inequívoca do analito propiciada pela espectrometria de massas. Todos os parâmetros de desempenho pelos quais o método foi avaliado foram atendidos satisfatoriamente. Neste método, a determinação de sacarose em mel pode ser realizada após simples preparo de amostra e mais rapidamente do que o método volumétrico oficial atualmente disponível. O método foi então aplicado a amostras colhidas pela fiscalização do MAPA e os resultados mostraram que deve haver controle mais rigoroso, uma vez que foi evidenciada a presença de não conformidade. Dessa forma, o método desenvolvido neste trabalho poderá ser uma ferramenta valiosa na fiscalização, contribuindo para a proteção dos consumidores.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 11, de 20 de outubro de 2000. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel**. Brasília, Diário Oficial da União.
2. ANKLAM, Elke. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 63, n. 4, p.549-562, 1998. Elsevier BV.
3. PEREIRA, F., et al. **Produção de mel. Embrapa Meio-Norte**, versão virtual. 2003. Disponível em:  
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/index.htm>>. Acesso em: setembro de 2016.
4. SILVA, Priscila Missio da et al. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 196, p.309-323, 2016. Elsevier BV.
5. COULTATE, Tom P. **Food: the chemistry of its components**. Fifth edition. Royal Society of Chemistry, 2009.
6. SOLOMONS, T. W. Graham; FRYHLE, Craig B. **Química Orgânica: Volume 2**, tradução da 8ª edição norte-americana. 8. ed. Rio de Janeiro: Ed. LTC, 2006.
7. MCMURRY, John. **Química Orgânica**. Tradução da 6ª edição norte-americana. 6. ed São Paulo: Ed. Thomson, 2005.
8. HOLLER, F. James; SKOOG, Douglas A.; CROUCH, Stanley R. **Princípios de análise instrumental**. Sexta edição. Porto Alegre: Bookman, 2009.
9. LANÇAS, Fernando Mauro et al. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

10. LANÇAS, Fernando M. Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC). **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 49-57, 2010.
11. BUSZEWSKI, Bogusław; NOGA, Sylwia. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) - a powerful separation technique. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 402, n. 1, p. 231-247, 2012.
12. PAVIA, Donald L. et al. **Introdução à Espectroscopia**, tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.
13. IGLESIAS, A. H. **Introdução ao Acoplamento Cromatografia Líquida Espectrometria de Massas**. Disponível em: <<http://www.cnpsa.embrapa.br/met//minicursos>>. Acesso em: setembro de 2016.
14. DEWALD, Howard D. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation and Applications (ed. Cole, Richard B.). **Journal of Chemical Education**, [s.l.], v. 76, n. 1, p.33-33, 1999. American Chemical Society (ACS).
15. HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. Tradução da 8ª edição norte-americana. 8. ed. Rio de Janeiro: Ed. LTC, 2005.
16. MOLOGNONI, Luciano. **Desenvolvimento de metodologias para determinação simultânea de ácido sórbico, nisina, natamicina e tilosina em produtos lácteos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas**. 2015. 128 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
17. KRUYE, Anneli et al. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 870, p.29-44, 2015. Elsevier BV.
18. BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica: fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Brasília. MAPA/ACS, 2011.

19. ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração**. Brasília. ISO/IEC 17025, 2005.
20. EURACHEM. The fitness for purpose of analytical method, a laboratory guide to method validation and related topics. ed. 1, Teddington, UK, 1998.  
**Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement: JCGM 100:2008 GUM 1995 with minor corrections**. 2. ed.: Jcgm, 2008.
21. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Revisão 3. Rio de Janeiro: INMETRO, 2010. 20p.
22. E.C. European Commission. Commission decision 2002/657/EC of 12 August 2002. **Implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results**. Off. J. of the Eur. Communities, Brussels, L221/8, 2002.
23. VALESE, Andressa Camargo et al. A fast and simple LC-ESI-MS/MS method for detecting pyrrolizidine alkaloids in honey with full validation and measurement uncertainty. **Food Control**, [s.l.], v. 67, p.183-191, 2016. Elsevier BV.
24. RIZELIO, Viviane Maria et al. Development of a fast capillary electrophoresis method for determination of carbohydrates in honey samples. **Talanta**, [s.l.], v. 93, p.62-66, 2012. Elsevier BV.
25. LEUNG, Kit-yi et al. Quantitative analysis of myo-inositol in urine, blood and nutritional supplements by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, [s.l.], v. 879, n. 26, p.2759-2763, 2011. Elsevier BV.



26. LIU, Zhiqian; ROCHFORD, Simone. Identification and quantitative analysis of oligosaccharides in wheat flour using LC–MS. **Journal of Cereal Science**, [s.l.], v. 63, p.128-133, 2015. Elsevier BV.
27. ZHOU, Yang et al. A LC–MS/MS method for the determination of stachyose in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study. **Journal Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 123, p.24-30, 2016. Elsevier BV.
28. MA, Chunmei et al. Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC–ELSD. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 145, p.784-788, 2014. Elsevier BV.
29. FILIP, Miuța et al. Simultaneous determination of glucose, fructose, sucrose and sorbitol in the leaf and fruit peel of different apple cultivars by the HPLC–RI optimized method. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 199, p.653-659, 2016. Elsevier BV.
30. ZHENG, Huiwen et al. Determination of sugars, organic acids, aroma components, and carotenoids in grapefruit pulps. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 205, p.112-121, 2016. Elsevier BV.
31. HOFF, R.B., et al. Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis. **Talanta**, v. 132, p. 443-450, 2015.
32. DOLZAN, Maressa D. et al. Comparison of superficially porous and fully porous silica supports used for a cyclofructan 6 hydrophilic interaction liquid chromatographic stationary phase. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1365, p.124-130, 2014. Elsevier BV.
33. LIU, Zhiqian; ROCHFORD, Simone. A fast liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) method for quantification of major polar metabolites in plants. **Journal Of Chromatography B**, [s.l.], v. 912, p.8-15, 2013. Elsevier BV.

34. LANAGRO. Rede Nacional de Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Manual de validação, verificação/confirmação de desempenho, estimativa de incerteza de medição e controle de qualidade intralaboratorial.** Divisão de Ensaio Químicos. Brasília. DEQ/CGAL, 2014.