

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

TAINARA VANESSA DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS EM AMOSTRAS DE MÉIS UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA IÔNICA PARA INVESTIGAR POSSÍVEIS ADULTERAÇÕES**

Porto Alegre
2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA**

TAINARA VANESSA DOS SANTOS

**IDENTIFICAÇÃO DE CARBOIDRATOS EM AMOSTRAS DE MÉIS UTILIZANDO
CROMATOGRAFIA IÔNICA PARA INVESTIGAR POSSÍVEIS ADULTERAÇÕES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do curso de Química Industrial, como requisito parcial para obtenção do grau de Química Industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato

Porto Alegre

2022

CIP - Catalogação na Publicação

Santos, Tainara Vanessa dos
Identificação de carboidratos em amostras de méis
utilizando cromatografia iônica para investigar
possíveis adulterações / Tainara Vanessa dos Santos.
-- 2022.
53 f.
Orientadora: Tânia Mara Pizzolato.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Química, Curso de Química Industrial, Porto Alegre,
BR-RS, 2022.

1. Cromatografia iônica. I. Pizzolato, Tânia Mara,
orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço as pessoas que foram fundamentais desde o início da minha trajetória acadêmica e que foram essenciais durante esses anos de muito aprendizado, que foram a graduação.

Aos meus pais, Maria e Darli, sou profundamente grata pelo amor incondicional e por terem me mostrado o caminho do aprendizado desde muito cedo. Obrigada por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões, sempre lembrarei com muito carinho o quão difícil foi chegar até aqui e o quanto o apoio de vocês foi essencial para eu obter êxito na minha trajetória acadêmica e profissional. Ao meu irmão mais novo, Rodrigo, obrigada por entender minhas ausências e compreender que muitas vezes não pude estar presente em momentos importantes da tua vida.

Ao meu eterno trio, Jaldrezito e Ayla, muito obrigada pela ajuda de sempre, muito obrigada pelo apoio e pela troca de conhecimento. Vocês me deram todo suporte necessário para eu continuar em frente na graduação. Tenho certeza que sem vocês meu caminho seria mais árduo e menos alegre. Tenham certeza que nossa amizade será levada para a vida.

À minha best, Pâmela, muito obrigada por me apresentar novos lugares e estar sempre disponível para quando eu precisava desopilar e desabafar. Sei que muitas vezes não me fiz presente, mas obrigada por sempre compreender e me apoiar.

Aos meus amigos, Rôzinho e Lucas, muito obrigada pelas conversas e conselhos, por sempre me ouvirem e estarem presentes quando eu mais precisei. Vocês foram essenciais para a conclusão desse trabalho e para a conclusão do curso. Sempre vou lembrar com muito carinho de nossas conversas.

Ao meu amigo Romulinho, que considero o irmão mais velho que nunca tive, muito obrigada por todos os conselhos, por sempre me ouvir e por ser meu coach profissional. Nunca esquecerei de tudo o que fez por mim.

Agradeço a professora Tânia, que aceitou ser minha orientadora e me deu todo o suporte necessário para a realização desse trabalho.

Agradeço aos meus amigos e colegas do LFDA, por toda a paciência, apoio e amizade não só durante a realização desse trabalho de conclusão de curso como também na nossa rotina.

Aos professores do instituto de química, tenho muito a agradecer por todos os conhecimentos transmitidos durante esses anos de graduação, me levando a me

tornar uma boa profissional. Agradeço a UFRGS por me proporcionar um ensino de qualidade, pelos desafios desde o início até o fim do curso.

Por fim, agradeço a mim mesma, por ter persistido em momentos de dúvidas e incertezas, por sempre buscar a minha melhor versão e por não ter desistido de correr atrás dos meus sonhos.

RESUMO

O mel é um alimento de origem animal muito utilizado em todo o mundo. Por ter um alto valor agregado, ele está sujeito a diversas adulterações por parte de produtores e distribuidores. Para coibir essas ações, esse alimento passa por controle de qualidade a fim de evitar fraudes que venham a trazer prejuízos para o consumidor final. Alguns parâmetros são estabelecidos para atestar a qualidade do mel, entre eles açúcares redutores e índice de sacarose aparente. A Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), regulamenta o teor mínimo de açúcares redutores (frutose e glicose) e o teor máximo de sacarose aparente presentes no mel comercial, e cabe ao LFDA (Laboratório Federal de Defesa Agropecuária) realizar as análises e suporte laboratorial para as ações de fiscalização. Atualmente, o método de referência utiliza a técnica de cromatografia a Líquido de alta eficiência (CLAE), com detector de RID (Refractive Index Detector) para quantificar os açúcares redutores e o teor de sacarose aparente. No entanto, este método possui como desvantagens um alto custo do equipamento e de manutenção, além de maior volume de resíduos gerados. Nesse trabalho, está sendo proposto um protocolo para a quantificação de carboidratos no mel utilizando a técnica de cromatografia iônica com detecção amperométrica em complemento à determinação da razão isotópica do carbono. Quarenta e cinco amostras, pertencentes aos programas de fiscalização oficiais do MAPA (PACPOA), e amostras suspeitas provenientes de uma ação conjunta entre o MAPA e a Polícia Federal foram analisadas, utilizando a proposta metodológica. Os resultados obtidos mostraram que das quarenta e cinco amostras de mel analisadas, somente duas atendem aos parâmetros estabelecidos pela IN nº 11 para o teor de açúcares redutores e índice de sacarose aparente, trinta e três amostras possuem um teor de sacarose além do estabelecido e trinta e duas amostras não possuem o teor mínimo de açúcares redutores, indicando a possibilidade de utilizá-lo para quantificar os carboidratos presentes em amostras de mel.

Palavras-chave: mel, cromatografia iônica, açúcares redutores, sacarose

ABSTRACT

Honey is a food of animal origin that is widely used around the world. Due to its high added value, it is subject to several adulterations by producers and distributors. To curb these actions, this food undergoes quality control in order to avoid fraud that may harm the final consumer. Some parameters are established to attest the quality of the honey, including reducing sugars and apparent sucrose index. Normative Instruction nº 11, of October 20, 2000, of MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), regulates the minimum content of reducing sugars (fructose and glucose) and the maximum content of apparent sucrose present in commercial honey, and it is up to the LFDA (Laboratório Federal de Defesa Agropecuária) to carry out the analyzes and laboratory support for inspection actions. Currently, the reference method uses the technique of high-performance liquid chromatography (HPLC), with a RID detector (Refractive Index Detector) to quantify reducing sugars and apparent sucrose content. However, this method has disadvantages of a high cost of equipment and maintenance, as well as a larger volume of waste generated. In this work, a protocol for the quantification of carbohydrates in honey is being proposed using the technique of ion chromatography with amperometric detection complementary to the determination of the isotopic ratio of carbon. Forty-five samples from MAPA's official inspection programs (PACPOA) and suspected samples from a joint action between MAPA and the Federal Police were analyzed using the methodology proposal. Results obtained showed that of the forty-five samples of honey analyzed, only two met the criteria established by IN nº 11 for the content of reducing sugars and apparent sucrose index, thirty-three samples have a sucrose content beyond the established and thirty-two samples do not have the minimum content of reducing sugars, indicating the possibility of using it to quantify the carbohydrates present in honey samples.

Keywords: honey, ion chromatography, reducing sugars, sucrose

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros estabelecidos na IN n° 11 para Identidade e Qualidade do mel	19
Tabela 2 - Condições cromatográficas para análise de mel por cromatografia iônica	29
Tabela 3 - Resultados obtidos nas análises do mel por cromatografia iônica e por razão isotópica de carbono	32
Tabela 4 - Cálculo dos custos envolvidos para a realização da análise do mel por Cromatografia Iônica.....	34
Tabela 5 – Cálculo dos custos envolvidos para a realização da análise do mel por Cromatografia a Líquida de Alta Eficiência.....	34
Tabela 6 - Avaliação do percentual de recuperação e coeficiente de variação de sacarose em amostras de leite cru, leite UHT e leite condensado.....	45
Tabela 7 - Avaliação da metodologia de cromatografia iônica em matrizes lácteas...	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos açúcares presentes no mel.....	18
Figura 2 - Reação de hidrólise da sacarose.....	20
Figura 3 - Esquema do detector amperométrico utilizado em cromatografia iônica...	25
Figura 4 - Curva de calibração para a sacarose.....	30
Figura 5 - Curva de calibração para a frutose.....	30
Figura 6 - Curva de calibração para a glicose.....	30
Figura 7 - Cromatograma dos padrões da curva de calibração.....	31
Figura 8 - Concentração do padrão de verificação.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

AOAC - Associação dos químicos analíticos oficiais, *Association of Official Analytical Chemists*

CI - Cromatógrafo iônico

CI-AM - Cromatografia iônica com detector amperométrico

CLAE - Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

CLAE-IR - Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência com detector de índice de refração

FID - Detector por Ionização em Chama, *Flame Ionization Detector*

HMF - Hidrometilfurfural

IN - Instrução normativa

IQA - Identidade e Qualidade de Alimentos

LFDA - Laboratório Federal de Defesa Agropecuária

MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento

PACPOA - Programa de Avaliação de Conformidade de Parâmetros Físico-Químicos e Microbiológicos de Produtos de Origem Animal comestíveis

PAD - Detector Amperométrico Pulsado, *Pulsed Amperometric Detector*

RID - Detector de Índice de Refração, *Refractive Index Detector*

RTIQ - Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade

VPDB - Escala internacional de expressão de razão isotópica de carbono, *Vienna Pee Dee Belemnite*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 PROPOSTA TECNOLÓGICA.....	16
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
4.1 COMPOSIÇÃO E IMPORTÂNCIA DO MEL.....	17
4.2 MÉTODOS PARA IDENTIFICAR FRAUDE EM MEL.....	20
4.2.1 RAZÃO ISOTÓPICA DO CARBONO.....	21
4.2.2 CROMATOGRAFIA IÔNICA.....	24
5 METODOLOGIA.....	27
5.1 MATERIAIS.....	27
5.2 REAGENTES.....	27
5.3 EQUIPAMENTOS.....	27
5.4 CURVA ANALÍTICA E PADRÃO DE VERIFICAÇÃO.....	28
5.5 PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS.....	28
5.6 PREPARO DAS AMOSTRAS.....	28
5.7 ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL.....	28
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
6.1 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA IÔNICA.....	29
6.2 CURVA ANALÍTICA E PADRÃO DE VERIFICAÇÃO.....	29
6.3 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES EM MEL.....	32
6.4 AÇUCAR INVERTIDO.....	33
7 AVALIAÇÃO DE CUSTOS.....	34
8 CONCLUSÕES.....	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXO A – DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ DO MEL.....	40
ANEXO B – RESULTADOS DE $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ NO MEL (EM SOLUÇÃO A 5%), PROTEÍNA EXTRAÍDA E SUA DIFERENÇA.....	41

ANEXO C - VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE SACAROSE E LACTOSE POR CROMATOGRAFIA IÔNICA.....	43
APÊNDICE A – CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS.....	47
APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

A Rede LFDA (Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária) atua, nas ações de monitoramento, controle e fiscalização de alimentos, bebidas e insumos agropecuários produzidos e comercializados no Brasil e no exterior [1]. A Rede LFDA engloba diversos laboratórios, entre eles o IQA – Laboratório de Identidade e Qualidade de Alimentos, onde é realizado o controle de qualidade de alimentos de origem animal, entre eles derivados lácteos, mel e ovos.

Entre estes alimentos, tem o mel que é um alimento muito utilizado pela sociedade desde a antiguidade, por seus inúmeros benefícios para a saúde humana e por suas propriedades medicinais. Devido a seu alto valor agregado, o mel pode ser alvo de adulterações, por adição de açúcares como a glicose comercial, solução ou xarope de sacarose, melado e solução de sacarose invertida (por sacarose invertida, entende-se açúcar invertido).

Com o avanço de novas adulterações em mel comercial, tornou-se necessário novas abordagens analíticas, além daquelas que já são realizadas na rotina. Entre os métodos utilizados para detectar fraudes, a análise isotópica de carbono foi pioneira em identificar adulterações por açúcar comercial ou xarope de milho. Porém, essa técnica não obtém êxito em quantificar açúcares (também denominados genericamente de carboidratos) presentes nas amostras de mel, sendo necessário uma técnica complementar para isso.

A fim de realizar a quantificação dos açúcares (glicose, frutose e sacarose), a cromatografia iônica tem se apresentado como alternativa viável.

O mel apresenta na sua composição, principalmente glicose e frutose e uma pequena quantidade de sacarose proveniente de sua composição natural. Em amostras fraudadas, a quantidade de sacarose presente é muito superior, aos níveis da composição natural. Em termos de legislação, segundo a Instrução Normativa (IN) nº 11 [2], o limite é de 6g a cada 100 gramas de amostra.

A cromatografia iônica geralmente é a mais adequada quando se trata de análise de íons ou moléculas, onde uma mistura de íons ou moléculas é separada por troca iônica e detectada conforme o tipo de detector, no caso dos carboidratos, por amperometria. Para os carboidratos, quanto maior o número de hidroxilas, carbonilas ou heteroátomos presentes em suas cadeias, maior será a interação com a fase estacionária, aumentando assim o tempo de retenção na coluna e possibilitando a separação dos sacarídeos. Entre os carboidratos presentes no mel, o que possui o

maior tempo de retenção é a sacarose, por ser um dissacarídeo e por esse motivo ficar mais tempo interagindo com a fase estacionária.

O método de cromatografia iônica é validado para os carboidratos sacarose e lactose para utilização em produtos lácteos no IQA, porém é necessário avaliar a metodologia para a matriz de mel, em que se faz necessário quantificar além da sacarose, a frutose e a glicose.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer protocolo para identificar adulteração em mel comercial pela adição de açúcares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar a quantificação de açúcares em mel pela técnica de cromatografia iônica com detecção PAD (*Pulsed Amperometric Detector*);
- Quantificar a sacarose, glicose e frutose em amostras de mel comercial para avaliar adulterações;
- Avaliar o potencial da metodologia por cromatografia iônica para a matriz de mel, como técnica complementar a análise de razão isotópica do carbono.

3 PROPOSTA TECNOLÓGICA

A proposta tecnológica é a avaliação do potencial da técnica de cromatografia iônica com detecção amperométrica para a identificação de fraude por adição de açúcares em mel comercial, como técnica complementar à razão isotópica, para a rotina do IQA – LFDA/RS.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 COMPOSIÇÃO E IMPORTÂNCIA DO MEL

O mel é um produto de origem animal, proveniente das abelhas, muito apreciado em todo o mundo. Possui inúmeros benefícios para a saúde humana, além de propriedades medicinais [3]. Por ser produzido a partir do néctar das plantas, o mel possui diferentes características físico-químicas, sendo necessário para sua produção abundância e qualidade de flores no raio de ação das abelhas. Vários fatores interferem na sua qualidade, como condições climáticas, espécies de abelhas, espécie vegetal que originou a matéria prima e processamento/armazenamento do mel [4].

O mel, além de possuir propriedades sensoriais agradáveis, atrai muitos consumidores pela sua qualidade nutricional, possuindo em sua composição vitaminas, minerais e além de ser um produto de alto valor energético. Fora sua qualidade nutricional, também possui propriedades medicinais reconhecidas, como ação antioxidante e antisséptica, relacionada a seus compostos fenólicos [5].

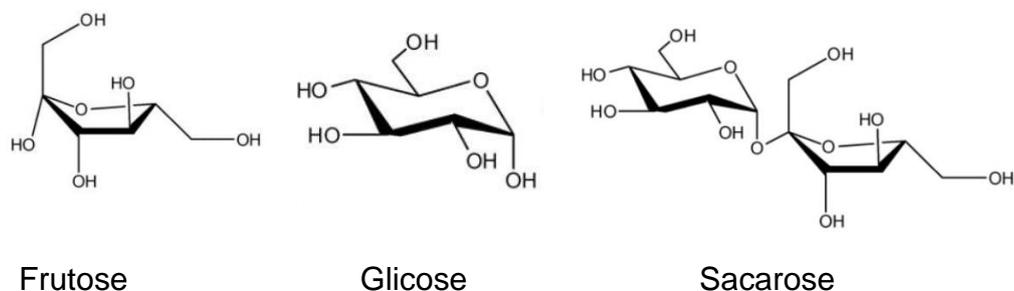
Dimensionar o volume de mel produzido e comercializado é uma tarefa difícil, pois muitos apicultores possuem produções independentes e não são incluídos nos números oficiais. Mas estima-se que a produção mundial de mel durante é de aproximadamente 1.263 mil toneladas, sendo a China o maior produtor (256 mil toneladas). Segundo dados do IBGE, a produção de mel no Brasil fica em torno 21.865.144 kg, gerando um faturamento de R\$ 84.640.339,00. Os maiores exportadores mundiais são: China, Argentina, México, Estados Unidos e Canadá [5].

O Brasil tem um alto potencial para melhorar a comercialização e revitalizar o mercado de mel, mas para isso são necessárias melhorias, entre elas envolvendo o desenvolvimento da tecnologia do setor, nível de formalização, maior organização e cadeias locais competitivas, desenvolvimento das redes de comercialização e de assistência técnica, definição dos padrões de qualidade, controles sanitários e marcas próprias que agreguem valor ao produto, aumentando assim, o consumo interno e a ampliação do mercado externo [6].

Sua composição depende das fontes vegetais às quais as abelhas tiveram acesso. O mel é, basicamente, uma solução concentrada de açúcares com predominância de glicose e frutose. Contém, ainda, uma mistura complexa de outros hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias

aromáticas, pigmentos e grãos de pólen, podendo conter cera de abelhas procedente do processo de extração [7].

Figura 1 - Estrutura química dos açúcares presentes no mel



Fonte: adaptado pela autora

A Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) regulamenta os parâmetros de qualidade do mel no Brasil, obrigatórias para a determinação da qualidade do mel. Segundo a IN nº 11,

“Entende-se por mel o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia” [2]

Para padronizar o processamento e comercialização do mel e preservar suas características físico-químicas, diversos parâmetros foram estabelecidos, sendo eles encontrados no RTIQ (Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade) do mel. Na tabela 1, estão apresentados os parâmetros físico-químicos estabelecidos na IN nº 11 para a garantia da qualidade do mel, com os respectivos métodos de referência utilizados.

Tabela 1 - Parâmetros estabelecidos na IN nº 11 para Identidade e Qualidade do mel

Parâmetros	Valores estabelecidos	Métodos de referência
Acidez	Máximo de 50 meq kg ⁻¹ *	A.O.A.C. 16th Edition, Rev. 4th , 1998 962.19 [8]
Açúcares redutores	Mel floral: mínimo 65% Mel de melato: mínimo 60%	CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.1 [9]
Atividade diastásica	Mínimo 8 na escala de Gothe**	CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.7 [9]
Hidroximetilfurfural (HMF)	Máximo 60 mg kg ⁻¹	A.O.A.C. 16th Edition, Rev. 4th, 1998 980.23 [8]
Minerais (cinzas)	Mel floral: máximo 0,6% Mel de melato: máximo 1,2%	CAC/Vol. III Supl. 2, 1990, 7.5 [9]
Sacarose aparente	Mel floral: máximo 6% Mel de melato: máximo 15%	CAC/Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.2 [9]
Sólidos insolúveis em água	Máximo 0,1 % Para mel prensado, máximo 0,5%	CAC/Vol. III, Supl.2, 1990, 7.4 [9]
Umidade (Método refratométrico)	Máximo 20%	A.O.A.C. 16th Edition, Rev. 4th , 1998 - 969.38B [8]

Fonte: a autora

* Anexo A

** A diastase (a-amilase) é uma das enzimas presentes no mel, formada principalmente pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas, sendo encontrada também, em baixa proporção, nos grãos de pólen. Sua função é digerir a molécula de amido, estando, possivelmente, envolvida na digestão do pólen. O índice de diastase é expresso na escala de Gothe, ou seja, o volume (mL) de solução de amido a 1% hidrolisada pela enzima presente em 1g de mel por 1 hora a 40°C

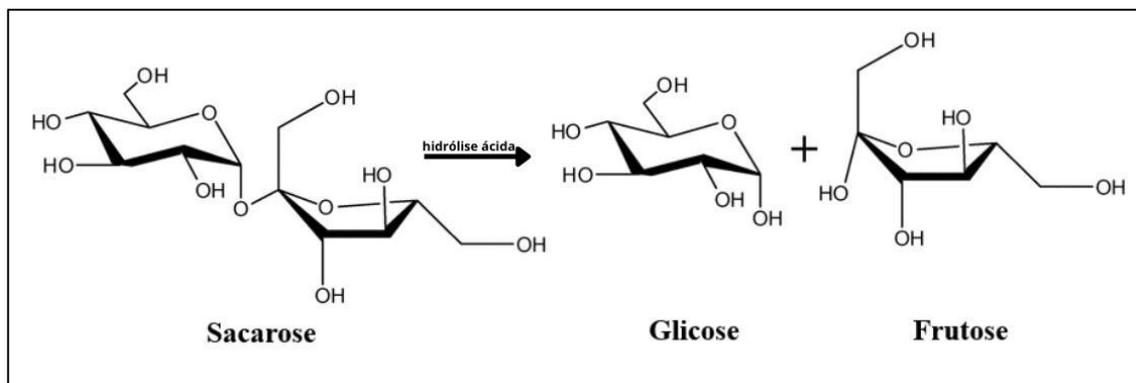
Segundo a IN nº 11, mel de melato é o mel obtido principalmente a partir de secreções das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas.

O mel é um produto de alto valor agregado e, por esse motivo, é passível de ações fraudulentas. Geralmente, a adulteração acontece através da adição de açúcares comerciais, como glicose comercial, solução ou xarope de sacarose, melado e solução de açúcar invertido.

O açúcar invertido consiste na hidrólise das moléculas de sacarose, que separa a sacarose em frutose e glicose, como pode ser visualizado na figura 2. Ele leva esse

nome pois a reação da hidrólise ácida da sacarose inverte o plano de luz polarizada na direção oposta a sacarose, enquanto a sacarose desvia o plano de luz polarizada para a direita, o açúcar invertido desvia o plano de luz polarizada a esquerda [10].

Figura 2 - Reação de hidrólise da sacarose



Fonte: adaptado pela autora

Segundo a legislação, o mel não pode ser adicionado de açúcares ou outras substâncias que alterem a sua composição original.

4.2 MÉTODOS PARA IDENTIFICAR FRAUDE EM MEL

A identificação de fraude no mel, tem por objetivo verificar a adição de sacarose de fonte externa. A sacarose é um tipo de glicídio formado por uma molécula de glicose ($C_6H_{12}O_6$), produzida pela planta ao realizar o processo de fotossíntese, e uma de frutose. A sacarose, conhecida comumente como açúcar, é um sólido cristalino à temperatura ambiente, que se dissolve em água e possui sabor doce. A sacarose é encontrada em diversas plantas, principalmente na beterraba e na cana-de-açúcar.

É hidrolisada com grande facilidade por ácidos diluídos, resultando da reação o “açúcar invertido”, isto é, a mistura equimolar de D-glicose e D-frutose, que é levogira, porque a frutose possui rotação específica negativa ($-92,4^\circ$) mais alta do que a rotação específica positiva da glicose ($+52,7^\circ$). A reação é chamada de inversão e é estritamente monomolecular, isto é, a fração da sacarose presente, cindida por unidade de tempo, é constante. Assim, a velocidade da reação depende exclusivamente da concentração de sacarose. A inversão da sacarose pode ser efetuada também enzimaticamente. A invertase, que cinde os b-frutosídeos, e as α -glicosidases são as enzimas que catalisam a sua hidrólise.

À base disso, a sacarose é considerada um α -glicosídeo e um β -frutosídeo. A sacarose não é um açúcar redutor. Isso significa que os dois grupos redutores dos monossacarídeos que a formam estão envolvidos na ligação glicosídica, ou seja, o átomo de carbono C1 da glicose e C2 da frutose devem participar da ligação. A hidrólise ácida da sacarose octometilada fornece 2,3,4,6-tetra-O-metil-D-glicose e 1,3,4,6-tetra-O-metil-D-frutose.

Para determinar a adição de sacarose é necessário quantificar esse açúcar em cada amostra. Segundo a IN nº 11, o limite legal de sacarose para um mel autêntico é de 6 gramas a cada 100 gramas de mel, enquanto para o mel de melato é de 15 gramas a cada 100 gramas de mel.

À medida que novos métodos de adulterações foram detectados nas amostras de mel, novas metodologias foram necessárias para provar a autenticidade e conformidade com a legislação.

4.2.1 RAZÃO ISOTÓPICA DO CARBONO

A razão isotópica de carbono tem grande destaque, pois essa análise é capaz de identificar se o mel foi adulterado com açúcar comercial ou xarope de milho, que estão associados ao metabolismo fotossintético C_4 .

A análise de razão isotópica do carbono distingue os diferentes ciclos de fotossíntese da planta da qual o mel foi produzido. O ciclo de Calvin (também chamado de ciclo C_3) contempla as plantas pertencentes ao grupo C_3 e o ciclo Hatch Slack (ou ciclo C_4) as plantas pertencentes ao grupo C_4 . As plantas C_4 são isotopicamente mais pesadas em ^{13}C e apresentam valores típicos de $\delta^{13}C$ entre -15 e -9 ‰, enquanto as plantas C_3 têm valores de $\delta^{13}C$ de -23 a -28 ‰.

A maioria das flores das quais as abelhas coletam o néctar possui metabolismo C_3 . Já as plantas de milho e cana-de-açúcar possuem metabolismo fotossintético C_4 . Esse método de análise baseia-se no fato de que a adição de xaropes de milho ou cana-de-açúcar ao mel puro pode mudar a composição da proporção de isótopos de ocorrência natural de carbono, mas não sua composição de proteína [11].

O método oficial para determinar a adição de açúcares é baseado na medida da diferença das razões de isótopos de carbono estáveis entre um mel e sua fração de proteína. Para o mel, cada amostra fornece seu próprio padrão interno, em um procedimento usando o valor da razão isotópica da fração de proteína de um mel como

o padrão interno, sua pureza é então julgada pela diferença entre esse valor e aquele do mel bruto. Os valores podem ser encontrados no anexo B.

As abelhas produzem todas as proteínas do mel por meio de reações entre enzimas e o néctar, então a razão isotópica do carbono do mel e sua proteína terão valores muito próximos quando o mel é puro. Portanto, a diferença entre a proporção de isótopos de carbono da proteína extraída e de mel fornecerão uma medida quantitativa de qualquer adulteração proveniente de plantas com metabolismo fotossintético C_4 [12]. Por exemplo, para um mel adulterado, em muitos casos, não há proteína extraída ou um valor de fonte C_4 é detectado. Já para um mel sem adulteração, espera-se que a diferença entre a proporção de isótopos de carbono da proteína extraída e da solução de mel seja zero.

Para a análise de razão isotópica do carbono nas amostras de mel na unidade do IQA, foi utilizado um Espectrômetro de massas de razão isotópica Thermo Fisher Delta V Advantage e seus periféricos: o analisador elementar Flash HT Plus, um cromatógrafo a gás Trace 1310 com amostrador automático TriPlus RSH e o sistema GasBench.

Essa técnica baseia-se na análise das massas do CO_2 gerado a partir da combustão do carbono integral da matriz ou fração extraída previamente, em forno de combustão. A análise consiste em submeter a amostra a um processo de decomposição térmica (combustão ou pirólise) para recombinar os elementos de interesse em seus gases básicos: CO_2 para análise de carbono, NO_x para análise de nitrogênio, SO_2 para análise de enxofre, CO para análise de oxigênio e H_2 para análise de hidrogênio. Os gases passam por uma coluna cromatográfica específica e são direcionados ao espectrômetro de massa, que determina a proporção entre isótopos estáveis de um determinado elemento e expressa-o de acordo com o valor convencional escolhido para o método [13].

A análise por cromatografia gasosa introduz a possibilidade de submeter a amostra a uma coluna de separação cromatográfica prévia à análise de razão isotópica. A amostra é injetada pelo sistema de cromatografia a gás, utilizando um amostrador automático, que passa pela coluna cromatográfica e divide-se no final: parte é levada ao detector por ionização em chama (FID) e parte é levada ao forno. No forno, a amostra passa por um processo de decomposição térmica (combustão ou

pirólise) e é conduzida ao espectrômetro de massas, permitindo obter os valores de razão isotópica de cada sinal analítico presente no cromatograma [13].

Para o mel, o resultado é expresso em termos de açúcares C₄ através da equação abaixo, tomando por base o padrão da sacarose de cana-de-açúcar:

$$\text{açúcares } C_4(\%) = \frac{\delta_p - \delta_H}{\delta_p - \delta_{C4}}$$

Onde temos que:

δ_p : *delta-C da proteína extraída da amostra de mel*

δ_H : *delta-C da amostra bruta de mel*

δ_{C4} : *delta-C da referência C4 (cana-de-açúcar)*

Ao mel é proibida qualquer adição de carbono de origem C₄, portanto esse método bastaria para uma análise qualitativa, indicando a presença de carbono de origem do metabolismo fotossintético C₄.

A análise isotópica do carbono fornece ótimos resultados qualitativos quanto a detecção de fraudes no mel, por ser uma técnica de triagem, mas não quantifica os açúcares presentes nas amostras. Por isso, faz-se necessária uma técnica complementar, quantitativa, para determinar os açúcares presentes e verificar sua conformidade com a legislação.

Estudos sugerem utilizar a cromatografia iônica acoplada à espectrometria de massas de razão isotópica através de uma interface líquida, para quantificar simultaneamente os valores de δ_{13C} de açúcares e ácidos orgânicos. A cromatografia iônica obteve bons resultados, devido as suas características, como sua eluição ser realizada com soluções básicas isentas de carbono. Outra característica importante para essa finalidade é o fato da facilidade da cromatografia iônica para evitar a presença de carbonato dissolvido no eluente, evitando assim uma interferência na análise de razão isotópica do carbono [14].

Todas as amostras analisadas no presente trabalho, indicaram fraude na análise de razão isotópica do carbono. Os resultados dessas análises podem ser observados na tabela 3.

4.2.2 CROMATOGRAFIA IÔNICA

A cromatografia é um método analítico muito utilizado em análises químicas por sua versatilidade. Consiste, basicamente, em separar os componentes de uma amostra, em função de suas diferentes interações com a fase estacionária e a fase móvel [15].

As técnicas cromatográficas baseiam-se no princípio de que os componentes que têm mais afinidade com a fase estacionária vão migrar mais lentamente, devido a retenção que eles terão na coluna. Os compostos que têm menos afinidade, não ficam tanto tempo retidos na coluna. Sendo assim, é possível separar os diferentes componentes de uma amostra, mesmo de uma mistura complexa.

Dentre as técnicas de cromatografia a líquido, a cromatografia iônica é específica para análise de moléculas e compostos com cargas (cátions e ânions). O sistema de cromatografia iônica encontra um amplo campo de aplicação, podendo ser utilizado para tanto para a determinação de cátions e ânions inorgânicos, como para metais de transição, ácidos carboxílicos, organo-fosforados, complexos metálicos, carboidratos, entre outros [16]. A utilização da cromatografia iônica para análise de açúcares em amostras de mel, é uma proposta relativamente nova, portanto, estudos mais específicos são necessários nesta área.

Um método de cromatografia iônica com detecção amperométrico foi desenvolvido para a determinação de açúcares em geléia real, permitindo a quantificação de dezenove açúcares com maior sensibilidade do que o método Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência. Comparando o método de cromatografia iônica com os métodos de CLAE e de Cromatografia Gasosa, o método de cromatografia iônica tem muitas vantagens distintas em sensibilidade, precisão, facilidade de operação e por não ser necessário utilizar nenhum solvente orgânico [17].

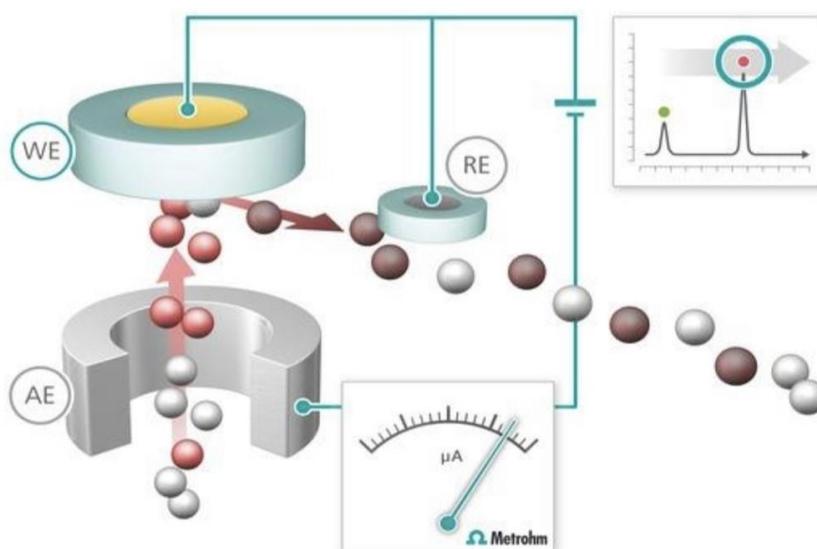
Vários são os métodos que podem ser utilizados na análise pela cromatografia iônica, dependendo do açúcar a ser estudado. Para isso, o método pode ser otimizado ajustando diversos fatores, como a temperatura da coluna, a dosagem de acetato de sódio utilizado como aditivo para o eluente e também um gradiente de concentrações decrescentes de acetato de sódio e hidróxido de sódio pode ser feito [18].

Na análise de açúcares (genericamente denominados carboidratos) por cromatografia iônica, em valores de pH maior que 12 utilizando como eluente o hidróxido de sódio (NaOH), os grupos hidroxilas dos açúcares são parcialmente

ionizados, produzindo então ânions ácidos fracos. Os ânions são separados na fase estacionária, por interação diferenciada com ela e são posteriormente identificados pelo detector. O acetato de sódio (NaOAc) é adicionado ao hidróxido de sódio para acelerar a eluição dos analitos, pois os carboidratos têm maior solubilidade em uma fase móvel composta por hidróxido de sódio e acetato de sódio, propiciando sua separação e detecção [19].

Vários são os detectores utilizados em cromatografia iônica. Dentre eles, os detectores eletroquímicos são os mais indicados para análise de carboidratos. Em relação aos detectores eletroquímicos, o amperométrico e o potenciométrico. Para análise de açúcares, o amperométrico é o indicado uma vez que a aplicação de um potencial é capaz de oxidar ou reduzir estes compostos [20]. O detector amperométrico consiste em um sistema com três eletrodos, sendo eles: eletrodo de trabalho, eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar. A reação de oxi-redução ocorre sob a superfície do eletrodo de trabalho, onde a transição de elétrons gera uma corrente que é então medida. A Figura 2 apresenta um esquema do funcionamento do detector amperométrico. AE é o representa o eletrodo auxiliar, WE é o eletrodo de trabalho e RE o eletrodo de referência.

Figura 3 - Esquema do detector amperométrico, utilizado em cromatografia iônica



Fonte: adaptado pela autora

Após os ânions dos carboidratos serem separados na coluna cromatográfica, e assim que eles chegam ao sistema, uma corrente elétrica é gerada por sua oxidação na superfície do eletrodo de trabalho por um tempo fixo, sendo detectada através da amperometria pulsada, onde um potencial de trabalho é aplicado por um curto período de tempo, na ordem de milissegundos. A cada amostra, os produtos da reação de oxidação são limpos entre as medições utilizando potenciais entre os valores de -1,25 volts e +0,75 volts para o eletrodo de trabalho de ouro, que é o indicado para o uso em carboidratos.

5 METODOLOGIA

5.1 MATERIAIS

Os materiais utilizados para esse estudo foram:

- Balões volumétricos de 100 mL e 25 mL;
- Espátulas;
- Bastões de vidro;
- Tubos para cromatografia iônica;
- Micropipeta volumétrica.

5.2 REAGENTES

A fase móvel utilizada foi uma solução contendo hidróxido de sódio (NaOH) na concentração de 300 mmol L⁻¹ e acetato de sódio na concentração de 1 mmol L⁻¹.

A solução estoque, contendo todos os analitos, foi preparada pela dissolução de 0,0501 g de sacarose; 0,0503 g de frutose e 0,0501 g de glicose em balão de 25 mL e completado com de água ultrapura, resultando em uma solução de concentração aproximada de 2 g L⁻¹ de cada analito. Os padrões de sacarose (100,00%) e frutose (99,90%) foram adquiridos do fabricante Sigma-Aldrich, a glicose (99,70%) foi adquirida do fabricante National Institute of Standards e Technology.

5.3 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados para o desenvolvimento da metodologia foram:

- Balança analítica com resolução mínima de 0,01g - Marca Marte, modelo AY220;
- Cromatógrafo iônico – Marca METROHM, modelo 881 BASIC IC plus, Suíça. O equipamento utiliza duas colunas cromatográficas para carboidratos de estireno/divinilbenzeno (Carb2).

Detector: eletrodo de trabalho de ouro (3 mm), um eletrodo de referência de paládio, espaçador em 50 µm, potencial de medida em 50 mV, faixa de medida de 200 µA, duração da medida em 100 ms, duração do ciclo em 550 ms, temperatura da célula de medida em 35 °C no modo PAD (*Pulsed Amperometric Detector*).

Os equipamentos encontram-se na unidade IQA (Identidade e Qualidade de Alimentos) do LFDA-RS (Laboratório Federal de Defesa Agropecuária no Rio Grande do Sul)

5.4 CURVA ANALÍTICA E PADRÃO DE VERIFICAÇÃO

A curva analítica e o padrão de verificação foram preparados a partir da diluição da solução padrão estoque mista, de modo que os pontos da curva ficassem com as seguintes concentrações: 5 mg L⁻¹; 10 mg L⁻¹; 30 mg L⁻¹; 50 mg L⁻¹; 70 mg L⁻¹ e 90 mg L⁻¹. O padrão de verificação, conforme estipulado arbitrariamente pelo laboratório, tem uma concentração de 40 mg L⁻¹.

5.5 PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS

Determinou-se a concentração de carboidratos de 45 amostras de mel oriundas dos programas de fiscalização oficiais do MAPA (PACPOA) e amostras suspeitas provenientes de uma ação conjunta entre o MAPA e a Polícia Federal. As amostras foram coletadas entre 2020 e 2021 e têm origem geográfica diversa, em âmbito nacional. Todas as amostras analisadas apresentaram um indicativo de fraude nas análises de razão isotópica de carbono.

5.6 PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras foram homogeneizadas utilizando bastão de vidro com o cuidado para que o mínimo de ar fosse incorporado durante a homogeneização. Pesou-se cerca de 0,5 g que foram quantitativamente transferidas para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água ultrapura. A partir desta solução, uma alíquota de 1 mL foi transferida para um balão de 25 mL e completado à marca com água ultrapura.

5.7 ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL

As análises foram realizadas no laboratório IQA do LFDA/RS. Procedeu-se o preparo das amostras conforme item 4.6 e o preparo da curva de calibração e do padrão de verificação conforme item 4.4. A determinação de sacarose, glicose e frutose em cada uma das amostras foi realizada em duplicata.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA IÔNICA

As condições cromatográficas para a análise por cromatografia iônica estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Condições cromatográficas para análise de mel por cromatografia iônica

Modo isocrático	0,4 mL min ⁻¹
Tempo de corrida	33 minutos
Tempo de equilíbrio	9 minutos
Volume de injeção	20 µL

Fonte: a autora.

Todas as soluções envolvidas no trabalho: amostras processadas, curva analítica e o padrão de verificação, foram adequadamente transferidas para tubos de injeção específicos para a injeção no cromatógrafo iônico.

6.2 CURVA ANALÍTICA E PADRÃO DE VERIFICAÇÃO

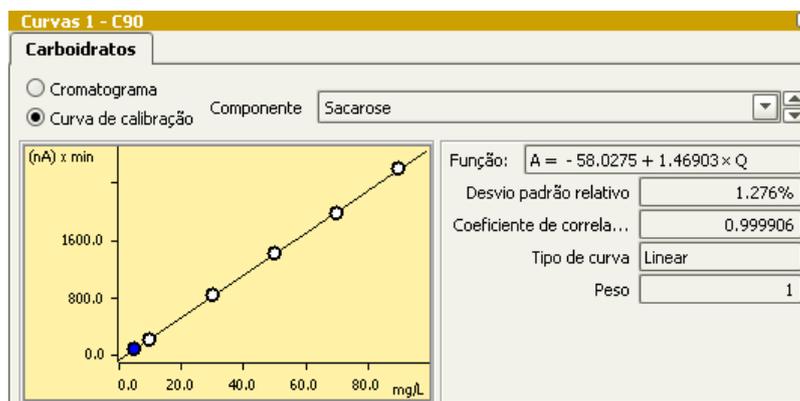
O método de cromatografia iônica foi o mesmo validado para as matrizes lácteas, que está descrito no anexo C. A validação das matrizes lácteas foi utilizada para ponderar a proposta tecnológica, avaliando se o método instrumental pode ser aplicado para a matriz de mel.

Apesar de estar sendo utilizada a validação para amostras lácteas, os resultados podem ser aproveitados para a matriz de mel pois o mesmo método instrumental é utilizado, sendo o analito sacarose o mesmo para ambas as matrizes.

Das amostras utilizadas na validação dos produtos lácteos, o leite condensado possui o mesmo preparo de amostras do que a utilizada para a matriz de mel, descrito no item 5.6. O leite cru e leite UHT são preparados de uma maneira diferente, onde são pesados aproximadamente 0,1 g de amostra e avolumados para um balão de 100 mL com água ultrapura. Após, o procedimento analítico é o mesmo descrito para todas as amostras.

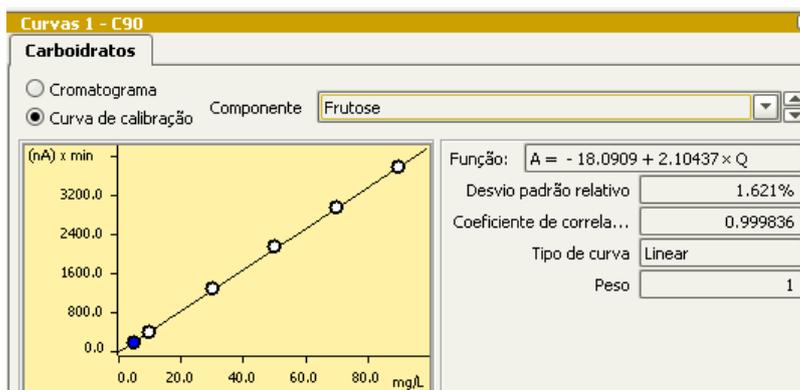
Foram feitas três curvas de calibração para avaliar a linearidade do método e a precisão para os açúcares frutose e glicose. As curvas de calibração obtidas para a sacarose, a frutose e a glicose podem ser visualizadas nas Figuras 4, 5 e 6.

Figura 4 – Curva de calibração para a sacarose



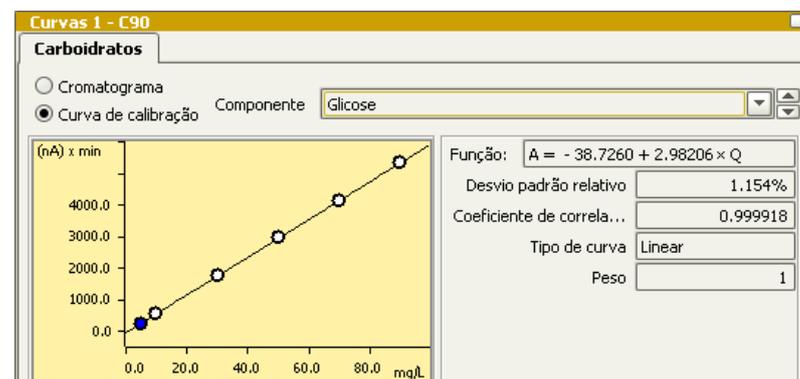
Fonte: a autora

Figura 5 – Curva de calibração para a frutose



Fonte: a autora

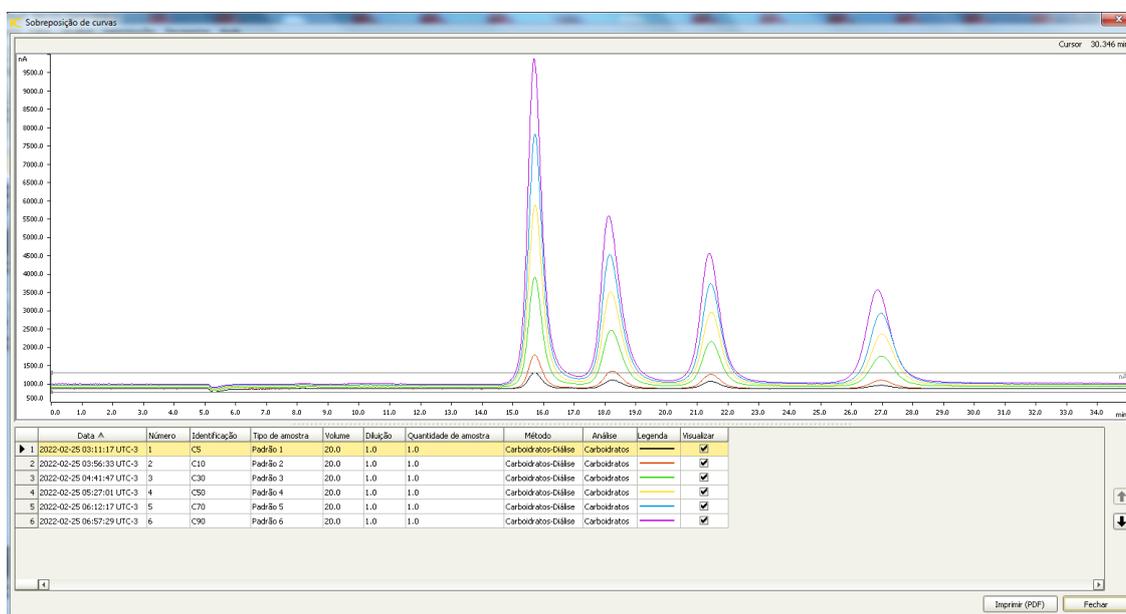
Figura 6 – Curva de calibração para a glicose



Fonte: a autora

O cromatograma obtido para os padrões da curva de calibração pode ser visualizado na Figura 7.

Figura 7 - Cromatograma dos padrões da curva de calibração



Fonte: a autora

Para o padrão de verificação de aproximadamente 40 mg L⁻¹, foram encontradas as concentrações descritas na Figura 8 para cada açúcar.

Figura 8 – Concentração do padrão de verificação

Resultados				
Resultados		Monitoramento		
Carboidratos				
Nome do componente	Tempo de retenção [min]	Altura [nA]	Área [(nA) × min]	Concentração [mg/L]
Glicose	15.70	4001.083	2374.325	40.459
Frutose	18.19	2033.627	1666.662	40.030
Lactose	21.37	1622.730	1328.135	40.624
Sacarose	26.77	1120.844	1122.569	40.183

6.3 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES EM MEL

Quarenta e cinco amostras foram analisadas, utilizando a metodologia instrumental descrita.

A concentração de carboidratos nas amostras analisadas foi calculada a partir da equação da reta obtida na curva de calibração para cada carboidrato. Os valores apresentados na tabela 3 representam a média das duplicatas das análises. A tabela com os dados completos está no apêndice A.

Os cromatogramas obtidos para as amostras podem ser visualizados no apêndice B.

Tabela 3 - Resultados obtidos nas análises do mel por cromatografia iônica e por razão isotópica de carbono

AMOSTRA	C ₄ %	SACAROSE (g/100g)	GLICOSE (g/100g)	FRUTOSE (g/100g)	AMOSTRA	C ₄ %	SACAROSE (g/100g)	GLICOSE (g/100g)	FRUTOSE (g/100g)
44684/21	10,30	1,56	36,79	42,82	44740/21	93,70	18,31	32,81	28,69
44671/21	77,80	17,32	36,67	33,37	44751/21	93,80	18,18	33,38	28,66
44655/21	77,80	18,76	35,46	32,78	44762/21	93,90	28,60	30,90	27,35
44653/21	78,10	19,22	34,87	32,43	44760/21	94,80	23,64	30,66	30,54
44651/21	79,50	7,22	32,20	32,38	44767/21	95,00	24,25	32,26	29,70
44673/21	79,80	33,17	26,77	24,87	44698/21	95,60	17,70	26,97	28,06
44669/21	83,50	19,00	33,71	31,71	44696/21	96,00	18,38	29,47	32,84
44664/21	84,00	17,29	34,34	33,44	62436/21	87,70	26,13	20,89	13,45
44662/21	84,00	13,63	36,09	35,65	62437/21	44,90	5,40	27,50	26,10
44660/21	84,10	16,46	36,08	33,62	62438/21	45,40	6,19	32,30	29,04
44710/21	89,40	36,38	27,47	24,24	62439/21	12,40	1,36	38,27	25,61
44683/21	91,40	25,97	33,28	30,35	62440/21	29,60	2,74	28,85	34,72
44708/21	91,60	15,00	32,95	30,69	62421/21	35,60	3,66	29,83	34,77
44731/21	92,90	22,03	35,93	31,86	56482/20	14,23	1,46	31,66	36,19
44727/21	93,00	23,29	34,43	31,16	12166/21	15,90	1,46	30,10	32,55
44729/21	93,10	23,23	34,14	30,92	27234/21	34,66	7,19	30,38	32,29
44744/21	93,40	17,27	33,86	29,81	56411/20	78,60	13,22	32,96	28,89
44738/21	93,60	19,47	32,88	28,84	32627/21	87,60	3,30	28,31	34,64
44706/21	93,60	16,97	33,02	35,25	32628/21	90,20	3,42	28,62	34,95
44742/21	93,60	14,52	29,46	26,22	32629/21	91,80	3,23	29,10	34,66
44753/21	93,70	17,76	32,98	30,74	15018/21	26,24	1,47	17,65	34,50
44758/21	93,70	16,92	33,29	29,91	55130/20	27,03	1,47	26,53	36,52
44749/21	93,70	16,75	33,14	29,75					

Fonte: a autora.

O teor de açúcares redutores no mel consiste na soma da frutose e da glicose, presente nas amostras. A glicose e a frutose são carboidratos que possuem a característica de oxidar na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas, sendo então chamado de açúcares redutores.

O termo sacarose aparente refere-se à concentração de sacarose presente no mel. Um teor elevado pode ser resultado de uma colheita antes do tempo, onde a sacarose ainda não foi transformada em glicose e frutose, ou ainda a adição de sacarose comercial as amostras, sendo essa prática ilegal conforme a IN nº 11.

O método de razão isotópica do carbono é um método qualitativo de triagem muito confiável. Para métodos qualitativos, a validação de metodologia tem exigências menores do que as análises quantitativas [21].

Das quarenta e cinco amostras de mel analisadas, somente duas atendem aos parâmetros estabelecidos pela IN nº 11 para o teor de açúcares redutores e índice de sacarose aparente, que correspondem as amostras assinaladas em azul.

Trinta e três amostras possuem teor de sacarose aparente além do estabelecido, sendo esse limite 6 g/100g. Trinta e duas amostras não possuem o teor mínimo de açúcares redutores estabelecidos em 65%. As amostras assinaladas em vermelho estão fora dos parâmetros para o quesito sacarose aparente. As amostras assinaladas em verde estão fora dos parâmetros estabelecidos para o teor de açúcares redutores no mel autêntico. Por fim, as amostras assinaladas em amarelo estão fora dos parâmetros estabelecidos tanto para a sacarose aparente quanto para os açúcares redutores.

6.4 AÇÚCAR INVERTIDO

Com os dados obtidos e levando em consideração que todas as amostras utilizadas apresentam um indicativo de fraude devido a análise isotópica de carbono, levantou-se uma hipótese para explicar por que as amostras 44684/21 e 56482/20 (destacadas em azul) não apresentaram um índice de sacarose além do estabelecido pela IN nº 11. Uma explicação para esse fato seria a adição de açúcar invertido.

A análise de cromatografia iônica não é capaz de separar a frutose e a glicose proveniente do mel legítimo da glicose e sacarose proveniente do açúcar invertido. Para isso, seria necessário um polarímetro, complementando a análise de cromatografia iônica, pois esse equipamento é capaz de determinar o ângulo de luz polarizada que passa por um material, identificando assim a fonte da frutose e glicose.

7 AVALIAÇÃO DE CUSTOS

Para o cálculo de custos desse projeto tecnológico, foram consideradas a quantidade de reagentes necessários para a realização da técnica. Nessa análise de custos, não estão sendo considerados o valor do equipamento nem sua manutenção, apenas o levantamento do custo para a análise de uma amostra. Os custos aproximados dos reagentes necessários utilizando o método de cromatografia iônica para cada conjunto de amostras estão demonstrados na tabela 4.

Tabela 4 - Cálculo dos custos envolvidos para a realização da análise do mel por Cromatografia Iônica

Reagente	Preço pela quantidade vendida (R\$)	Quantidade utilizada	Custo (R\$)
Hidróxido de sódio	122,00/1 Kg	8,00 g	0,98
Acetato de sódio	132,00/1 Kg	0,083 g	0,011
Padrão de sacarose	444,00/250 g	0,05 g	0,089
Padrão de frutose	557,00/500 g	0,05 g	0,060
Padrão de glicose	179,00/100 g	0,05 g	0,090
Total			1,23

Fonte: a autora

O método de referência utiliza a Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência com detector de RID (*Refractive Index Detector*) (CLAE-IR). Os custos para análise pelo método de referência estão relacionados na tabela 5.

Tabela 5 – Cálculo dos custos envolvidos para a realização da análise do mel por Cromatografia a Líquida de Alta Eficiência

Reagente	Preço pela quantidade vendida (R\$)	Quantidade utilizada	Custo (R\$)
Acetonitrila	750,00/5 L	36,25 mL	5,44
Padrão de sacarose	444,00/250 g	0,60 g	1,07
Padrão de frutose	557,00/500 g	3,80 g	4,23
Padrão de glicose	179,00/100 g	3,01 g	5,39
Total			16,13

Fonte: a autora

Comparando-se o preço total de cada método utilizado para a quantificação dos carboidratos no mel, o método proposto é muito vantajoso com relação ao método de referência em termos econômicos.

Os resultados encontrados utilizando o método de cromatografia iônica para a quantificação dos carboidratos no mel foram condizentes com o esperado, levando em consideração que todas as amostras eram suspeitas de fraude devido aos resultados encontrados na análise isotópica do carbono.

Uma das questões mais interessantes comparando-se o método de referência CLAE-IR com o método avaliado é a geração de resíduos. O método de referência utiliza como solvente acetonitrila, tanto para a fase móvel quanto para o preparo das amostras, enquanto o método por cromatografia iônica utiliza como solvente somente água ultrapura para essas duas finalidades. É de interesse ambiental minimizar a geração de resíduos, sem impactar na quantificação dos carboidratos no mel de forma satisfatória.

8 CONCLUSÕES

A determinação de carboidratos em mel empregando a técnica de cromatografia iônica com detector de PAD (*Pulsed Amperometric Detector*) (CI-AM) pode ser considerado adequado para a determinação de fraude no mel pela adição do açúcar sacarose pois comparando os resultados que foram encontrados na análise de razão isotópica do carbono durante a triagem, houve a confirmação quantitativa do açúcar sacarose proveniente de plantas com metabolismo fotossintético C₄. No entanto, duas amostras não apresentaram um índice de sacarose além do estabelecido pela IN n° 11, sendo uma explicação para esse fato a adição de açúcar invertido nas amostras. A metodologia proposta atendeu as necessidades da IN n° 11, estabelecida pelo MAPA, identificando de forma satisfatória os carboidratos presentes nas amostras.

Este método mostrou-se adequado para complementar a análise isotópica do carbono. Das amostras analisadas, 4,44 % das amostras estavam dentro dos parâmetros estabelecidos pela IN n° 11. Para o parâmetro de sacarose aparente, 73,33% das amostras tiveram resultados acima do estabelecido. Para o parâmetro de açúcares redutores, 71,11% das amostras não atingiram a concentração mínima de frutose e glicose necessárias para estar em conformidade com a IN n° 11.

As amostras que não apresentaram resultados que indicassem fraude podem ser explicadas pelo uso do açúcar invertido para burlar a legislação vigente para qualidade do mel, pois como o açúcar invertido é hidrolisado em glicose e frutose, o CI não é capaz de fazer a distinção entre a glicose e frutose do açúcar invertido ou da amostra de mel puro, sendo necessário então uma técnica complementar com o uso do polarímetro para tal.

O método de CI-AM (Cromatografia iônica com detector amperométrico) apresenta vantagens em relação ao método de CLAE-IR (Cromatografia a líquido de Alta Eficiência com detector de índice de refração), como a diminuição da geração de resíduos por utilizar água ultrapura como solvente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. O que faz a rede LFDA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 08 nov. 2021, 18h41min. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/o-que-faz-a-rede-lfda>. Acesso em: 25 jan. 2022.
- [2] BRASIL. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000**. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/IN-11-de-2000.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2022.
- [3] KERR, W. E. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, p. 15-22, 1987.
- [4] ALVES, E. M. **Identificação da flora e caracterização do mel orgânico de abelhas africanizadas das Ilhas Floresta e Laranjeira, do Alto Rio Paraná**. 2008. 63 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, 2008.
- [5] CAMARGO, Ricardo Costa Rodrigues. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Sistema de Produção – Produção do mel**. 2002, Teresina: Embarapa Meio-Norte.
- [6] Buainin, A.M.; Batalha, M.O. 2007. Cadeias produtivas de flores e mel. In.: A. M. Buainin; M. O (Ed.). Série Agronegócios. Brasília: MAPA/SPA, p. 85-140, 2007. v. 9.
- [7] BERTOLDI, Fabiano Cleber; GONZAGA, Luciano; REIS, Vanderlei Doniseti Acaçio dos. 2004. Características físico-químicas do mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera scutellata*), com florada predominante de hortelã-do-campo (*Hyptis crenata*), produzido no Pantanal. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL, 4., Corumbá. **Anais do IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal**. Corumbá, 2004, p. 1 - 5.
- [8] AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL COUNCIL). Official methods of Analysis. 16.ed. Washington: AOAC, 1998
- [9] CAC (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION). Official methods of analysis. v.3, Supl.2, snp, 1990.
- [10] GUY, Charles L.; HUBER, Joan L. A.; HUBER, Steven C. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. **Plant Physiology**, v.100, n.1, p. 502-508, 1992.
- [11] GULER, Ahmet; KOCAOKUTGEN, Hasan; GARİPOĞLU, Ali V.; ONDER, Hasan; EKINCI, Deniz, BIYIK, Selim. Detection of adulterated honey produced by honeybee (*Apis mellifera L.*) colonies fed with different levels of comercial industrial sugar (C₃ and C₄ plants) syrups by the carbono isotope ratio analysis. **Food Chemistry**, v. 155, p. 155-160, 2014. Disponível em: www.elsevier.com/locate/foodchem. Acesso em: 23 mar. 2022.

[12] TOSUN, Murat. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis method. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2-3, p. 1629-1632, 2013. Disponível em: www.elsevier.com/locate/foodchem. Acesso em: 28 mar. 2022.

[13] FIGUEIRA, R. **Análise isotópica da variabilidade natural do carbono-13 e análise energética em suco, néctar e refrigerante de maçã** // Tese (Doutorado). - Botucatu - SP: Universidade Estadual Paulista - UNESP. Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2008. – 141 p

[14] GUYON, Francois; GAILLARD, Laetitia; BRAULT, Audrey; GAULTIER, Nicolas; SALAGOITY, Marie-Hélène; MÉDINA, Bernard. Potential of ion chromatography coupled to isotope ratio mass spectrometry via a liquid interface for beverages authentication. **Journal of Chromatography**, volume 1322, 27 December 2013, Pages 65-68. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967313017263?via%3Dihub>. Acesso em: 11 mai 2022.

[15] COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1997.

[16] BULDINI, Pier Luigi; CAVALLI, Silvano; MEVOLI, Anna; SHARMA, Jawahar. Ion chromatographic and voltammetric determination of heavy and transition metals in honey. **Food Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 487–495, 2001.

[17] ZHU, Zuoyi; ZHANG, Yu; WANG, Junhong; LI, Xue; WANG, Wei; HUANG, Zhongping. Characterization of sugar composition in Chinese royal jelly by ion chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Food Composition and Analysis**, volume 78, May 2019, Pages 101-107. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157518304095?via%3Dihub>. Acesso em 11 mai 2022.

[18] NAGEL, Andreas; SIRISAKULWAT, Surapat; CARLE, Reinhold; NEIDHART, Sybille. An Acetate-Hydroxide Gradient for the Quantitation of the Neutral Sugar and Uronic Acid Profile of Pectins by HPAEC-PAD without Postcolumn pH Adjustment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, volume 62, 2014, pages 2037-2048. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf404626d>. Acesso em 11 mai 2022.

[19] EGGLESTON, Gilian; BORGES, Eduardo. Multiple Applications of Ion Chromatography Oligosaccharide Fingerprint Profiles To Solve a Variety of Sugar and Sugar-Biofuel Industry Problems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, volume 63, 2015, pages 2841-2851. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf506370s>. Acesso em 28 abr 2022.

[20] MEYER, Veronika. R. **Practical High-Performance liquid Chromatography**. Saint Gallen: John Wiley & Sons, 1998.

[21] BRITO, Natilene Mesquits; JUNIOR, Ozelito Possidônio de Amarante; POLESE, Luciana; RIBEIRO, Maria Lúcia. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: R.Ecotoxicol e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.

ANEXO A – DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ DO MEL

O método da acidez é baseado em uma titulação ácido-base, utilizando um pHmetro para realizar a medida de pH. A amostra é pesada e diluída em água livre de gás carbônico. A solução preparada é titulada com hidróxido de sódio 0,05 N em um fluxo constante, interrompendo-se a titulação quando a solução chega a pH 8,5. Do volume de NaOH gasto na titulação, é descontado o branco e multiplica pelo fator 50 para determinar a acidez livre. O fator 50 está relacionado a conversão do valor encontrado para miliequivalentes de NaOH por Kg de mel.

$$\text{Acidez livre} = (\text{mL de NaOH } 0,05\text{N utilizados na bureta} - \text{mL do branco}) \times 50$$

**ANEXO B - RESULTADOS DE $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ NO MEL (EM SOLUÇÃO A 5%),
PROTEÍNA EXTRAÍDA E SUA DIFERENÇA**

AMOSTRA	MEL EM SOLUÇÃO	PROTEÍNA EXTRAÍDA DE MEL	DIFERENÇA $\delta^{13}\text{C}_\text{H} - \delta^{13}\text{C}_\text{p}$
44684/21	-21,56	-22,72	1,15
44671/21	-14,76	Não detectado	-
44655/21	-14,75	Não detectado	-
44653/21	-14,71	Não detectado	-
44651/21	-14,52	Não detectado	-
44673/21	-14,46	Não detectado	-
44669/21	-13,93	Não detectado	-
44664/21	-13,87	Não detectado	-
44662/21	-13,86	Não detectado	-
44660/21	-13,84	Não detectado	-
44710/21	-13,08	Não detectado	-
44683/21	-12,79	Não detectado	-
44708/21	-12,76	Não detectado	-
44731/21	-12,57	Não detectado	-
44727/21	-12,56	Não detectado	-
44729/21	-12,55	Não detectado	-
44744/21	-12,51	Não detectado	-
44738/21	-12,48	Não detectado	-
44706/21	-12,47	Não detectado	-
44742/21	-12,47	Não detectado	-
44753/21	-12,46	Não detectado	-
44758/21	-12,46	Não detectado	-
44749/21	-12,46	Não detectado	-
44740/21	-12,46	Não detectado	-
44751/21	-12,45	Não detectado	-
44762/21	-12,44	Não detectado	-
44760/21	-12,30	Não detectado	-

44767/21	-12,27	Não detectado	-
44698/21	-12,19	Não detectado	-
44696/21	-12,13	Não detectado	-
62436/21	-13,07	-23,89	10,82
62437/21	-19,15	-25,34	6,19
62438/21	-18,98	-25,15	6,18
62439/21	-21,66	-23,10	1,43
62440/21	-19,99	-23,55	3,56
62421/21	-20,36	-25,23	4,87
56482/20	-25,27	-27,5	2,3
12166/21	-23,55	-25,8	2,3
27234/21	-20,61	-25,4	4,8
56411/20	-14,64	Não detectado	-
32627/21	-13,3	Não detectado	-
32628/21	-13,0	Não detectado	-
32629/21	-12,7	Não detectado	-
15018/21	-12,32	Não detectado	-
55130/20	-12,46	Não detectado	-

Fonte: dados fornecidos pela unidade IQA

ANEXO C - VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE SACAROSE E GLICOSE POR CROMATOGRAFIA IÔNICA

O método de cromatografia iônica foi desenvolvido e validado no laboratório IQA, sendo utilizado para detectar e quantificar os carboidratos sacarose e lactose em amostras de produtos lácteos. Para a matriz de mel, somente a sacarose é de interesse analítico. O método é aplicável para todos os produtos lácteos, sendo que para sacarose foram testados leite cru, leite UHT e leite condensado.

5.1.1 Faixa de trabalho

A faixa de trabalho adotada no procedimento foi selecionada de forma a abranger a faixa limite previsto na legislação para os produtos lácteos com baixo teor de lactose e a de menor concentração de sacarose.

5.1.2 Especificidade

Os analitos estudados não apresentaram interferências de outros analitos no sinal emitido pelo cromatógrafo iônico, pois cada elemento apresenta um respectivo tempo de retenção, demonstrando então que a técnica de cromatografia iônica é seletiva para a finalidade proposta.

5.1.3 Seletividade

Foram testadas 10 amostras “brancas” para a sacarose, onde verificou-se a ausência de picos que pudessem contribuir com o erro de identificação e quantificação do analito sacarose.

5.1.4 Linearidade do método

A linearidade dos métodos analíticos quantitativos é a capacidade do método de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração

do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Para ser adequada, a linearidade considerada deve possuir $r^2 \geq 0,98$.

Foram desenvolvidas três curvas de calibração, em triplicata, para cada analito. Para a formação da curva de calibração, foram utilizados 6 pontos e foi determinado o coeficiente de correlação pela regressão linear. Foi utilizada solução estoque na concentração de 2 g L⁻¹.

Após as análises, as curvas de calibração demonstraram serem lineares para a faixa de trabalho proposta, estando todos os valores de coeficiente de correlação dentro do valor estabelecido.

5.1.5 Precisão e exatidão

A repetitividade de um método analítico reflete a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo analito, efetuadas sob as mesmas condições de medição, sendo elas o mesmo procedimento, o mesmo analista, o mesmo instrumento de medição e a repetição em um curto período de tempo.

A reprodutibilidade de um método analítico reflete o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo analito, efetuadas sob condições variadas de medições. No caso dessa validação de metodologia, o método de cromatografia iônica foi realizado por diferentes analistas, em dias e amostras diferentes.

A exatidão é o grau de concordância entre o resultado de uma medida experimental e o valor de referência aceito convencionalmente como verdadeiro, indicando a existência ou não de erro sistemático.

A forma para avaliar a precisão do método de cromatografia iônica para a determinação dos carboidratos sacarose e lactose foi o coeficiente de variação, que consiste no desvio padrão expresso como percentual da média entre os valores da setuplicada de cada matriz, em três níveis de fortificação, em três dias consecutivos e dois analistas. Utilizando a análise percentual de recuperação, nenhuma das amostras apresentou resultado acima do limite do coeficiente de variação, sendo a variação máxima tolerada de 10%.

Para avaliar a exatidão, foi realizada a determinação dos carboidratos nas amostras com adição em setuplicata em três níveis de fortificação, onde a recuperação média foi analisada levando em consideração o percentual de recuperação, que deve estar na faixa entre 80 a 110%.

A tabela 6 apresenta os resultados observados para a sacarose.

Tabela 6 - Avaliação do percentual de recuperação e coeficiente de variação de sacarose em amostras de leite cru, leite UHT e leite condensado

Nível de fortificação	Média global (mg L⁻¹)	Recuperação global (%)	CV Intra Dia	CV Inter Dia	CV Precisão Intermediária
2,50	2,50	99	4,00	5,10	6,50
5,00	5,40	107	3,30	2,60	4,20
10,00	10,90	109	3,10	1,80	3,60

Fonte: adaptado pela autora

5.1.6 Limite de quantificação e detecção

O limite de quantificação e detecção foi determinado como o primeiro ponto de calibração da curva de calibração, sendo para a sacarose o primeiro ponto onde há confiabilidade de detecção da amostra, já que a sacarose é proibida em amostras lácteas.

5.1.7 Incerteza da medição

Os dados obtidos através do método de cromatografia iônica para as matrizes lácteas utilizaram como parâmetro de incerteza para a determinação de amostras conformes e não conformes a concentração crítica para erro fixada. A avaliação de conformidade da metodologia pode ser observada na tabela 7.

Tabela 7 - Avaliação da metodologia de cromatografia iônica em matrizes lácteas

Parâmetro avaliado	Critério de aceitabilidade	Valor encontrado	Conclusão
SELETIVIDADE	Não foi verificada interferências de outras espécies no mesmo sinal	Não foi evidenciada interferências de espécies no mesmo sinal	CONFORME
LINEARIDADE DO MÉTODO	$r^2 > 0,9800$	Menor valor de $r^2 > 0,9922$	CONFORME
PRECISÃO	CV < 10% método quantitativo	Maior valor de CV encontrado: 9,3%	CONFORME
LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO E DETECÇÃO	----	Sacarose: 2,5 mg L ⁻¹	CONFORME
EXATIDÃO	Percentual de recuperação entre 80-110%	Variaram entre 99-109%	CONFORME
LIMITE DE DECISÃO (CC _α)	Menor que 20%	Sacarose: 8,20%	CONFORME

Fonte: adaptado pela autora

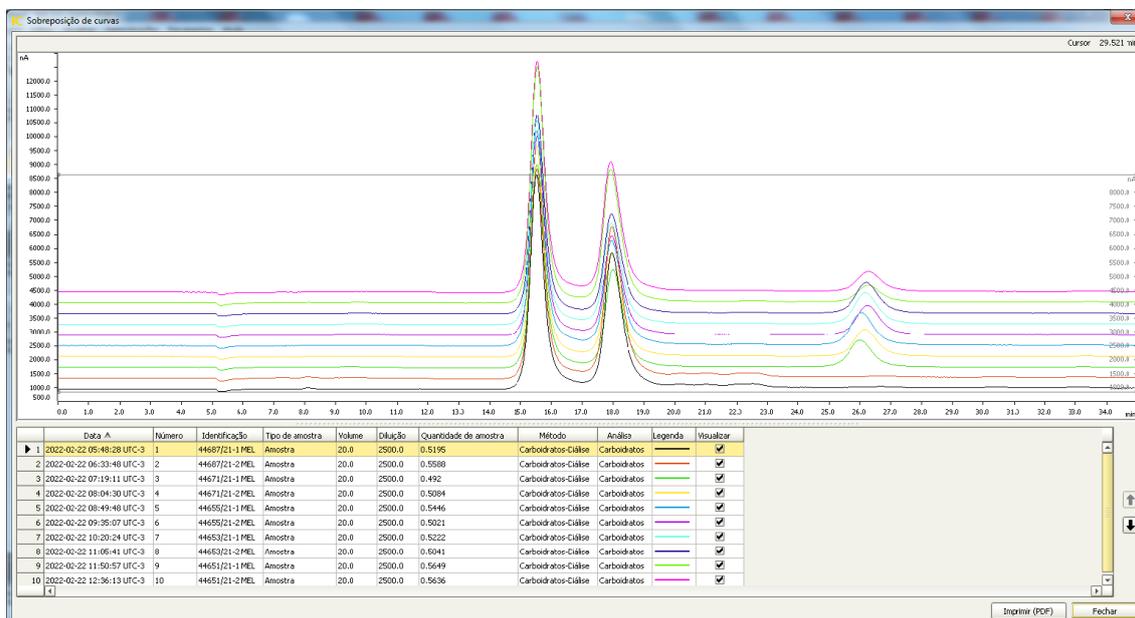
**APÊNDICE A - CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATOS ENCONTRADOS NAS
AMOSTRAS**

AMOSTRA	SACAROSE (g/100g)	GLICOSE (g/100g)	FRUTOSE (g/100g)	AMOSTRA	SACAROSE (g/100g)	GLICOSE (g/100g)	FRUTOSE (g/100g)
44684/21	1,57	36,79	42,91	44740/21	18,24	32,58	28,74
	1,55	36,80	42,74		18,38	33,04	28,64
44671/21	17,67	36,95	33,18	44751/21	17,91	32,86	28,39
	16,97	36,39	33,56		18,45	33,91	28,92
44655/21	18,60	35,55	32,42	44762/21	28,75	31,12	27,45
	18,52	35,36	33,14		28,45	30,69	27,26
44653/21	19,08	34,61	32,25	44760/21	23,58	30,57	30,36
	19,35	35,13	32,61		23,69	30,76	30,71
44651/21	7,43	32,56	32,82	44767/21	24,35	32,29	29,73
	7,01	31,84	31,94		24,16	32,23	29,67
44673/21	33,15	26,73	24,82	44698/21	17,90	27,16	28,12
	33,18	26,81	24,92		17,49	26,78	28,00
44669/21	19,10	33,83	31,62	44696/21	17,96	31,53	32,15
	18,89	33,58	31,80		18,79	27,40	33,52
44664/21	17,00	34,35	33,17	62436/21	26,05	20,73	13,36
	17,57	34,33	33,70		26,21	21,04	13,54
44662/21	13,66	35,63	35,67	62437/21	5,40	27,15	25,26
	13,61	36,55	35,63		5,40	27,85	26,85
44660/21	16,00	35,30	33,40	62438/21	6,27	31,96	28,39
	16,91	36,23	33,84		6,12	32,64	29,69
44710/21	36,52	27,58	24,43	62439/21	1,25	39,45	25,67
	36,25	27,35	24,04		1,47	37,09	25,55
44683/21	26,20	33,11	30,46	62440/21	2,77	28,48	34,42
	25,74	33,45	30,24		2,72	29,21	35,03
44708/21	14,93	32,97	30,71	62421/21	3,78	29,80	34,88
	15,06	32,93	30,67		3,55	29,86	34,66
44731/21	21,73	35,63	31,47	56482/20	1,39	31,04	35,78
	22,33	36,23	32,25		1,52	32,28	36,59
44727/21	23,34	34,62	31,32	12166/21	1,51	30,07	32,48

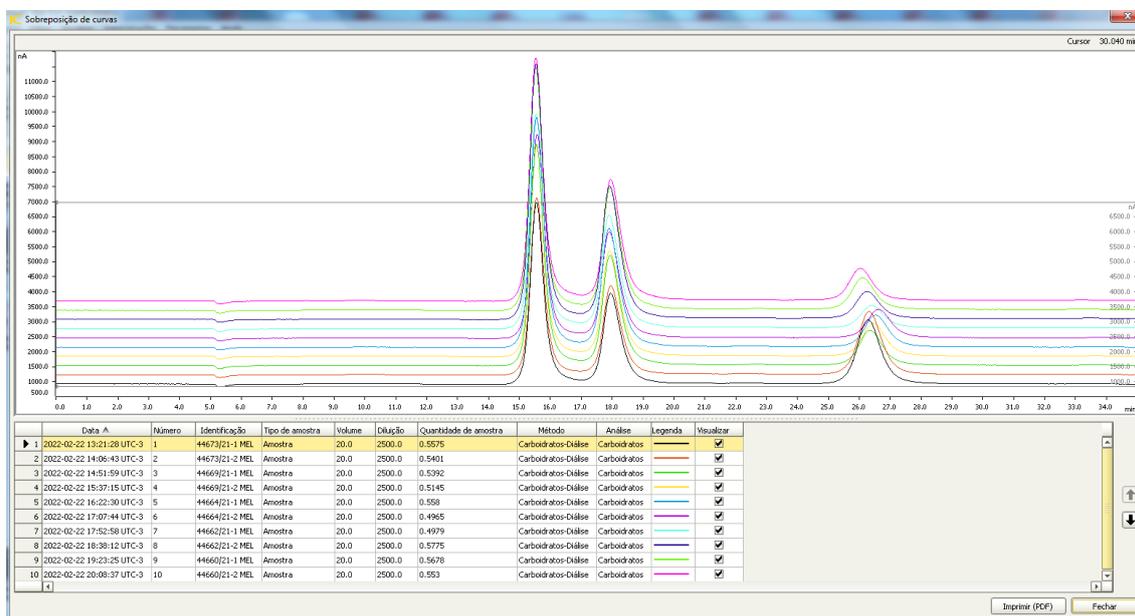
	23,25	34,24	30,99		1,40	30,14	32,60
44729/21	23,60	34,46	31,05	27234/21	7,28	30,27	32,34
	22,87	33,82	30,79		7,10	30,49	32,23
44744/21	17,30	33,81	29,76	56411/20	13,41	33,10	29,03
	17,23	33,91	29,86		13,03	32,83	28,75
44738/21	19,32	32,94	28,55	32627/21	3,49	28,43	34,84
	19,62	32,82	29,13		3,12	28,19	34,45
44706/21	17,39	32,76	35,54	32628/21	3,45	28,64	34,96
	16,54	33,27	34,96		3,40	28,60	34,94
44742/21	14,51	29,74	26,35	32629/21	3,30	29,09	34,69
	14,53	29,18	26,09		3,17	29,11	34,63
44753/21	17,57	32,54	30,87	15018/21	1,35	17,75	34,77
	17,96	33,41	30,61		1,59	17,54	34,23
44758/21	17,02	33,50	30,10	55130/20	1,48	26,30	36,30
	16,82	33,08	29,72		1,47	26,77	36,74
44749/21	16,87	33,28	29,97				
	16,64	33,00	29,45				

Fonte: a autora

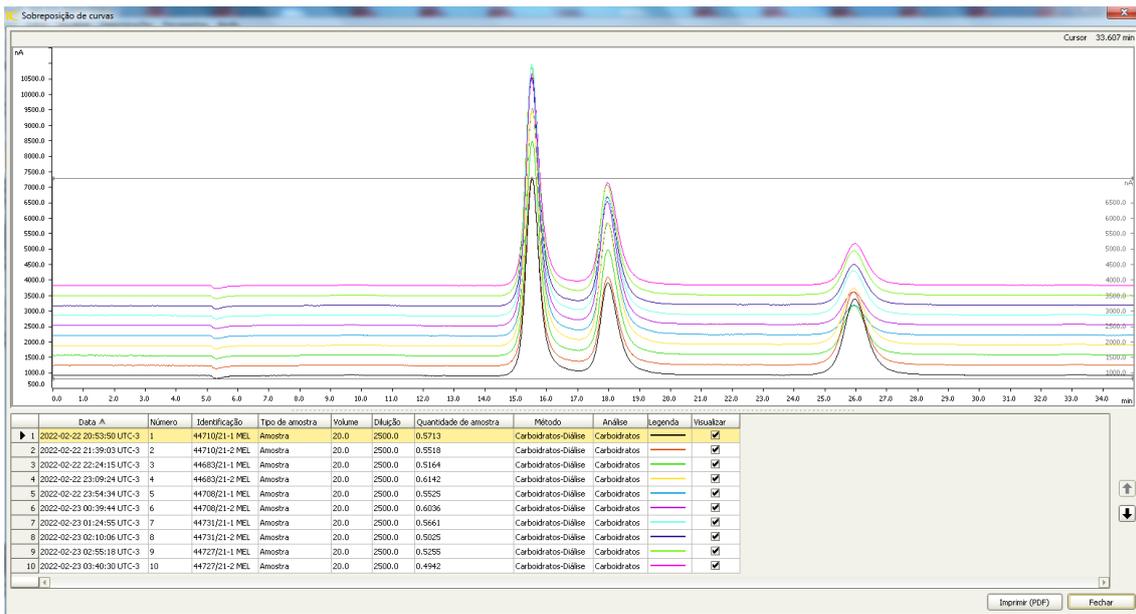
APÊNDICE B – CROMATOGRAMAS OBTIDOS PARA AS AMOSTRAS



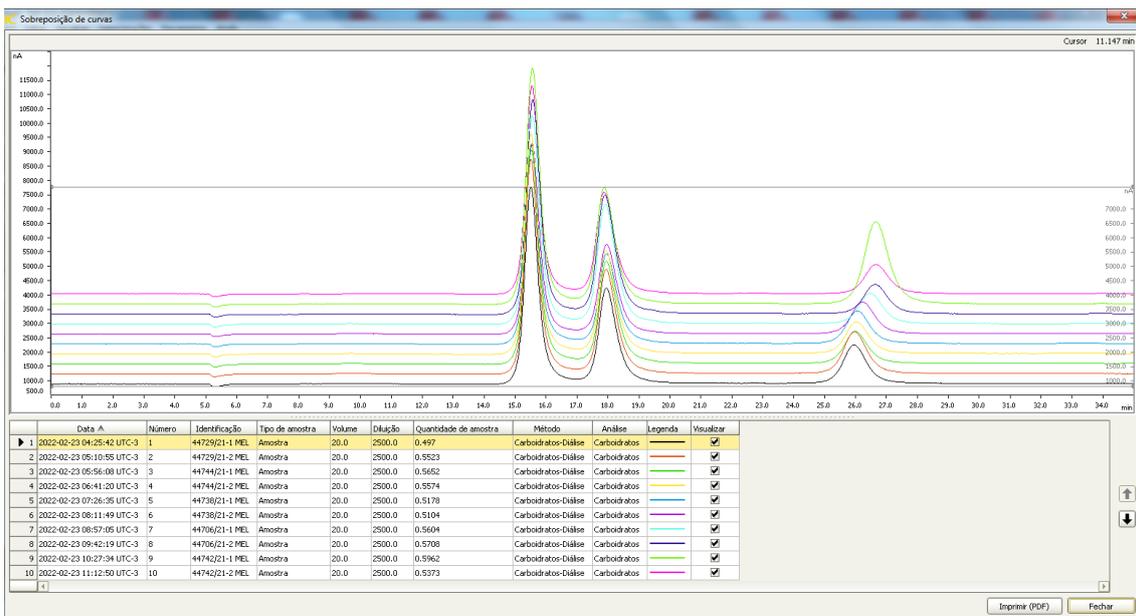
Fonte: a autora



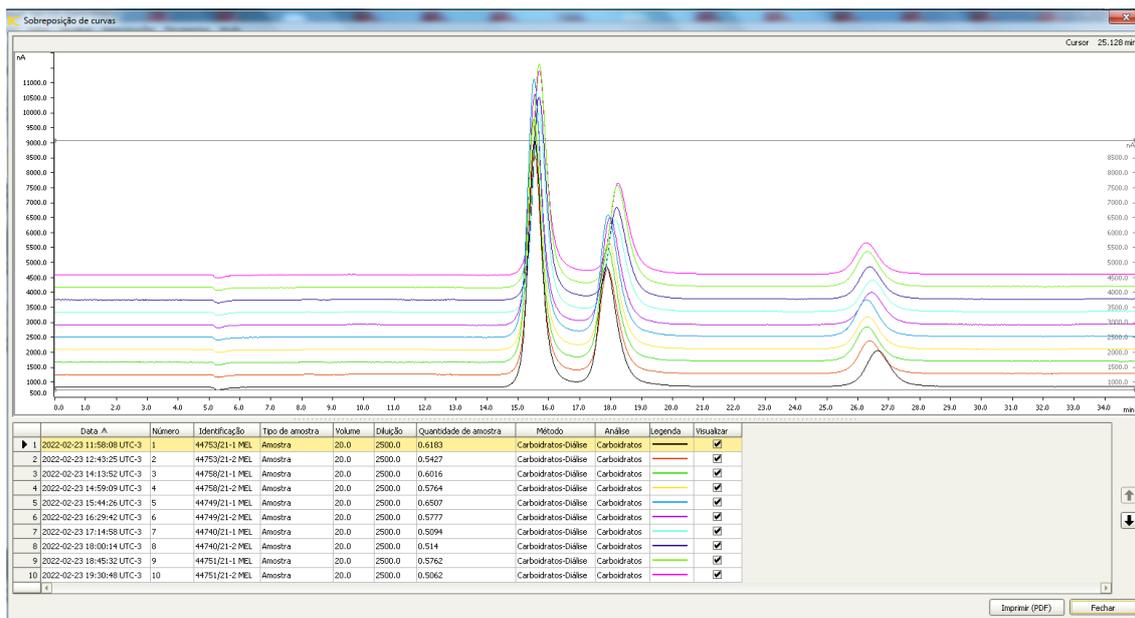
Fonte: a autora



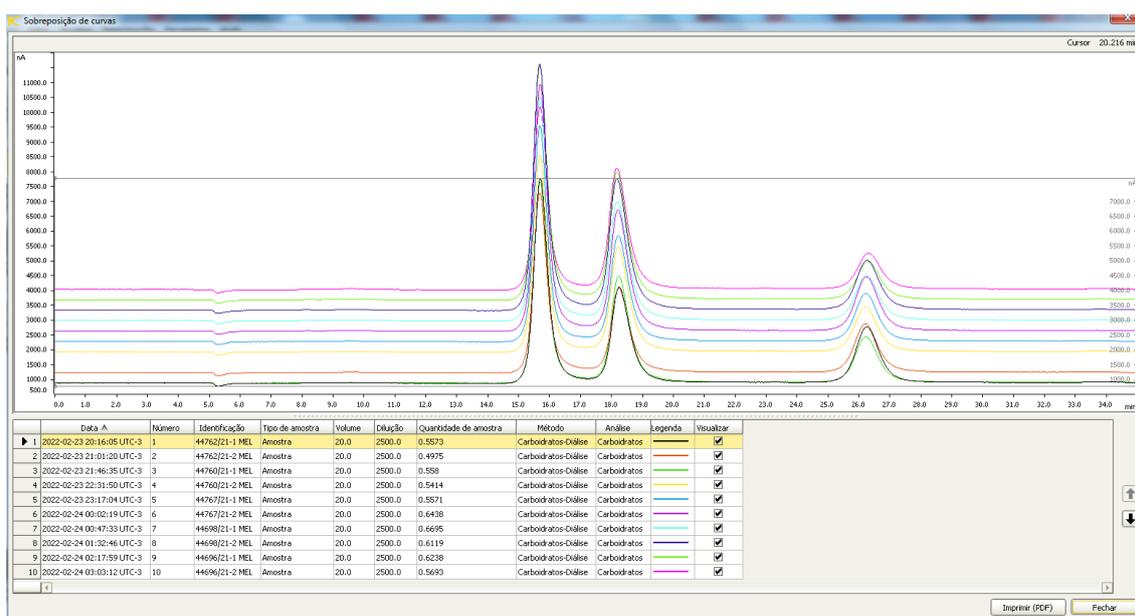
Fonte: a autora



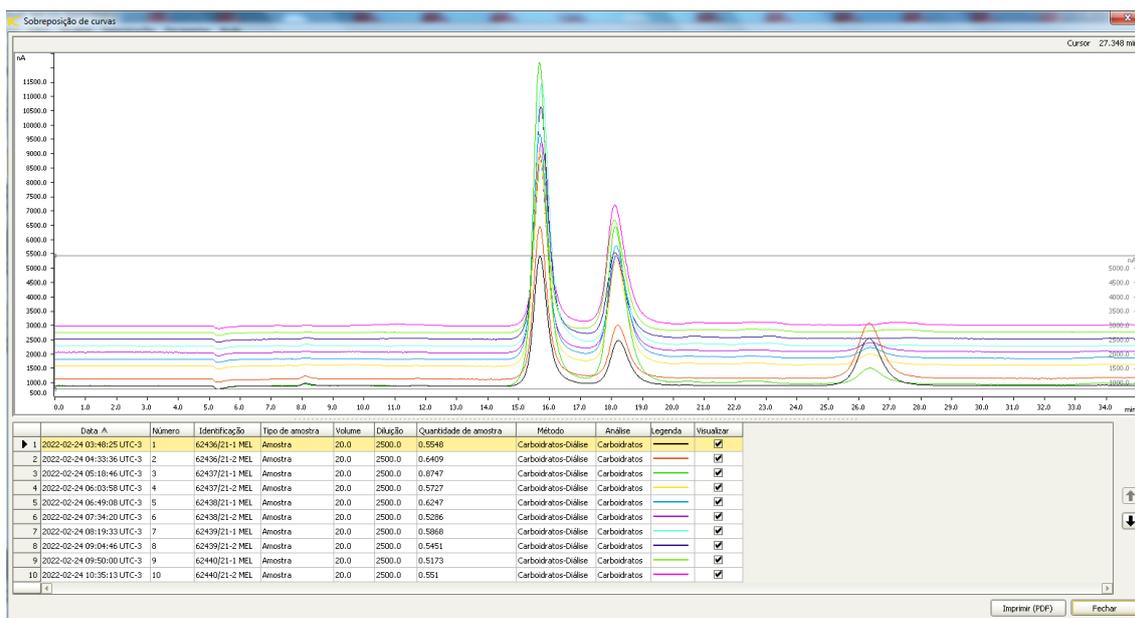
Fonte: a autora



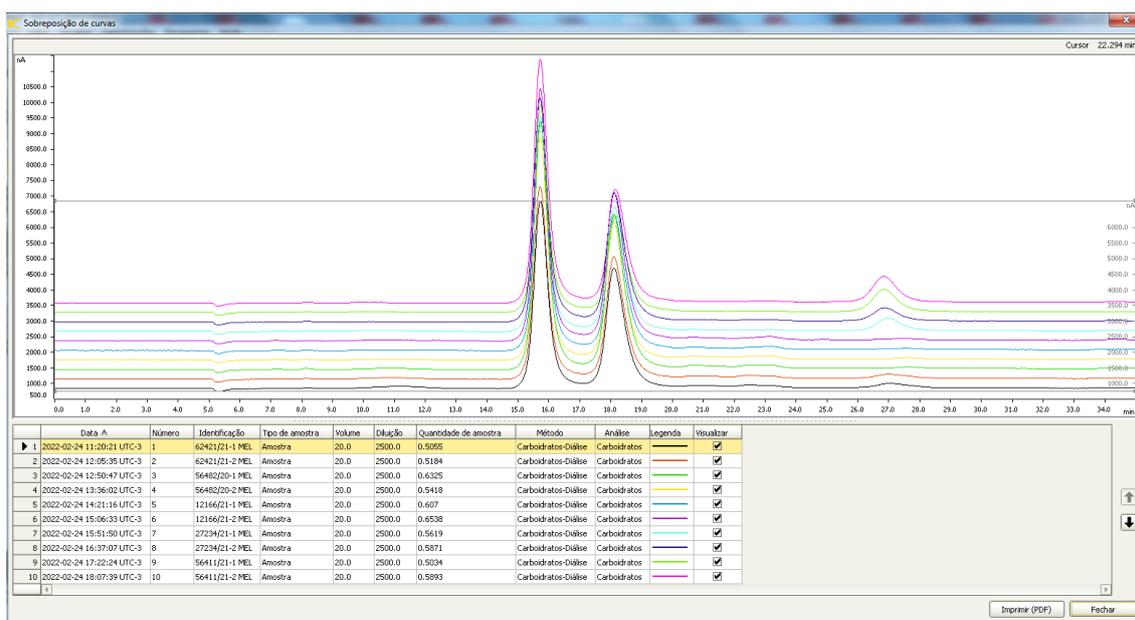
Fonte: a autora



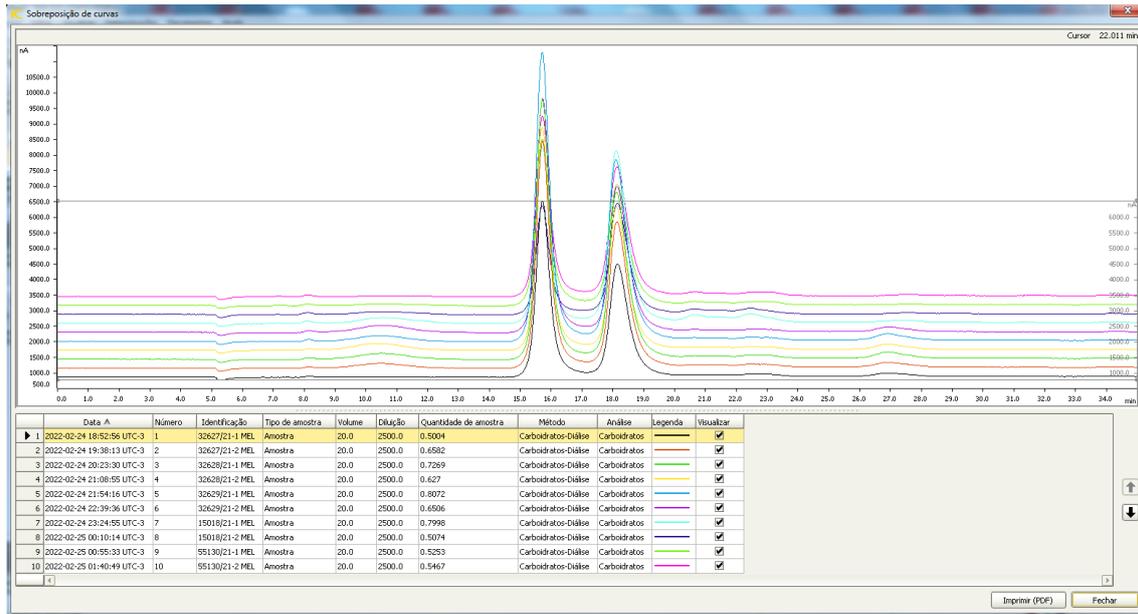
Fonte: a autora



Fonte: a autora



Fonte: a autora



Fonte: a autora