

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DOS ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS**

Viviane Maria Rizelio

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO MEL CATARINENSE:
COMPOSIÇÃO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E O USO DA
ELETROFORESE CAPILAR COMO ALTERNATIVA NA
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Roseane Fett

Florianópolis
2011

Viviane Maria Rizelio

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO MEL CATARINENSE:
COMPOSIÇÃO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E O USO DA
ELETROFORESE CAPILAR COMO ALTERNATIVA NA
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE**

Esta Dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de “Mestre em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Florianópolis, 19 de dezembro de 2011.

Prof^ª. Dr^ª Roseane Fett
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª Roseane Fett
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina de Oliveira Costa
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^ª. Dr^ª. Maria Beatriz De Abreu Glória
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof^ª. Dr^ª. Marilde Terezinha Bordignon Luiz
Universidade Federal de Santa Catarina

Quando o poder do amor superar o amor pelo
poder, o mundo conhecerá a paz.

JIMI HENDRIX

RESUMO

RIZELIO, Viviane Maria. **Caracterização química do mel catarinense: composição, atividade antioxidante e o uso da eletroforese capilar como alternativa na avaliação da qualidade.** 2011. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar amostras de mel produzidas no Estado de Santa Catarina na safra 2010/2011, e desenvolver e validar métodos para o controle de qualidade de mel empregando a eletroforese capilar. Foram estudadas amostras provenientes de oito regiões do Estado, que apresentaram adequados resultados quanto aos parâmetros de condutividade elétrica, pH, minerais, hidroximetilfurfural, atividade diastásica, frutose, glicose, sacarose e cor. Para apenas uma das regiões os resultados de umidade e acidez livre apresentaram-se fora dos limites legais, provavelmente devido à retirada prematura do mel das colmeias ou sob condições de alta umidade. Além disso, foi possível realizar a discriminação entre amostras de mel de diferentes origens geográficas de acordo com o conteúdo dos principais minerais presentes. As amostras apresentaram apreciável conteúdo de compostos fenólicos totais e carotenoides totais e atividade antioxidante *in vitro* pelos métodos DPPH e FRAP comprovando o potencial de consumo de mel como alimento funcional. Foram propostos três novos métodos para a determinação de cátions, de açúcares e de hidroximetilfurfural através de eletroforese capilar. Os três métodos apresentaram adequados resultados quanto à validação analítica, além de serem extremamente rápidos, econômicos e confiáveis, demonstrando o potencial da eletroforese capilar para análises de rotina da determinação da qualidade do mel.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antioxidante. Caracterização físico-química. Eletroforese capilar. Mel. Validação analítica.

ABSTRACT

Characterization of honey from Santa Catarina: composition, antioxidant activity and the use of capillary electrophoresis as an alternative in the assessment of quality.

The objective of this study was to characterize honey samples produced on State of Santa Catarina from the 2010/2011 harvest, and to develop and validate methods for the assessment of honey quality, employing capillary electrophoresis. Samples from eight regions of the State were studied. They showed adequate results for electrical conductivity, pH, minerals, hydroxymethylfurfural, diastase activity, fructose, glucose, sucrose and color. Samples from one of the regions showed moisture content and free acidity over the legal limits, probably due to premature harvest of honey from hives or under conditions of high humidity. Moreover, it was possible to discriminate honey samples from different geographical origins according to the contents of the principal cations present. The samples also showed appreciable contents of total phenolic compounds and total carotenoids, and antioxidant activity by DPPH and FRAP methods, demonstrating the potential of honey as a functional food. Three new methods for the determination of cations, sugars and hydroxymethylfurfural by capillary electrophoresis were developed. The three methods presented appropriate results regarding analytical validation. Furthermore, they were also fast, economical and reliable, demonstrating the potential of capillary electrophoresis for the routine analysis in the assessment of honey quality.

KEYWORDS: Analytical validation. Antioxidant activity. Capillary electrophoresis. Honey. Physico-chemical characterization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Representação esquemática da instrumentação de eletroforese capilar.....	43
Figura 1.2 – Representação dos modos de detecção direta e indireta.....	45
Figura 1.3 – Formação do fluxo eletrosmótico.....	46
Figura 1.4 – Representação do perfil radial (fluxo eletrosmótico) e do perfil parabólico (gerado por pressão) e comparação entre os picos resultantes.....	47
Figura 2.1 – Eletroferograma da solução padrão de HMF e cafeína (PI) sob as condições eletroforéticas otimizadas.....	60
Figura 2.2 – Eletroferograma da amostra 7.....	63
Figura 3.1 – Municípios de origem das amostras.....	72
Figura 3.2 – Avaliação da composição do BGE para determinação de cátions em mel utilizando o software <i>Peakmaster</i> [®]	75
Figura 3.3 – Eletroferograma da mistura de padrões de cátions sob as condições otimizadas.....	76
Figura 3.4 – Eletroferogramas obtidos da determinação de cátions nas amostras de mel.....	79
Figura 3.5 – Representação dos dois primeiros componentes principais quanto às variáveis (a) e quanto às amostras de mel (b).....	81
Figura 4.1 – Otimização do pH e da composição do BGE para determinação de açúcares em mel utilizando o software <i>Peakmaster</i> [®]	93
Figura 4.2 – Eletroferograma da mistura de padrões contendo frutose (1), glicose (2) e sacarose (3).....	95
Figura 4.3 – Eletroferograma da amostra de mel VI.....	98
Figura 5.1 – Municípios de origem das amostras.....	108
Figura 5.2 – Regressão linear obtida entre o conteúdo estimado de minerais e a condutividade elétrica das amostras..	115
Figura 5.3 – Regressão linear obtida entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH e FRAP.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Produção de mel mundial e dos principais países no ano de 2009.....	26
Tabela 1.2 – Consumo médio anual de mel por habitante por país..	27
Tabela 1.3 – Principais países exportadores de mel: quantidade e valores exportados no ano de 2008.....	27
Tabela 1.4 – Produção nacional de mel no ano de 2009.....	28
Tabela 1.5 – Características físico-químicas de méis de abelhas.....	31
Tabela 1.6 – Conteúdo de HMF e atividade diastásica determinados em amostras de mel.....	34
Tabela 1.7 – Conteúdo de frutose, glicose e sacarose encontrados em mel de abelhas.....	35
Tabela 1.8 – Conteúdo dos principais minerais (mg/kg) encontrados em mel.....	37
Tabela 1.9 – Valores dos parâmetros de cor L^* , a^* e b^* em méis....	38
Tabela 1.10 – Conteúdo de compostos fenólicos totais em méis e sua correlação com a atividade antioxidante.....	41
Tabela 2.1 – Planejamento fatorial 3^2 para definição das condições do método.....	59
Tabela 2.2 – Coeficientes calculados para a Equação 1.....	59
Tabela 2.3 – Parâmetros de avaliação do método analítico.....	61
Tabela 2.4 – Conteúdo de HMF em amostras de mel determinado por eletroforese capilar.....	62
Tabela 3.1 – Resultados da validação do método para análise de cátions em mel.....	77
Tabela 3.2 – Conteúdo de cátions (mg/kg) nas amostras de mel.....	78
Tabela 3.3 – Valores dos pesos de cada componente principal.....	80
Tabela 4.1 – Resultados da validação quanto à linearidade, LD e LQ.....	96
Tabela 4.2 – Resultados da avaliação da precisão.....	96
Tabela 4.3 – Resultados dos ensaios de recuperação.....	97
Tabela 4.4 – Conteúdo médio de frutose, glicose e sacarose (g/100 g) nas amostras analisadas.....	98
Tabela 5.1 – Descrição geográfica dos municípios de origem das amostras.....	107
Tabela 5.2 – Características físico-químicas determinadas nas amostras.....	113
Tabela 5.3 – Conteúdo de HMF e atividade diastásica determinados nas amostras de mel.....	116
Tabela 5.4 – Conteúdos de frutose, glicose e sacarose (g/100 g)	

encontrados nas amostras.....	117
Tabela 5.5 – Parâmetros referentes à cor das amostras analisadas...	118
Tabela 5.6 – Características bioativas encontradas nas amostras.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μA – microampère(s)
ACP – análise de componentes principais
ANOVA – análise de variância
BGE – eletrólito de corrida
CG – cromatografia gasosa
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
CZE – eletroforese capilar de zona
CTAB – brometo de cetil-trimetil-amônio
CV% – coeficiente de variação
DAD – detector de arranjo de diodos
DI – diâmetro interno
DP – desvio padrão
DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
 $\text{E}\beta\text{C}$ – equivalentes a β -caroteno
EAA – equivalentes a ácido ascórbico
EAG – equivalentes a ácido gálico
EC – eletroforese capilar
EMD – dispersão por eletromigração
EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
FAO – *Food and Agriculture Organization of the United Nations*
FEO – fluxo eletrosmótico
FRAP – *Ferric Reducing Antioxidant Potential*
hab – habitante
HMF - hidroximetilfurfural
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LC-MS/MS - cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LD – limite de detecção
 L_{ef} – comprimento efetivo
LQ – limite de quantificação
 L_{tot} – comprimento total
m/m – razão massa/massa
m/v – razão massa/volume
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mbar – milibar
MECC – cromatografia eletrocinética micelar capilar
mS – milisiemens
ND – não detectado

PC – componente(s) principal(is)

Pa – pascal

r – coeficiente de correlação de Pearson

R^2 – coeficiente de determinação

SDS – dodecil-sulfato de sódio

TBS – tetraborato de sódio

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazina

UV/Vis – ultravioleta/visível

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1 A Produção apícola.....	25
2 Mel: definição, composição e qualidade.....	29
3 Compostos bioativos do mel e atividade antioxidante.....	38
4 A técnica de eletroforese capilar.....	41
4.1 Instrumentação.....	43
4.2 Fluxo eletrosmótico.....	45
CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR	49
Resumo	51
1 Introdução	53
2 Material e Métodos	54
2.1 Reagentes e Soluções.....	54
2.2 Instrumentação e procedimentos analíticos.....	55
2.3 Amostras de mel.....	56
2.4 Validação do método.....	56
3 Resultados e Discussão	57
3.1 Desenvolvimento do método.....	57
3.2 Validação do método.....	61
3.3 Análise das amostras.....	62
4 Conclusão	63
CAPÍTULO 3 – O USO DE ELETROFORESE CAPILAR PARA A DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE CÁTIONS EM MEL: UM POSSÍVEL MÉTODO PARA A DISCRIMINAÇÃO DA ORIGEM GEOGRÁFICA DAS AMOSTRAS	65
Resumo	67
1 Introdução	69
2 Material e Métodos	70
2.1 Material.....	70
2.2 Instrumentação.....	71
2.3 Amostras de mel.....	71
2.4 Desempenho analítico do método.....	72
2.5 Análises estatísticas.....	73
3 Resultados e Discussão	73
3.1 Desenvolvimento do método.....	73
3.2 Desempenho do método.....	76

3.3	Análise das amostras de mel.....	77
3.4	Análise multivariada.....	80
4	Conclusão.....	83
CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ELETROFORESE CAPILAR PARA A DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE AÇÚCARES EM MEL.....		85
	Resumo.....	87
1	Introdução.....	89
2	Material e Métodos.....	90
2.1	Material.....	90
2.2	Instrumentação.....	90
2.3	Amostras.....	91
2.4	Validação do método.....	91
3	Resultados e Discussão.....	92
3.1	Desenvolvimento do método.....	92
3.2	Parâmetros de validação.....	95
3.3	Análise das amostras.....	97
4	Conclusão.....	99
CAPÍTULO 5 – MEL CATARINENSE: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....		101
	Resumo.....	103
1	Introdução.....	105
2	Material e Métodos.....	106
2.1	Material.....	106
2.2	Amostras.....	107
2.3	Caracterização físico-química.....	108
2.4	Compostos bioativos e atividade antioxidante.....	110
2.5	Análises estatísticas.....	112
3	Resultados e Discussão.....	112
3.5	Caracterização físico-química.....	112
3.6	Compostos bioativos e atividade antioxidante.....	118
4	Conclusão.....	121
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....		123
REFERÊNCIAS.....		125

INTRODUÇÃO

O mel é um ingrediente tradicional usado mundialmente desde os tempos antigos devido às suas propriedades dietéticas, curativas e como adoçante natural. É uma alternativa ao uso de açúcar em muitos produtos, substituindo as calorias vazias provenientes do açúcar refinado (GHELDOF; ENGESETH, 2002). Devido ao seu alto valor calórico (303 kcal/100 g), e a alta absorção de carboidratos, seu consumo é adequado para pessoas de todas as idades, sendo particularmente recomendado para crianças acima de um ano e atletas (BLASA et al., 2006). A atual tendência de consumo de produtos naturais com propriedades preventivas, além de seu papel como alimento funcional, tem aumentado o interesse dos consumidores sobre o mel (IURLINA et al., 2009).

Diversos usos terapêuticos do mel são reportados na literatura, e cada vez mais surgem evidências da sua efetividade em condições clínicas e experimentais. Estudos relatam seu uso como antibacteriano, bacteriostático, anti-inflamatório, cicatrizante de feridas e queimaduras, no tratamento de distúrbios intestinais, asma, diabetes, úlceras gástricas, catarata e outras doenças oculares (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002; CASTALDO; CAPASSO, 2002; ALJADI; KAMARUDDIN, 2004; BERETTA et al., 2005). Alguns autores também já descreveram as propriedades antioxidantes do mel e a efetividade do seu uso como preservativo natural dos alimentos em diversas aplicações: contra a oxidação lipídica de carnes (ANTONY; RIECK; DAWSON, 2000; MCKIBBEN; ENGESETH, 2002; NAGAI et al., 2006), na inibição do escurecimento enzimático de frutas, vegetais e sucos (CHEN et al., 2000; ROSA et al., 2011), na proteção contra deterioração oxidativa de alimentos (MCKIBBEN; ENGESETH, 2002), no aumento da capacidade antioxidante do soro humano (SCHRAMM et al., 2003), na inibição da oxidação de lipoproteínas do soro (GHELDOF; ENGESETH, 2002) e na proteção de eritrócitos contra hemólise e lipoperoxidação induzida (BLASA et al., 2007).

A produção de mel no Brasil conta com o apoio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que em 2006 criou e instituiu a Câmara Setorial da Cadeia Produtiva de Mel e Produtos Apícolas. Este órgão é o principal fórum de discussão e definição de políticas, diretrizes e ações para o desenvolvimento do setor apícola brasileiro. Estima-se que no país existam cerca de 200 mil apicultores e mais de 2,5 milhões de colmeias (VIEIRA, 2011).

O Estado de Santa Catarina foi responsável por 11,6% do volume total de mel produzido no ano de 2009, sendo atualmente o 4º maior produtor nacional (IBGE, 2011). Por possuir uma vegetação natural diversificada, de boa qualidade melífera, e clima favorável, Santa Catarina tem boas condições de produzir mel em todo seu território. O Estado Catarinense, juntamente com São Paulo, Ceará e Rio Grande do Sul, somam mais de 75% do volume de mel exportado do Brasil, com destino principalmente para os Estados Unidos, Alemanha e Reino Unido (VIEIRA, 2011).

A qualidade do mel produzido em Santa Catarina é fundamental para sua valorização no mercado interno e como produto de exportação. Vários fatores afetam a composição e a qualidade do mel, entre eles a origem floral e geográfica, condições de manipulação, processamento e estocagem (ANKLAM, 1998; GHELDOLF; WANG; ENGESETH, 2002). Durante a produção e processamento, podem ocorrer práticas fraudulentas visando aumentar o rendimento, principalmente através da alimentação artificial das abelhas com xaropes de açúcar, ou pela diluição direta do mel com xaropes ou com água (ANKLAM, 1998; AJLOUNI; SUJIRAPINYOKUL, 2009). Outras práticas, como o sobreaquecimento para reduzir a viscosidade, também afetam diretamente a qualidade deste produto (TURHAN et al., 2008). Neste sentido, a avaliação da composição físico-química do mel é importante para determinar sua autenticidade e sua qualidade, protegendo o consumidor de possíveis fraudes ou de produtos de qualidade inferior (FÉAS et al., 2010b).

No Brasil, o MAPA, através da Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, preconiza os parâmetros físico-químicos a serem avaliados no mel e estabelece seus limites de aceitação (BRASIL, 2000). Os métodos recomendados são tradicionais e amplamente reconhecidos, porém o desenvolvimento de novos métodos analíticos vem recebendo muita atenção da comunidade científica nos últimos anos, com especial destaque para metodologias rápidas e econômicas tanto financeiramente quanto ambientalmente (CIULU et al., 2011). Desta forma, a técnica de eletroforese capilar (EC) tem emergido como altamente promissora, por apresentar baixíssimo consumo de reagentes e de amostra, rapidez nas análises e alta resolução na separação, identificação e quantificação de diversas substâncias (CHENG et al., 2008). Poucos estudos ainda são encontrados empregando a técnica de EC na determinação da qualidade do mel de abelhas (SUÁREZ-LUQUE et al., 2005; CHENG et al., 2008; SILVA et al., 2008; TEIXIDÓ et al., 2011), desta forma percebe-se a

necessidade de uma melhor exploração desta ferramenta tão útil na caracterização deste alimento.

O objetivo geral deste trabalho foi realizar a caracterização química do mel catarinense, considerando os parâmetros físico-químicos, compostos bioativos e atividade antioxidante e promover a técnica de eletroforese capilar como alternativa no desenvolvimento de métodos analíticos que auxiliem na avaliação da qualidade do mel. Este trabalho foi dividido em cinco capítulos, com a seguinte estruturação: o Capítulo 1 apresenta uma revisão bibliográfica contextualizada sobre o alimento mel, sua produção em nível mundial, nacional e estadual, suas características físico-químicas e propriedades antioxidantes, bem como uma breve revisão sobre a técnica de eletroforese capilar e seus princípios e conceitos centrais. Os Capítulos 2, 3 e 4 tratam do desenvolvimento e da validação de métodos analíticos para a determinação de respectivamente hidroximetilfurfural, cátions e açúcares e em amostras de mel, todos empregando a técnica de eletroforese capilar. Finalmente, o Capítulo 5 trata da caracterização de amostras de mel produzidas no Estado de Santa Catarina na safra 2010/2011, quanto aos seus parâmetros físico-químicos, presença de compostos bioativos e atividade antioxidante.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 A Produção apícola

A atividade apícola, também chamada apicultura, é caracterizada pela criação de abelhas controlada pelo ser humano, em colmeias artificiais, utilizando métodos e equipamentos desenvolvidos para melhor explorar a capacidade natural destes insetos (REIS; FILHO, 2003). Mundialmente, cerca de 140 países exploram a atividade apícola, sendo que alguns deles têm se destacado quanto ao volume produzido, bem como na oferta de produtos e subprodutos oriundos desta atividade (VIEIRA, 2011).

Conforme dados da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* – FAO, no ano de 2009 foram produzidas no mundo mais de 1,5 milhões de toneladas de mel, correspondentes a um montante financeiro de cerca de 1,82 bilhões de dólares (FAO, 2011). Esta cifra, no entanto, tende a aumentar consideravelmente se for considerada a produção de própolis, pólen, geleia real e cera, bem como os serviços de polinização disponibilizados regularmente para as atividades de agricultura e pastagens (VIEIRA; 2011).

Os países que mais se destacaram na produção apícola no ano de 2009 estão listados na Tabela 1.1. A China lidera a produção mundial com 26,5%, seguida pela Argentina (5,4%) e Turquia (5,4%). O Brasil ocupa apenas a 10ª posição no ranking, correspondendo a somente 2,5% da produção mundial (FAO, 2011). Considerando a vasta extensão territorial de 8,513 milhões de quilômetros quadrados, a vegetação e o clima diversificado que favorecem a produção apícola em todos os estados e em todas as épocas do ano, percebe-se que a atividade apícola brasileira ainda é pouco expressiva frente ao imenso potencial existente (VIEIRA, 2011).

Tabela 1.1 – Produção de mel mundial e dos principais países no ano de 2009.

Ranking	País	Quantidade (t)	%
	Mundo	1.535.194	100
1°	China	407.367	26,5
2°	Argentina	83.121	5,4
3°	Turquia	82.203	5,4
4°	Ucrânia	74.000	4,8
5°	Estados Unidos	65.366	4,3
6°	México	56.071	3,7
7°	Rússia	53.655	3,5
8°	Índia	43.865	2,9
9°	Etiópia	40.688	2,7
10°	Brasil	38.765	2,5
11°	Tanzânia	33.420	2,2
12°	Espanha	32.000	2,1
13°	Irã	31.850	2,1
14°	Canadá	29.387	1,9
15°	Coreia	26.009	1,7
16°	Angola	25.556	1,7
17°	Quênia	25.100	1,6
18°	Hungria	22.000	1,4
19°	Uruguai	21.068	1,4
20°	Romênia	19.937	1,3
	Subtotal	1.211.428	78,9

Fonte: FAO (2011).

Um dos fatores que pode explicar a baixa exploração da atividade apícola nacional é o fato de o consumo de mel *in natura* ainda ser bastante baixo e pouco difundido junto à população brasileira (VIEIRA, 2011). Enquanto a média mundial de consumo é de cerca de 300 g/hab/ano (Tabela 1.2), no Brasil esta média está em torno de 100 g/hab/ano, quantidade pouco expressiva. Em países da comunidade europeia, entretanto, a média do consumo é de 700 g/hab/ano, podendo superar o índice de 1000 g/hab/ano em alguns países (FAO, 2011).

Tabela 1.2 – Consumo médio anual de mel por habitante por país.

País	Consumo (g/hab/ano)
Áustria	1.700
Grécia	1.600
Suíça	1.300
Alemanha	1.200
Eslovênia	1.100
Ucrânia	1.000
Turquia	800
Canadá	700
Estados Unidos	600
Brasil	100

Fonte: FAO (2011).

No ano de 2008, segundo estimativas da FAO, foram exportadas no mundo todo 451.246 toneladas de mel *in natura*, gerando um movimento financeiro de mais de 1,2 bilhões de dólares. Os principais países exportadores foram, em volume, China, Argentina, México, Alemanha e Hungria (Tabela 1.3). Juntos, estes cinco países somaram participação superior a 53% do total das exportações. O Brasil aparece como o 8º maior exportador, com cerca de 4% de participação no mercado. De acordo com a Associação Brasileira dos Exportadores de Mel, até novembro de 2010 a quantidade de mel exportado pelo Brasil alcançou 17 mil toneladas, sendo que os três principais mercados compradores de mel brasileiro foram respectivamente os Estados Unidos, Alemanha e o Reino Unido (ABEMEL, 2011).

Tabela 1.3 – Principais países exportadores de mel: quantidade e valores exportados no ano de 2008.

País	Quantidade (t)	Valor acumulado (US\$)
China	89.277	153.480.000
Argentina	69.228	181.311.000
México	29.646	83.789.000
Alemanha	27.598	121.409.000
Hungria	24.179	87.997.000
Canadá	22.640	66.883.000
Vietnã	19.807	33.029.000
Brasil	18.271	43.571.000
Espanha	16.338	62.217.000

Fonte: FAO (2011).

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011), a produção nacional no ano de 2009 atingiu a marca de 38.764 toneladas, registrando um acréscimo de 2,6% na produção em relação ao ano de 2008. Os estados que obtiveram as maiores produções foram Rio Grande do Sul, Paraná, Ceará Piauí e Santa Catarina (Tabela 1.4), que juntos contabilizaram 65,8% do volume total produzido. Dentre as regiões, a Região Sul se destaca no volume de produção (42,6%), seguida pela Nordeste (38,6%). O setor apícola nacional é responsável por grande contribuição na geração de benefícios econômicos e sociais, pois gera milhares de empregos diretos e indiretos durante a cadeia produtiva, como na polinização de pomares, na manutenção dos apiários, produção de equipamentos e manejo de produtos e serviços apícolas (VIEIRA, 2011).

Tabela 1.4 – Produção nacional de mel no ano de 2009.

Ranking	Estado	Quantidade (t)	%
	Brasil	38.764	100
1°	Rio Grande do Sul	7.155	18,5
2°	Paraná	4.831	12,5
3°	Ceará	4.735	12,2
4°	Santa Catarina	4.515	11,6
5°	Piauí	4.278	11,0
6°	Minas Gerais	2.606	6,7
7°	São Paulo	2.103	5,4
8°	Bahia	1.922	5,0
9°	Pernambuco	1.595	4,1
10°	Rio Grande do Norte	1.107	2,9
	Demais estados	3.917	10,1

Fonte: IBGE (2011).

O Estado de Santa Catarina apresenta boas condições para o desenvolvimento da atividade apícola em toda sua extensão territorial, com vegetação natural diversificada e de boa qualidade melífera. Estas qualidades fazem de Santa Catarina o 4° maior produtor nacional, responsável por 11,6% do volume de mel produzido em 2009 (Tabela 1.4). Estima-se que existam cerca de 350 mil colmeias distribuídas em praticamente todos os municípios do Estado, e aproximadamente 30 mil apicultores, dentre os quais cerca de três mil são considerados apicultores profissionais e têm na atividade apícola sua principal fonte de renda (VIEIRA, 2011).

As mesorregiões catarinenses de maior produtividade são Oeste Catarinense (1.163 t produzidas em 2009), Serrana (1.080 t) e Sul Catarinense (840 t), com rendimento médio oscilando entre 14 e 26 quilos por colmeia durante o ano (IBGE, 2011). A variação do rendimento está diretamente relacionada com as condições climáticas (índice pluviométrico, índice de insolação, temperatura e umidade relativa), com a localização geográfica da colmeia e com a disponibilidade e condições da florada. As floradas mais utilizadas para extração de néctar ao longo do estado são flores silvestres, eucalipto, vassouras, bracatinga, uva-do-japão e laranjeira (VIEIRA, 2011).

2 Mel: definição, composição e qualidade

Entende-se por mel, o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores que ficam sobre as partes vivas das plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000).

Do ponto de vista químico, mel é uma solução aquosa supersaturada de açúcares invertidos, principalmente glicose e frutose (BERTONCELJ et al., 2007; KÜÇÜK et al., 2007; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). Além dos açúcares, o mel é composto minoritariamente por cerca de outras 200 substâncias, como minerais, outros sacarídeos (sacarose, maltose), proteínas, enzimas (invertase, glicose oxidase, catalase, fosfatase), aminoácidos, vitaminas (ácido ascórbico, niacina, piridoxina), ácidos orgânicos (glucônico, acético), ácidos fenólicos, flavonoides, compostos voláteis, carotenoides, produtos da reação de Maillard, cera e grãos de pólen (WHITE, 1979a; GHELDOLF; WANG; ENGESETH, 2002; FALLICO et al., 2004; BERETTA et al., 2005; BLASA et al., 2006).

O mel pode ser classificado de acordo com sua origem em mel floral ou mel de melato. O mel floral é aquele derivado do néctar das flores, enquanto o mel de melato é obtido principalmente a partir da excreção açucarada de alguns insetos hemípteros na planta hospedeira ou do exsudato de plantas, como por exemplo, o melato de bracatinga (SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010; VIEIRA, 2011). O mel floral ainda pode ser classificado usualmente em monofloral quando mais de

45% do pólen presente é proveniente de plantas da mesma família, gênero ou espécie, e multifloral quando o pólen presente não é majoritariamente da mesma origem (ANKLAM, 1998; SILICI; SAGDIC; EKICI, 2010; LÉON-RUIZ et al., 2011). Porém, como as abelhas visitam plantas em uma área relativamente grande (aproximadamente 7 km²), os méis multiflorais, compostos de uma mistura de diferentes tipos de néctares e/ou exsudatos, ocorrem mais comumente que os méis monoflorais (KROPF et al., 2010; BILANDŽIĆ et al., 2011). Desta forma méis monoflorais são mais raros, mais difíceis de produzir e apresentam aromas altamente característicos, indicando a origem do néctar (FALLICO et al., 2004; VANHANEN; EMMERTZ; SAVAGE, 2011). Atualmente, percebe-se um crescente interesse comercial na produção de méis monoflorais, devido aos usos terapêuticos e gastronômicos de certas variedades de mel (LÉON-RUIZ et al., 2011).

A composição e a qualidade do mel são amplamente relacionadas com sua origem floral e geográfica, porém também são afetadas pelas condições climáticas, pelo processamento, manipulação, embalagem e estocagem (ANKLAM, 1998; GHELDOF; WANG; ENGESETH, 2002; BERETTA et al., 2005; TURHAN et al., 2008). A elaboração de normas para padronizar o mel é importante para estabelecer o nível mínimo de qualidade para a comercialização do produto e para proteger os consumidores de eventuais fraudes (FÉAS et al., 2010b). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) é o órgão responsável pelo regulamento técnico de identidade e qualidade do mel, através da Instrução Normativa n^o 11, de 20 de outubro de 2000, que tem como objetivo estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deve cumprir o mel destinado ao consumo humano direto. Esta regulamentação, entre outros fatores, leva em conta as características físico-químicas do mel, estabelecendo limites mínimos ou máximos para parâmetros relacionados à maturidade, pureza e deterioração das amostras (BRASIL, 2000). Para os consumidores, as características determinantes da qualidade são o estado de cristalização, o qual está relacionado ao conteúdo de glicose e frutose, e a cor (MOISE et al., 2007). A Tabela 1.5 apresenta os valores encontrados na literatura para os alguns dos principais parâmetros físico-químicos de qualidade de amostras de mel analisadas em diferentes países.

Tabela 1.5 – Características físico-químicas de méis de abelhas.

Ref.*	País de origem	Umidade (g/100 g)	Condutividade elétrica (mS/cm)	Acidez livre (mEq/kg)	pH
1	Itália	15,2 – 18,5	0,13 – 1,13	9,7 – 23,0	3,4 – 5,9
2	Uruguai	16,6 – 18,6	0,41 – 0,99	-**	3,0 – 4,3
3	Turquia	17,0 – 19,7	-	29,4 – 36,7	-
4	Algéria	14,6 – 19,0	0,21 – 1,61	-	3,5 – 4,4
5	Argentina	14,3 – 18,6	-	21,2 – 43,2	3,3 – 4,7
6	Itália	18,0 – 20,0	0,23 – 1,22	11,3 – 28,0	3,2 – 6,5
7	Argentina	19,3 – 20,3	-	15,2 – 29,8	-
8	Austrália	10,6 – 17,8	-	10,3 – 20,3	4,0 – 4,7
9	Argentina	15,8 – 20,2	-	10,1 – 52,2	3,1 – 5,8
10	Portugal	16,8 – 18,6	0,46 – 0,94	17,2 – 45,2	3,5 – 4,2
11	Portugal	15,9 – 17,2	0,19 – 0,53	16,0 – 32,0	3,7 – 4,3
12	Turquia	13,6 – 19,4	-	7,0 – 29,6	-
13	Malásia	9,3 – 22,3	-	23,3 – 81,8	3,4 – 4,0
14	Índia	17,2 – 21,6	0,33 – 0,94	-	3,7 – 4,4
15	Cuba	17,4 – 20,3	0,10 – 0,60	16,8 – 27,7	3,9 – 4,9
16	Argentina	14,1 – 18,8	0,12 – 0,68	9,9 – 36,8	3,2 – 4,1
17	Espanha	15,3 – 16,1	0,13 – 1,06	9,5 – 45,0	4,0 – 4,7
18	Espanha	15,5 – 18,9	0,20 – 2,09	8,9 – 48,8	3,5 – 6,9

*Referências: 1 - Fallico et al. (2004); 2 - Corbella e Cozzolino (2006); 3 - Küçük et al. (2007); 4 - Ouchemoukh, Louaileche e Schweitzer (2007); 5 - Cantarelli et al. (2008); 6 - Fallico, Arena e Zappala (2008); 7 - Tosi et al. (2008); 8 - Ajlouni e Sujirapinyokul (2009); 9 - Baroni et al. (2009); 10 - Féas et al. (2010a); 11 - Gomes et al. (2010); 12 - Kahraman et al. (2010); 13 - Khalil, Sulaiman e Gan (2010); 14 - Saxena, Gautam e Sharma (2010); 15 - Alvarez-Suarez et al. (2011); 16 - Isla et al. (2011); 17 - León-Ruiz et al. (2011); 18 - Manzanares et al. (2011).

** Parâmetro não avaliado.

O conteúdo de umidade é considerado um parâmetro relacionado à maturidade do produto, e não deve estar acima de 20 g/100 g de mel (BRASIL, 2000). É uma característica influenciada pela origem botânica, geográfica e condições climáticas da estação, sendo que altos teores de água são indicativos de colheita prematura ou sob condições de alta umidade (AJLOUNI; SUJIRAPINYOKUL, 2009; KHALIL; SULAIMAN; GAN, 2010). Considerado um bom critério de qualidade, altos teores de água podem resultar em fermentação indesejável dos açúcares presentes no mel durante seu armazenamento, causada por leveduras osmotolerantes, com conseqüente formação de

álcool etílico e dióxido de carbono. O álcool formado pode então ser oxidado a ácido acético, que confere um gosto amargo no mel (CORBELLA; COZZOLINO, 2006; AL et al., 2009; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). Além disso, um baixo teor de umidade contribui para a estabilidade contra a granulação durante a estocagem, enquanto altos teores podem indicar adulteração por adição de água (ANKLAM, 1998; KÜÇÜK et al., 2007).

A medida da condutividade elétrica não é uma exigência da legislação brasileira, porém o Codex Alimentarius preconiza (com algumas exceções) que mel floral apresente condutividade elétrica menor do que 0,8 mS/cm e mel de melato apresente valores maiores do que 0,8 mS/cm (CODEX STAN 12, 2001). A análise é considerada fácil, rápida e barata, usada para a diferenciação entre mel floral e mel de melato, entretanto ainda é pouco utilizada nas análises de rotina (OUCHEMOUKH; LOUAILECHE; SCHWEITZER, 2007; KAŠKONIENĚ; VENSKUTONIS; ČEKSTERYTĚ, 2010). A condutividade elétrica do mel pode ser explicada levando em conta o conteúdo de minerais e a acidez livre, as quais refletem a presença de íons e ácidos orgânicos: quanto maiores os seus conteúdos, maior a condutividade (TERRAB et al., 2003; GOMES et al., 2010; VANHANEN; EMMERTZ; SAVAGE, 2011).

Em geral, o mel é naturalmente ácido, independente da origem botânica (SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). A acidez livre é considerada um indicativo de deterioração do mel, e seu conteúdo máximo é de 50 mEq/kg de mel (BRASIL, 2000). Altos valores de acidez livre são indicadores da ocorrência de fermentação dos açúcares pela ação de leveduras. A acidez do mel parece ser influenciada pela origem floral, e é proveniente da presença de ácidos orgânicos, particularmente ácido glucônico, pirúvico, málico e cítrico, todos em equilíbrio com suas lactonas ou ésteres, além de íons orgânicos, como fosfatos e cloretos (ANKLAM, 1998; AJLOUNI; SUJIRAPINYOKUL, 2009). Observa-se uma relação negativa entre o teor de acidez e o conteúdo de cinzas, que pode ser explicada considerando que um alto conteúdo de minerais corresponde a uma maior fração salinizada dos ácidos presentes (FINOLA; LASAGNO; MARIOLI, 2007). O pH do mel geralmente apresenta valores em torno de 4,0, o que inibe a presença e o crescimento de micro-organismos, além de ser importante durante a extração e estocagem, por influenciar na textura, estabilidade e vida de prateleira do produto (TERRAB et al., 2004; CORBELLA; COZZOLINO, 2006; OUCHEMOUKH; LOUAILECHE; SCHWEITZER, 2007; BERTONCELJ et al., 2011a).

O conteúdo de hidroximetilfurfural (HMF) é considerado um parâmetro de deterioração do mel, e não deve ultrapassar o valor de 60 mg/kg (BRASIL, 2000). Recentemente surgiu na Europa uma classificação de mel “fresco, cru ou virgem” para méis com umidade não superior a 18 g/100 g e conteúdo de HMF menor que 25 mg/kg (FÉAS et al., 2010a). O aquecimento do mel durante o processamento e o armazenamento durante longos períodos podem levar à conversão de açúcares em HMF, através da desidratação de hexoses em meio ácido, ou via reação de Maillard (KÜÇÜK et al., 2007; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). Outros fatores também afetam a formação de HMF, como a origem floral do mel, algumas de suas propriedades físico-químicas (umidade, pH, acidez, conteúdo de minerais) e outros fatores relacionados ao processamento, como o uso de recipientes metálicos (FALLICO et al., 2004; KHALIL; SULAIMAN; GAN, 2010). A prática de adulteração pela adição de xaropes de açúcares invertidos também pode incrementar o valor do HMF. Uma condição importante que deve ser levada em consideração em países como o Brasil é o clima tropical, que pode aumentar o nível de HMF formado ainda na colmeia (AJLOUNI; SUJIRAPINYOKUL, 2009).

A atividade diastásica está relacionada com a atividade da enzima amilase que é adicionada no mel pelas das abelhas (ANKLAM, 1998). Também é considerado um parâmetro relacionado com a deterioração do mel, e deve estar acima de 8 unidades na escala Göthe. Porém, em méis com baixo conteúdo enzimático natural podem apresentar como mínimo 3 unidades Göthe, desde que o conteúdo de HMF não exceda 15 mg/kg (BRASIL, 2000). Uma unidade Göthe, ou número de diastase, correspondente também à escala Schade, equivale ao número de mL de uma solução de amido 1% (m/v) hidrolisada em uma hora, a 40 °C, pela enzima presente em 1 g de mel (KÜÇÜK et al., 2005). Este parâmetro pode indicar a exposição do mel a aquecimento excessivo e longo tempo de armazenagem, pois estes dois fatores contribuem para a diminuição da atividade diastásica (ANKLAM, 1998). Desta forma, a atividade diastásica e o conteúdo de HMF são reconhecidos mundialmente como indicadores de frescor e sobreaquecimento do mel, sendo que uma amostra de qualidade apresenta alta atividade diastásica e baixo conteúdo de HMF (CORBELLA; COZZOLINO, 2006; KÜÇÜK et al., 2007; BARONI et al., 2009). A Tabela 1.6 mostra os valores encontrados para o conteúdo de HMF e atividade diastásica em amostras de mel de diferentes países.

Tabela 1.6 – Conteúdo de HMF e atividade diastásica determinados em amostras de mel.

Ref.*	País de origem	HMF (mg/kg)	Atividade diastásica
1	Itália	1,2 – 5,9	7,6 – 33,9
2	Turquia	19,2 – 28,6	17,7 – 23,0
3	Argentina	1,5 – 34,1	10,1 – 41,0
4	Argentina	5,8 – 20,6	11,2 – 25,8
5	Austrália	0,4 – 74,9	9,4 – 25,4
6	Argentina	0,1 – 9,2	8,9 – 38,4
7	Portugal	0,2 – 22,8	10,0 – 30,0
8	Portugal	18,0 – 94,0	8,7 – 16,1
9	Turquia	7,7 – 52,6	5,0 – 17,9
10	Cuba	3,3 – 15,9	13,4 – 33,4
11	Espanha	ND – 10,8	4,7 – 35,9

*Referências: 1 - Fallico et al. (2004); 2 - Küçük et al. (2007); 3 - Cantarelli et al. (2008); 4 - Tosi et al. (2008); 5 - Ajlouni e Sujirapinyokul (2009); 6 - Baroni et al. (2009); 7 - Féas et al. (2010a); 8 - Gomes et al. (2010); 9 - Kahraman et al. (2010); 10 - Alvarez-Suarez et al. (2011); 11 - Manzanares et al. (2011).

ND – não detectado

Açúcares representam os principais componentes do mel, correspondendo a cerca de 95 g/100 g em matéria seca (KÜÇÜK et al., 2007; AL et al., 2009; KAŠKONIENĚ; VENSKUTONIS; ČEKSTERYTĚ, 2010). Eles são produzidos pelas abelhas a partir da sacarose presente no néctar, que é transformada pela ação de diversas enzimas, como a α e β -glucosidase, α e β -amilase e β -frutoseidase (FUENTE et al., 2011). Os açúcares são os responsáveis pelas propriedades de viscosidade, higroscopicidade, granulação e pelo alto valor energético do mel (OUCHEMOUKH et al., 2010). Entre os dois açúcares principais, a concentração de frutose geralmente é predominante sobre a de glicose, e, além destes, estão presentes cerca de outros 25 diferentes di, tri e oligossacarídeos minoritários, compostos de diferentes combinações entre as moléculas de glicose e frutose (ANKLAM, 1998; FINOLA; LASAGNO; MARIOLI, 2007; KAŠKONIENĚ; VENSKUTONIS; ČEKSTERYTĚ, 2010). O conteúdo de açúcares redutores calculados como açúcares invertidos é um indicativo de maturidade, e deve ser maior que 65 g/100 g em mel floral ou 60 g/100 g em mel de melato (BRASIL, 2000). Considerando que a glicose é menos solúvel que a frutose, a razão entre o conteúdo destes açúcares é determinante na fluidez do mel: se a taxa frutose/glicose for maior que 1 o mel estará fluido, de modo inverso, se esta taxa for menor

que 1 o mel estará cristalizado (AL et al., 2009). Além disso, a taxa frutose/glicose pode afetar o sabor do mel, tendo em vista que a frutose é mais doce que a glicose (AJLOUNI; SUJIRAPINYOKUL, 2009).

O teor de sacarose aparente também é considerado uma característica de maturidade, e não deve ser superior a 6 g/100 g de mel floral ou 15 g/100 g de mel de melato (BRASIL, 2000). Teores altos de sacarose aparente, na maioria das vezes indicam uma colheita precoce do mel, visto que o período de maturação é necessário para que, entre outros fatores, a sacarose presente no néctar seja transformada em glicose e frutose pela ação da invertase das abelhas (KÜÇÜK et al., 2007). Paralelamente, altos conteúdos de sacarose sugerem adulteração do mel através da alimentação artificial das abelhas com xarope de sacarose ou adição de xaropes diretamente no mel (ANKLAM, 1998). A Tabela 1.7 apresenta os valores encontrados na literatura para o conteúdo de frutose, glicose e sacarose presentes no mel de abelhas.

Tabela 1.7 – Conteúdo de frutose, glicose e sacarose encontrados em mel de abelhas.

Ref.*	País de origem	Frutose (g/100 g)	Glicose (g/100 g)	Sacarose (g/100 g)
1	Itália	32,2 – 38,8	25,1 – 32,2	-**
2	Argentina	33,0 – 48,4	24,0 – 31,7	-
3	China	33,5 – 41,2	28,0 – 38,5	2,4 – 7,4
4	Argentina	32,5 – 41,6	25,2 – 33,5	-
5	Austrália	30,8 – 40,0	26,5 – 34,5	-
6	Romênia	20,8 – 45,8	21,6 – 45,6	ND – 0,8
7	Argentina	26,1 – 48,3	19,4 – 38,0	-
8	Lituânia	32,9 – 40,0	34,6 – 42,6	0,7 – 2,5
9	Argélia	36,0 – 42,6	24,6 – 35,1	ND – 5,3
10	México	37,5 – 44,0	35,0 – 40,2	2,8 – 3,1
11	Espanha	30,1 – 45,3	23,6 – 37,5	ND – 2,2
12	Espanha	30,4 – 40,7	20,2 – 37,8	-
13	Espanha	35,9 – 42,9	26,6 – 38,7	0,05 – 3,3

* Referências: 1 - Fallico et al. (2004); 2 - Finola, Lasagno e Marioli (2007); 3 - Cheng et al. (2008); 4 - Tosi et al. (2008); 5 - Ajlouni e Sujirapinyokul (2009); 6 - Al et al. (2009); 7 - Baroni et al. (2009); 8 - Kaškonienė, Venskutonis e Čeksterytė (2010); 9 - Ouchemoukh et al. (2010); 10 - Viuda-Martos et al. (2010); 11 - Fuente et al. (2011); 12 - León-Ruiz et al. (2011); 13 - Manzanares et al. (2011).

** Parâmetro não avaliado.

ND – não detectado.

A quantidade e o perfil de minerais presentes no mel são dependentes principalmente dos nutrientes que foram absorvidos pela planta de origem, que por sua vez são determinados pelas características do solo e do clima, desta forma este parâmetro é um potencial indicador da origem geográfica do mel (GONZÁLEZ-MIRET et al., 2005; BARONI et al., 2009; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). O conteúdo de minerais no mel geralmente é baixo, variando entre 0,05 a 0,2% em mel floral, podendo ultrapassar 1% em mel de melato (HERNÁNDEZ et al., 2005; VANHANEN; EMMERTZ; SAVAGE, 2011). O principal mineral presente é o potássio, que contabiliza cerca de 50% do total (TERRAB et al., 2004). Outros minerais presentes são sódio, cálcio, magnésio, manganês, cobre, ferro, silício, fósforo (fosfato), cloro (cloreto) e enxofre (sulfato) (ANKLAM, 1998; TERRAB et al., 2003; GONZÁLEZ-MIRET et al., 2005; SUÁREZ-LUQUE et al., 2005). A Tabela 1.8 apresenta os teores dos principais minerais presentes no mel. A ocorrência de alguns íons metálicos como o cobre, níquel e cobalto sugerem contaminação durante a produção, processamento, transporte e armazenamento devido ao uso de materiais inapropriados de aço ou galvanizados, enquanto é recomendado o uso de materiais inoxidáveis (ANKLAM, 1998; CORBELLA; COZZOLINO, 2006). Além disso, o mel pode ser considerado um biomarcador de poluição ambiental, pois a presença de certos elementos pode indicar a contaminação cumulativa no ar, na água, nas plantas e no solo da região visitada pelas abelhas (PYRZYNSKA; BIESAGA, 2009; ALMEIDA-SILVA et al., 2011). Normalmente, o teor de cinzas está relacionado positivamente com a condutividade elétrica e com a intensidade da cor e do sabor do mel (TERRAB et al., 2003; GONZÁLEZ-MIRET et al., 2005; AL et al., 2009).

Tabela 1.8 – Conteúdo dos principais minerais (mg/kg) encontrados em mel.

Ref.*	K	Ca	Na	Mg	Mn
1	261 – 1380	110 – 248	256 – 501	37 – 139	-**
2	639 – 1845	45,6 – 341,0	11,7 – 218,5	13,3 – 73,2	0,13 – 9,47
3	151,8 – 1718,0	19,1 – 138,8	47,5 – 319,7	4,7 – 176,1	0,63 – 26,96
4	214 – 3166	20,7 – 193	9,4 – 258	7,2 – 165	-
5	500 – 4380	50 – 179	26 – 221	17 – 209	2,3 – 51
6	500 – 3818	160 – 900	73 – 115	-	0,59 – 9,69
7	90,9 – 1955,8	18,6 – 136,1	6,1 – 90,0	6,0 – 46,6	0,07 – 0,68
8	147 – 4136	137 – 409	56,6 – 232	22,2 – 159	0,13 – 16,9
9	300 – 1999,6	109,8 – 183,3	27,4 – 39,2	34,2 – 67,1	-
10	13 – 743,7	9 – 80	6 – 194	1 – 118	ND – 1,76
11	7,8 – 4221,6	ND – 159,2	0,4 – 89,6	0,1 – 64,8	0,12 – 13,2
12	261 – 3940	15,4 – 164	-	-	1,65 – 25,4
13	406 – 425	37,6 – 33,5	12,3 – 18,3	16,4 – 21,7	0,64 – 0,83
14	34,8 – 3640	7,2 – 94,3	1,1 – 110	7,5 – 86,3	0,18 – 4,75

* Referências: 1 - Terrab et al. (Espanha, 2004); 2 - Fernández-Torres et al. (Espanha, 2005); 3 - González-Miret et al. (Espanha, 2005); 4 - Hernández et al. (Ilhas Canárias, 2005); 5 - Suárez-Luque et al. (Espanha, 2005); 6 - Küçük et al. (Turquia, 2007); 7 - Cantarelli et al. (Argentina, 2008); 8 - Pisani, Protano e Riccobono (Itália, 2008); 9 - Turhan et al. (Turquia, 2008); 10 - Baroni et al. (Argentina, 2009); 11 - Chudzinska e Baralkiewicz (Polônia, 2010); 12 - Kropf et al. (Eslovênia, 2010); 13 - Almeida-Silva et al. (Portugal, 2011); 14 - Vanhanen, Emmertz e Savage (Nova Zelândia, 2011).

** Parâmetro não avaliado.

ND – Não detectado.

A cor do mel é resultante de uma combinação de diversos fatores, como o conteúdo de carotenoides e flavonoides, potencial alcalino, conteúdo de minerais, presença de contaminantes específicos decorrentes da manipulação, processamento e estocagem e ocorrência de reações químicas durante a maturação e armazenamento, como reações de Maillard (FRANKEL; ROBINSON; BERENBAUM, 1998; BERETTA et al., 2005; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2011). Assim, podem ser observadas cores muito variadas, desde branco pálido até marrom escuro ou até mesmo preto (GONZÁLEZ-MIRET et al., 2005; ALMEIDA-SILVA et al., 2011). Juntamente com outras características sensoriais como sabor e aroma, a cor é um atributo que pode indicar a origem botânica da amostra. Diferentes autores utilizam diferentes métodos de avaliação da cor do mel, que podem ser subjetivos (sensoriais) ou objetivos (instrumentais). Dentre os métodos instrumentais, um dos mais usados é o método de refletância do sistema

CIE $L^*a^*b^*$ (BERTONCELJ et al., 2007). O parâmetro L^* indica o grau de luminosidade, que varia de 0 (preto) a 100 (branco). Alguns autores classificam o mel como claro quando L^* é maior do que 50 e como escuro quando L^* é menor do que 50. O valor de a^* positivo indica componentes vermelhos e negativo indica componentes verdes, enquanto o valor de b^* positivo indica componentes amarelos e negativos indica componentes azuis (GONZÁLEZ-MIRET et al., 2005; AJLOUNI; SUJIRAPINYOKUL, 2009; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). Os valores encontrados por outros autores para os parâmetros L^* , a^* e b^* em amostras de mel podem ser observados na Tabela 1.9.

Tabela 1.9 – Valores dos parâmetros de cor L^* , a^* e b^* em méis.

Ref.*	País de origem	L^*	a^*	b^*
1	Espanha	28,68 – 87,42	0,66 – 31,14	1,59 – 66,12
2	Eslovênia	37,97 – 65,67	-3,79 – 12,31	13,49 – 49,36
3	Austrália	80,8 – 101,0	-0,20 – 5,13	-9,79 – 9,11
4	Eslovênia	46,26 – 65,95	-2,86 – 9,56	15,82 – 42,79
5	Índia	26,3 – 36,8	0,12 – 4,90	0,70 – 14,40
6	México	23,87 – 37,38	0,45 – 3,32	2,21 – 11,09
7	Eslovênia	32,75 – 66,27	-4,43 – 15,62	6,20 – 51,62
8	Espanha	38,46 – 88,23	-0,10 – 21,05	17,37 – 78,02

* Referências: 1 - González-Miret et al. (2005); 2 - Bertonselj et al. (2007); 3 - Ajlouni e Sujirapinyokul (2009); 4 - Kropf et al. (2010); 5 - Saxena, Gautam e Sharma (2010); 6 - Viuda-Martos et al. (2010); 7 - Bertonselj et al. (2011); 8 - León-Ruiz et al. (2011).

3 Compostos bioativos do mel e atividade antioxidante

Diversos estudos mostram que folhas, flores e frutos de diferentes plantas sintetizam substâncias através de seu metabolismo secundário, os quais apresentam atividade antioxidante, agindo como defensores contra radicais livres. O número de compostos com atividade antioxidante sintetizados pelas plantas é estimado atualmente entre 4000 e 6000, sendo que grande parte destes são compostos fenólicos. A maioria destas plantas é utilizada pelas abelhas para colher néctar e produzir mel, conseqüentemente, estes componentes bioativos das plantas podem ser transferidos para o mel (BALTRUŠAITYTĖ; VENSKUTONIS; ČEKSTERYTĖ, 2007; KÜÇÜK et al., 2007; BERTONCELJ et al., 2011b). O perfil e a quantidade dos componentes

bioativos presentes no néctar são dependentes de fatores como espécie da planta e condições climáticas e geográficas, por isso é sensato esperar que méis provindos de diferentes locais apresentem propriedades antioxidantes diferentes (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002; SILICI; SAGDIC, EKICI, 2010).

Numerosos estudos podem ser encontrados na literatura descrevendo as propriedades antioxidantes do mel, através de distintos métodos *in vitro* ou *in vivo* (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002; GHEDOLF; WANG; ENGESETH, 2002; ALJADI; KAMARUDDIN, 2004; BERETTA et al., 2005; BLASA et al., 2006; NAGAI et al., 2006; BERTONCELJ et al., 2007; KÜÇÜK et al., 2007; AL et al., 2009; FERREIRA et al., 2009; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2011; LACHMAN et al., 2010; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010; SILICI; SAGDIC; EKICI, 2010; BERTONCELJ et al., 2011a; ISLA et al., 2011; KHALIL et al., 2011). Os métodos para a determinação da atividade antioxidante geralmente envolvem a geração de espécies oxidativas, comumente radicais, cuja concentração é monitorada na presença de compostos antioxidantes que atuam sobre eles (KÜÇÜK et al., 2007).

Não existe um método oficial para a determinação da atividade antioxidante em amostras de mel, porém observa-se na literatura uma grande utilização dos métodos DPPH e FRAP. O método do radical DPPH é um dos mais rápidos para avaliar a habilidade da transferência de elétrons/hidrogênio em diversas matrizes com potencial antioxidante (BERETTA et al., 2005). O DPPH é um radical orgânico estável de nitrogênio amplamente utilizado para testar a capacidade de inibição de radicais livres de diversas matrizes. A presença de elétrons desemparelhados no DPPH é responsável pela forte absorção máxima no comprimento de onda de 515 nm, resultando na cor púrpura. A alteração da cor púrpura para amarelo ocorre quando o elétron desemparelhado forma um par com o hidrogênio doado pelo composto antioxidante, convertendo o DPPH para sua forma reduzida (BERTONCELJ et al., 2007; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). O método do poder redutor FRAP é vantajoso na estimativa direta dos antioxidantes e redutores presentes em uma amostra, baseado na habilidade da amostra em reduzir o Fe^{+3} (oxidado) em Fe^{+2} (reduzido) (BERETTA et al., 2005).

Os compostos bioativos encontrados no mel com função antioxidante podem ser enzimáticos, como catalase, glicose oxidase e peroxidase, e não-enzimáticos, como flavonoides, ácidos fenólicos, ácido ascórbico, tocoferol, ácidos orgânicos, aminoácidos, carotenoides

e produtos de Maillard (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002; GHELDOF; WANG; ENGESETH, 2002; TURKMEN et al., 2005). Considerando que o mel possui compostos antioxidantes tanto lipofílicos quanto hidrofílicos, pode-se afirmar que a interação sinérgica entre estes compostos faz do mel um antioxidante natural ideal que pode agir em diferentes sítios celulares (ALJADI; KAMARUDDIN, 2004).

Os principais fitoquímicos reportados no mel com atividade antioxidante são os compostos fenólicos, cuja presença no mel e sua forte relação com a atividade antioxidante já é amplamente reportada na literatura (Tabela 1.10). A estrutura química dos compostos fenólicos é caracterizada pela presença de ao menos um anel aromático com no mínimo um hidrogênio substituído por um grupamento hidroxila, o que confere atividade antioxidante relacionada a diferentes mecanismos, como sequestro de radicais livres, doação de hidrogênio, extinção do oxigênio singlete, quelação de íons metálicos e ação como substrato para radicais como superóxido e hidroxila (SIMÕES et al., 2004). Os principais compostos fenólicos do mel são da classe dos flavonoides, que ocorrem no néctar e no pólen na forma de glicosídeos, e são hidrolisados a agliconas no estômago das abelhas, e posteriormente, transferidos ao mel (IURLINA et al., 2009; SILICI; SAGDIC; EKICI, 2010). Os flavonoides majoritários são as flavanonas pinocembrina e pinobanksina, e as flavonas crisina e galangina, todos derivados do própolis. Outros flavonoides já identificados são quercetina, kaempferol, miricetina, catequina, naringenina, apigenina, hesperidina e luteolina (ANKLAM, 1998; GHELDOF; WANG; ENGESETH, 2002; BERTONCELJ et al., 2011b; ISLA et al., 2011). Os ácidos fenólicos são outra classe de compostos fenólicos presentes no mel, sendo que alguns autores já identificaram ácido gálico, fenilacético, benzoico, hidroxibenzoico, cinâmico, vanílico, abscísico, *p*-cumárico, elágico, clorogênico, cafeico, ferúlico e siríngico (ANKLAM, 1998; GHELDOF; WANG; ENGESETH, 2002; STEPHENS et al., 2010; KHALIL et al., 2011). A composição e o perfil de compostos fenólicos presentes são variáveis e dependem principalmente da origem floral do mel (ANKLAM, 1998; ALJADI; KAMARUDDIN, 2004; KÜÇÜK et al., 2007). Desta forma, a presença de alguns compostos individuais ou grupo de compostos pode servir como uma importante ferramenta na determinação da origem floral do mel (ANDRADE et al., 1997; BALTRUŠAITYTĖ; VENSKUTONIS; ČEKSTERYTĖ, 2007; IURLINA et al., 2007; BERTONCELJ et al., 2011b).

Tabela 1.10 – Compostos fenólicos totais em méis e sua correlação com a atividade antioxidante.

Ref.*	País de origem	Fenólicos totais (mg EAG/100 g)	Coeficiente de correlação (r)	
			DPPH	FRAP**
1	Malásia	1,6 – 2,1	-**	0,869
2	Itália	5,2 – 79,0	0,918	0,885
3	Itália	3,0 – 18,0	-	0,938
4	Eslovênia	2,6 – 28,6	0,932	0,966
5	Romênia	2,0 – 125,0	0,940	-
6	Rep. Tcheca	8,2 – 24,2	-	0,852
7	Índia	47,0 – 98,0	0,800	0,900
8	Cuba	21,4 – 23,4	-	0,890
9	Eslovênia	2,6 – 31,6	0,827	0,960
10	Malásia	15,2 – 52,6	0,965	0,976

EAG – equivalentes a ácido gálico.

* Referência: 1 - Aljadi e Kamaruddin (2004); 2 - Beretta et al. (2005); 3 - Blasa et al. (2006); 4 - Bertoneclj et al. (2007); 5 - Al et al. (2009); 6 - Lachman et al. (2010); 7 - Saxena, Gautam e Sharma (2010); 8 - Alvarez-Suarez et al. (2011); 9 - Bertoneclj et al. (2011a); 10 - Khalil et al. (2011).

** Parâmetro não avaliado pelo autor.

A concentração de carotenoides no mel também é um fator de impacto na atividade antioxidante. Estudos de Alvarez-Suarez et al. (2011) demonstraram a associação existente entre a atividade antioxidante (método FRAP) com o conteúdo de carotenoides totais, com valor do coeficiente de correlação na ordem de 0,665. Resultados semelhantes foram descritos por Ferreira et al. (2009).

4 A técnica de eletroforese capilar

A técnica de eletroforese foi desenvolvida pelo químico sueco Arne Tiselius no início dos anos 30 para o estudo de proteínas do soro sanguíneo e lhe rendeu o prêmio Nobel em 1948 (JIMIDAR, 2006). É uma técnica instrumental de separação, baseada na velocidade de migração de espécies com diferentes cargas através da aplicação de um campo elétrico. As moléculas migram para o ânodo (polo positivo) ou para o cátodo (polo negativo) em função de sua carga específica, e a separação acontece pela diferença entre as mobilidades das espécies carregadas, resultante da razão massa/carga e da estrutura de cada molécula (SKOOG, 2006; SILVA et al., 2007).

A eletroforese em formato capilar foi desenvolvida na década de 1970, despertando interesse na indústria da biotecnologia, no que diz respeito ao sequenciamento do DNA para o Projeto Genoma Humano, além de ser uma técnica aplicável na separação de cátions e ânions inorgânicos, aminoácidos, fármacos, vitaminas, carboidratos, peptídeos, ácidos nucleicos, entre outros (LEWIS; ANASTOS; BARNETT, 2005).

A eletroforese capilar (EC) é mais vantajosa que os outros métodos de eletroforese, pois o formato geométrico do capilar (grande área superficial interna comparada ao volume total) controla de forma eficiente o efeito Joule, promovendo a dissipação do calor gerado pela passagem da corrente elétrica. Deste modo, é possível aplicar elevados valores de campo elétrico, obtendo separações de alta eficiência (ROUESSAC; ROUESSAC, 2007). Além disso, a técnica de EC ainda apresenta atributos vantajosos sobre outras técnicas de separação, como rapidez, baixo custo econômico e ambiental, consumo mínimo de solventes, reagentes, e de amostra (na ordem de nanolitros), e compatibilidade com diversos detectores, o que faz da EC uma técnica extremamente versátil e promissora (TAVARES, 1996; CHENG et al., 2008; SILVA et al., 2008).

Os diferentes modos de separação utilizando eletroforese capilar permitem uma grande variedade de aplicações desta técnica (SUÁREZ-LUQUE, 2006). No presente trabalho foram utilizados os modos de eletroforese capilar de zona (CZE) e de cromatografia eletrocinética micelar capilar (MECC).

O modo CZE é um dos mais utilizados para separações, devido principalmente a facilidade de implementação e otimização das condições experimentais (TAVARES, 1997). A separação por CZE consiste em introduzir a amostra num tubo capilar na presença de uma solução tampão, onde é aplicada uma diferença de potencial. Deste modo, é gerado um campo elétrico ao longo do capilar, então os componentes da amostra migram de modo independente uns dos outros, devido às suas diferenças de mobilidade, e com velocidade constante (SILVA et al., 2007). Para alcançar uma separação efetiva é necessário considerar dois fatores: maximizar as diferenças entre as mobilidades efetivas dos analitos e minimizar as causas do alargamento das zonas (TAVARES, 1997). Uma das causas do alargamento de zonas é a dispersão por eletromigração (EMD), que ocorre devido à diferença de intensidade do campo elétrico entre a zona do analito e do eletrólito de corrida (BGE) (GAŠ et al., 2001). A EMD pode ser reduzida a um nível aceitável, através da seleção de um coíon (componente do BGE com carga igual a do analito) de mobilidade iônica próxima à do analito de

interesse. A redução da EMD até próximo de zero garante a simetria dos picos obtidos e a eficiência da separação (PIOVEZAN, 2010).

O modo MECC permite a separação de analitos sem carga (TEIXIDÓ et al., 2011). Esta técnica consiste na adição de um agente tensoativo, como o dodecil-sulfato de sódio (SDS), ao BGE, em concentração suficiente para que sejam formadas micelas na solução, proporcionando um sistema cromatográfico em duas fases. O BGE representa a fase primária, a qual será transportada pela ação do campo elétrico, enquanto as micelas representam a fase secundária, ou pseudo-estacionária. O analito, sem carga iônica, sofre partição entre estas duas fases de acordo com sua hidrofobicidade, ficando parte livre na solução do eletrólito e parte no interior das micelas. Como as micelas estão carregadas, o analito presente no interior delas será arrastado até o sistema detector (TAVARES, 1997; SILVA et al., 2008; PYRZYNSKA; BIESAGA, 2009).

4.1 Instrumentação

A simplicidade instrumental é uma característica importante da EC. O equipamento de EC ainda não é comum na rotina em laboratórios de análises de alimentos, porém é economicamente mais acessível que um equipamento de cromatografia gasosa (CG), ou de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (SILVA et al., 2008). Uma representação esquemática da instrumentação de EC é apresentada na Figura 1.1.



Figura 1.1 – Representação esquemática da instrumentação de eletroforese capilar.

FONTE: adaptado de VALESE (2010).

O sistema de EC consiste basicamente de: dois eletrodos, normalmente de platina; um capilar, usualmente de sílica fundida (pois apresentam boa condutividade térmica e transparência na região do UV/Vis), com comprimento variável (geralmente entre 30 e 150 cm) e diâmetro interno entre 15 e 100 μm ; um sistema de detecção; e uma fonte de alta tensão, podendo funcionar com tensão constante (-30 a 30 kV) ou corrente constante (-200 a 200 μA), que estabelecerá o campo elétrico ao longo do capilar (ROUESSAC; ROUESSAC, 2007).

O capilar é preenchido com o BGE, que pode ser uma solução tampão, que está contida nos recipientes do eletrólito. As extremidades do capilar e os eletrodos são mergulhados nestes recipientes, fechando o circuito, e é aplicada uma diferença de potencial, que gera uma corrente elétrica no interior do capilar (JIMIDAR, 2006). O capilar possui uma janela de detecção, que é posicionada no sistema de detecção, sendo que neste trabalho foi utilizado um detector de arranjo de diodos (DAD).

A injeção da amostra pode acontecer de forma hidrodinâmica ou eletrocínética. No modo hidrodinâmico, a amostra é introduzida no capilar através da aplicação de pressão por determinado período de tempo, no recipiente contendo a amostra. Na injeção eletrocínética, é aplicada uma diferença de potencial por determinado período de tempo no reservatório da amostra, introduzindo a amostra no capilar. Independente do tipo de injeção utilizado, após a amostra ser introduzida, nas duas extremidades do capilar aloca-se os recipientes contendo o BGE, e então é aplicada uma diferença de potencial através do capilar, que promoverá a separação e posterior detecção em fluxo (TAVARES, 1996).

A detecção do analito em um sistema de EC acoplada a um DAD pode ser realizada de maneira direta ou indireta. A detecção direta é baseada na medição direta da absorbância UV/Vis do analito de interesse no momento que este chega à janela de detecção, gerando um sinal no eletroferograma. Este tipo de detecção é limitada aos compostos que possuem absorvidade molar relativamente alta (PADARAUSKAS, 2003). Para os compostos que apresentam pouca ou nenhuma absorvidade molar, como íons inorgânicos, opta-se pelo uso da detecção indireta. Na detecção indireta um íon cromóforo está presente no BGE, gerando um sinal alto e constante no detector. No momento em que o analito sem absorvidade chega ao detector, ele provoca um decréscimo no sinal, que pode ser detectado e quantificado (JOHNS; MACKA; HADDAD, 2003). A Figura 1.2 demonstra ambos os tipos de detecção.

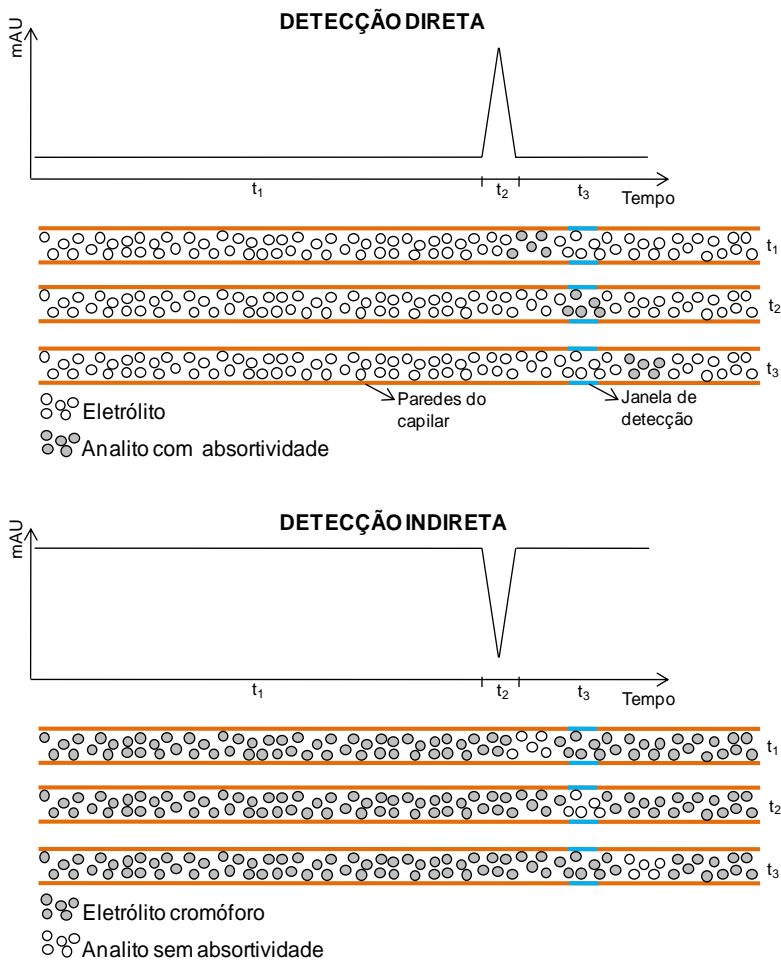


Figura 1.2 – Representação dos modos de detecção direta e indireta.

4.2 Fluxo eletrosmótico

O fluxo eletrosmótico (FEO) é um fenômeno de extrema importância na separação por EC, e ocorre pela presença de grupamentos silanóis (Si-OH) na parede interna do capilar de sílica. Estes grupamentos apresentam caráter ácido, e quando entram em contato com soluções aquosas com pH maior que 3,0, tornam-se ionizados, deixando a parede do capilar com carga negativa (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997). Estes grupos

ionizados negativamente atraem os prótons (H^+) originados do eletrólito de corrida, formando uma camada fina de cátions próxima a parede do capilar. Esta camada fina não é suficiente para neutralizar todas as cargas negativas da parede do capilar, então forma-se uma segunda camada de cátions, que é uma camada móvel. Com a aplicação da diferença de potencial, a camada móvel, juntamente com as moléculas de água que solvatam todos estes íons, migram para o cátodo (polo negativo), gerando o FEO (Figura 1.3) (TAVARES, 1996).

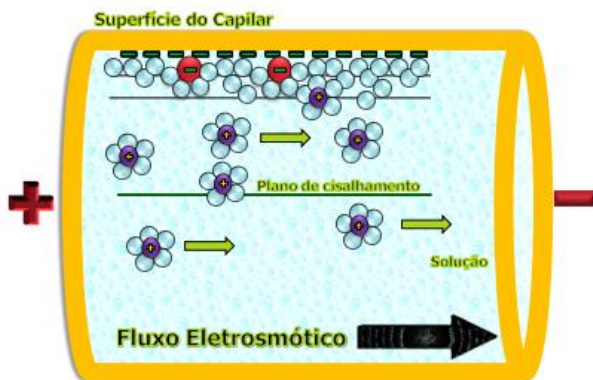


Figura 1.3 – Formação do fluxo eletrosmótico.

FONTE: adaptado de VALESE (2010).

O FEO é diretamente proporcional ao pH do BGE (SCHWER; KENNDLER, 1991). Abaixo de pH 4, a ionização dos grupamentos silanóis é pequena, então o FEO não é significativo, porém, acima de pH 8, os grupos silanóis ficam completamente ionizados, e portanto o FEO é considerado alto (HAYES; EWING, 1992).

O FEO é responsável por arrastar os analitos, independente de suas cargas, em direção ao detector. Na EC são possíveis dois modos de análises quanto ao FEO: o modo coeletrosmótico, no qual os analitos migram na mesma direção do FEO, como por exemplo, na análise de cátions, e o modo contraeletrosmótico, onde os analitos migram no sentido contrário do FEO, que é o responsável por carregá-los até o detector, utilizado, por exemplo, na análise de ânions (TAVARES, 1997).

O FEO induz a um fluxo uniforme e sem geração de pressão, resultando em um perfil plano, perpendicular a parede do capilar, que não produz alargamento dos picos em razão do fluxo, conforme demonstra a Figura 1.4. Esta é uma importante vantagem da EC quando

comparada a CLAE, que apresenta perfil parabólico do fluxo, induzido pela pressão. Desde modo, o FEO contribui para que a técnica de EC gere bandas de melhor eficiência quando comparados aos de CLAE (TAVARES, 1996).

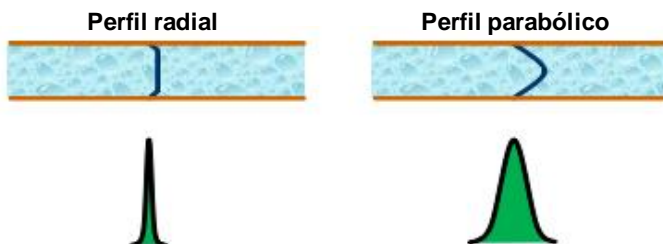


Figura 1.4 – Representação do perfil radial (fluxo eletrosmótico) e do perfil parabólico (gerado por pressão) e comparação entre os picos resultantes.

FONTE: adaptado de PIOVEZAN (2010).

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE 5- HIDROXIMETILFURFURAL EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA CAPILAR MICELAR

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL EM MEL UTILIZANDO CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA CAPILAR MICELAR

Resumo

O objetivo do presente capítulo foi o desenvolvimento de um método analítico para determinação de hidroximetilfurfural (HMF) utilizando eletroforese capilar na sua variável cromatografia eletrocínética micelar capilar, usando cafeína como padrão interno. A otimização da composição do eletrólito de corrida foi realizada com o auxílio de um planejamento fatorial completo, 3^2 , com ponto central, para determinar as concentrações dos componentes do eletrólito de corrida. A interpretação dos resultados da superfície de resposta obtida indicou que a melhor composição para o eletrólito de corrida seria 5 mmol/L de tetraborato de sódio contendo 120 mmol/L de dodecil-sulfato de sódio, em pH 9,3. A partir destas condições otimizadas, a separação da substância de interesse foi realizada em menos de 2 minutos. Em seguida, o método proposto foi validado e aplicado na quantificação de HMF em amostras de mel de abelhas com diferentes tempos de armazenamento, que foram diluídas em água deionizada, filtradas e injetadas diretamente no equipamento de eletroforese capilar, sem qualquer outra etapa de pré-tratamento. O método desenvolvido apresentou satisfatória linearidade ($R^2 > 0,999$), precisão ($CV < 5,5\%$), seletividade e exatidão (recuperação entre 96,37 e 99,56%). O desempenho do método proposto demonstra seu potencial para implementação em laboratórios de análises de alimentos, para determinação de rotina de HMF em amostras de mel.

Palavras-chave: Cromatografia eletrocínética micelar capilar. Hidroximetilfurfural. Mel. Planejamento fatorial.

RIZELIO, V. M et al. Development of a fast meck method for determination of 5-HMF in honey samples. **Food Chemistry**, doi: 10.1016/j.foodchem.2011.11.058, 2011.

1 Introdução

O mel é um alimento produzido pelas abelhas melíferas a partir do néctar das plantas, e consiste em uma solução aquosa supersaturada de açúcares, principalmente frutose e glicose. Além disso, é composto em caráter minoritário por uma mistura complexa de outras substâncias, como minerais, outros sacarídeos, proteínas, enzimas, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos, ácido fenólicos, flavonoides, carotenoides, compostos voláteis e produtos da reação de Maillard (ANKLAM, 1998).

Durante o processamento, o mel é usualmente aquecido com o objetivo de reduzir sua viscosidade, e prevenir a cristalização e a fermentação. O uso de temperaturas entre 32 e 40 °C não afeta a qualidade do mel, porém, altas temperaturas podem levar a formação de um importante produto de degradação, o hidroximetilfurfural (HMF) (ANKLAM, 1998; TURHAN et al., 2008).

O HMF é um aldeído furânico formado como um intermediário na reação de Maillard ou da desidratação direta de açúcares em meio ácido, durante o tratamento térmico aplicado aos alimentos (AMES, 1992; KROH, 1994). Os principais fatores que contribuem para o que a concentração do HMF aumente expressivamente são o uso de altas temperaturas aplicadas aos alimentos e o armazenamento dos mesmos por prolongados períodos (LEE; NAGY, 1990). Além disso, a formação do HMF nos alimentos também depende do tipo de açúcar presente, do pH do alimento, da atividade de água e da presença de cátions no meio (LEE; NAGY, 1990; KROH, 1994; GÖKMEN; SENYUVA, 2006. GÖKMEN et al., 2007; GÖKMEN et al., 2008).

O Codex Alimentarius estabelece o conteúdo máximo de HMF presente no mel de abelhas em 40 mg/kg (CODEX STAN 12, 2001), enquanto a legislação brasileira permite um conteúdo máximo de HMF de 60 mg/kg (BRASIL, 2000). Atualmente, o perfil toxicológico do HMF ainda não está claramente elucidado, entretanto, alguns estudos demonstram a atividade citotóxica, mutagênica, carcinogênica e genotóxica *in vitro* desta substância (MURKOVIC; PICHLER, 2006; TEIXIDÓ et al., 2006).

A determinação do conteúdo de HMF em alimentos é feita tradicionalmente pelo método espectrofotométrico descrito por White (1979b). Diversos outros métodos foram desenvolvidos, muitos empregando CLAE com detecção UV/Vis (XU; TEMPLETON REED, 2003; ZAPPALÁ et al., 2005; AQUINO et al., 2006; MICHAIL et al., 2007; GASPARI; LUCENA, 2009; SPANO et al., 2009; PEREIRA et al., 2011). Também são encontrados métodos utilizando cromatografia

líquida com detecção amperométrica pulsada (XU; TEMPLETON REED, 2003), com detecção pelo índice de refração (XU; TEMPLETON REED, 2003), ou acoplada à espectrometria de massas (GÖKMEN; SENYUVA, 2006). Além disso, técnicas de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (TEIXIDÓ et al., 2006) e biosensores eletroquímicos (LOMILLO; CAMPO; PASCUAL, 2006) também já foram usadas na determinação de HMF em amostras de mel, alimentos infantis, geleias, suco de frutas e produtos de panificação, entre outros.

Como uma técnica alternativa, a eletroforese capilar tem sido ocasionalmente empregada na análise de HMF em diferentes matrizes alimentares, como cereais matinais, torradas, mel, suco de laranja e de maçã, geleias, café, chocolate e biscoitos (SILVA et al., 2008; TEIXIDÓ et al., 2011). A determinação de HMF via EC é realizada pelo modo de cromatografia eletrocínética micelar capilar. Morales e Jiménez-Pérez (2001) desenvolveram um método de MECC com corridas de 5 minutos para a análise de HMF em laticínios, e compararam com um método de HPLC, obtendo resultados semelhantes de repetibilidade e recuperação. Silva et al. (2008) aplicou um método de MECC para a determinação de HMF em mel, com a separação completa também em 5 minutos. Mais recentemente, Teixidó et al. (2011) realizou a determinação de HMF em alimentos por MECC (tempo de corridas de 6 minutos), comparando os resultados com os de cromatografia líquida com espectrometria de massas, alcançando resultados satisfatórios. Considerando estes aspectos, o objetivo deste capítulo foi desenvolver um método rápido para a análise de HMF, utilizando MECC. A composição do eletrólito de corrida foi otimizada através de um planejamento fatorial 3^2 , e o método otimizado foi validado e aplicado na determinação de HMF em amostras de mel com diferentes tempos de armazenamento. Não foi encontrado na literatura um método de MEEC mais rápido que este para a determinação de tal substância.

2 Material e Métodos

2.1 Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico, solventes de pureza cromatográfica, e água purificada através de sistema de deionização (Deionizador Milli-Q, Milipore, Bedford, EUA). HMF, cafeína (PI), TBS, metanol e SDS foram obtidos da Sigma

Aldrich (Santa Ana, EUA). NaOH foi obtido da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

A solução estoque do padrão de HMF foi preparada na concentração de 1000 mg/L em metanol 50 % (v/v) e estocada a 4 °C até as análises. A solução do PI de cafeína foi preparada a 1000 mg/L em água deionizada e estocada a 4 °C até a utilização. Após os experimentos de otimização, a composição do BGE foi definida em TBS 5 mmol/L, SDS 120 mmol/L em pH 9,3, que foi preparado e estocado em temperatura ambiente até o momento da análise.

2.2 Instrumentação e procedimentos analíticos

O método de MECC foi conduzido em um equipamento de eletroforese capilar Modelo 7100 (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com DAD no comprimento de onda selecionado de 284 nm. A temperatura do sistema foi mantida a 25 °C e a aquisição dos dados foi realizada através do software HP ChemStation (v. A.06.01). O capilar utilizado é composto de sílica fundida e revestido de poliimida (Polymicro Technologies, Phoenix, EUA), com 32 cm de comprimento total, 8,5 cm de comprimento efetivo, 50 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo.

O condicionamento inicial do capilar foi realizado com a lavagem do capilar por 40 minutos com NaOH 1 mol/L, seguido de água deionizada por mais 40 min. No início de cada dia, o capilar foi condicionado com lavagem de NaOH 1 mol/L por 10 minutos, seguido de água deionizada por 10 minutos e do BGE por 10 minutos. Entre cada uma das corridas realizadas, o capilar foi lavado por 1 minuto com o BGE. Ao final de cada dia o capilar foi lavado com NaOH 1 mol/L por 5 minutos, seguido de água deionizada por 10 minutos e em seguida foi seco com ar por 2 minutos. Todas as soluções foram introduzidas pela extremidade mais próxima ao detector (*outlet*) com injeção de modo hidrodinâmico, com pressão negativa de 50 mbar por 3 segundos. A voltagem aplicada nas corridas foi 15 kV com polaridade positiva na extremidade da injeção.

Para confirmar os resultados obtidos, a determinação do conteúdo de HMF nas amostras de mel foi realizada paralelamente por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em sequência (LC-MS/MS). O equipamento utilizado consiste em um cromatógrafo líquido (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas triplo quadripolo modelo Q Trap 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canadá). A concentração de

HMF nas amostras foi detectada e quantificada utilizando monitoramento de reações múltiplas (MRM). Com auxílio do software Statística 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA), os resultados obtidos para os dois métodos foram submetidos ao Teste t de comparação de médias para amostras dependentes, adotando nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

2.3 Amostras de mel

Amostras de mel ($n=8$) de *Apis mellifera* foram obtidas através da EPAGRI de Santa Catarina e também diretamente de produtores do Estado de Santa Catarina. As amostras foram coletadas entre os anos de 2008 e 2010, apresentando assim diferentes tempos de armazenamento. Todas as amostras foram armazenadas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

O preparo das amostras pode ser considerado extremamente simples. Alíquotas de 5,0 g de mel foram diluídas com água deionizada e transferidas pra balões volumétricos de 10 mL, onde foram adicionados 2 mL da solução de cafeína 1000 mg/L, a fim de obter a concentração final do PI de 200 mg/L. O volume dos balões foi completado com água deionizada. As amostras então foram filtradas através de membranas de 0,45 μm (Milipore, Bedford, EUA) e injetadas em triplicata diretamente no equipamento

2.4 Validação do método

Para a validação do método proposto foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, precisão, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão (ensaio de recuperação).

A linearidade do método proposto foi avaliada através de curvas de calibração em cinco níveis: 10, 20, 40, 60 e 80 mg/L de HMF, todos com a adição do PI de cafeína a 200 mg/L. As curvas de calibração foram construídas considerando a relação entre área do pico do HMF e a área do PI *versus* concentração do HMF. O método dos mínimos quadrados foi empregado para avaliar a linearidade da curva, através do coeficiente de determinação.

A precisão foi analisada através do cálculo do CV% em termos de precisão instrumental, precisão intermediária (intra e inter-ensaio). A precisão instrumental foi determinada através de 20 injeções consecutivas, sob as mesmas condições, da solução de HMF 20 mg/L e PI. Na precisão intra-ensaio foram preparadas duas vezes a mesma

solução de HMF 20 mg/L e PI e cada uma foi injetada em triplicata, resultando em 6 injeções. Para a precisão inter-ensaio foram preparadas soluções de HMF 20 mg/L e PI por 3 dias consecutivos e injetadas seis vezes cada, resultando em 18 injeções.

A seletividade foi avaliada com o auxílio do detector de arranjo de diodos (DAD). A pureza dos picos de HMF e de cafeína foi avaliada pela sobreposição comparativa entre o espectro UV obtido nos picos das injeções de solução padrão com os espectros UV obtidos nos picos das injeções de amostra.

O LD e o LQ foram calculados considerando uma relação sinal:ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente, e foram determinados tanto para a solução padrão, quanto para as amostras de mel.

A exatidão avaliada através de ensaios de recuperação. Foi utilizada amostra de mel sem quantidades detectáveis de HMF (Amostra 5), na qual se adicionou solução padrão de HMF de modo a obter-se uma concentração final nos níveis de 20 e 40 mg/L de HMF, e PI nas concentração final adequada (200 mg/L). A porcentagem de recuperação foi calculada comparando a quantidade de HMF adicionada e a quantidade de HMF detectada pelo método.

3 Resultados e Discussão

3.1 Desenvolvimento do método

Foram realizados experimentos iniciais, antecedendo o planejamento fatorial, para estabelecer os parâmetros que influenciaram no tempo de migração do HMF, tais como o eletrólito de corrida, a faixa de pH do meio de separação, a faixa de concentração do tensoativo SDS, a temperatura, a voltagem e o tempo de injeção.

O valor do pH do eletrólito de corrida é uma variável importante pois influencia carga do analito investigado, entretanto, neste experimento o pH exerce um pequeno efeito na mobilidade do HMF, que possui pKa 12,82, e encontra-se na sua forma neutra na maioria dos valores de pH utilizados em EC. Devido a esta característica da molécula, foi adicionado ao eletrólito de corrida um meio micelar, contendo SDS, possibilitando a interação do analito com micelas, promovendo diferenciação entre a mobilidade do FEO e a mobilidade do HMF. Deste modo, as análises foram realizadas em pH 9,3, no modo contra-eletrosmótico, com tampão tetraborato de sódio (TBS), pois este tampão gerou a menor corrente e a linha de base mais estável.

A temperatura foi definida em 25 °C e a voltagem máxima aplicada foi de 15 kV, pois esta voltagem foi suficiente para garantir a eficiência da separação e não gerou corrente excessiva, devido ao efeito Joule. O efeito do tempo de injeção também foi estudado, no intervalo de 1 a 9 segundos, avaliando-se as características do pico. O aumento do tempo de injeção resultou em aumento da altura do pico até o tempo de injeção de 3 segundos. A altura do pico do HMF permaneceu igual nos tempos de injeção maiores de 3 segundos, porém o formato do pico foi alterado, apresentando deformação. Deste modo, o tempo de injeção de 3 segundos foi escolhido e utilizado em todo o experimento.

Durante o desenvolvimento do método, foi preferido o uso de adição de padrão interno (PI), pois este método permite que pequenas mudanças nas variáveis experimentais e instrumentais sejam amenizadas, não interferindo nos resultados obtidos. As características consideradas na escolha do padrão interno foram a similaridade química ao analito de interesse e conseqüentemente a mobilidade eletroforética, a disponibilidade da substância no laboratório, a pureza do composto, a proximidade entre o pico do PI e o pico HMF e a resolução entre estes (MARTINS, 2008). Foram selecionadas e avaliadas cinco substâncias (cumarina, ácido *p*-cumárico, ácido *o*-cumárico, ácido caféico e cafeína) e definiu-se a cafeína como padrão interno, pois este composto atendeu os requisitos discutidos anteriormente e apresentou melhor resolução entre os picos sem afetar o tempo de análise.

Após definidos estes parâmetros, foram avaliados três variáveis relevantes para a separação eletroforética: a concentração do tampão TBS, a concentração do tensoativo SDS e a percentagem de metanol (MeOH). Com o objetivo de alcançar o menor tempo de análise sem o comprometimento da resolução entre o HMF e a cafeína, optou-se pela execução de um planejamento fatorial. Para tanto, com as variáveis selecionadas foi realizado um planejamento fatorial completo do tipo 3^2 com ponto central. As variáveis investigadas e os seus níveis correspondentes estão apresentados na Tabela 2.1. Todas as variáveis foram avaliadas em dois níveis, um baixo (denotado por -1) e um alto (denotado por +1). O ponto central (denotado por 0) foi realizado em triplicata para a estimativa da variância experimental. Foram então realizadas corridas individuais de modo randômico, uma vez que a randomização garante que a variação de fatores não controlados pelo delineamento fatorial não influencie nos resultados.

Tabela 2.1 – Planejamento fatorial 3^2 para definição das condições do método.

Variáveis	-1	0	+1
TBS (mmol/L)	5	10	15
SDS (mmol/L)	100	110	120
MeOH (% v/v)	0	5	10

TBS – tetraborato de sódio; SDS – dodecil-sulfato de sódio; MeOH - metanol

Através de regressão múltipla foi possível estabelecer as relações matemáticas entre as respostas e as variáveis independentes. O tamanho do pico e o tempo de migração do HMF e da cafeína foram calculados em função da composição do eletrólito de acordo com a seguinte equação empírica:

$$t_i \text{ ou } R_{w1/2} = \text{constante} + a[\text{TBS}] + b[\text{SDS}] + c[\text{MeOH}] \quad (1)$$

onde t_i é o tempo de migração do analito i , e w é o tamanho do pico do analito.

As equações foram resolvidas numericamente através do algoritmo *Solver* (Microsoft Excel 2007) e os coeficientes calculados estão apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Coeficientes calculados para a Equação 1.

Composto		Constante	A	b	c
HMF	t_i	0,436	0,013	0,004	0,031
Cafeína	t_i	0,369	0,018	0,007	0,027

Os resultados experimentais obtidos através do planejamento fatorial foram usados como modelo para estimar o tamanho do pico e tempo de migração dos analitos. Com estes dados, foi possível estimar a resposta utilizando a Equação 2:

$$\text{Resposta} = \frac{R}{t_{caf}} \quad (2)$$

onde R é a resolução entre o HMF e a cafeína e t_{caf} é o tempo de migração da cafeína (PI), que corresponde ao último pico do eletroferograma. A resolução (R) foi calculada com o auxílio da Equação 3:

$$R = \frac{t_2 - t_1}{0,5(w_1 + w_2)} \quad (3)$$

onde t_1 e t_2 são os tempo de migração e w_1 e w_2 são a largura da base dos picos de HMF e de cafeína, respectivamente.

A função resposta (Equação 2) foi então calculada para o conjunto de dados obtidos, e uma superfície de resposta foi gerada indicando a que a melhor condição de separação dos analitos ocorre com o eletrólito composto de 5 mmol/L de TBS e 120 mmol/L de SDS, em pH 9,3. O eletroferograma da solução padrão de HMF e PI gerado sob as condições otimizadas está demonstrado na Figura 2.1. O tempo de análise mostrou-se satisfatoriamente reduzido utilizando um alto campo elétrico (468,8 V/cm) e o modo de injeção pela extremidade do capilar mais próxima do detector (*outlet*), sendo que o comprimento efetivo do capilar ficou então em 8,5 cm. Uma separação com alta resolução entre o pico do HMF e do PI foi obtida em menos de 2 minutos. Pode-se observar que este tempo de separação é menor que em outros métodos para determinação de HMF por MECC reportados na literatura (MORALES; JIMÉNEZ-PÉREZ, 2001; SILVA et al., 2008; TEIXIDÓ et al., 2011). O espectro UV obtido com o auxílio do DAD para a solução padrão de HMF está apresentado na Figura 2.1(a).

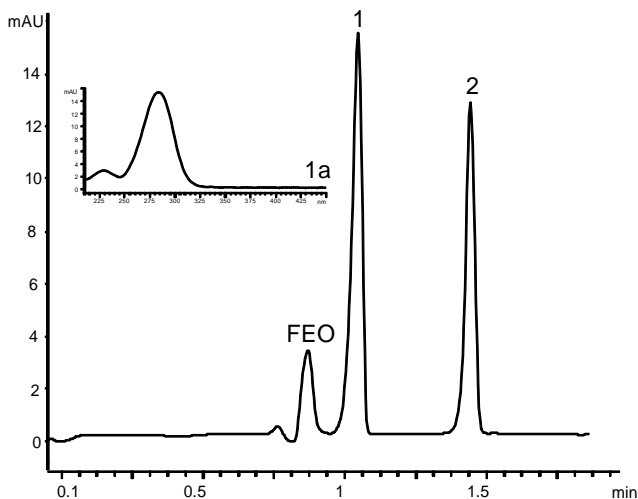


Figura 2.1 – Eletroferograma da solução padrão de HMF e cafeína (PI) sob as condições eletroforéticas otimizadas. 1 – HMF; 1a – espectro UV do HMF; 2 – cafeína (PI); FEO – fluxo eletrosmótico. Condições: 5 mmol/L de TBS e 120 mmol/L de SDS, pH 9,3; injeção hidrodinâmica (-50 mbar, 3s); tensão de -15 kV; 25°C; detecção direta em 284 nm.

3.2 Validação do método

Após a otimização das condições do método, foram avaliados os seguintes parâmetros de validação: linearidade, precisão, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão (ensaio de recuperação). Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Parâmetros de avaliação do método analítico.

Parâmetro	Valor
Linearidade – inclinação (média, n = 3)	0,5434
Linearidade – inclinação (desvio padrão, n=3)	0,0079
Linearidade – intercepto (média, n = 3)	1,3070
Linearidade – intercepto (desvio padrão, n = 3)	0,3679
Linearidade – coeficiente de determinação (R^2 , média, n = 3)	0,9997
Precisão instrumental – área dos picos (CV %, n = 20)	4,91
Precisão instrumental – tempos de migração (CV %, n = 20)	2,40
Precisão intraensaio – área dos picos (CV %, n = 6)	1,07
Precisão intraensaio – tempos de migração (CV %, n = 6)	0,60
Precisão interensaio – área dos picos (CV %, n = 18)	5,41
Precisão interensaio – tempos de migração (CV %, n = 18)	1,61
LD (mg/kg) na amostra	3,37
LQ (mg/kg) na amostra	11,24
Recuperação (% - adicionados 20 mg/L)	99,56
Recuperação (% - adicionados 40 mg/L)	96,37

Na avaliação da linearidade, foi obtida uma relação linear entre a razão área do HMF/área do PI e a concentração do HMF na faixa analisada (entre 10 e 80 mg/L de HMF), com um coeficiente de determinação (R^2) satisfatório, superior a 0,999, e intercepto próximo à origem.

A precisão (instrumental, intra e interensaio) foi avaliada considerando a razão (HMF/PI) entre os tempos de migração e entre as áreas dos picos obtidos. Quanto à precisão instrumental (n = 20 injeções), os coeficientes de variação (CV %) foram 2,40 e 4,91 para o tempo de migração e para a área do pico, respectivamente, e demonstram a repetibilidade do método. Para a precisão intraensaio (n = 6 injeções) os valores de CV % obtido para o tempo de migração e para a área do pico foram 0,60 e 1,07, respectivamente. No ensaio de precisão interensaio (n = 18 injeções) os resultados de CV % obtidos foram 1,61 e 5,41 para o tempo de migração e para área do pico

respectivamente. Os valores de CV % obtidos indicam um aceitável nível de precisão intermediária do método proposto.

O método apresentou alto grau de seletividade para o analito de interesse. A detecção foi realizada em 284 nm e a sobreposição dos espectros UV obtidos para a solução padrão de HMF e para as amostras de mel demonstrou que os espectros obtidos são idênticos, indicando a pureza do pico e ausência de substâncias interferentes. Além disso, amostras sem HMF (HMF abaixo do LD) foram analisadas e não apresentaram nenhum pico que pudesse interferir nas análises, reforçando a seletividade do método.

Os valores obtidos quanto ao LD para a determinação de HMF nas amostras de mel foi de 3,37 mg/kg. O LQ foi de 11,24 mg/g.

Na avaliação da exatidão através dos ensaios de recuperação, as percentagens de recuperação obtidas foram 99,56 e 96,37% para os níveis adicionados de 20 e 40 mg/L de HMF respectivamente. Estes resultados demonstram alta confiabilidade no método proposto para a determinação de HMF em amostras de mel.

3.3 Análise das amostras

Após o desenvolvimento e validação do método conforme descrito anteriormente, foi determinado o conteúdo de HMF em 8 amostras de mel utilizando o método proposto. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Conteúdo de HMF em amostras de mel determinado por eletroforese capilar.

Amostra	HMF (mg/kg)
1	17,91 ± 1,56
2	11,97 ± 0,86
3	16,32 ± 1,46
4	127,25 ± 8,97
5	ND
6	12,87 ± 1,18
7	82,80 ± 5,63
8	12,96 ± 2,02

Resultados expressos como média ± desvio padrão.

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2000), é possível verificar que as amostras 4 e 7 apresentam conteúdo de HMF superior ao limite estabelecido de 60 mg/kg, sendo consideradas então

fora dos padrões de qualidade estabelecidos em nosso país. Conforme reportado anteriormente neste trabalho, uma série de fatores pode contribuir para o aumento do conteúdo do HMF no mel, por isso somente uma caracterização completa das amostras permitiria sugerir a causa do elevado conteúdo de HMF nestas amostras. A Figura 2.2 mostra o eletroferograma obtido para a amostra 7.

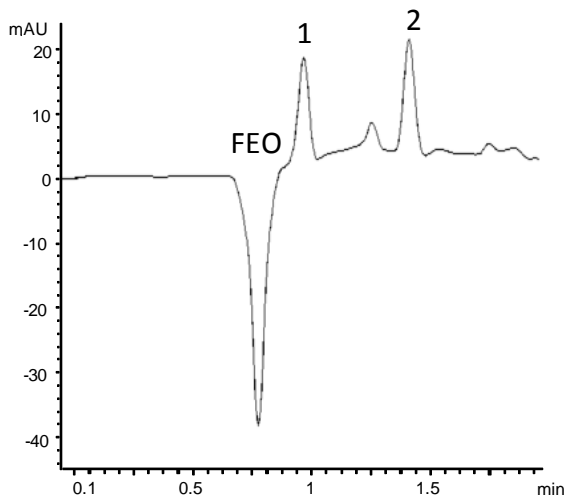


Figura 2.2 - Eletroferograma da amostra 7. 1 – HMF; 2 – cafeína (PI); FEO – fluxo eletrosmótico. Condições: ver Figura 2.1.

Para verificar diferenças entre os resultados obtidos pelos métodos de MECC porpostos e o método de LC-MS/MS comparativo, foi aplicado o Teste *t* pareado entre amostras dependentes, com nível de confiança de 95%. O valor de *p* encontrado foi de 0,12 ($p > 0,05$), e o valor do coeficiente de Pearson encontrado foi de 0,98, mostrando que os resultados obtidos pelos dois métodos não apresentam diferença significativa com 95% de nível de confiança.

4 Conclusão

Neste capítulo foi desenvolvido um método de MECC para determinação de HMF em amostras de mel, utilizando um planejamento fatorial para otimizar o tempo de análise e a resolução do composto de interesse. Foram obtidos resultados satisfatórios quanto à linearidade,

seletividade, precisão e exatidão, os quais confirmaram que o método proposto produz resultados confiáveis.

Os resultados demonstram que a eletroforese pode ser utilizada como técnica alternativa na análise de HMF em mel. Avaliando o desempenho do método desenvolvido, podemos destacar o baixo tempo de análise, o baixo custo e a simplicidade da etapa de preparação das amostras, o que faz com que o método apresente potencial aplicabilidade para análises de rotina para controle de qualidade em mel.

CAPÍTULO 3

O USO DE ELETROFORESE CAPILAR PARA A DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE CÁTIONS EM MEL: UM POSSÍVEL MÉTODO PARA A DISCRIMINAÇÃO DA ORIGEM GEOGRÁFICA DAS AMOSTRAS

O USO DE ELETROFORESE CAPILAR PARA A DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE CÁTIONS EM MEL: UM POSSÍVEL MÉTODO PARA A DISCRIMINAÇÃO DA ORIGEM GEOGRÁFICA DAS AMOSTRAS

Resumo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método rápido para a análise de cátions presentes no mel, e relacionar o conteúdo encontrado com a origem geográfica das amostras. O eletrólito de corrida (BGE) foi otimizado com auxílio do software *Peakmaster*[®], através da construção de curvas da mobilidade efetiva, da dispersão da eletromigração, da capacidade tamponante e condutividade. A composição ótima do BGE foi definida em 30 mmol/L de imidazol, 300 mmol de ácido acético e 140 mmol/L de ácido láctico, em pH 3,0, e a separação de cinco cátions (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+}) utilizando Ba^{2+} como padrão interno foi realizada em menos de 2 minutos. O método apresentou adequados resultados de linearidade ($R^2 > 0,999$), com LD entre 0,27 e 3,17 mg/L e LQ entre 0,91 e 10,55 mg/L. A determinação da precisão foi satisfatória ($CV\% < 4,64\%$), e foram obtidas recuperações entre 93,6 e 108,6%, demonstrando a confiabilidade do método. O método foi aplicado com sucesso na determinação dos principais cátions presentes em 40 amostras de mel provenientes de 8 regiões do Estado de Santa Catarina, as quais foram diluídas, adicionadas de padrão interno e filtradas antes da injeção. Os resultados foram submetidos à Análise de Componentes Principais (ACP), cujos dois primeiros PCs explicaram mais de 85% da variabilidade dos resultados e demonstraram que as amostras de mel podem ser diferenciadas entre suas origens geográficas de acordo com a concentração dos cátions presentes.

Palavras-chave: Análise de componentes principais. Determinação de cátions. Eletroforese capilar. Mel. *Peakmaster*[®].

1 Introdução

O mel é um alimento produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das plantas. Do ponto de vista químico, é uma solução aquosa supersaturada de açúcares, que contém em caráter minoritário uma mistura complexa de outras substâncias (minerais, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, enzimas e etc) (ANKLAM, 1998). A composição do mel varia de acordo com vários fatores, inclusive a origem geográfica onde o mel foi produzido. Desde que a presença de diferentes minerais no solo e o clima da região determinam a flora presente no local, a região geográfica onde estão as plantas que as abelhas visitaram e onde está a colmeia afeta diretamente a composição do mel (ANKLAM, 1998; BARONI et al., 2009).

O teor de minerais no mel pode ser considerado muito baixo, entre 0,04 até 0,2% (m/m). O perfil de minerais presentes depende principalmente do tipo de solo onde estão as plantas que fornecerão o néctar para a produção do mel (ANKLAM, 1998). O conteúdo mineral do solo é incorporado pelas raízes das plantas e é, posteriormente, excretado através de glândulas especializadas presentes nas folhas e flores (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2011). Desta forma, o perfil de minerais presentes pode dar uma indicação da origem geográfica do mel (ANKLAM, 1998).

A composição de minerais tem sido utilizada para discriminar méis produzidos em diferentes áreas geográficas. Como exemplo, Terrab et al. (2004) determinaram 24 minerais em amostras de mel da Espanha, e reportaram a relação existente entre os minerais presentes e a origem geográfica das amostras. Baroni et al. (2009) confirmaram a autenticidade de amostras de mel produzidas na Província de Córdoba (Argentina) através da análise da composição mineral do mel combinada com técnicas estatísticas multivariadas.

A determinação de minerais em mel pode ser realizada por diferentes métodos. Küçük et al. (2007) e Baroni et al. (2009) utilizaram a técnica de espectrometria de absorção atômica em chama. Diversos autores também utilizaram a técnica de espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (TERRAB et al., 2004; FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2005; TERRAB et al., 2005), enquanto outros optaram pela espectrometria de emissão ótica acoplada a espectrometria de massas (PISANI; PROTANO; RICCOBONO, 2008; CHUDZINSKA; BARALKIEWICZ, 2010). Além disso, encontram-se trabalhos utilizando espectrometria de reflexão total de raios X (GOLOB et al., 2005; NEČEMER et al., 2009; KROPF et al., 2010),

cromatografia iônica e voltametria pulsada (BULDINI et al., 2001). Ocasionalmente, a técnica de EC também tem sido usada na análise de minerais na forma iônica (cátions metálicos), em diferentes alimentos (SUÁREZ-LUQUE et al., 2005; SUÁREZ-LUQUE et al., 2006).

Para a determinação da influência geográfica do perfil de minerais no mel, existe a necessidade de avaliar numerosas amostras. Consequentemente percebe-se que apenas métodos rápidos, baratos e precisos são adequados para este tipo de estudo. Desta forma a EC surge como uma importante opção como técnica de separação, com muitas vantagens sobre outras técnicas analíticas, como a necessidade de baixíssimas quantidades de amostra, pequeno consumo de solventes e reagentes químicos, reduzido custo e curto tempo de análise, mantendo o alto poder de resolução (CHENG et al., 2008). Somado a isso, a análise de cátions por EC não requer etapas de mineralização e/ou digestão das amostras. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um método rápido para a determinação de cátions em amostras de mel, utilizando a técnica de EC. Além disso, foi proposto caracterizar o conteúdo dos principais cátions presentes em amostras de mel produzidas no Estado de Santa Catarina (Brasil), e correlacionar o perfil de cátions com a origem geográfica das amostras através de análise estatística multivariada.

2 Material e Métodos

2.1 Material

Os padrões analíticos de K^+ , Ba^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} , e imidazol foram adquiridos da Sigma Aldrich (Santa Ana, EUA). Ácido acético, ácido láctico, e NaOH, todos de grau analítico foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A água utilizada foi purificada através de deionização (deionizador Milli-Q, Millipore, Bedford, EUA).

Foram preparadas soluções aquosas estoque dos padrões de cada um dos analitos na concentração de 100 mmol/L, que foram armazenadas a 4 °C e diluídas diariamente em água deionizada até as concentrações requeridas para os experimentos. Para a determinação indireta de cátions em mel o BGE utilizado foi composto de 30 mmol/L de imidazol, 300 mmol/L de ácido acético e 140 mmol/L de ácido láctico, em pH 3,0.

2.2 Instrumentação

Os experimentos foram realizados em equipamento de EC modelo 7100 (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com DAD no comprimento de onda selecionado de 215 nm (detecção indireta, através do imidazol). A temperatura do sistema foi mantida a 20 °C, e os dados foram adquiridos através do software fornecido pelo fabricante do equipamento (HP ChemStation, v. A.06.01). Foram utilizados capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, EUA) com dimensões de 48,5 cm de comprimento total, 8,5 cm de comprimento efetivo e 75 µm de diâmetro interno.

O condicionamento dos capilares novos foi realizado através das seguintes etapas: passagem de NaOH 1 mol/L pelo capilar por 40 minutos, seguido de água deionizada por 40 minutos. No início de cada dia de experimentos, o capilar foi lavado por 10 minutos com NaOH 1 mol/L, seguido de 10 minutos com água deionizada, e de 15 minutos com a solução do BGE. Entre as corridas o capilar foi recondicionado por 2 minutos com o BGE. No final dos experimentos, o capilar foi lavado com NaOH 1 mol/L por 5 minutos, seguido de água deionizada por 5 minutos, e secagem com fluxo de ar por 2 minutos.

A injeção das soluções padrão e das amostras foi realizada pela extremidade do capilar mais próxima à janela de detecção (*outlet*) e de modo hidrodinâmico, com aplicação de -50 mbar (1 mbar = 100 Pa) por 3 segundos. A voltagem aplicada para a separação foi de 15 kV, com polaridade positiva na extremidade da injeção.

2.3 Amostras de mel

O método proposto e otimizado foi aplicado na análise dos principais cátions presentes em amostras de mel, que foram obtidas através de uma parceria com a EPAGRI de Santa Catarina. As amostras foram coletadas entre os meses de novembro de 2010 e fevereiro de 2011, provenientes de estações experimentais localizadas em oito regi distribuídos ao longo de todo Estado de Santa Catarina. Foram coletadas cinco amostras de cada um dos municípios, totalizando 40 amostras. A localização dos municípios pode ser observada na Figura 3.1

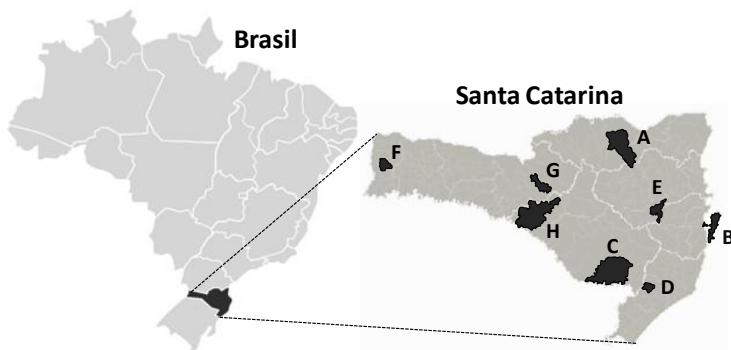


Figura 3.1 – Municípios de origem das amostras: A – Italiópolis; B – Florianópolis; C – São Joaquim; D – Lauro Muller; E – Vidal Ramos; F – São Miguel do Oeste; G – Videira; H – Campos Novos.

Para os experimentos, alíquotas de 3,0 g de mel foram pesadas, diluídas em água deionizada, transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume do balão foi aferido com água deionizada. Esta solução foi então filtrada em membranas de 0,45 μm (Millipore, Bedford, EUA). Em seguida, bário foi adicionado como padrão interno (PI), de forma que atingisse a concentração final de 0,5 mmol/L e a solução foi injetada diretamente no equipamento, sem a necessidade de qualquer outra etapa de tratamento da amostra.

2.4 Desempenho analítico do método

Para verificar o desempenho do método foram avaliados os parâmetros de validação analítica quanto à linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), precisão (instrumental, intraensaio e interensaio) e recuperação.

A linearidade foi avaliada utilizando seis soluções aquosas de diferentes concentrações contendo uma mistura de padrões dos cátions. Curvas de calibração para cada um dos cátions analisados foram construídas com os valores da razão das áreas dos picos obtidos (analito/PI) versus a concentração do analito. O LD e o LQ foram calculados com base na relação sinal ruído de 3:1 e de 10:1, respectivamente, e foram determinados nas amostras de mel. A precisão instrumental foi avaliada através do cálculo do coeficiente de variação (CV%) das razões das áreas dos picos (analito/PI) obtidas de vinte injeções consecutivas da mesma solução padrão. A precisão intraensaio foi determinada através da injeção em triplicada de duas soluções padrão

na mesma concentração (6 replicatas no total). Para analisar a precisão interensaio foram injetadas seis vezes por dia a mesma solução padrão por três dias consecutivos (18 replicatas no total). As precisões intra e interensaio foram também expressas pelo CV% das razões das áreas dos picos. O ensaio de recuperação foi realizado adicionando em uma amostra de mel a solução de padrões dos cátions, em três concentrações para cada analito. O cálculo da porcentagem de recuperação foi efetuado com base na diferença entre o conteúdo total do analito na amostra adicionada e o conteúdo presente na mesma amostra sem a adição, dividido pela quantidade adicionada.

2.5 Análises estatísticas

Foi utilizado o software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA) para os cálculos estatísticos básicos e para a análise multivariada (Análise de Componentes Principais – ACP). Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Foi usada análise de variância (ANOVA) seguida de teste HSD de Tukey para a comparação entre os resultados apresentado pelas amostras de mel de diferentes origens geográficas. As diferenças entre as médias no nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) foram consideradas estatisticamente significantes. ACP foi utilizada para derivar os cinco primeiros componentes principais dos resultados obtidos, com o objetivo de visualizar a distribuição relativa das amostras de mel de acordo com suas origens geográficas.

3 Resultados e Discussão

3.1 Desenvolvimento do método

Foram considerados alguns parâmetros para a escolha do BGE. Inicialmente, considerando a mobilidade iônica dos analitos de interesse, percebe-se que em valores de pH abaixo de 5,0 esses se encontram completamente dissociados (PIOVEZAN, 2010). Deste modo definiu-se que o pH do BGE deveria permanecer abaixo de 5,0, pois pequenas mudanças no valor do pH durante a preparação do BGE não afetariam na mobilidade dos analitos.

O bário escolhido como PI, por apresentar características semelhantes às dos analitos e por não estar presente nas amostras de mel em quantidades detectáveis. Os cátions K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+}

foram identificados pela comparação de seus tempos de migração relativos ao tempo de migração do PI.

Como coíon foi escolhido o imidazol, na concentração de 30 mmol/L, pois esta substância apresenta mobilidade semelhante à dos cátions analisados, o que é uma característica importante para diminuir a ocorrência de EMD. O fenômeno de EMD acontece geralmente em eletrólitos onde há uma grande diferença entre a mobilidade dos analitos e a mobilidade do coíon utilizado, provocando uma diminuição da simetria dos picos (GAŠ et al., 2001). Além disso, considerando que os cátions analisados não apresentam absorção na região do UV/Vis, o imidazol também atua como cromóforo, possibilitando a detecção indireta dos analitos. Porém, como o imidazol não apresenta capacidade tamponante na faixa de pH requerida para a separação, o ácido acético (pKa 4,75) foi selecionado como contraíon para o ajuste do pH. A concentração ideal de ácido acético foi definida com o auxílio do software *Peakmaster*[®] (GAŠ et al., 2001; ŠTĚDRÝ; JAROŠ; GAŠ, 2002; ŠTĚDRÝ et al., 2003). Este software permite observar a influência do pH do BGE na condutividade elétrica e na capacidade tamponante do mesmo, bem como verificar a mobilidade efetiva dos analitos e a ocorrência de EMD. A Figura 3.2, construída através do programa de simulação, mostra as curvas de mobilidade efetiva, EMD, capacidade tamponante e condutividade do BGE, composto de uma concentração constante de 30 mmol/L de imidazol e concentração variável de ácido acético de 30 a 400 mmol/L, o que gerou valores de pH do BGE entre 3,6 a 5,9.

De acordo com a Figura 3.2, pode-se observar que separação de três dos cinco cátions de interesse, e do PI ocorre com um BGE composto de 30 mmol/L de imidazol e 300 mmol/L de ácido acético, em pH 3,7. Neste valor de pH a capacidade tamponante do BGE é alta e os valores de EMD estão aproximados do valor zero de modo suficiente a garantir a simetria dos picos. Também é possível confirmar que a mobilidade dos analitos é constante em valores de pH menor que 5,0. Porém, como pode ser visto na Figura 3.2(A), os cátions Mg^{2+} e Mn^{2+} apresentam suas curvas de mobilidade quase sobrepostas, não sendo separados nesta condição. Para solucionar este problema, optou-se pela adição de ácido láctico no BGE, que atua como agente complexante, modificando a mobilidade dos analitos através da formação de complexos metálicos. Como a formação destes complexos ocorre rapidamente, a fração livre do cátion e a fração complexada ficam em equilíbrio, fazendo com que o eletroferograma deste equilíbrio apresente somente um pico relativo às duas espécies em solução (JAGER;

TAVARES, 2001). Como o software *Peakmaster*[®] não simula fenômenos de complexação, foram testadas adições de ácido láctico no BGE nas concentrações entre 100 e 300 mmol/L. Após os testes, a composição ideal do BGE ficou definida em 30 mmol/L de imidazol, 300 mmol/L de ácido acético e 140 mmol/L de ácido láctico, em pH 3,0.

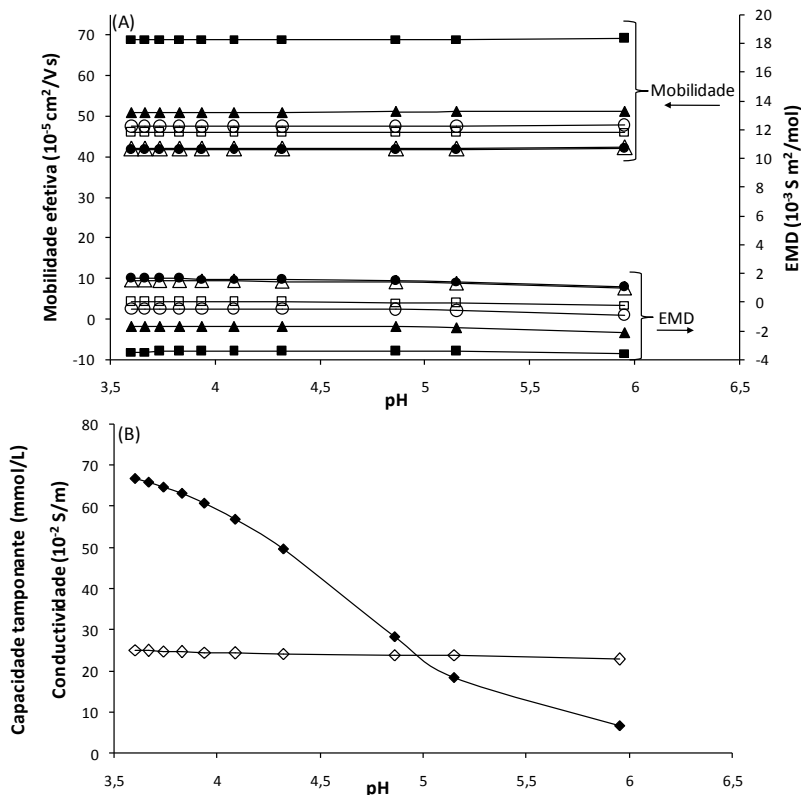


Figura 3.2 – Avaliação da composição do BGE para determinação de cátions em mel utilizando o software *Peakmaster*[®]. Concentração constante de 30 mmol/L de imidazol e concentração variável de ácido acético, entre 30 e 400 mmol/L, resultando nos valores de pH representados no eixo x. (A) Curvas de mobilidade efetiva dos analitos e EMD versus pH. As setas indicam o eixo y e de cada parâmetro. (B) Curvas da capacidade tamponante e da condutividade do BGE versus pH. Legenda: (■) potássio; (▲) bário (PI); (□) sódio; (○) cálcio; (●) magnésio; (△) manganês; (◇) condutividade; (◆) capacidade tamponante.

Uma vez selecionados o coíon, o contraíon, o agente complexante e suas respectivas concentrações, foram definidos outros parâmetros da corrida eletroforética, entre eles a tensão aplicada e o comprimento do capilar. O eletroferograma obtido de uma mistura de padrões dos cátions de interesse sob as condições otimizadas está ilustrado na Figura 3.3. A separação dos cinco cátions mais o PI foi realizada em menos de 2 minutos.

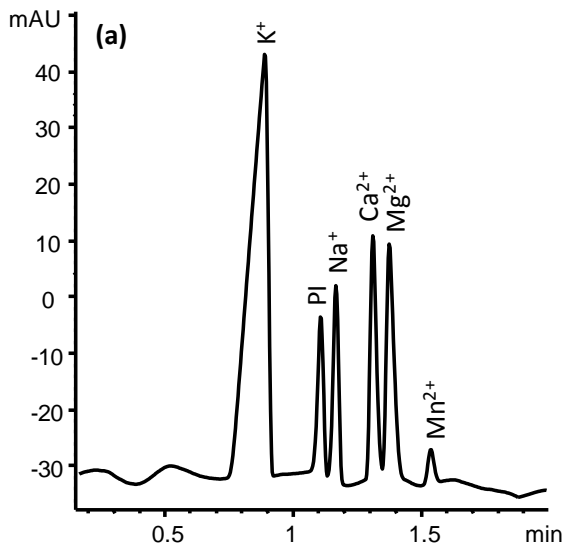


Figura 3.3 – Eletroferograma da mistura de padrões de cátions sob as condições otimizadas. Condições: imidazol 30 mmol/L, ácido acético 300 mmol/L, ácido láctico 140 mmol/L, pH 3,0; injeção a -50 mbar por 3 segundos; voltagem de -15 kV; capilar de 48,5 cm (L_{tot}) x 8,5 cm (L_{ef}) x 75 μ m (DI); 20 °C; detecção indireta em 215 nm (imidazol); PI – Ba²⁺ 0,5 mmol/L.

3.2 Desempenho do método

A Tabela 3.1 traz a síntese dos resultados obtidos quanto ao desempenho analítico do método. Todas as curvas de calibração apresentaram adequada linearidade, com coeficientes de determinação (R^2) maiores que 0,999 em todos os casos. Os valores de LD variaram entre 0,27 mg/L para Mn²⁺ e 3,17 mg/L para K⁺, enquanto os valores de LQ ficaram entre 0,91 mg/L para Mn²⁺ e 10,55 mg/L para K⁺. Os valores do CV% obtidos quanto à precisão instrumental foram \leq 4.64% para a relação entre a área dos picos (analito/PI). Para as precisões

intraensaio e interensaio, os valores de CV% foram respectivamente $\leq 3.48\%$ e $\leq 4.02\%$. Em todos os ensaios de precisão o valor de CV% não foi maior que 5%, demonstrando a adequada repetibilidade e reprodutibilidade do método proposto. A exatidão do método foi determinada através de ensaios de recuperação, em três níveis para cada cátion, e os resultados da porcentagem de recuperação estiveram entre 93,6 e 108,6%, também com satisfatórios valores de CV%.

Tabela 3.1 – Resultados da validação do método para análise de cátions em mel.

Cátion	Linearidade			Precisão** (CV %)			Exatidão	
	R ²	LD*	LQ*	Inst	Intr	Inte	Rec. (%)	CV%
K ⁺	0,9997	3,17	10,55	0,66	0,32	1,46	94,3 – 105,4	0,48 – 1,30
Ca ²⁺	0,9998	1,17	3,91	0,57	0,55	0,91	94,3 – 108,4	0,25 – 0,87
Na ⁺	0,9992	0,31	1,05	4,64	1,47	4,02	93,6 – 108,6	1,05 – 3,01
Mg ²⁺	0,9996	0,42	1,42	0,82	0,73	0,95	95,0 – 107,5	0,43 – 1,65
Mn ²⁺	0,9993	0,27	0,91	2,51	3,48	2,97	94,2 – 104,5	1,61 – 1,88

* Valores expressos em mg/L, determinados em amostras de mel.

** Precisão: Inst – instrumental; Intr – intraensaio; Inte – interensaio.

Rec. (%) – porcentagem de recuperação.

3.3 Análise das amostras de mel

Os valores dos conteúdos de cátions encontrados nas amostras (média, desvio padrão, valores mínimos e máximos) estão apresentados na Tabela 3.2. A análise de variância ANOVA considerando a origem geográfica como efeito principal mostrou que existem diferenças significativas entre os valores médios encontrados para todos os cátions determinados, indicando que a procedência geográfica das amostras afeta no perfil de minerais. A Figura 3.4 mostra os eletroferogramas obtidos para a amostra B1 (a) e amostra F3 (b). A diferença observada entre as áreas dos picos de cada cátion nas duas amostras ilustra a grande diferença no conteúdo de cátions destas amostras.

Tabela 3.2 – Conteúdo de cátions (mg/kg) nas amostras de mel.

Origem	Cátion (mg/kg)				
	K ⁺	Ca ²⁺	Na ⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺
A M ± DP	624,95 ± 73,57 ^d	32,18 ± 3,49 ^b	5,91 ± 2,80 ^c	8,44 ± 1,23 ^d	1,99 ± 0,85 ^d
Mín-Máx	527,72-718,77	27,57-36,64	3,53-9,33	7,34-10,47	1,25-3,45
B M ± DP	1999,59 ± 129,79 ^a	165,01 ± 10,33 ^a	64,17 ± 5,55 ^a	68,03 ± 4,47 ^a	4,36 ± 0,49 ^{abc}
Mín-Máx	1905,54-2221,10	157,24-182,84	58,92-72,32	65,02-75,89	3,73-4,81
C M ± DP	1161,56 ± 128,10 ^b	154,52 ± 60,47 ^a	14,38 ± 1,88 ^b	45,93 ± 22,41 ^b	5,49 ± 1,63 ^{ab}
Mín-Máx	967,24-1289,71	93,19-229,81	12,67-17,52	25,41-74,02	3,94-8,19
D M ± DP	894,29 ± 110,06 ^c	73,02 ± 3,25 ^b	55,83 ± 5,41 ^a	21,25 ± 1,55 ^{cd}	4,84 ± 1,54 ^{ab}
Mín-Máx	804,51-1040,64	67,91-75,86	49,76-62,01	18,89-22,70	3,96-7,58
E M ± DP	586,76 ± 17,37 ^d	55,70 ± 5,15 ^b	15,18 ± 4,79 ^b	14,77 ± 0,44 ^{cd}	3,79 ± 0,17 ^{bc}
Mín-Máx	558,74-606,75	46,76-59,13	6,70-17,93	14,37-15,43	3,52-3,95
F M ± DP	507,77 ± 16,25 ^d	49,15 ± 2,60 ^b	10,31 ± 1,68 ^{bc}	13,66 ± 0,95 ^d	3,08 ± 0,23 ^{cd}
Mín-Máx	481,05-525,16	45,47-52,11	8,10-12,60	12,13-14,51	2,84-3,37
G M ± DP	1216,53 ± 12,66 ^b	75,08 ± 1,89 ^b	12,42 ± 2,48 ^{bc}	31,57 ± 5,04 ^{bc}	5,18 ± 0,41 ^{ab}
Mín-Máx	1205,05-1237,84	72,50-77,76	9,08-15,92	28,80-40,55	4,69-5,62
H M ± DP	610,92 ± 7,07 ^d	59,09 ± 1,49 ^b	14,35 ± 5,52 ^b	22,89 ± 0,44 ^{cd}	5,74 ± 0,25 ^a
Mín-Máx	600,94-620,05	57,67-61,09	6,40-20,36	22,39-23,39	5,42-5,99

M ± DP: Média ± desvio padrão ($n = 5$ para cada região).

Mín – Valor mínimo. Máx – Valor máximo.

^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

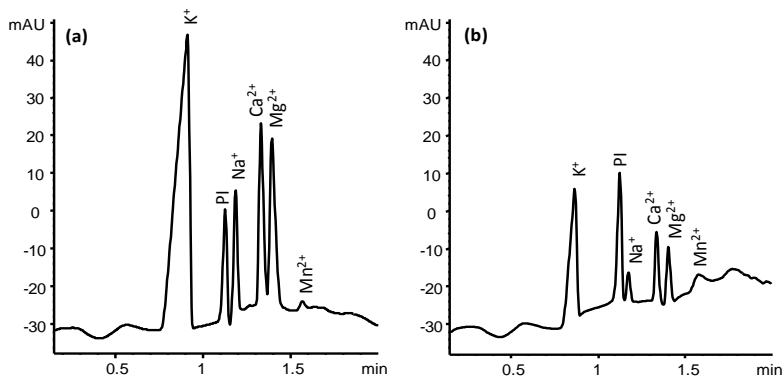


Figura 3.4 – Eletroferogramas obtidos da determinação de cátions nas amostras de mel. (a) – Amostra B1. (b) Amostra F3. Para as condições da separação, ver Figura 3.3.

O elemento K^+ foi o mais abundante em todas as amostras analisadas, com valores entre 507,77 e 1999,59 mg/kg. Este dado coincide com o de outros autores, que consideram que este mineral seja o mais importante do mel do ponto de vista quantitativo, contabilizando mais de 50% do total de minerais presentes (FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2005; GOLOB et al., 2005; PISANI; PROTANO; RICCOBONO, 2008; BARONI et al., 2009; CHUDZINSKA; BARALKIEWICZ, 2010; KROPF et al., 2010).

O segundo elemento mais abundante para todas as amostras foi o Ca^{2+} , com médias de 32,18 a 165,01 mg/kg. Estes valores são similares aos encontrados por Suárez-Luque et al. (2005), Pisani, Protano e Riccobono (2008) e Kropf et al. (2010), para méis provenientes da Eslovênia, Itália e Espanha, respectivamente.

Os conteúdos médios de Mg^{2+} e Na^+ foram bastante variáveis entre as amostras, de acordo com suas origens geográficas. As concentrações encontradas nas amostras foram respectivamente de 8,44 a 68,03 mg/kg para Mg^{2+} e entre 5,91 e 64,17 para Na^+ . Na maioria das amostras analisadas (provenientes das regiões A, B, C, F, G e H) o conteúdo de Mg^{2+} foi o terceiro maior, enquanto nas amostras de mel providas das regiões D e E o terceiro cátion mais abundante foi o Na^+ . Fernández-Torres et al. (2005) e Suarez-Luque et al. (2005) encontraram resultados semelhantes, com os teores relativos desses dois cátions variando entre si em amostras de mel originárias de diferentes regiões.

Por último, a concentração de Mn^{2+} foi a menor encontrada entre os cátions determinados, variando entre 1,99 a 5,74 mg/kg, com

valores similares aos encontrados por outros estudos (FERNÁNDEZ-TORRES et al., 2005; GOLOB et al., 2005; PISANI; PROTANO; RICCOBONO, 2008; CHUDZINSKA; BARALKIEWICZ, 2010).

Com o objetivo de estabelecer as diferenças existentes entre o conteúdo de cátions nas amostras de acordo com suas origens geográficas, a técnica de estatística multivariada de APC foi aplicada aos dados obtidos.

3.4 Análise multivariada

A ACP é uma técnica de reconhecimento de padrões frequentemente empregada para discriminar amostras de mel originárias de diferentes regiões (TERRAB et al., 2004; CORBELLA; COZZOLINO, 2006; KROPF et al., 2010). A ACP é utilizada para examinar tendências no conjunto de dados, fornecendo uma visão parcial dos dados no espaço, com reduzido número de dimensões, preservando a variabilidade presente. Esta técnica efetua combinações lineares das variáveis originais gerando novas variáveis, as quais são denominadas Componentes Principais (PC) (CHUDZINSKA; BARALKIEWICZ, 2010).

A Tabela 3.3 mostra os valores dos pesos das variáveis de cada PC. Pode-se perceber que para o PC1 os conteúdos de K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} são as variáveis mais importantes na discriminação das amostras de mel de acordo com suas origens geográficas, enquanto para o PC2 a variável mais importante foi o conteúdo de Mn^{2+} . A distribuição espacial das variáveis nos dois primeiros PCs pode ser observada na Figura 5(a). Chudzinska e Baralkiewicz (2010) sugerem que um modelo consistente de ACP requer um número tal de componentes para que pelo menos 75% da variância total dos dados sejam representados. Assim, infere-se que o modelo obtido pode ser considerado confiável, desde que os dois primeiros PCs somam mais de 85% da variação dos resultados apresentados pelas amostras de mel.

Tabela 3.3 – Valores dos pesos de cada componente principal

Variável	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
K^+	0,934	-0,192	-0,044	0,293	0,048
Ca^{2+}	0,928	0,025	-0,295	-0,210	0,084
Na^+	0,716	-0,317	0,613	-0,102	-0,006
Mg^{2+}	0,962	-0,027	-0,240	-0,023	-0,124
Mn^{2+}	0,484	0,846	0,221	0,034	0,002

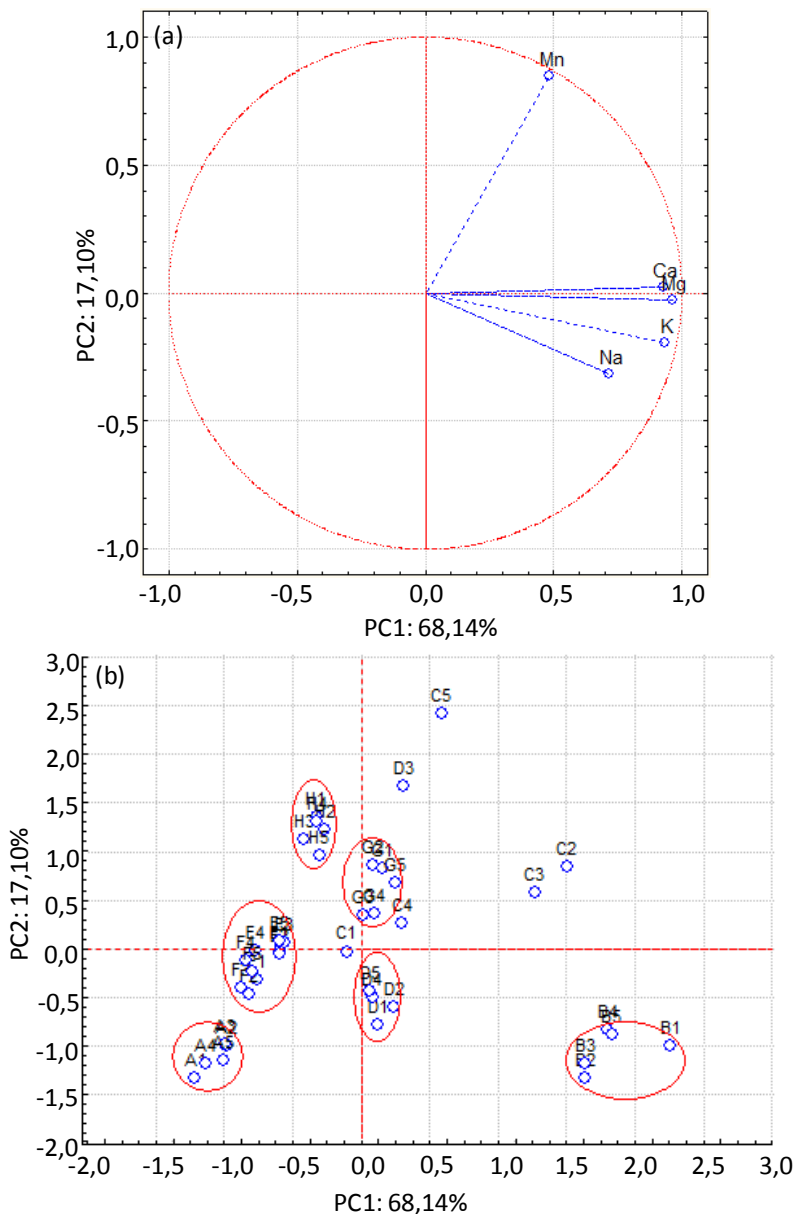


Figura 3.5 – Representação dos dois primeiros componentes principais quanto às variáveis (a) e quanto às amostras de mel (b). Para a origem das amostras ver Figura 3.1.

A Figura 3.5(b) representa o gráfico da distribuição espacial das amostras de mel de acordo com seus escores de PC1 e PC2, e mostra que as amostras de mel podem ser diferenciadas segundo suas origens geográficas. É possível observar que as amostras aparecem divididas em grupos separados, relacionados com a procedência geográfica das amostras.

As amostras da região B (Florianópolis) apresentaram os maiores valores para todos os elementos determinados, e aparecem no gráfico como um grupo isolado, com forte correlação positiva com PC1, e correlação negativa com PC2. O alto conteúdo de minerais destas amostras pode estar relacionado com o fato da região de origem ser uma ilha, como mostra a Figura 3.1. Em méis produzidos em regiões costeiras ou em ilhas, o mar também é uma fonte geogênica de sais minerais, que chegam até as colmeias através da maresia (POHL, 2009). Além disso, o solo das regiões costeiras também apresenta maior teor salino, então, o néctar das plantas incorpora mais minerais oriundos do solo (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2011).

As amostras das regiões A (Itaiópolis), E (Vidal Ramos), F (São Miguel do Oeste) e H (Campos Novos) apresentaram os menores valores da determinação de cátions, e por isso aparecem do lado esquerdo do gráfico, correlacionados negativamente com PC1. Estas amostras podem ser diferenciadas entre si de acordo com o conteúdo de Mn^{2+} : amostras da região H apresentam os maiores teores de Mn^{2+} , por isso estão relacionadas positivamente com PC2 e aparecem na parte superior do gráfico; amostras da região A possuem menores teores de Mn^{2+} , assim aparecem posicionadas da parte inferior do gráfico; e as amostras das regiões E e F apresentaram conteúdos intermediários de Mn^{2+} e por isso aparecem juntas, sobre o eixo de PC2.

As amostras de mel das regiões D (Lauro Muller) e G (Videira) apresentaram conteúdos intermediários de cátions, e por isso aparecem no centro do gráfico. Estas duas regiões aparecem separadas no gráfico devido a sua grande diferença no conteúdo de Na^+ , uma vez que a concentração de Na^+ nas amostras da região D foi cerca de cinco vezes maior do que na região G. Finalmente, as amostras da região C não formaram um grupo homogêneo no gráfico, fato que pode ser explicado pelos altos valores do desvio padrão dos conteúdos médios de Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} destas amostras.

4 Conclusão

Foi desenvolvido um método de EC indireto para a determinação de cátions em amostras de mel oriundas de diferentes regiões do Estado de Santa Catarina. O método foi otimizado com auxílio do software de simulação *Peakmaster*[®] e posteriormente validado, apresentando adequados resultados em termos de linearidade, precisão e exatidão. Os valores de LD obtidos variaram entre 0,27 mg/L para Mn^{2+} até 3,17 mg/L para K^+ . O método foi aplicado na análise de cinco cátions nas amostras de mel, com corridas de apenas 2 minutos. A preparação das amostras consistiu em simplesmente diluí-las em água deionizada e filtrá-las. Os resultados obtidos mostraram que o conteúdo de cátions difere estatisticamente ($p < 0,05$) entre amostras provenientes de diferentes regiões. Méis da região costeira apresentaram maiores conteúdos de todos os elementos, provavelmente devido à influência da salinidade do mar. A técnica de ACP foi aplicada com sucesso para a discriminação entre as amostras de acordo com suas origens geográficas.

CAPÍTULO 4

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ELETROFORESE CAPILAR PARA A DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE AÇÚCARES EM MEL

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ELETROFORESE CAPILAR PARA A DETERMINAÇÃO RÁPIDA DE AÇÚCARES EM MEL

Resumo

Neste capítulo, foi desenvolvida uma metodologia para determinação de frutose, glicose e sacarose em amostras de mel utilizando a técnica de eletroforese capilar. A tendência dos analitos sofrerem dispersão da eletromigração bem como a capacidade tamponante do eletrólito de corrida foram avaliadas com o auxílio do software *Peakmaster*[®], e estes parâmetros foram considerados na otimização do eletrólito de corrida, composto de ácido sórbico 20 mmol/L, CTAB 0,2 mmol/L e NaOH 40 mmol/L, em pH 12,2. Nas condições otimizadas, a separação das substâncias de interesse foi realizada em menos de 2 minutos. O limite de detecção para os três analitos variou entre 0,022 e 0,029 g/L, e as medidas de precisão apresentaram resultados de coeficiente de variação entre 0,62 e 4,69%. O método proposto foi aplicado na análise quantitativa dos principais açúcares em amostra de mel, que foram simplesmente dissolvidas em água deionizada, filtradas e injetadas diretamente no equipamento, sem qualquer outra etapa de tratamento das amostras. Os resultados encontrados nas amostras foram entre 33,65 e 45,46 g/100 g para frutose, 24,63 e 35,06 g/100 g para glicose e <0,22 a 1,32 g/100 g para sacarose. O desempenho do método analítico mostrou-se satisfatório para a implementação do mesmo em laboratórios de análises de alimentos para a determinação rotineira destes açúcares em mel de abelhas.

Palavras-chave: Determinação de açúcares. Eletroforese capilar. Mel. *Peakmaster*[®].

1 Introdução

O mel é um alimento natural produzido pelas abelhas a partir do néctar das plantas. É composto de uma solução aquosa supersaturada de açúcares, que contém minoritariamente outras substâncias, como minerais, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonoides, ácidos fenólicos, enzimas, entre outras (WHITE, 1979a; ANKLAM, 1998). A composição e a qualidade do mel dependem principalmente de sua origem botânica e geográfica, porém também sofrem influência de fatores ambientais, condições de processamento e armazenamento (ANKLAM, 1998).

Os açúcares constituem os principais componentes do mel, contabilizando cerca de 95 g/100 g em matéria seca (ANKLAM, 1998; KAŠKONIENĚ; VENSKUTONIS; ČEKŠTERYTĚ, 2010). Os açúcares redutores frutose e glicose são os dois principais; outros dissacarídeos, trissacarídeos e oligossacarídeos também estão presentes, porém em menores concentrações (KÜÇÜK et al., 2007; KAŠKONIENĚ; VENSKUTONIS; ČEKŠTERYTĚ, 2010). Durante a produção e a comercialização do mel, podem ocorrer ações fraudulentas, como por exemplo, a adição direta de xaropes de sacarose, ou a alimentação forçada das abelhas com xaropes. Neste sentido, a determinação dos conteúdos de frutose, glicose e sacarose são importantes na avaliação da qualidade do mel (ANKLAM, 1998; CHENG et al., 2008).

A determinação de açúcares em mel tem sido realizada empregando diferentes métodos, sendo que os mais usuais empregam a técnica de CLAE com detecção de índice de refração (IHC, 2002; AOAC, 2005). Outros métodos utilizam de técnicas de CLAE com detecção amperométrica pulsada (NOZAL et al., 2005), cromatografia de troca iônica com detecção amperométrica (BOGDANOV; RUOFF; ODDO, 2004), CG com detecção de ionização em chama (COTTE et al., 2004; SANZ et al., 2004; KAŠKONIENĚ; VENSKUTONIS; ČEKŠTERYTĚ, 2010), CG acoplada a espectrometria de massas (SANZ; SANZ; MARTÍNEZ-CASTRO, 2004), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (SIVAKESAVA; IRUDAYARAI, 2001; WANG et al., 2010), espectroscopia Raman (BATSOULIS et al., 2005) e testes enzimáticos (CAVIA et al., 2002; FALLICO; ARENA; ZAPPALA, 2008). Como uma técnica alternativa, a EC tem sido ocasionalmente usada na análise de açúcares em diferentes matrizes alimentares, como sucos, iogurte, frutas, vinho, arroz, bebidas (SOGA; SERWE, 2000; CAO et al., 2004;

CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2004; ROVIO; SIRÉN; SIRÉN, 2011) e também em mel (CHENG et al., 2008).

A EC é uma importante técnica de separação que apresenta alta resolução, e está se tornando uma ferramenta de escolha na análise de muitas substâncias (SOGA; SERWE, 2000). Muitas são as vantagens da EC quando comparada a outras técnicas analíticas, como o uso de um volume muito pequeno de amostra, reduzido consumo de solventes, rapidez das análises, alta resolução, e mínima preparação da amostra (CAO et al., 2004; CHENG et al., 2008). O objetivo deste capítulo foi desenvolver um método rápido para a determinação dos açúcares frutose, glicose e sacarose em mel, utilizando uma metodologia de EC. O método desenvolvido foi validado e aplicado em amostras de mel de diferentes origens geográficas.

2 Material e Métodos

2.1 Material

Todas as soluções foram preparadas utilizando reagentes de grau analítico, solventes de pureza cromatográfica e água purificada através de deionização (Deionizador Milli-Q, Millipore, Bedford, EUA). Ácido sórbico e CTAB foram obtidos da Sigma Aldrich (Santa Ana, EUA). NaOH, D-(+)-glicose mono-hidratada, D-frutose e sacarose foram adquiridas da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

Soluções padrão de estoque de frutose, glicose e sacarose foram preparadas diariamente, armazenadas a 4 °C, e diluídas com água deionizada até as concentrações requeridas para os experimentos. Para a análise dos açúcares em mel, foi utilizado um BGE composto de ácido sórbico 20 mmol/L, CTAB 0,2 mmol/L e NaOH 40 mmol/L, em pH 12,2.

2.2 Instrumentação

Os experimentos foram conduzidos em equipamento de EC modelo 7100 (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com DAD no comprimento de onda de 254 nm (detecção indireta – ácido sórbico). A temperatura foi mantida a 25 °C e os dados foram adquiridos com auxílio do software HP ChemStation (v. A.06.01), fornecido pelo fabricante do equipamento. Foram utilizados capilares de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, EUA) com dimensões de 60,0 cm de

comprimento total, 8,5 cm de comprimento efetivo, 50 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo.

Capilares novos foram condicionados por 40 minutos com NaOH 1 mol/L, seguido de água deionizada por mais 40 minutos. No início de cada dia, o capilar foi condicionado por 10 minutos com NaOH 1 mol/L, 10 minutos com água deionizada e 15 minutos com o BGE. Entre as corridas, o capilar foi recondicionado com o BGE por 2 minutos. No final de cada dia de experimentos, o capilar foi lavado com NaOH 1 mol/L por 5 minutos e em seguida com água por 10 minutos, e foi seco com ar por 2 minutos.

A injeção de todas as soluções foi realizada pela extremidade do capilar mais próxima à janela de detecção (*outlet*), no modo hidrodinâmico (50 mbar por 3 segundos, 1 mbar = 100 Pa), com pressão negativa. A voltagem utilizada na separação foi de 25 kV, com polaridade negativa na extremidade da injeção.

2.3 Amostras

O método proposto foi aplicado em dez amostras de mel obtidas de produtores locais, através da EPAGRI de Santa Catarina. As amostras foram coletadas entre os anos de 2008 e 2010, provenientes de diferentes locais do Estado de Santa Catarina, e foram armazenadas em temperatura ambiente até a utilização.

Alíquotas de 2,5 g de mel foram pesadas, dissolvidas em água deionizada e transferidas para um balão volumétrico de 50 mL, e em seguida o volume do balão foi aferido. A solução de mel foi então filtrada através de membranas de 0,45 μm (Millipore, Bedford, MA, EUA) e o filtrado foi dissolvido na proporção 1:10 em água deionizada, atingindo a concentração final de 5 g/L. Esta solução foi injetada diretamente no equipamento de EC sem nenhuma outra etapa de pré-tratamento da amostra.

2.4 Validação do método

Com o objetivo de validar o método proposto, foram avaliados os parâmetros de linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), precisão e exatidão.

Para a avaliação da linearidade do método, a área dos picos obtidos de frutose, glicose e sacarose foi plotada contra suas respectivas concentrações para construir uma curva de calibração para cada açúcar, com cinco níveis em cada curva. O método dos mínimos quadrados foi

empregado para determinar a linearidade e calcular os coeficientes de determinação. Os LD e LQ foram determinados nas amostras de mel, considerando a concentração de açúcar necessária para gerar uma relação sinal ruído de 3:1 e de 10:1, respectivamente. A precisão instrumental foi analisada através da injeção da mesma solução padrão por 20 vezes consecutivas, com posterior cálculo do coeficiente de variação (CV%). As precisões intraensaio e interensaio foram avaliadas, também através do CV%. Foram preparadas duas soluções padrão de igual concentração para cada açúcar, e os eletroferogramas foram obtidos todos no mesmo dia, em triplicata para a avaliação da precisão intraensaio ($n = 6$), e posteriormente em três dias consecutivos, para a avaliação da precisão interensaio ($n = 18$). A exatidão foi avaliada em termos da porcentagem de recuperação, determinada pelo método de adição de padrão, em três níveis para cada açúcar, sendo cada nível avaliado em triplicata.

3 Resultados e Discussão

3.1 Desenvolvimento do método

Para tornar possível a análise açúcares por EC, é necessário que o BGE seja uma solução altamente alcalina, com pH acima de 12, para ocorrer a ionização dos grupamentos hidroxila ($pK_a \approx 12$) presentes nas moléculas de açúcar (SOGA; SERWE, 2000; ROVIO; SIRÉN; SIRÉN, 2011). Além disso, como os açúcares não apresentam grupamentos com forte absorção na região UV/Vis, é preferida a detecção indireta, com a adição ao BGE de uma substância cromófora com alta absorvidade molar.

Considerando estes aspectos, o íon sorbato foi selecionado como coíon, pois é um forte cromóforo, e apresenta mobilidade similar à dos açúcares frutose, glicose e sacarose, o que é importante para minimizar os valores de EMD. O fenômeno de EMD em eletrólitos fortes é descrito por modelos baseados principalmente na diferença entre a mobilidade efetiva do analitos e a mobilidade efetiva do coíon do BGE (GAŠ et al., 2001). A concentração indicada do coíon foi de 20 mmol/L, baseada no fato que concentrações maiores provocam redução do FEO com conseqüente aumento do tempo de corrida, enquanto concentrações menores que esta promovem corridas relativamente curtas, porém com resolução inferior.

O NaOH foi escolhido como contraíon, para permitir o pH do BGE acima de 12. A concentração ideal do NaOH foi definida com o

auxílio do software *Peakmaster*[®], desenvolvido por Gaš e colaboradores (GAŠ et al., 2001; ŠTĚDRÝ; JAROŠ; GAŠ, 2002; ŠTĚDRÝ et al., 2003). Através deste software foi possível checar a ocorrência de EMD, a capacidade tamponante e a condutividade do BGE. A Figura 4,1, construída com auxílio do software *Peakmaster*[®], mostra as curvas de mobilidade efetiva, EMD, capacidade tamponante e condutividade em um sistema composto de um BGE com concentração constante de 20 mmol/L de ácido sórbico, e concentração variável de NaOH na faixa entre 25 e 70 mmol/L, as quais geraram os valores de pH representados no eixo *x* da Figura 4.1.

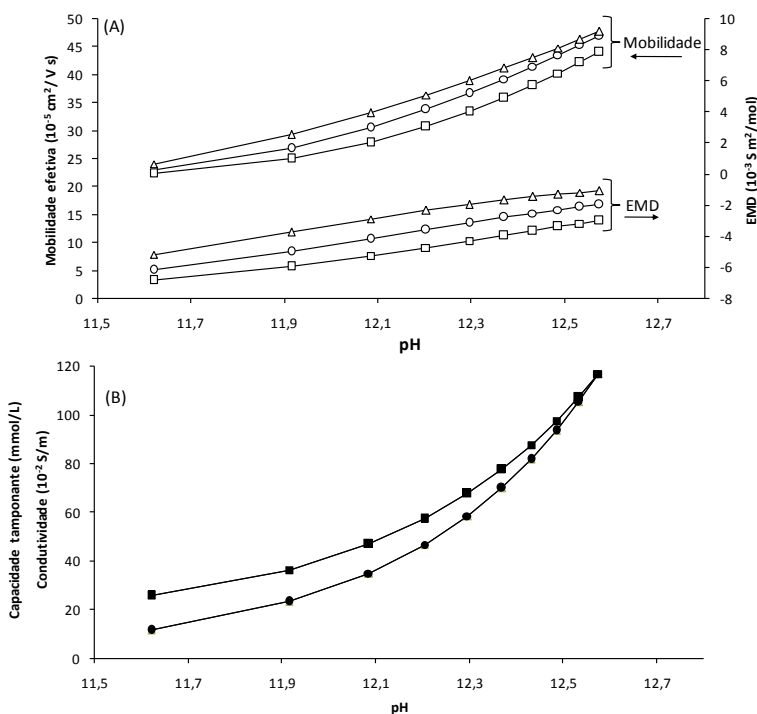


Figura 4.1 – Otimização do pH e da composição do BGE para determinação de açúcares emmel utilizando o software *Peakmaster*[®]. Concentração constante de 20 mmol/L ácido sórbico e concentração de NaOH variável de 25 a 70 mmol/L, resultado nos valores de pH representados no eixo *x*. (A) Curvas de mobilidade efetiva e EMD versus pH para os analitos de interesse. As setas indicam o eixo *y* de cada parâmetro. (B) Curvas da capacidade tamponante e da condutividade do BGE versus pH. Legenda: (\triangle) frutose; (\circ) glicose; (\square) sacarose; (\blacksquare) condutividade; (\bullet) capacidade tamponante.

Os resultados obtidos permitem definir a condição para uma separação satisfatória dos analitos com um BGE composto de 20 mmol/L de ácido sórbico e 40 mmol/L de NaOH, em pH 12,2. Neste valor de pH a capacidade tamponante é suficientemente alta, e o valor de EMD é baixo o bastante para garantir a simetria dos picos obtidos. Observando a Figura 4.1 percebe-se que em valores de pH mais altos as curvas de mobilidade efetiva do par crítico frutose/glicose começam a se sobrepor, o que significa que nestas condições não ocorreria a separação com adequada resolução. Além disso, valores altos de pH provocam incremento na condutividade do BGE, o que resultaria em aumento excessivo da corrente resultante. Finalmente, para promover a separação no modo coeletrosmótico, optou-se pela adição do tensoativo catiônico CTAB, na concentração de 0,2 mmol/L, suficiente para promover a reversão do FEO (TAVARES; COLOMBARA; MASSARO, 1997).

Uma vez definidos o coíon, o contraíon e o tensoativo para reverter o FEO, outros parâmetro do método de EC foram definidos utilizando o software *Peakmaster*[®], incluindo o comprimento do capilar e a tensão aplicada. O eletroferograma obtido de uma mistura de padrões de frutose, glicose e sacarose, sob as condições otimizadas do método, é mostrado na Figura 4.2, na qual é possível observar que uma satisfatória separação com adequada resolução pôde ser obtida em menos de 2 minutos.

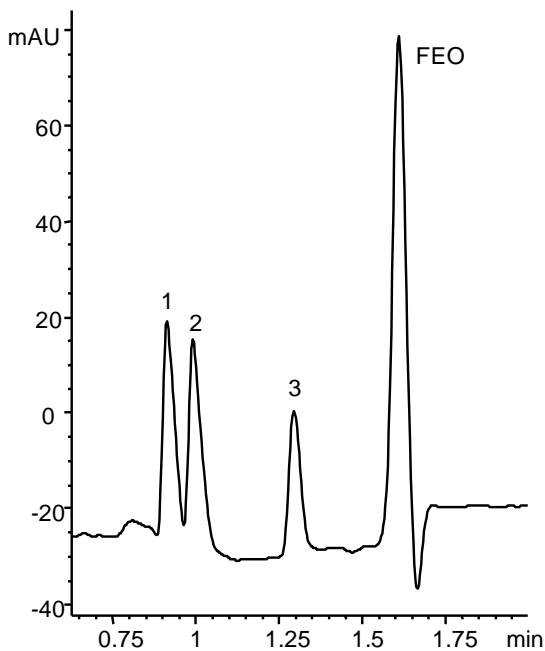


Figura 4.2 – Eletroferograma da mistura de padrões contendo frutose (1), glicose (2) e sacarose (3). Condições: ácido sórbico 20 mmol/L, CTAB 0,2 mmol/L, NaOH 40 mmol/L, pH 12,2; injeção a -50 mbar por 3 segundos; voltagem de +25 kV; capilar de 60 cm (L_{tot}) x 8,5 cm (L_{ef}) x 50 μ m (DI); 25 °C; detecção indireta em 254 nm (ácido sórbico).

3.2 Parâmetros de validação

Após a otimização das condições analíticas do método, foi avaliada a linearidade. As curvas padrão foram construídas com cinco níveis de soluções padrão, nas faixas de concentração de 1,0 a 20,0 mmol/L para frutose e glicose, e de 0,5 a 5 mmol/L para sacarose, sendo cada solução injetada em triplicata. Foi observada uma relação linear entre a área dos picos obtidos e a concentração dos analitos, resultando em valores satisfatórios dos coeficientes de determinação para cada um dos analitos ($R^2 > 0,999$), e intercepto das curvas analíticas próximos a origem. A Tabela 4.1 reúne os resultados obtidos para a linearidade do método.

Tabela 4.1 – Resultados da validação quanto à linearidade, LD e LQ.

Analito	Faixa linear ^a	R ²	LD ^a	LQ ^a
Frutose	0,180 – 3,603	0,9993	0,026	0,088
Glicose	0,180 – 3,603	0,9995	0,026	0,097
Sacarose	0,171 – 1,172	0,9997	0,022	0,074

^a Valores expressos em g/L.

Os resultados encontrados para o LD e para o LQ nas amostras de mel foram respectivamente 0,026 e 0,088 g/L para frutose, 0,029 e 0,097 para glicose e 0,022 e 0,074 para sacarose (Tabela 4.1).

A precisão do sistema de injeção foi avaliada injetando 20 vezes consecutivas a mesma mistura de padrões na concentração de 10 mmol/L (1,801 g/L) para frutose e glicose e de 2 mmol/L (0,685 g/L) para sacarose. Todas as corridas foram realizadas nas mesmas condições experimentais. Os eletroferogramas obtidos foram avaliados quanto ao tempo de migração dos analitos e a área dos picos obtidos. Todos os valores de CV% calculados estão expostos na Tabela 4.2, e apresentaram-se abaixo de 5%, indicando uma aceitável precisão instrumental para o método.

Tabela 4.2 – Resultado da avaliação da precisão.

Parâmetro	Valor (CV%)		
	Frutose	Glicose	Sacarose
Precisão instrumental - área do pico	4,66	2,86	4,69
Precisão instrumental - tempo de migração	0,66	0,70	1,29
Precisão intraensaio - área do pico	3,87	2,43	2,02
Precisão intraensaio - tempo de migração	0,69	0,62	0,93
Precisão interensaio - área do pico	1,06	2,76	3,58
Precisão interensaio - tempo de migração	2,06	2,93	3,50

A precisão intraensaio (repetibilidade) foi estabelecida por três injeções de duas soluções padrão preparadas na mesma concentração: 10 mmol/L para frutose e glicose e 2 mmol/L para sacarose, resultando em 6 injeções no total. A repetibilidade dos tempos de migração e da área dos picos foi estimada entre 0,62 e 3,87 CV%. A precisão interensaio (intermediária) foi determinada através de 6 injeções de soluções padrão de frutose e glicose a 10 mmol/L e sacarose 2 mmol/L, por três dias consecutivos, totalizando 18 injeções. Os resultados variaram entre 1,06 e 3,58 CV%. A Tabela 4.2 mostra os resultados da precisão intraensaio e interensaio, os quais demonstram a satisfatória precisão do método.

A exatidão do método foi avaliada através de ensaios de recuperação, pela adição de soluções padrões dos açúcares em amostras de mel, sendo avaliados três níveis de adição para cada açúcar: 5, 10 e 15 mmol/L (0,901, 1,801 e 2,702 g/L, respectivamente) para frutose e glicose, e 1, 2 e 3 mmol/L (0,342, 0,685 e 1,027 g/L) para sacarose. Os resultados da porcentagem de recuperação estão apresentados na Tabela 4.3, e variaram entre 99,53 e 109,02% para frutose, 98,98 e 107,14% para glicose e entre 96,20 e 108,15% para sacarose, demonstrando a confiabilidade do método para a determinação destes três açúcares em amostras de mel.

Tabela 4.3 – Resultado dos ensaios de recuperação.

Analito	Concentração adicionada (g/L)	Concentração encontrada (g/L)	Recuperação (%)	CV%
Frutose	0,901	0,899	99,53	1,62
	1,801	1,845	102,45	1,88
	2,702	2,946	109,02	2,23
Glicose	0,901	0,892	98,98	1,52
	1,801	1,692	93,83	2,09
	2,702	2,895	107,14	1,83
Sacarose	0,342	0,341	99,85	1,48
	0,685	0,659	96,20	1,78
	1,027	1,111	108,15	2,38

3.3 Análise das amostras

Após sua otimização e validação, o método proposto foi aplicado com sucesso na determinação dos principais açúcares presentes em amostras de mel ($n = 10$), as quais foram preparadas conforme descrito anteriormente. As concentrações médias de frutose, glicose e sacarose presentes nas amostras então apresentadas na Tabela 4.4. A Figura 4.3 mostra o eletroferograma obtido para a amostra VI.

Tabela 4.4 – Conteúdo médio de frutose, glicose e sacarose (g/100 g) nas amostras analisadas.

Amostra	Frutose	Glicose	F/G	Sacarose
I	38,93 ± 0,61	34,98 ± 0,29	1,11	< LD
II	45,46 ± 0,69	22,34 ± 0,48	2,03	< LQ
III	38,56 ± 0,83	26,90 ± 0,33	1,43	< LQ
IV	33,21 ± 0,44	26,51 ± 0,03	1,25	1,32 ± 0,01
V	40,22 ± 1,00	32,47 ± 0,67	1,24	0,89 ± 0,01
VI	33,65 ± 0,69	35,39 ± 0,30	0,95	< LQ
VII	39,33 ± 0,74	32,34 ± 1,36	1,22	0,91 ± 0,01
VIII	37,21 ± 0,91	38,05 ± 0,20	0,98	< LD
IX	37,86 ± 1,19	35,05 ± 1,24	1,08	< LD
X	39,24 ± 0,87	34,92 ± 0,43	1,12	< LD

F/G – razão entre os conteúdos de frutose e glicose.

LD – Limite de detecção, LQ – Limite de quantificação.

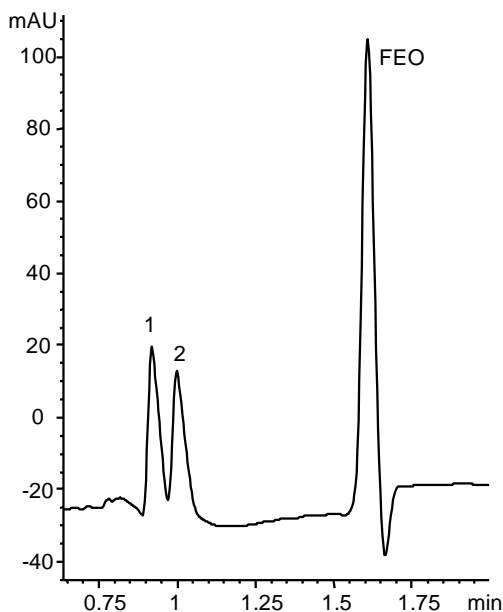


Figura 4.3 – Eletroferograma da amostra VI. Legenda: 1 – frutose; 2 – glicose; FEO – fluxo eletromótico. Para condições da separação, ver Figura 4.2.

Do ponto de vista quantitativo, o açúcar mais abundante é a frutose, com concentração nas amostras variando entre 33,65 e 45,46 g/100 g, seguido de glicose, com concentração entre 22,34 e 38,05 g/100

g. A proporção entre estes dois açúcares no mel depende largamente da origem do néctar, e a razão frutose/glicose pode impactar no sabor do mel, uma vez que a frutose é mais doce que a glicose (ANKLAM, 1998). Além disso, méis com alta razão frutose/glicose podem permanecer fluidos por mais tempo, pois a frutose tem solubilidade maior que glicose. De fato, entre as amostras analisadas, percebeu-se que as amostras VI e VII, cuja razão frutose/glicose foi menor que 1, apresentaram alto grau de cristalização, enquanto todas as outras permaneceram completamente fluidas.

A determinação do conteúdo de sacarose é importante para detectar a adulteração de méis pela adição de xaropes (ANKLAM, 1998). Em paralelo, altos teores de sacarose no mel também podem indicar retirada prematura do mel dos favos da colmeia, considerando que a sacarose presente no néctar não foi totalmente transformada em glicose e frutose pela ação da invertase das abelhas (KÜÇÜK et al., 2007). O conteúdo médio de sacarose presente em todas as amostras analisadas mostrou-se abaixo do limite estabelecido pela legislação brasileira, que é de no máximo 6 g/100 g de mel (BRASIL, 2000).

4 Conclusão

Um novo método para a determinação de frutose, glicose e sacarose em amostras de mel através da técnica de EC foi desenvolvido e otimizado neste capítulo. O método apresentou alta eficiência, baixo custo de análise com mínimo consumo de reagentes e preparação simples da amostra. Sob as condições otimizadas, os três açúcares analisados foram completamente separados e quantificados em menos de dois minutos, com adequada linearidade, precisão e exatidão. O método proposto foi aplicado em dez amostras de mel, que apresentaram resultados satisfatórios. Não foi encontrado na literatura revisada nenhum método mais rápido que este para a determinação destes açúcares em amostras de mel.

CAPÍTULO 5

MEL CATARINENSE: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

MEL CATARINENSE: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, COMPOSTOS BIOATIVOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Resumo

Neste capítulo foram determinadas e comparadas as características físico-químicas (umidade, condutividade elétrica, acidez livre, pH, teor de minerais, HMF, diastase, frutose, glicose, sacarose e cor), bem como a presença de compostos bioativos e atividade antioxidante de 40 amostras de mel provenientes de 8 regiões do Estado de Santa Catarina. Quanto aos parâmetros físico-químicos, somente as amostras da região G apresentaram valores fora dos limites estabelecidos para umidade e acidez livre, provavelmente relacionados à colheita prematura das amostras ou sob condições de alta umidade. Os parâmetros de condutividade elétrica e conteúdo estimado de minerais apresentaram forte correlação entre si ($r = 0,99$). Todas as amostras apresentaram conteúdos importantes de compostos fenólicos, carotenoides totais e atividade antioxidante, variando significativamente para amostras de diferentes regiões ($p < 0,05$). Foi encontrada uma forte correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante, determinada pelos métodos DPPH e FRAP. Este estudo demonstra variações significativas nas características químicas e na atividade antioxidante das amostras, dependendo da sua origem geográfica. Os resultados obtidos comprovam a qualidade do mel catarinense e seu potencial de consumo como alimento funcional na dieta.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Caracterização físico-química. Compostos fenólicos. Mel.

1 Introdução

O mel é um alimento natural, produzido pelas abelhas, a partir do néctar das plantas, e consiste em uma solução aquosa supersaturada de açúcares, composta principalmente de frutose e glicose (ANKLAM, 1998; BERTONCELJ et al., 2007). Outros constituintes minoritários do mel são proteínas, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídeos, vitaminas, compostos voláteis, ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides, produtos de Maillard e minerais (WHITE, 1979; GHELDOLF; WANG; ENGESETH, 2002; BLASA et al., 2006).

A composição do mel é bastante variável, sendo que os fatores que mais contribuem são a origem floral (as plantas das quais foi coletado o néctar pelas abelhas) e a origem geográfica das amostras. Outros fatores que também afetam na composição e qualidade do mel são as condições ambientais e climáticas, o processamento, manipulação e armazenamento do produto (ANKLAM, 1998; BERETTA et al., 2005; TURHAN et al., 2008). No Brasil, os critérios de qualidade físico-químicos do mel são estabelecidos pelo pela Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, elaborada pelo MAPA, que estabelece os limites mínimos ou máximos para parâmetros relacionados à maturidade, pureza e deterioração das amostras (BRASIL, 2000).

Nos últimos anos percebe-se uma crescente demanda por produtos naturais com atividade funcionais na dieta, devido provavelmente aos possíveis efeitos negativos dos aditivos artificiais na saúde humana e ao crescente interesse dos consumidores por este assunto (BALTRUŠAITYTĖ; VENSKUTONIS; ČEKSTERYTĖ, 2007). A atividade antioxidante é uma das mais importantes funções fisiológicas dos alimentos, e protege o organismo contra danos oxidativos, prevenindo a ocorrência de várias patologias, tais como o câncer, doenças cardiovasculares e diabetes (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 1994).

O mel é reconhecido por ter propriedades terapêuticas há muitos anos, sendo um importante ingrediente da medicina tradicional (BERETTA et al., 2005; FERREIRA et al., 2009). Além disso, recentemente tem-se valorizado o seu potencial como alimento natural antioxidante, devido à presença de compostos bioativos como flavonoides, ácidos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides, catalase, peroxidase, e alguns produtos da reação de Maillard (BALTRUŠAITYTĖ; VENSKUTONIS; ČEKSTERYTĖ, 2007; BERTONCELJ et al., 2007; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). O consumo de mel é reportado como efetivo no aumento da capacidade

antioxidante e redutora total do plasma em humanos (GHELDOLF; WANG; ENGESETH, 2002). Em paralelo, muitos autores já investigaram as propriedades químicas e biológicas do mel, demonstrando sua importante atividade antioxidante *in vitro* (BLASA et al., 2006; BERTONCELJ et al., 2007; KÜÇÜK et al., 2007; BERTONCELJ et al., 2007; AL et al., 2009; FERREIRA et al., 2009; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010).

O Brasil possui um grande potencial na produção de mel, sendo atualmente o 10º maior produtor mundial, com produção estimada em mais de 38 mil toneladas de mel no ano de 2009 (FAO, 2011). O Estado de Santa Catarina é o 4º maior produtor nacional, responsável por 11,6% do volume total de mel produzido no Brasil em 2009 (IBGE, 2011). A atividade apícola no país todo gera importantes benefícios econômicos e sociais, porém ainda é pouco explorada, devido principalmente ao baixo consumo do mel *in natura*, estimado em apenas 100 g/hab/ano. Em países da comunidade europeia, o consumo de mel é em média de 700 g/hab/ano, mostrando a necessidade da divulgação deste produto junto à população brasileira (FAO, 2011; VIEIRA, 2011).

Apesar de existirem muitos estudos na literatura sobre mel, pouco se sabe sobre o mel produzido em Santa Catarina. Assim, este capítulo teve como objetivo realizar a caracterização de amostras de mel do Estado de Santa Catarina, considerando parâmetros físico-químicos, a presença de compostos bioativos e a determinação da atividade antioxidante das amostras, apresentando seus benefícios como alimento funcional, impulsionando seu consumo e incentivando a cadeia produtora apícola

2 Material e Métodos

2.1 Material

Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico, nacionais ou importados. Os reagentes TBS, SDS, ácido sórbico, CTAB, cafeína, Folin-Ciocalteu, 2,4,6-tris-(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e os padrões de K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ba^{2+} , HMF, foram obtidos da Sigma Aldrich (Santa Ana, EUA). Os reagentes hidróxido de sódio, cloreto de sódio, ácido acético, ácido láctico, acetato de sódio, amido, iodo, ácido ascórbico, cloreto férrico, sulfato ferroso, ácido gálico, carbonato de sódio, β -caroteno, frutose, glicose, sacarose e os solventes metanol, acetona, e hexano serão todos obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). A água utilizada foi filtrada

por sistema de deionização (deionizador Milli-Q, Millipore, Bedford, EUA).

Os principais equipamentos utilizados foram: condutivímetro modelo Tec-4MP, pH-metro Quimis, espectrofotômetro modelo HP 8452A (Cheadle Heath, Stockport Cheshire, UK), eletroforese capilar modelo 7100 (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), capilares Polymicro (Polymicro Technologies, Phoenix, EUA), e colorímetro portátil Minolta CR-400 Chroma.

2.2 Amostras

Foram analisadas 40 amostras de mel, obtidas através de uma parceria com a EPAGRI de Santa Catarina. As amostras foram coletadas entre os meses de novembro de 2010 e fevereiro de 2011, provenientes de estações experimentais localizadas em oito municípios do Estado de Santa Catarina: Itaiópolis, Florianópolis, São Joaquim, Lauro Muller, Vidal Ramos, São Miguel do Oeste, Videira e Campos Novos, sendo cinco amostras coletadas por região. A posição geográfica e a localização dos municípios estão descritas na Tabela 5.1 e na Figura 5.1. Todas as amostras foram armazenadas em frascos plásticos, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente até o momento das análises.

Tabela 5.1 – Descrição geográfica dos municípios de origem das amostras.

Amostra	Município	Latitude	Longitude	Altitude (m)
A ($n = 5$)	Itaiópolis	26° 20' 24''	49° 53' 4''	923
B ($n = 5$)	Florianópolis	27° 35' 49''	48° 32' 56''	0
C ($n = 5$)	São Joaquim	28° 26' 13''	49° 95' 6''	1.217
D ($n = 5$)	Lauro Muller	28° 23' 34''	49° 23' 48''	220
E ($n = 5$)	Vidal Ramos	27° 24' 33''	49° 23' 60''	661
F ($n = 5$)	São Miguel do Oeste	26° 46' 96''	53° 30' 78''	606
G ($n = 5$)	Videira	26° 58' 40''	51° 11' 35''	690
H ($n = 5$)	Campos Novos	27° 22' 59''	51° 13' 16''	961

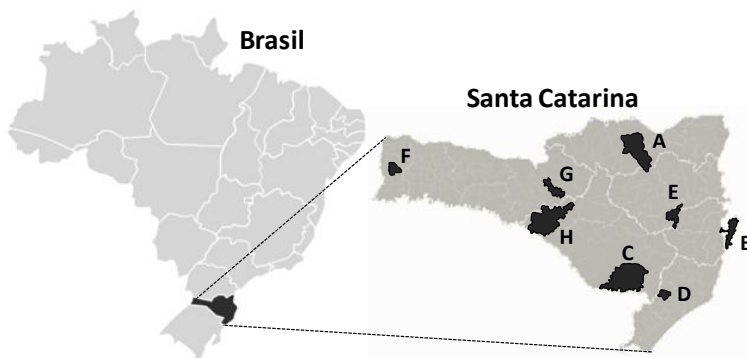


Figura 5.1 – Municípios de origem das amostras: A – Italiópolis; B – Florianópolis; C – São Joaquim; D – Lauro Muller; E – Vidal Ramos; F – São Miguel do Oeste; G – Videira; H – Campos Novos.

2.3 Caracterização físico-química

O conteúdo de umidade foi determinado com base no método refratométrico. O índice de refração das amostras de mel foi determinado à temperatura ambiente usando um refratômetro de Abbé. As leituras obtidas foram então corrigidas para a temperatura padrão de 20 °C através do uso de um fator de correção de 0,00023 por grau acima ou abaixo do padrão. O teor de umidade correspondente ao índice de refração foi calculado usando a tabela de Wedmore, e expresso em g/100 g de mel (AOAC, 2005).

A condutividade elétrica foi determinada em uma solução de mel a 20% m/v em água destilada, a 25 °C, usando um condutivímetro. Os resultados foram lidos diretamente no equipamento e expressos em mS/cm (BOGDANOV, 1999).

A determinação de acidez fundamenta-se na neutralização de uma massa conhecida de mel por uma solução padronizada de NaOH 0,1 mol/L até pH 8,5. Alíquotas de 10 g de amostra de mel foram diluídas em 75 mL de água destilada com agitação magnética. Com o auxílio de um pH-metro foi verificado o valor inicial do pH da amostra. Para a determinação da acidez livre, esta solução foi titulada com NaOH 0,1 mol/L até alcançar pH 8,5. O valor da acidez livre foi calculado com auxílio da equação: $\text{acidez livre} = (v \times f \times 100)/m$, sendo que **v** corresponde ao volume (mL) de NaOH 0,1 mol/L gasto na titulação da amostra, **f** é o fator de correção da solução de NaOH 0,1 mol/L e **m** é a

massa da amostra (g) utilizada na análise. Os valores foram expressos em mEq/kg (AOAC, 2005).

O teor de minerais foi estimado pela soma dos conteúdos individuais dos cátions K^+ , Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} e Mn^{2+} e expresso em mg/kg. Tais cátions foram determinados utilizando uma metodologia de EC, e os dados sobre o desenvolvimento, validação, e aplicação desta metodologia nas amostras de mel estão apresentados no Capítulo 3 deste trabalho.

O conteúdo de HMF foi determinado utilizando o método de MECC com detecção por DAD, e expresso em mg/kg. As condições do método foram: BGE composto de TBS 5 mmol/L e SDS 120 mmol/L, em pH 9,3; capilar de 32 cm de comprimento total, 8,5 cm de comprimento efetivo e 50 μ m de diâmetro interno; injeção hidrodinâmica a -50 mbar por 3 segundos; voltagem de -15 kV; temperatura de 25 °C; e detecção direta em 284 nm. Para mais detalhes sobre o desenvolvimento e a validação deste método, ver Capítulo 2.

A atividade diastásica foi determinada de acordo com AOAC (2005). Amostras de 5 g de mel foram diluídas em 10 mL de água destilada, tamponadas com 2,5 mL de tampão acetato 1,59 mol/L (pH 5,3) e transferidas para um balão volumétrico de 25 mL contendo 1,5 mL de NaCl 0,5 mol/L. O volume então foi completado com água destilada. 5 mL desta solução foram transferidos para um tubo de ensaio, deixado posteriormente em banho-maria a 40 °C juntamente com um segundo tubo de ensaio contendo solução de amido 1%. Após 15 minutos, 2,5 mL da solução de amido foram transferidos para o tubo contendo a solução de mel, com agitação e cronometragem do tempo. Após 5 minutos, 0,25 mL da mistura foram combinados com 2,5 mL de uma solução de iodo 0,00035 mol/L e com o volume de água destilada requerido para que a absorbância inicial a 660 nm fosse $0,760 \pm 0,02$. A reação foi repetida em intervalos de 5 minutos até que a absorbância atingisse 0,235 ou menos. Com os valores obtidos, foram construídos gráficos da absorbância versus o tempo, para o cálculo de t_x , que é tempo (minutos) necessário para atingir a absorbância de 0,235. O quociente $300/t_x$ resultou na atividade diastásica, expressa em mL de solução de amido 1% hidrolisada por 1 hora pela enzima presente em 1 g de mel, em unidades Schade ou Göthe. (AOAC, 2005; KÜÇÜK et al., 2005).

A determinação dos açúcares frutose, glicose e sacarose foi realizada através de método indireto de EC, com BGE composto de 20 mmol/L de ácido sórbico, 0,2 mmol/L de CTAB e 40 mmol/L de NaOH, em pH 12,2. O capilar utilizado possuía 60 cm de comprimento total,

8,5 cm de comprimento efetivo e 50 μm de diâmetro interno. A injeção foi realizada de modo hidrodinâmico (-50 mbar, 3 s), e a voltagem aplicada foi de 25 kV. A temperatura foi mantida a 25 °C, e a detecção indireta foi realizada em 254 nm, através do ácido sórbico. A descrição completa do desenvolvimento e da validação do método está presente no Capítulo 4. Os resultados foram expressos em g/100 g.

A cor das amostras foi analisada através do método instrumental não-destrutivo CIE $L^*a^*b^*$, com auxílio de um colorímetro portátil calibrado com um padrão branco. Em amostras que apresentaram algum grau de cristalização, foi utilizado aquecimento em banho-maria a 45 °C para dissolver cristais de açúcar presentes. As amostras foram transferidas para cubetas onde foram realizadas as leituras dos parâmetros L^* , a^* e b^* , diretamente do equipamento (BERTONCELJ et al., 2007).

2.4 Compostos bioativos e atividade antioxidante

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado através do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Aliquotas de 100 μL de uma solução aquosa de mel (0,2 g/mL) foram misturadas com 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu em balão volumétrico de 10 mL. Após 2 minutos, foram adicionados 1,5 mL de carbonato de sódio 20% m/v, a solução foi novamente misturada, e o volume foi aferido com água destilada com posterior homogeneização. A solução permaneceu 2 horas no escuro, e em seguida a absorbância em 765 nm foi determinada em espectrofotômetro. O conteúdo de compostos fenólicos totais foi calculado por comparação com uma curva padrão construída usando ácido gálico (50 – 300 mg/L), e foi expresso em miligramas de equivalente a ácido gálico (mg EAG)/100 g de mel.

Para a determinação do conteúdo de carotenoides, 2 g de mel foram extraídos com 10 mL de uma mistura de acetona e hexano (4:6), durante 10 minutos sob vigorosa agitação. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 450 nm da fração orgânica em espectrofotômetro. O conteúdo de carotenoides foi calculado por comparação com uma curva padrão construída com β -caroteno (0 – 100 mg/mL), e expresso em miligramas equivalentes a β -caroteno (mg E β C)/kg de mel (FERREIRA et al., 2009; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2011).

A avaliação da atividade antioxidantes das amostras foi realizada através de dois métodos baseados em diferentes princípios e

condições experimentais: o método de seqüestro de radicais do DPPH, de acordo com Brand-Williams, Cuverlier e Berset (1995), e o método do poder redutor FRAP, descrito por Benzie e Strain (1996) e modificado por Bertoncej et al. (2007). A solução de análise foi preparada com 5 g de mel diluídos em quantidade suficiente para 25 mL com água destilada.

O método do radical DPPH é um dos mais rápidos para avaliar a habilidade da transferência de elétrons/hidrogênio em diversas matrizes com potencial antioxidante (BERETTA et al., 2005). O DPPH é um radical orgânico estável de nitrogênio amplamente utilizado para testar a capacidade de inibição de radicais livres de diversas matrizes. A presença de elétrons desemparelhados no DPPH é responsável pela forte absorção máxima no comprimento de onda de 515 nm, resultando na cor púrpura. A alteração da cor púrpura para amarelo ocorre quando o elétron desemparelhado forma um par com o hidrogênio doado pelo composto antioxidante, convertendo o DPPH para sua forma reduzida (BERTONCELJ et al., 2007; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). O radical DPPH foi preparado na concentração de 0,1 mmol/L em metanol. Essa solução foi diluída na proporção 1:100 em metanol 80% v/v, até a absorbância inicial de 0,800 em 515 nm. Em uma cubeta, foi verificada a absorbância de 2,9 mL da solução de DPPH (A_0) e em seguida adicionados 100 μ L da solução de mel. A mistura ficou no escuro por 30 minutos e em seguida a absorbância foi novamente medida (A_{30}). Uma prova em branco foi realizada utilizando somente água destilada ao invés da solução de mel. A percentagem de inibição dos radicais foi calculada através da equação: $\% = (1 - A_{30}/A_0) \times 100$. Uma curva padrão foi preparada usando ácido ascórbico (0 – 100 mg/L), e os resultados expressos em miligramas equivalentes a ácido ascórbico (mg EAA)/100 g de mel (BRAND-WILLIAMS; CUVERLIER; BERSSET, 1995).

O método FRAP estima diretamente os antioxidantes e redutores presentes em uma amostra, baseado na habilidade da amostra em reduzir o Fe^{+3} (oxidado) em Fe^{+2} (reduzido) (BERETTA et al., 2005). O reagente de FRAP foi preparado diariamente, e consiste em uma mistura de uma parte de TPTZ 10 mmol/L em HCl 40 mmol/L, uma parte de FeCl_3 20 mmol/L, e dez partes de tampão acetato de sódio 0,3 mol/L, pH 3,6. Alíquotas de 200 μ L da solução de mel foram misturadas com 1,8 mL do reagente de FRAP e deixadas por 10 minutos em banho-maria a 37 °C. Em seguida a absorbância foi medida a 593 nm. Um solução aquosa de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0 – 750 μ mol/L) foi usada na preparação de uma curva padrão, e os resultados expressos em μ mols

equivalentes a Fe (II)/100 g de mel (BENZIE; STRAIN, 1996; BERTONCELJ et al., 2007).

2.5 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram tratados com auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, EUA). Todas as análises foram realizadas em triplicata para cada uma das amostras de mel, e os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão das cinco amostras de cada região. As médias de cada região foram então submetidas à análise de variância (ANOVA) e teste HSD de Tukey para verificar diferenças entre as médias, sendo que diferenças ao nível de 5% ($p < 0,05$) foram consideradas estatisticamente significantes. Também foram avaliadas as regressões lineares entre os parâmetros através do coeficiente de determinação (R^2) e calculado o coeficiente de correlação de Pearson (r) para detectar relações entre as variáveis em estudo.

3 Resultados e Discussão

3.5 Caracterização físico-química

Os resultados encontrados para a caracterização físico-química das amostras de mel podem ser apreciados nas Tabelas 5.2, 5.3 e 5.4. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias obtidas em todos os parâmetros avaliados.

O conteúdo de umidade das amostras variou entre 16,99 e 21,71 g/100 g (Tabela 5.2). Somente as amostras da região G apresentaram teor de umidade acima do limite estabelecido pela legislação brasileira, que é de 20 g/100 g (BRASIL, 2000). Altos teores de água indicam colheita prematura do mel ou sob condições de alta umidade, e podem levar a fermentação indesejável dos açúcares presentes, conferindo gosto amargo ao mel e afetando sua qualidade (AJLOUNI; SUJIRAPINYOKUL, 2009; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). O conteúdo de água é considerado um bom critério na avaliação da qualidade do mel (AL et al., 2009).

Tabela 5.2 – Características físico-químicas determinadas nas amostras de mel.

Região	Umidade (g/100 g)	Condutividade elétrica (mS/cm)	Acidez livre (meq/kg)	pH	Minerais (mg/kg)
A	16,99 ± 0,55 ^d	0,32 ± 0,03 ^e	24,75 ± 3,26 ^c	3,74 ± 0,11 ^{b,c}	675,49 ± 77,15 ^d
B	17,99 ± 0,46 ^{c,d}	1,00 ± 0,01 ^a	30,10 ± 1,63 ^c	4,12 ± 0,06 ^a	2294,76 ± 149,66 ^a
C	19,46 ± 0,89 ^{b,c}	0,60 ± 0,07 ^b	30,79 ± 3,17 ^c	4,13 ± 0,21 ^a	1381,88 ± 206,31 ^b
D	18,37 ± 0,90 ^c	0,49 ± 0,03 ^c	31,40 ± 4,96 ^c	4,03 ± 0,25 ^{a,b}	1049,22 ± 110,93 ^c
E	17,84 ± 0,39 ^{c,d}	0,33 ± 0,01 ^{d,e}	44,89 ± 2,53 ^{a,b}	3,68 ± 0,22 ^{b,c,d}	676,21 ± 25,84 ^d
F	18,71 ± 0,28 ^b	0,28 ± 0,01 ^e	29,53 ± 1,01 ^c	3,19 ± 0,06 ^e	583,97 ± 20,09 ^d
G	21,71 ± 0,24 ^a	0,64 ± 0,01 ^b	52,18 ± 1,54 ^a	3,48 ± 0,07 ^{c,d,e}	1340,77 ± 16,37 ^b
H	18,04 ± 0,08 ^{c,d}	0,40 ± 0,01 ^d	44,42 ± 6,65 ^b	3,41 ± 0,17 ^{d,e}	712,99 ± 9,51 ^d

Valores expressos como média ± desvio padrão ($n = 5$ para cada região).

^{a,b,c,d,e} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

A condutividade elétrica encontrada nas amostras variou entre 0,28 e 1,00 mS/cm e apresentou grande variabilidade entre as regiões (Tabela 5.2). As amostras da região B apresentaram os maiores valores, e as amostras das regiões A, E e F os menores valores. Outros autores também encontraram valores de condutividade bastante variáveis entre amostras de mel: entre 0,23 e 1,22 para méis da Itália (FALLICO; ARENA; ZAPPALA, 2008), entre 0,33 e 0,94 para méis da Índia (SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010), e entre 0,20 e 2,09 para méis da Espanha (MANZNARES et al., 2011).

Os valores de acidez livre encontrados estiveram entre 24,75 e 52,18 meq/kg (Tabela 5.2). Novamente as amostras da região G foram as únicas que apresentaram valores fora do limite legal, de 50 meq/kg (BRASIL, 2000). Como estas amostras mostraram altos teores de umidades, era esperada a ocorrência de fermentação, confirmada pela alta acidez das amostras. Assim, pode-se inferir que as amostras da região G foram colhidas antes da completa maturação do mel nos favos, ou mesmo sob condições climáticas de alta umidade. Khalil, Sulaiman e Gan (2010) avaliaram amostras de mel da Malásia e também encontraram amostras com altos valores de umidade associados com teor de acidez acima do limite.

Todas as amostras apresentaram caráter ácido, típico do mel, com pH variando entre 3,19 e 4,13 (Tabela 5.2). Os valores foram semelhantes aos encontrados em amostras do Uruguai, Portugal, Índia e Argentina com pH variando entre 3,0 e 4,3, 3,5 e 4,2, 3,7 e 4,4 e 3,2 e 4,1, respectivamente (CORBELLA; COZZOLINO, 2006; FÉAS et al., 2010a; SAXENA, GAUTAM; SHARMA, 2010; ISLA et al., 2011).

O teor estimado de minerais foi bastante variável de acordo com a procedência das amostras e apresentou valores entre 583,97 e 2294,76 mg/kg, com os menores valores encontrados para as amostras das regiões A, E, F e H (Tabela 5.2). As amostras da região B apresentaram os maiores valores, quase quatro vezes superior aos daquelas regiões. Este fato pode ser explicado pela região de origem ser uma ilha, onde o mar atua como uma fonte extra de sais minerais (POHL, 2009). Alvarez-Suarez et al. (2011) também encontraram maior conteúdo de minerais em amostras provenientes de regiões litorâneas. Além disso, foi encontrada uma forte correlação positiva e linear entre o conteúdo de minerais e a condutividade elétrica (Figura 5.2), com R^2 de 0,98 e r de 0,99. Outros autores encontraram correlações similares, com coeficientes de 0,99 para méis de Portugal e 0,98 em méis Indianos (FÉAS et al., 2010a; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010).

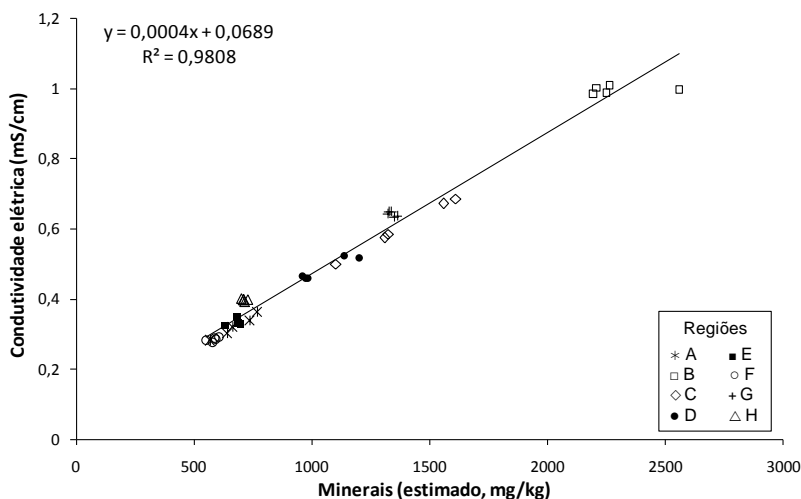


Figura 5.2 – Regressão linear obtida entre o conteúdo estimado de minerais e a condutividade elétrica das amostras.

A substância HMF não foi detectada nas amostras provenientes das regiões A, B, C, D, E e F, e o conteúdo encontrado nas amostras das regiões G e H foi de respectivamente 4,26 e 7,69 mg/kg. A atividade diastásica das amostras variou entre 9,10 e 28,90 unidades Göethe (Tabela 5.3). Esses dois parâmetros são reconhecidos mundialmente como indicadores do frescor do mel, sendo que as amostras devem apresentar HMF inferior a 60 mg/kg e diastase superior 8 unidades Göethe para estarem de acordo com a legislação nacional (BRASIL, 2000; KÜÇÜK et al., 2007; BARONI et al., 2009). Deste modo, percebe-se que os resultados foram altamente satisfatórios, demonstrando que nenhuma das amostras sofreu aquecimento excessivo e nem foi armazenada por períodos longos de tempo (ANKLAM, 1998; KÜÇÜK et al., 2007).

Tabela 5.3 – Conteúdo de HMF e atividade diastásica determinados nas amostras de mel.

Região	HMF (mg/kg)	Diastase (un. Göthe)
A	ND	9,10 ± 1,45 ^c
B	ND	18,87 ± 0,75 ^b
C	ND	15,89 ± 2,37 ^b
D	ND	11,65 ± 0,62 ^c
E	ND	10,77 ± 3,52 ^c
F	ND	19,38 ± 2,78 ^b
G	4,26 ± 0,58 ^b	27,13 ± 1,14 ^a
H	7,69 ± 0,78 ^a	28,90 ± 0,63 ^a

Valores expressos como média ± desvio padrão ($n = 5$ para cada região).

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

ND – não detectado

Os açúcares representam os principais constituintes do mel, principalmente os açúcares redutores frutose e glicose (KÜÇÜK et al., 2007; AL et al., 2009). O conteúdo de frutose nas amostras variou entre 34,60 e 39,69 g/100 g e em todas as amostras foi superior ao conteúdo de glicose, que variou entre 26,47 e 33,06 g/100 g (Tabela 5.4). Estes valores são similares aos apresentados por outros autores (FALLICO et al., 2004; TOSI et al., 2008; OUCHEMOUKH et al., 2010). A taxa frutose/glicose calculada para todas as amostras apresentou-se acima de 1, indicando a fluidez das amostras, o que foi confirmado visualmente (AL et al., 2009). A soma dos conteúdos de frutose e glicose das amostras de seis regiões foi superior a 65 g/100 g, que é o limite mínimo estabelecido para o conteúdo de açúcares redutores (BRASIL, 2000). Entretanto, como não foi quantificado o conteúdo de açúcares redutores totais, e sim somente frutose e glicose, não se pode afirmar que as amostras das duas outras regiões estão fora dos padrões legais. Quanto ao teor de sacarose, nenhuma amostra apresentou quantidades detectáveis deste açúcar não-redutor, estando todas de acordo com o valor da legislação (menor que 6 g/100 g, BRASIL, 2000).

Tabela 5.4 – Conteúdos de frutose, glicose e sacarose (g/100 g) encontrados nas amostras.

Região	Frutose	Glicose	F+G	F/G	Sacarose
A	37,27 ± 2,50 ^{a,b,c}	33,06 ± 1,83 ^a	70,33 ± 4,07	1,13	< LD
B	39,69 ± 2,04 ^a	26,47 ± 1,20 ^d	66,16 ± 2,27	1,50	< LD
C	38,77 ± 1,48 ^{a,b}	31,97 ± 1,41 ^{a,b,c}	70,74 ± 2,49	1,21	< LD
D	36,90 ± 1,78 ^{a,b,c}	31,79 ± 2,83 ^{a,b,c}	68,69 ± 4,22	1,16	< LD
E	37,95 ± 1,51 ^{a,b}	32,26 ± 1,28 ^{a,b}	70,21 ± 1,99	1,18	< LD
F	35,58 ± 2,59 ^{b,c}	29,00 ± 1,32 ^{b,c,d}	64,58 ± 2,71	1,23	< LD
G	34,60 ± 1,28 ^c	28,79 ± 1,32 ^{b,c,d}	63,39 ± 1,32	1,20	< LD
H	37,15 ± 1,70 ^{a,b,c}	28,60 ± 1,39 ^{c,d}	65,75 ± 2,27	1,30	< LD

Valores expressos como média ± desvio padrão ($n = 5$ para cada região).

^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

F+G – soma dos conteúdos de frutose e glicose; F/G – razão entre os conteúdos de frutose e glicose; LD – limite de detecção.

As características de cor das amostras estão apresentadas na Tabela 5.5. Com base no critério de que méis com valor de $L^* > 50$ são considerados claros e com $L^* \leq 50$ são considerados escuros, todas as amostras podem ser consideradas escuras, pois o valor de L^* variou entre 21,15 e 34,37 (SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). As amostras das regiões B e H apresentaram os menores valores, sendo então as mais escuras. O coeficiente r entre o valor de L^* e o conteúdo de minerais estimado nas amostras foi de -0,69, e indica que os minerais contribuem para a intensidade da cor do mel, confirmando o que outros autores já haviam reportado (GONZÁLEZ-MIRET et al., 2005; AL et al., 2009). Os valores de a^* variaram de 2,69 a 5,69, enquanto os valores de b^* estiveram entre -1,62 e 6,67, e são semelhantes ao encontrados por Ajlouni e Sujirapinyokul (2009) e por Saxena, Gautam e Sharma (2010) em amostras de mel da Austrália e da Índia, respectivamente.

Tabela 5.5 – Parâmetros referentes à cor das amostras analisadas.

Região	L^*	a^*	b^*
A	$34,37 \pm 4,10^a$	$4,39 \pm 1,07^{a,b}$	$-1,62 \pm 0,72^b$
B	$21,15 \pm 0,74^c$	$4,72 \pm 0,31^{a,b}$	$6,09 \pm 1,02^a$
C	$30,56 \pm 3,43^{a,b}$	$4,97 \pm 1,37^{a,b}$	$2,04 \pm 0,82^{a,b}$
D	$32,56 \pm 4,29^{a,b}$	$5,41 \pm 1,13^a$	$-1,11 \pm 0,26^b$
E	$32,52 \pm 4,37^{a,b}$	$4,02 \pm 1,47^{a,b}$	$0,34 \pm 0,33^b$
F	$32,36 \pm 2,19^{a,b}$	$2,69 \pm 1,50^b$	$6,07 \pm 2,56^a$
G	$31,31 \pm 5,03^{a,b}$	$5,69 \pm 1,50^a$	$-1,13 \pm 0,89^b$
H	$25,40 \pm 3,59^{b,c}$	$4,85 \pm 0,50^{a,b}$	$6,67 \pm 1,42^a$

Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n = 5$ para cada região).

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.6 Compostos bioativos e atividade antioxidante

Os valores encontrados para o conteúdo de compostos fenólicos totais, carotenoides totais e para a avaliação da atividade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP das amostras de mel analisadas podem ser observados na Tabela 5.6. Em todas as determinações foram encontradas diferenças significativas entre as médias das diferentes regiões ($p < 0,05$).

Tabela 5.6 – Características bioativas encontradas nas amostras.

Região	Fenólicos totais (mg EAG/ 100 g)	Carotenoides totais (mg E β C/kg)	DPPH (mg EAA/ 100 g)	FRAP (μ mol Fe II/ 100 g)
A	$36,37 \pm 2,01^d$	$11,66 \pm 0,95^a$	$9,55 \pm 1,04^{b,c}$	$90,13 \pm 21,65^d$
B	$71,69 \pm 7,70^a$	$9,92 \pm 1,12^{a,b}$	$16,96 \pm 2,56^a$	$53,03 \pm 26,89^a$
C	$41,03 \pm 3,06^{c,d}$	$7,46 \pm 3,12^{a,b}$	$12,19 \pm 1,53^b$	$69,84 \pm 63,38^b$
D	$46,03 \pm 1,46^c$	$9,75 \pm 1,82^{a,b}$	$12,50 \pm 1,79^b$	$22,39 \pm 16,28^{b,c}$
E	$44,17 \pm 2,51^{c,d}$	$6,34 \pm 1,09^b$	$9,38 \pm 0,67^{b,c}$	$76,92 \pm 9,02^c$
F	$41,53 \pm 1,43^{c,d}$	$7,06 \pm 1,45^{a,b}$	$11,68 \pm 1,50^b$	$50,44 \pm 6,51^d$
G	$69,32 \pm 1,35^a$	$6,44 \pm 3,19^b$	$19,09 \pm 1,77^a$	$69,73 \pm 8,59^b$
H	$62,39 \pm 3,91^b$	$11,74 \pm 2,58^a$	$7,48 \pm 1,90^c$	$67,11 \pm 28,00^c$

Valores expressos como média \pm desvio padrão ($n = 5$ para cada região).

^{a,b,c,d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as médias de acordo com teste de Tukey ($p < 0,05$).

EAG – equivalentes a ácido gálico; E β C – equivalentes a β -caroteno; EAA – equivalentes a ácido ascórbico.

O teor de compostos fenólicos totais encontrado nas amostras variou entre 36,37 a 71,69 mg EAG/100 g de mel. Amostras das regiões B e G apresentaram os maiores valores, enquanto as amostras das regiões A, C, E e F apresentaram os menores teores. A concentração e o tipo de compostos fenólicos presentes são influenciados majoritariamente pela origem floral do mel, e esta classe de substâncias parece ser a principal contribuinte para as atividades bioativas do mel (ANKLAM, 1998; AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002; KÜÇÜK et al., 2007). Outros autores encontraram valores de compostos fenólicos entre 47,0 e 98,0 mg EAG/100 g para méis da Índia e entre 15,2 e 52,6 mg EAG/100 g para méis da Malásia (SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010; KHALIL et al., 2011).

O conteúdo dos carotenoides totais avaliado nas amostras apresentou-se entre 6,34 e 11,74 mg E β C/kg de mel, sendo que as amostras das regiões A e H apresentaram os maiores valores. Ferreira et al. (2009) encontrou resultados semelhantes em méis portugueses, entre 8,64 e 9,49 mg E β C/kg, enquanto Alvarez-Suarez et al. (2011) encontrou resultados inferiores, variando entre 1,17 e 5,57 mg E β C/kg para méis cubanos. Alvarez-Suarez et al. (2011) sugere que pelo fato da composição do mel ser altamente complexa e dependente de diversos fatores, variações sazonais e ambientais podem ser responsáveis pelas diferenças detectadas entre os resultados.

No presente estudo a atividade antioxidante foi avaliada por dois diferentes métodos: DPPH e FRAP. O método do DPPH é baseado no sequestro de radicais livres pelos antioxidantes presentes em uma amostra, e utilizando uma curva padrão construída com ácido ascórbico é possível calcular a atividade antioxidante da amostra em equivalentes a ácido ascórbico. Os resultados do DPPH variaram de 7,48 a 19,09 mg EAA/100 g de mel, e diferiram significativamente entre amostras de diferentes regiões. Assim como no conteúdo de compostos fenólicos, as amostras das regiões B e G apresentaram os maiores valores de DPPH, e amostras da região H apresentaram os menores valores. Resultados similares foram encontrados em méis da República Tcheca e da Índia (LACHMAN et al., 2010; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010). Assim como reportado por outros autores, foi encontrada uma correlação positiva entre o valor de DPPH e o teor de compostos fenólicos ($r = 0,89$, Figura 5.3), indicando que os fenólicos contribuem para a atividade antioxidante do mel (BERETTA et al., 2005; SAXENA; GAUTAM; SHARMA, 2010; BERTONCELJ et al., 2011a).

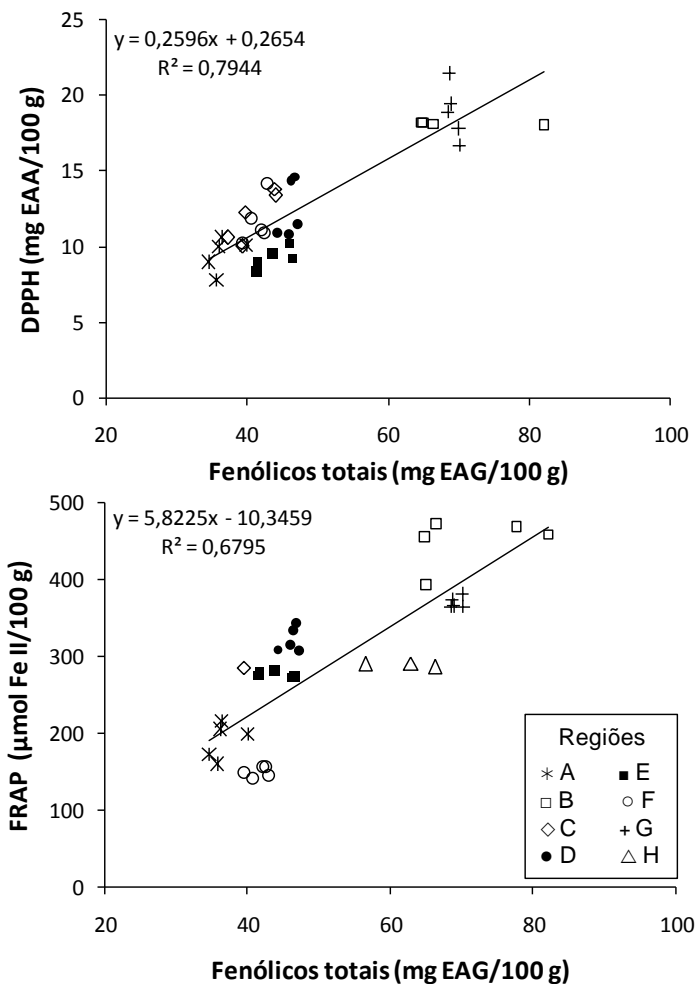


Figura 5.3 – Regressão linear obtida entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH e FRAP.

A análise de FRAP é importante na determinação direta da presença de antioxidantes e/ou redutores em uma amostra. Os valores médios de FRAP encontrados nas amostras variaram entre 150,44 e 453,03 $\mu\text{mol Fe II}/100\text{ g}$ de mel, e foram significativamente diferentes entre as regiões analisadas: novamente, amostras da região B apresentaram os maiores valores, enquanto amostras das regiões A e F

os menores valores. Também foi encontrada uma correlação positiva linear entre o valor de FRAP e o conteúdo de compostos fenólicos (Figura 2.4), com valor de r de 0,82, novamente confirmando a hipótese dos compostos fenólicos contribuírem amplamente para as atividades biotivas do mel. Do mesmo modo, outros autores encontraram esta forte correlação (BERETTA et al., 2005; BERTONCELJ et al., 2007; LACHMAN et al., 2010).

4 Conclusão

Foram avaliadas as características físico-químicas, presença de compostos bioativos e atividade antioxidante de 40 amostras de mel provenientes de 8 municípios do Estado de Santa Catarina. Os resultados obtidos quanto a caracterização físico-química mostram que 35 amostras (provenientes de 7 regiões) apresentaram composição de acordo com os critérios de qualidade estabelecido para mel de abelhas, quanto à umidade, acidez livre, pH, HMF, atividade diastásica, frutose, glicose e sacarose. Apenas as amostras da região G apresentaram valores excessivos de umidade e acidez livre, indicando provável colheita prematura das amostras ou sob condições climáticas de alta umidade. Foi estabelecida uma forte correlação positiva entre o conteúdo de minerais estimado e a condutividade elétrica das amostras. O conteúdo de compostos fenólicos totais e de carotenoides totais variou de forma significativa entre as amostras ($p < 0,05$). Foi encontrada uma importante correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante determinada pelos métodos DPPH e FRAP, sugerindo que estes compostos contribuem grandemente para esta propriedade funcional do mel. De modo geral, as amostras provenientes da região B apresentaram os maiores conteúdos de compostos fenólicos e consequente atividade antioxidante superior às outras amostras. Estudos mais específicos sobre compostos presentes no mel são requeridos, principalmente para identificar e quantificar compostos individuais com atividade biológica. O presente estudo contribui para divulgar o mel catarinense como um produto de qualidade e com importantes propriedades funcionais, valorizando este alimento natural frente à comunidade científica e a população em geral.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização deste trabalho demonstrou que o mel catarinense é um produto de alta qualidade, com características físico-químicas dentro dos padrões recomendados. Foram percebidas variações significativas na composição do mel de acordo com sua origem geográfica, sendo que a determinação do conteúdo dos principais minerais permitiu a discriminação das amostras entre suas diferentes origens geográficas através de ferramentas estatísticas.

Embora não haja evidências para afirmar que o mel é um alimento de importância primária na dieta humana, seu consumo é recomendado para complementar a dieta como fonte de compostos com atividade antioxidante, agindo como preventivo de doenças degenerativas. Estudos mais específicos são de extrema importância para a identificação e quantificação individual das substâncias responsáveis pelas propriedades antioxidantes encontradas no mel.

Por fim, a eletroforese capilar demonstra ser uma técnica de excepcional utilidade para o desenvolvimento de novas metodologias para o controle de qualidade do mel, com análises rápidas, econômicas e extremamente confiáveis.

REFERÊNCIAS

ABEMEL. Associação Brasileira de Exportadores de Mel. **Exportação de Mel Brasileiro 2000 a 2010**. Disponível em <http://www.abemel.com.br/estatisticas.htm>. Acesso em 01 de setembro de 2011.

AJLOUNI, S.; SUJIRAPINYOKUL, P. Hydroxymehtylfurfuraldehyde and amylase contents in Australian honey. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1000-1005, 2009.

AL, M. L. et al. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 863-867, 2009.

ALJADI, A. M.; KAMARUDDIN, M. Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, n. 4, p. 513-518, 2004.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, v. 22, n. 9, p. 1041-1047, 2002.

ALMEIDA-SILVA, M. et al. Trace elements in wild and orchard honeys. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 69, p. 1592-1595, 2011.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. et al. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2490-2499, 2011.

AMES, J. M. The Maillard reaction. In: HUDSON, B. J. **Biochemistry of food proteins** (Ed.). London: Elsevier, p. 99-153, 1992.

ANDRADE, P. et al. Determination of phenolic compounds in honey with different floral origin by capillary zone electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 79-84, 1997.

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 63, n. 4, p. 549-562, 1998.

AOAC. Official Methods of Analysis. In W. Horwitz (Ed) (18th ed.). Gaithersburg, MD, USA: Association of official Analytical Chemists, Inc., 2005.

AQUINO, F. W. B. et al. Simultaneous determination of aging markers in sugar cane spirits. **Food Chemistry**, v. 98, p. 569-574, 2006.

BALTRUŠAITYTĖ, V.; VENSKUTONIS, P. R.; ČEKŠTERYTĖ, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 502-514, 2007.

BARONI, M. V. et al. Composition of honey from Córdoba (Argentina): Assessment of North/South provenance by chemometrics. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 727-733, 2009.

BATSOULIS, A. N., et al.. FT-Raman spectroscopic simultaneous determination of fructose and glucose in honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 207-210, 2005.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BERETTA, G. et al. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorometric assays and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 533, n. 2, p. 185-191, 2005.

BERTONCELJ, J. et al. Characterization of Slovenian honeys on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 1661-1671, 2011a

BERTONCELJ, J. et al. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 822-828, 2007.

BERTONCELJ, J. et al. LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 127, p. 296-302, 2011b.

BILANDŽIĆ, N. et al. Determination of trace elements in Croatian floral honey originating from different regions. **Food Chemistry**, v. 128, p. 1160-1164, 2011.

BLASA, M. et al. Honey flavonoids as protection agents against oxidative damage to human red blood cells. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1635 – 1640, 2007.

BLASA, M. et al. Raw *Millefiori* honey is packed full of antioxidants. **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p.217-222, 2006.

BOGDANOV, S. Honey quality and internacional regulatory standards: Review by the Internacional Honey Comission. **Bee World**, v. 90, p. 61-69, 1999.

BOGDANOV, S.; RUOFF, K.; ODDO, L. P. Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: A review. **Apidologie**, v. 35, p. 4-17, 2004.

BRAND-WILLIAMNS, W.; CUVERLIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel**. MAPA, Brasília, 2000.

BULDINI, P. L. et al. Ion chromatographic and voltammetric determination of heavy and transition metals in honey. **Food Chemistry**, v. 73, p. 487-495, 2001.

CANTARELLI, M. A. et al. Quality of honey from Argentina: study of chemical composition and trace elements. **Journal of the Argentine Chemical Society**, v. 96, p. 33-41, 2008.

CAO, Y. et al. Study on sugar profile of rice during ageing by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Food Chemistry**, v. 86, p. 131-136, 2004.

CAVIA, M. M. et al. Evolution of fructose and glucose in honey over one year: influence of induced granulation. **Food Chemistry**, v. 78, p. 157–161, 2002.

CHENG, X. et al. Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a nano-nickel oxide modified carbon paste electrode. **Food Chemistry**, v. 106, p. 830-835, 2008.

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, p. 284-290, 2010.

CIULU, M. et al. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. **Talanta**, v. 83, p. 924-929, 2011.

CODEX STAN 12. Codex Alimentarius Commission. **Codex Standard for Honey**, n. 12, v. 11, rev. 2, p.1-8, 2001. Disponível em http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=310. Acesso em 18 de setembro de 2011.

COLOMBARA, R.; TAVARES, M. F. M.; MASSARO, S.; Determinação Simultânea de Ânions por Eletroforese Capilar: Características e Aplicações. **Química Nova**, v. 20, p. 512-518, 1997.

CORBELLA, E.; COZZOLINO, D. Classification of the floral origin of Uruguayan honeys by chemical and physical characteristics combined with chemometrics. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, p. 534-539, 2006.

CORTACERO-RAMÍREZ, S. et al. Analysis of carbohydrates in beverages by capillary electrophoresis with precolumn derivatization and UV detection. **Food Chemistry**, v. 87, p. 471-476, 2004.

COTTE, J. F. et al. Chromatographic analysis of sugar applied to the characterization of monofloral honey. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 380, p. 698-705, 2004.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAOSTAT. Disponível em <http://faostat.fao.org/>. Acesso em 01 de setembro de 2011.

FALLICO, B.; ARENA, E.; ZAPPALA, M. Degradation of 5-Hydroxymethylfurfural in Honey. **Journal of Food Science**, v. 73, p. C625-C631, 2008.

FALLICO, B. et al. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. **Food Chemistry**, v. 85, p. 305-313, 2004.

FÉAS, X. et al. Characterization of artisanal honey produced on the Northwest of Portugal by melissopalynological and physico-chemical data. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3462-3470, 2010a.

FÉAS, X. et al. Palynological and physicochemical data characterisation of honeys produced in the *Entre-Douro e Minho* region of Portugal. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1255-1262, 2010b.

FERNÁNDEZ-TORRES, R. et al. Mineral content and botanical origin of Spanish honeys. **Talanta**, v. 65, p. 686-691, 2005.

FERREIRA, I. C. F. R. et al. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: different contribution of the entire honey and phenolic extract. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, 1438–1443, 2009.

FINOLA, M. S.; LASAGNO, M. C.; MARIOLI, J. M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1649-1653, 2007.

FRANKEL, S.; ROBINSON, G. E.; BERENBAUM, M. R. Antioxidant capacity and correlated characteristic of 14 unifloral honeys. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 1, p. 27-31, 1998.

FUENTE, E. et al. Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1483-1489, 2011.

GAŠ, B., et al. Optimization of background electrolytes for capillary electrophoresis: I. Mathematical and computational model. **Journal of Chromatography. A**, v. 905, p. 269-279, 2001.

GASPAR, E. M. S. M.; LUCENA, A. F. F. Improved HPLC methodology for food control – furfurals and patulin as markers of quality. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1576-1582, 2009.

GHELDOF, N.; ENGESETH, N. J. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources bases on the determination of Oxygen Radical Absorbance Capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3050-3055, 2002.

GHELDOF, N.; WANG, X. H.; ENGESETH, N. J. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5870-5877, 2002.

GÖKMEN, V.; SENYUVA, H. Z. improved method for determination of hydroxymethylfurfural in baby foods using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2845-2849, 2006.

GÖKMEN, V. et al. Effects fo dough formula and baking conditions on acrylamide and hydroxymethylfurfural formation in cookies. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1136-1142, 2007.

GÖKMEN ., V. et al. Effects on leavening agents and sugars on the formation of hydroxymethylfurfural in cookies during baking. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1031-1037, 2008.

GOLOB, T. et al. Determination of trace and minor elements in Slovenian honey by total reflection X-ray fluorescence spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 91, p. 593-600, 2005.

GOMES, S. et al. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 544-548, 2010.

GONZÁLEZ-MIRET, M. L. et al. Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2574-2580, 2005.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in aging and disease: fact or fantasy. In: **Antioxidants in**

nutrition, health, and disease. Oxford, UK: Oxford University Press, 1994.

HAYES, M.A.; EWING, A.G. Electroosmotic flow control and monitoring with an applied radial voltage for Capillary Zone Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 512-516, 1992.

HERNÁNDEZ, O. M. et al. Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. **Food Chemistry**, v. 93, p. 449-458, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa da Pecuária Municipal 2009.** Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=5&z=t&o=24&u1=2&u2=1&u3=1&u4=1&u5=1&u6=1&u7=1>. Acesso em 01 de setembro de 2011.

IHC. International Honey Commission. **Harmonized methods of the international honey commission.** Liebefeld, Switzerland: Swiss Bee Research Centre, 2002.

ISLA, M. I. et al. Physico chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 1922-1930, 2011.

IURLINA, M. O. et al. Major flavonoids of Argentinean honeys. Optimisation of the extraction method and analysis of their content in relationship to the geographical source of honeys. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 1141-1149, 2009.

JAGER, A. V.; TAVARES, M. F. M. Determinação simultânea de cátions por eletroforese capilar: fundamentos e aplicações. **Química Nova**, v. 24, p. 363-373, 2001.

JIMIDAR, M. Electromigration methods: origins, principles and applications. In: AHUJA, S.; JESPERSEN, N. (ed.). **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 47, p. 572-623, 2006.

JOHNS, C.; MACKA, M.; HADDAD, P. R. Highly sensitive indirect photometric detection of cations by capillary electrophoresis with the

cationic dye chrysoidine. **Journal of Chromatography A**, v. 997, p. 87-94, 2003.

KAHRAMAN, T. et al. Physico-chemical properties in honey from different regions of Turkey. **Food Chemistry**, v. 123, n. 1, p. 41-44, 2010.

KAŠKONIENĖ, V.; VENSKUTONIS, P. R.; ČEKSTERYTĖ, V. Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n. 5, p. 801-807, 2010.

KHALIL, M. I. et al. Phenolic acid composition and antioxidant properties of Malaysian honeys. **Journal of Food Science**, v. 76, p. C921-C928, 2011.

KHALIL, M. I.; SULAIMAN, S. A.; GAN, S. H. High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2388-2392, 2010.

KROH, L. W. Caramelisation in food and beverages. **Food Chemistry**, v. 51, p. 373-379, 1994.

KROPF, U. et al. Determination of the geographical origin of Slovenian black locust, lime and chestnut honey. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 839-846, 2010.

KÜÇÜK, M. et al. Biological activities and chemical composition of three honeys of different typed from Anatolia. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 526-534, 2007.

LACHMAN, J. et al. Evaluation of antioxidant activity and total phenolic of selected Czech honeys. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 52-58, 2010.

LEE, H. S.; NAGY, S. Relative reactivities of sugars in the formation of 5-hydroxymethylfurfural in sugar-catalyst model systems. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 14, p. 171-178, 1990.

LÉON-RUIZ, V. et al. Vitamin C and sugar levels as simples markers for discriminating Spanish honey sources. **Journal of Food Science**, v. 76, p. C356-C361, 2011. 3

LEWIS, S. W.; ANASTOS, N.; BARNETT, N. W. Capillary Electrophoresis for forensic drug analysis: a review. **Talanta**, v. 67, p. 269-279, 2005.

LOMILLO, M. A. A.; CAMPO, F. J.; PASCUAL, F. J. M. Preliminary contribution to the quantification of HMF in honey by electrochemical biosensor chips. **Electroanalysis**, v. 18, p. 2435-2440, 2006.

MANZANARES, A. B. et al. Differentiation of blossom and honeydew honey using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition. **Food Chemistry**, v. 126, p. 664-672, 2011.

MARTINS, I. Validação analítica. In: MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

MCKIBBEN, J.; ENGESETH, N. J. Honey as a protective agent against lipid oxidation in ground turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 592-595, 2002.

MICHAIL, K. et al. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of hydroxymethylfurfural and alpha-ketoglutaric acid in human plasma. **Analytica Chimica Acta**, v. 581, p. 287-297, 2007.

MOISE, A. et al. Physico-chemical properties and radical scavenging activity of Arabian honey. In: **Proceedings of the International Conference “Agricultural and Food Science, Process and Technologies”**, v. 3, p. 231-236, 2007.

MORALES, F. J.; JIMÉNEZ-PÉREZ, S. Hydroxymethylfurfural determination in infant Milk-based formulas by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Food Chemistry**, v. 72, p. 525-531, 2001.

MURKOVIC, M.; PICHLER, N. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in coffee, dried fruits and urine. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, p. 842-846, 2006.

NAGAI, T. et al. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. **Food Chemistry**, v. 97, n. 2, p. 256-262, 2006.

NEČEMER, M. et al. Application of total reflection X-ray spectrometry in combination with chemometric methods for determination of the botanical origin of Slovenian Honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4409-4414, 2009.

NOZAL, M. J., et al. The use of carbohydrate profiles and chemometrics in the characterization of natural honeys of identical geographical origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3095-3100, 2005.

OUCHEMOUKH, S. et al. HPLC sugar profiles of Algerian honeys. **Food Chemistry**, v. 121, p. 561-568, 2010.

OUCHEMOUKH, S.; LOUAILECHE, H.; SCHWEITZER, P. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. **Food Control**, v. 18, n. 1, p. 52-58, 2007.

PADARAUSKAS, A. Derivatization of inorganic ions in capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2054-2063, 2003.

PEREIRA, A. et al. Evolution of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural (F) in fortified wines submitted to overheating conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 71-76, 2011.

PIOVEZAN, M. **Desenvolvimento de metodologias por eletroforese capilar para avaliação de parâmetros químicos da qualidade de biodiesel**. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

PISANI, A.; PROTANO, G.; RICCOBONO, F. Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). **Food Chemistry**, v. 107, p. 1553-1560, 2008.

POHL, P. Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, p. 117-128, 2009.

PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 7, p. 893-902, 2009.

REIS, V. D. A.; FILHO, J. A. C. Importância da Apicultura no Pantanal Sul-Mato-Grossense. **Embrapa**, 2003.

ROSA, L. A. et al. Mechanism for the inhibition of Apple juice enzymatic browning by Palo Fierro (desert ironweed) honey extract and other natural compounds. **LWT – Food Science and Technology**, v. 44, p. 269-276, 2011.

ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. Capillary Electrophoresis and electrochromatography. **Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques**, p. 147, 2007.

ROVIO, S.; SIRÉN, K.; SIRÉN, H. Application of capillary electrophoresis to determine metal cations, anions, organic acids, and carbohydrates in some Pinot Noir red wines. **Food Chemistry**, v. 24, p. 1194-1200, 2011.

SANZ, M. L. et al. Carbohydrate composition and physic chemical properties of artisanal honeys from Madrid (Spain): occurrence of *Echium* sp honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1577-1584, 2004.

SANZ, M. L.; SANZ, J.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. Gas chromatographic-mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey. **Journal of Chromatography A**, v. 1059, p. 143-148, 2004.

SAXENA, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 391-397, 2010.

SCHWER, C.; KENNDLER, E. Electrophoresis in fused-silica capillaries: the influence of organic solvents on the electroosmotic velocity and the potential zeta. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 1801-1807, 1991.

SILICI, S.; SAGDIC, O.; EKICI, L. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 238-243, 2010.

SILVA, J. A. F. et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, p. 740-744, 2007.

SILVA, S, J. N. et al. Determinação de 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrocínética capilar micelar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 46-50, 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Detection of inverted beet sugar adulteration of honey by FTIR spectroscopy. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 683-690, 2001.

SKOOG, D. A. **Fundamentos de Química Analítica**. São Paulo: Pioneira, 2006.

SOGA, T.; SERWE, M. Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. **Food Chemistry**, v. 69, p. 339-344, 2000.

SPANO, N. et al. A direct RP-HPLC method for the determination of furanic aldehydes and acids in honey. **Talanta**, v. 78, p. 310-314, 2009.

ŠTĚDRÝ, M.; JAROŠ, M.; GAŠ, B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: I. System eigenpeaks and resonance in systems with strong electrolytes. **Journal of Chromatography A**, v. 960, p. 187-198, 2002.

ŠTĚDRÝ, M. et al. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: II. Eingepeaks in univalent weak electrolytes. **Electrophoresis**, v. 24, p. 536-547, 2003.

STEPHENS, J. M. et al. Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 78-86, 2010.

SUÁREZ-LUQUE, S. et al. Capillary zone electrophoresis method for the simultaneous determination of cations in honey. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, p. 193-198, 2005.

SUÁREZ-LUQUE, S. et al. Rapid capillary zone electrophoresis method for the determination of metal cations in beverages. **Talanta**, v. 68, p. 1143-1147, 2006.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 09, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, p. 493-511, 1997.

TAVARES, M. F. M.; COLOMBARA, R.; MASSARO, S. Modified electroosmotic flow by cationic surfactant additives in capillary electrophoresis: Evaluation of electrolyte systems for anion analysis. **Journal of Chromatography. A**, v. 772, p. 171-178, 1997.

TEIXIDÓ, E. et al. 5-Hydroxymethylfurfural content in foodstuffs determined by micellar electrokinetic chromatography. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1902-1908, 2011.

TEIXIDÓ, E. et al. Analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1135, p. 85-90, 2006

TEIXIDÓ, E. et al. Liquid chromatography multi-stage mass spectrometry for the analysis of 5-hydroxymethylfurfural in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, p. 102-108, 2008

TERRAB, A. et al. Characterization of Spanish thyme honey by their physicochemical characteristics and mineral contents. **Food Chemistry**, v. 88, n. 4, p. 537-542, 2004.

TERRAB, A. et al. Contribution to the study of avocado honeys by their mineral contents using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Food Chemistry**, v. 92, p. 305-309, 2005.

TERRAB, A. et al. Mineral content and electrical conductivity of the honeys produced in Northwest Morocco and their contribution on the characterization of unifloral honeys. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 637-643, 2003.

TOSI, E. et al. Honey diastase activity modified by heating. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 883-887, 2008.

TURHAN, I. et al. Quality of honeys influenced by thermal treatment. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, n. 8, p. 1396-1399, 2008.

TURKMEN, N. et al. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. **Food Chemistry**, v. 95, p. 653-657, 2005.

VALESE, A. C. **Desenvolvimento de método para determinação de cloreto e sulfato em álcool etílico combustível utilizando eletroforese capilar**. 2010. 43 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

VANHANEN, L. P.; EMMERTZ, A.; SAVAGE, G. P. Mineral analysis of mono-floral New Zealand honey. **Food Chemistry**, v. 128, p. 236-240, 2011.

VIEIRA, L. M. Mel. **Síntese anual da Agricultura de Santa Catarina 2009 – 2010**, parte I, p. 225 – 235, 2011. Disponível em: http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/Sintese_2010/sintese%202010_inteira.pdf. Acesso em 01 de setembro de 2011.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Aroma profile and physico-chemical properties of artisanal honey from Tabasco, Mexico. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 1111-1118, 2010.

WANG, J. et al. Rapid analysis of glucose, fructose, sucrose and maltose in honeys from different geographic regions using Fourier

transformed infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Journal of Food Science**, v. 75, p. C208-C214, 2010.

WHITE, J. W. Composition of honey. In: CRANE, E. **Honey: a comprehensive survey**. London: Heinemann, p. 157-158, 1979a.

WHITE, J.W. Spectrophotometric method for hydroxymethyl furfural in honey. **Journal. of the Association of Official. Analytical Chemists**, v. 62, p. 509-514, 1979b

XU, H.; TEMPENTON, A. C.; REED, R. A. Quantification of 5-HMF and dextrose in commercial aqueous dextrose solutions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 451-459, 2003.

ZAPPALÁ, M. et al. Methods for the determination of HMF in honey: a comparison. **Food Control**, v. 16, p. 273-277, 2005.