

DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES EM MEL FLORAL E MEL DE MELATO DE ALGUMAS REGIÕES DE MINAS GERAIS E DE SANTA CATARINA

Gisélia CAMPOS*
Giancarlo Ubaldo NAPPI**
Marcelo BASTOS***
Maria de Fátima GOMIDES*
Mariem Rodrigues RIBEIRO-CUNHA*
Kleber Eduardo BATISTA*
Regina Célia DELLA MODESTA***

RIALA 06/867

CAMPOS, G. et al.- Determinação de açúcares em mel floral e mel de melato de algumas regiões de Minas Gerais e de Santa Catarina. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(2): 63-70, 1999.

RESUMO: O mel de melato difere do mel floral em relação à sua composição em açúcares. A fim de verificar estas diferenças, foram analisadas 14 amostras de mel floral e 11 amostras de mel de melato e determinados os teores de frutose, glicose, sacarose, maltose, melezitose, erlose e rafinose por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração. Foram testadas diferentes fases móveis para separar melezitose de erlose que são trissacarídeos presentes no mel. O mel de melato apresentou teor de glicose menor que o mel floral, o que foi estatisticamente confirmado pelo teste U de Mann-Whitney. A erlose estava presente em todas as amostras. Não foi detectada melezitose nas amostras de mel floral.

DESCRITORES: mel, mel de melato, açúcares, carboidratos

INTRODUÇÃO

Para obter os nutrientes necessários ao seu organismo, as abelhas coletam pólen, néctar e melato. Este se refere às excreções, em forma de líquidos açucarados, de um grande número de espécies de homópteros que vivem como parasitas sugadores da seiva elaborada do floema das plantas. Donner (1977) analisou 490 amostras de mel floral e 14 de mel de melato dos EUA e encontrou os valores de 38,19% de frutose e 31,28% de glicose para o mel floral e 31,80% de frutose e 26,08%

de glicose para o mel de melato, afirmando ainda que o mel de melato possui maior teor de oligossacarídeos. De acordo com Donner (1977) e Siddiqui, (1970), melezitose é um trissacarídeo, característico do mel de melato, embora o trissacarídeo erlose também possa estar presente. Embora Belliardo e Buffa (1979), considerem a presença de erlose como característica de mel floral e Siddiqui, (1970) considere a melezitose como fator de diferenciação entre estes dois tipos de mel, White & Maher (1953) e Doner (1977), consideraram a possibilidade de existirem dois tipos de mel de melato: do tipo

*Da Fundação Ezequiel Dias, Divisão de Bromatologia e Toxicologia, Serviço de Química Bromatológica, Rua Conde Pereira Carneiro nº 80 CEP 30.510-010 Belo Horizonte, MG.

**Bolsista da FAPEMIG

***Da Embrapa Agroindústria de Alimentos, 23.020-070 Rio de Janeiro, RJ.

melezitose, que pode granular rapidamente e o do tipo erlose que não granula. Esta diferença é supostamente atribuída ao fato de que a abelha pode coletar exsudatos açucarados das plantas, que não passaram pelo corpo do inseto. Contrariamente, Belliardo & Buffa (1979) consideraram a presença de erlose como característica do mel floral. Os métodos para determinação de carboidratos em alimentos podem ser classificados em físicos, químicos, colorimétricos e enzimáticos. Os procedimentos enzimáticos e cromatográficos (físicos) são os mais comumente utilizados. Dentre os métodos cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência é o sistema mais utilizado para análise dos açúcares. Esta metodologia foi aplicada neste trabalho, com o objetivo de caracterizar o mel de algumas regiões de Minas Gerais e o mel de melato proveniente de Santa Catarina, visando a obtenção de uma metodologia eficiente que, aplicada isoladamente ou como suporte a outras metodologias seja eficiente para diferenciar mel floral de mel de melato.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram analisadas quatorze amostras de mel floral e onze amostras de mel de melato assim classificadas por Campos (1998) de acordo com os métodos de Kirkwood (1960) e White (1980). Dentre as amostras de mel de melato, quatro foram provenientes de Santa Catarina, de apiários localizados em meio à plantação de bracatinga.

Determinação de frutose, glicose, sacarose, maltose, erlose, melezitose e rafinose por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

— Equipamento: cromatógrafo Líquido composto de Injetor Waters com loop de 20 μ L e bomba da Waters; Coluna Waters carbohydrate (NH₂ – PN 84038) 30cm x 3,9mm x 10 μ m; detector de Índice de Refração CG – 410 acoplado a sistema de registro computadorizado.

Reagentes:

— Solução de padrões isolados e em mistura: pesou-se, cerca de 0,2000g de frutose marca Aldrich 99%, glicose marca Fluka — teor de pureza > 99,5%, sacarose marca Fluka — teor de pureza > 99,5%, maltose monohidratada marca Sigma, melezitose monohidratada marca Sigma, e rafinose sem especificação. Foi feita a transferência, quantitativamente, para balão de 100 mL com 50mL de água desionizada, e completado o volume com acetonitrila, obtendo-se uma concentração de 2mg/mL.

— Solução padrão de erlose: o conteúdo do frasco (14 mg) foi transferido para um balão de 5mL com 2,5mL de água e 2,5mL de acetonitrila, obtendo-se uma concentração de 2,8mg/mL.

— Fase móvel: acetonitrila / água, 75:25 ; fluxo 0,7 mL/min; 80:20; fluxo 2 mL/min e 0,7 mL/min.

Para separar os picos de melezitose e erlose e confirmar qual destes açúcares estava presente nas amostras que apresentaram picos com tempo de retenção na região destes dois padrões, foram feitos vários testes com soluções dos padrões de melezitose monohidratada marca Sigma e erlose marca Sigma teor de pureza de 97%:

Fase móvel acetonitrila / água nas proporções 85:15, 80:20, 70:30, 60:40 com fluxos variando de 0,7 a 2 mL/min.

Fase móvel acetonitrila / água 80:20, contendo 0,1% de polietilenoglicol (Churms, 1996).

Fase móvel acetonitrila / água / metanol 80:15:5, com fluxo de 1 mL/min

— Soluções padrão em mistura e isolados contendo cerca de 0,2g /mL de erlose e melezitose.

— Preparo da amostra: pesou-se cerca de 5,0000g de amostra de mel em béquer de 50mL, transferindo-se com 25 mL de água para balão volumétrico de 50mL, completando-se o volume com acetonitrila. Filtrou-se em papel de filtro qualitativo e em seguida em SEP-PAK C₁₈ lavado com água, em seguida metanol e água novamente.

— Técnica do padrão externo: os padrões foram injetados separadamente, para determinação dos tempos de retenção nas condições utilizadas. Em seguida foi feita a injeção da mistura padrão e introdução dos valores de concentração, para obtenção dos fatores de resposta. O cálculo foi feito comparando-se as áreas dos picos dos padrões e das amostras (AOAC, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quanto à determinação de açúcares por CLAE as curvas de calibração para os açúcares frutose, glicose, sacarose, maltose, melezitose e rafinose, injetados separadamente em concentrações que variaram de cerca de 0,2 a 0,6 mg/20 μ L, mostraram-se lineares e com r² que variou de 0,9933 a 0,9997. Os teores médios de frutose, glicose, sacarose, e maltose determinados por CLAE nas quatorze amostras de mel floral e 11 de mel melato assim classificadas de acordo com Kirkwood e White encontram-se na Tabela 1.

As quatro amostras de mel de melato, provenientes de Santa Catarina, foram as que apresentaram teores menores de glicose, que variaram de 17,36 a 23,3. Dentre todas as amostras, classificadas como mel de melato, algumas apresentaram teores menores de glico-

se, e outras não. Contudo, o resultado médio do teor de glicose das amostras de mel de melato foi menor que o das amostras de mel floral (Tabela 1), confirmado estatisticamente pelo teste U de Mann-Whitney (Tabelas 2 e 3) o que está de acordo com Bonvehi (1987) e Doner (1977) que encontrou valores de 26,08% de glicose para mel de melato e 31,28% para mel floral.

Em se tratando de misturas de mel floral com mel de melato, tanto a fonte floral quanto a presença de melato interferem no espectro dos açúcares.

Em relação à frutose, os resultados médios não variaram para os dois tipos de mel, sendo que Doner (1977) encontrou 31,80% de frutose para mel de melato 38,19% para mel de floral.

A sacarose não foi detectada em sete das vinte e cinco amostras analisadas e os resultados encontrados tanto para sacarose quanto para maltose, variaram bastante independente do tipo de mel. Doner encontrou 0,80% de sacarose para mel de melato e 1,31% para mel floral; 8,80% de maltose para mel de melato e 7,31% para mel

floral. Para alto açúcares o mesmo autor encontrou 4,70% para mel de melato e 1,50 % para mel floral. Nas condições em que foram feitas as análises, os açúcares melezitose e erlose apresentaram tempo de retenção muito próximos, dificultando a interpretação dos cromatogramas.

Então, diminuiu-se o fluxo para 1mL/min. para melhorar a separação. Nestas condições a erlose apresentou um tR' de 27,70 e a melezitose de 29,257. A Amostra 22 injetada nestas mesmas condições, apresentou um pico em 28,009 que foi considerado como erlose. A amostra nº 5, também injetada nestas mesmas condições apresentou pico com tR' de 28,318, indicando a presença de erlose. Porém, houve alargamento do pico, o que dificultou a interpretação. As Figuras de 1 a 8, mostram os cromatogramas obtidos a partir de padrões dos açúcares pesquisados no mel e de amostras de mel floral e de mel de melato.

Dos testes realizados para confirmar a presença de erlose ou melezitose nas amostras que apresentaram pico com tempo de retenção na região destes padrões, somente a adição de metanol à fase móvel proporcionou uma

Tabela 1. Teores médios de açúcares determinados por CLAE em 14 amostras de mel floral e 11 de mel de melato classificadas de acordo com os critérios de Kirkwood e White

	Frutose %	Glicose %	Sacarose %	Maltose %
Mel Floral de acordo com Kirkwood				
Média	38,03	34,75	0,94	2,69
S	6,09	4,07	1,25	1,09
Faixa	21,11 - 47,40	30,15 - 45,50	0,00 - 3,81	1,50 - 4,25
Mel floral de acordo com White				
Média	37,51	34,67	0,624	2,645
S	5,79	4,04	0,87	1,48
Faixa	21,11 - 47,40	30,15 - 45,50	0,00 - 3,81	1,50 - 4,25
Mel de melato de acordo com Kirkwood				
Média	36,91	29,07	1,40	1,37
S	3,34	7,51	1,29	2,98
Faixa	21,11 - 47,40	30,15 - 45,50	0,00 - 3,81	1,50 - 4,25
Mel de melato de acordo com White				
Média	37,56	29,16	1,80	3,40
S	4,06	7,60	1,40	2,74
Faixa	42,64 - 45,94	17,36 - 38,60	0,00 - 3,81	0,32 - 7,27

separação dos picos melezitose e erlose, tornando possível verificar qual destes açúcares estava presente nas amostras (Tabela 4). Os cromatogramas das figuras 7 e 8 mostram claramente a presença de erlose. A amostra nº 4 apresentou pico maior na região da erlose mas apresentou um pico pequeno correspondente à melezitose. Portanto, o teor de 1,02 (Tabela 4) corresponde a erlose mais melezitose. Já as amostras 12, 17 e 19 não apresentaram nenhum destes dois açúcares.

Das amostras analisadas quanto à rafinose, foi constatada a presença deste açúcar nas amostras 20, 23 e 25. Sua presença nos dois tipos de mel significa que este açúcar não é indicativo de mel de melato.

A análise de açúcares por CLAE possibilitou verificar a presença de erlose no mel de melato, estando de acordo com White (1963) e Doner (1977) quan-

do eles sugerem que há mel de melato do tipo erlose e do tipo melezitose. Stefanelli *et al.* (1989) não considerou a melezitose como fator de diferenciação do mel floral do mel de melato porque encontrou este açúcar em ambos os tipos de mel. Porém não utilizou padrão de erlose sendo que nas condições analíticas empregadas, a erlose se presente, sairia junto com a melezitose. No presente trabalho, melezitose não foi detectada em nenhuma amostra de mel floral, somente em pouca quantidade em duas amostras de mel de melato. Isto está de acordo com Bacon & Dickson (1957) que relatam que a melezitose não é produzida pelas abelhas, mas pelos afídeos os quais possuem atividade transglucosilase, capaz de converter sacarose em melezitose.

Tabela 2. Teores de glicose em mel floral e mel de melato classificados de acordo com Kirkwood para aplicação do teste U de Mann-Whitney

Número da amostra mel floral (B)	% Glicose	Classe	Número da amostra mel de melato (A)	% Glicose	Classe
1	36,06	19	4	22,16	3
2	39,84	23	5	23,3	4
3	45,63	24	6	36,95	21
9	33,51	12	7	27,69	5
11	35,36	16	8	38,79	22
14	30,96	9	10	35,18	15
16	30,15	8	12	35,65	18
17	30,96	9	13	34,52	14
18	33,45	11	15	28,09	7
19	34,34	13	22	17,36	1
20	31,94	10	23	20,20	2
21	35,56	17			
24	36,58	20			
25	28,08	6			
Total		197			112

Cálculo pela Fórmula (Levin, 1987)

$$U = n_1 n_2 + \frac{n_1 (n_1 + n_2)}{2} - P_1 = 108$$

$$U = n_1 n_2 + \frac{n_1 (n_1 + n_2)}{2} - P_2 = 23$$

$U_0 = 23$ H_0 : Tratamento A = tratamento B

$U_c = 40$

Rejeitar H_0 sempre que $U_0 < U_c$

Conclusão: os resultados são estatisticamente diferentes.

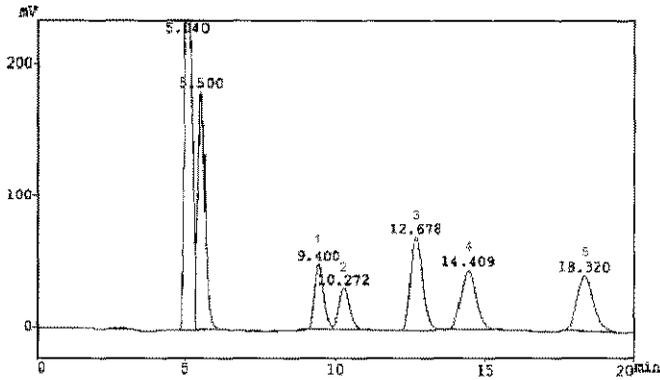


Figura 1 — CLAE de mistura dos padrões de frutose (1), glicose (2), sacarose (3), maltose (4), melezitose (5) — fase móvel acetonitrila: água 75:25, fluxo 0,7 mL/min, coluna Waters carbohydrate (NH₂ — PN 84038) 30 cm x 3,9 mm x 10 µm — detector IR.

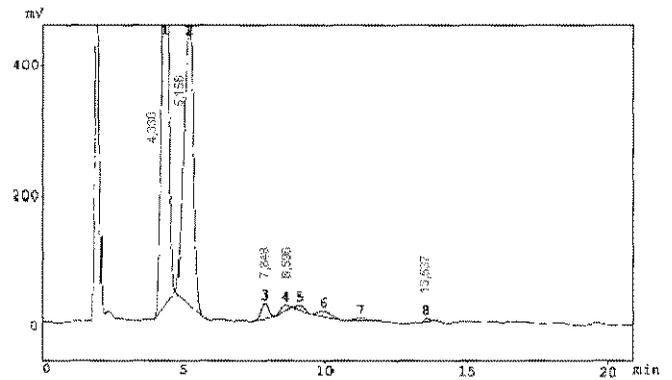


Figura 4 — CLAE de mel classificado como mel floral (amostra n° 16), 1-frutose, 2-glicose, 3-sacarose, 5-maltose, fase móvel acetonitrila: água 80:20, fluxo 2 mL/min, coluna Waters carbohydrate (NH₂ — PN 84038) 30 cm x 3,9 mm x 10 µm — detector IR

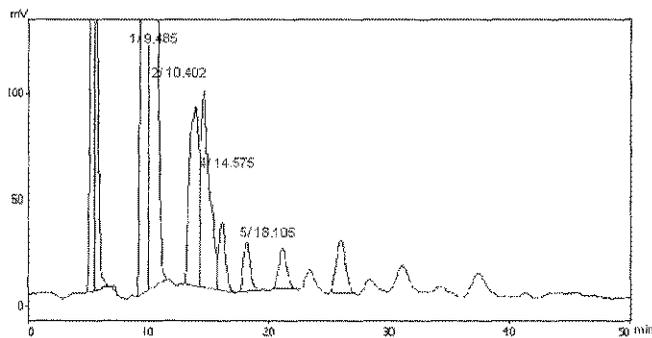


Figura 2 — CLAE de amostra de mel de melato (n° 4) — fase móvel acetonitrila: água 75:25, fluxo 0,7 mL/min, coluna Waters carbohydrate (NH₂ — PN 84038) 30 cm x 3,9 mm x 10 µm — detector IR

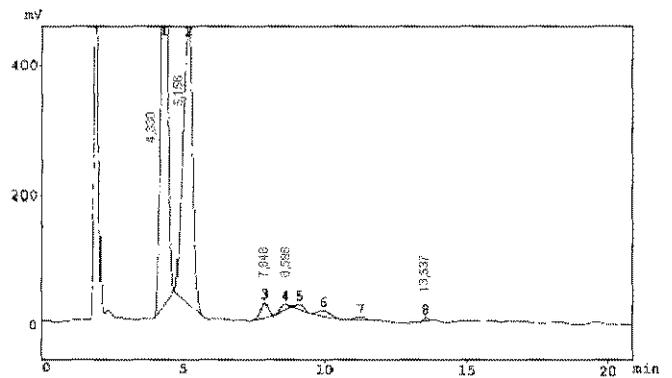


Figura 5 — CLAE de mel classificado como mel melato (amostra n° 13), 1-frutose, 2-glicose, 4-sacarose, 6-maltose, 9-erlose, fase móvel acetonitrila: água 80:20, fluxo 2 mL/min, coluna Waters carbohydrate (NH₂ — PN 84038) 30 cm x 3,9 mm x 10 µm — detector IR

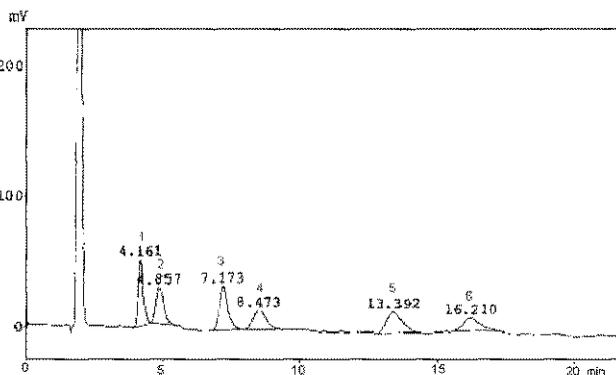


Figura 3 — CLAE de mistura dos padrões de frutose (1), glicose (2), sacarose (3), maltose (4), melezitose (5), rafinose (6), fase móvel acetonitrila: água 80:20, fluxo 2mL/min, coluna Waters carbohydrate (NH₂ — PN 84038) 30 cm x 3,9 mm x 10 µm — detector IR.

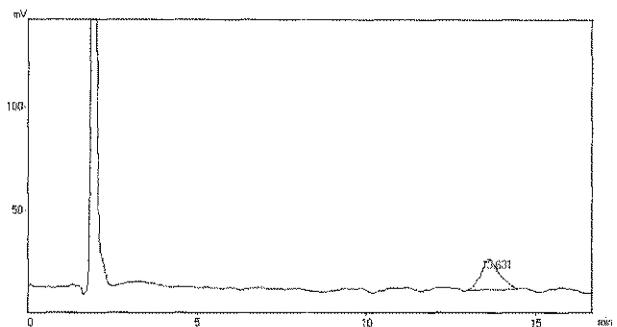


Figura 6 — CLAE de padrão de erlose, fase móvel acetonitrila: água 80:20, fluxo 2 mL/min, coluna Waters carbohydrate (NH₂ — PN 84038) 30 cm x 3,9 mm x 10 µm — detector IR

Tabela 4. Teores de erlose, melezitose e rafinose em amostras de mel determinados por CLAE

Amostra	Erlose %	Melezitose %	Rafinose %
1	0,11	ND	NE
2	0,17	ND	NE
3	0,26	ND	NE
4*	1,02	Presença	NE
5*	0,48	ND	NE
6*	3,07	ND	NE
7*	presença	ND	NE
8*	3,29	ND	NE
9	0,21	ND	NE
10*	0,34	ND	NE
11*	1,72	ND	ND
12*	ND	ND	ND
13*	1,93	ND	ND
14	0,11	ND	ND
15*	2,67	Presença	ND
16	ND	ND	ND
17	ND	ND	ND
18	0,50	ND	ND
19	ND	ND	ND
20	0,10	ND	0,31
21	0,28	ND	ND
22*	2,89	ND	ND
23*	1,48	ND	1,13
24*	3,91	ND	ND
25	0,13	ND	presença

NE = Não Efetuado

ND = Não Detectado

* Mel de melato de acordo com Kirkwood e/ou White

CONCLUSÕES

A adição de metanol à fase móvel mostrou ser um recurso eficiente na separação dos trissacarídeos melezitose e erlose.

Pelos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que a presença ou ausência de erlose em ambos os tipos de mel não é um fator de distinção entre eles pois todas as amostras analisadas independentemente de ser mel de melato ou floral, apresentaram este açúcar.

O mel de melato apresentou teor menor de glicose em relação ao mel floral, estatisticamente confirmado pelo teste U de Mann-Whitney.

Melezitose, contudo, mostrou ser apenas um possível indicador da presença do mel de melato já que, apesar de presente em apenas duas amostras deste tipo de mel, não foi detectada em nenhuma amostra de mel floral. Sua presença indica mel de melato mas sua ausência não significa que não é mel de melato.

Frutose não é indicativo de mel de melato pois os teores não variaram com o tipo do mel.

Rafinose não é indicativo de mel de melato porque foi detectada em apenas três das quinze amostras analisadas, sendo duas mel floral e uma mel de melato.

De acordo com os resultados obtidos, a metodologia de CLAE mostrou-se adequada para a determinação do teor de glicose e da presença de melezitose que são fatores determinantes na diferenciação entre mel floral e de melato.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e à Agroindústria de Alimentos (EMBRAPA) pelo suporte técnico.

CAMPOS, G. et al — Sugar determination in floral honey and honey dew from regions of Minas Gerais and Santa Catarina. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 58(222): 63-70, 1999.

ABSTRACT : Honeydew honey differs of floral honey in sugar aspect. In order to check that, eleven honeydew honey and fourteen floral honey were analysed for fructose, glucose, sucrose, melezitose, erlose and raffinose by high performance liquid chromatography with refractive index detector. Different mobile phases were tested to separate melezitose from erlose, both are trisaccharides commonly found in honey. Honeydew honey presented less glucose content than honey and erlose was present in all honeydew honey. Melezitose was not detected in floral honey samples.

KEY WORDS: honey, honeydewhoney, sugars, carbohydrates

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13. ed. Washington D.C.
2. BONVEHI, J. S. Características físico-químicas. Composición de la miel de Eucalipto (*Eucalyptus* sp.) producida en España. *Anales de Bromatologia*, XLI-1, p.41-56, 1989.
3. BACON, J. S. D. & DICKSON, B. Biochem. J. 1957, 66, 289 apud DONNER, W. L. The sugars of Honey — A review *J. Sci. Food. Agric.* v. 28, p. 443 — 456, 1977.
4. BELLIARDO, F. & BUFFA, M. Identificación of melezitose and erlose in floral and honeydew honeys. *Carbohydrate Research*, v. 71, p.335 -338, 1979.
5. CAMPOS, G. Melado no mel e sua determinação através de diferentes metodologias: Belo Horizonte, Escola de Veterinária-UFMG, 1998, 178 p. (Tese de Doutorado em Ciência Animal).
6. CHURMS, S. C. Recent progress in carbohydrate separation by high-performance liquid chromatography based on hydrophilic interaction. Review. *Journal of Chromatography*, v. 720, p. 75-91, 1996.
7. DONER, W. L. The sugars of Honey — A review *J. Sci. Food. Agric.* v. 28, p. 443 — 456, 1977.
8. KIRKWOOD, K. C., MITCHELL, T. J., SMITH, D. An examination of the occurrence of honeydew in honey. *Analyst*, v.85, p. 412-416, 1960.
9. LEVIN, J. *Estatística Aplicada a Ciências Humanas*. Editora Harbra, 2 ed. 391pp, 1987.
10. SIDDIQUI, I. R. The sugars of honey. *Adv. Carbohydr. Chem.* n. 25, p. 285 — 288, 1970.
11. STEFANELLI, C., NIOLA, I., VALLETRISCO, M. Possibilità di Diferenziazione del miele de melata da quello florale mediante HPLC. *Industria Alimentari*. v. 28, p. 138 — 140, Febbraio, 1989.
12. WHITE Jr., J.W. Detection of Honey Adulteration By Carbohydrate Analysis. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, v. 63, n.1, 1980.
13. WHITE Jr., J. W. "The Hive and the Honey Bee", R. A. Grout, ed, Dadant and Sorns, Inc., Hamilton, Illinois, 1963, p. 369. apud SIDDIQUI, I. R. The sugars of honey. *Adv. Carbohydr. Chem.* n. 25, p. 285 — 288, 1970.
14. WHITE Jr., J. W. & MAHER, J. (1953). Transglucosidation by honey invertase. *Archs. Biochem. Biophys.* 48: 360-367 apud LOW, N. H., NELSON, D. L., SPORNS, P. Carbohydrate Analysis of Western Canadian Honeys and their Nectar Sources to Determine The Origin of honey oligosaccharides. *Journal of Apicultural Research*, v.27, n.4, p. 245-251, 1988.

Recebido para publicação em 11.03.1999