

MÉTODOS QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS DE DETERMINAÇÃO DE 5-HIDROXIMETILFURFURAL EM DIFERENTES TIPOS DE MEL

Ana Carolina Ferreira¹, Renato C. F. Neves¹, Otávio Augusto Martins^{2*}

¹Departamento de Exatas, Faculdades Integradas Regionais de Avaré, Fundação Regional Educacional de Avaré, Avaré, São Paulo, Brasil; ²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Cidade de Botucatu, São Paulo, Brasil. *E-mail: oamartins2008@yahoo.com.br

Resumo – O presente trabalho consistiu em avaliar os diferentes métodos quantitativos e qualitativos de determinação de HMF em diferentes tipos de méis. As amostras de méis de diferentes tipos foram de laranja, eucalipto e mel com própolis. O método qualitativo utilizado para verificar a presença de altas concentrações de HMF foi a Reação de Fiehe. Para quantificar o teor de HMF foram utilizados os métodos de Winkler e de White. O resultado demonstrou que as análises quantitativas (Métodos de Winkler e de White) não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) nos teores de HMF devido a elevada variabilidade. Também demonstrou, através de uma tendência percentual, que o mel do tipo silvestre apresentou teor de HMF superior a 40 mg/kg. Concluímos que os métodos quantitativos (Métodos de Winkler e de White) são adequados para determinar o teor de HMF e que o método qualitativo (Reação de Fiehe) não apresentou resultados precisos para sugerir altas concentrações de HMF.

Palavras-chave – Métodos, 5-hidroxiacetilfurfural, mel.

Abstract – The present work was to evaluate the different qualitative and quantitative methods of determination of HMF in different types of honeys. The honey samples of different types were orange, eucalyptus and honey with propolis. The qualitative method used to verify the presence of high concentrations of HMF was the reaction Fiehe. To quantify the amount of HMF were used methods of Winkler and White. The result showed that the quantitative analysis (Methods Winkler and White) showed no statistically significant difference ($p > 0.05$) in the levels of HMF due to high variability. Also shown, by means of a trend percentage that the wild-type showed honey HMF content greater than 40 mg/kg. We conclude that quantitative methods (Methods Winkler and White) are suitable to determine the content of HMF and the qualitative

method (Reaction Fiehe) did not present results accurate to suggest high concentrations of HMF.

Key- Words – methods, 5-hydroxymethylfurfural, honey.

I. INTRODUÇÃO

O mel é um produto alimentício natural produzido pelas abelhas melíferas a partir do néctar das flores ou secreções de plantas, cujas abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colméia (BRASIL, 2000; LEMOS et al., 2010).

Sobre sua composição, pode-se dizer que o mel é uma solução concentrada de açúcar, com predominância de glucose e frutose, contendo ainda uma mistura complexa de outros hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais (cálcio, cobre, ferro, magnésio, fósforo, potássio, entre outros), substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen, podendo conter ainda, cera de abelha, procedente do processo de extração (BRASIL, 2000; SILVA et al., 2008).

É possível ver o crescente consumo do mel nas últimas décadas, pois além de ser apreciado por seu sabor característico e seu considerável valor nutritivo, o homem utiliza esse produto como medicamento, devido às suas propriedades antimicrobianas e antissépticas. Sendo assim, a preocupação com a qualidade desse produto estimula a procura de procedimentos eficientes para avaliar a qualidade do mel. Um dos principais parâmetros são os teores de contaminantes (antibióticos, pesticidas, metais pesados), origem floral, área de produção e tempo de prateleira (SILVA et al., 2008, LEMOS et al., 2010).

Estudos e pesquisas mostram que o principal parâmetro utilizado para conferir o tempo de estocagem (prateleira) e aquecimento indesejável são os teores de 5-hidroximetilfurfural (HMF) (LEMOS et al., 2010).

O HMF é o resultado da transformação dos açúcares (frutose e glucose) encontrados naturalmente no mel. Segundo Gomes (2009), tal processo baseia-se numa sequência de reações de desidratação das hexoses em meio ácido, como ilustrado na Figura 1.

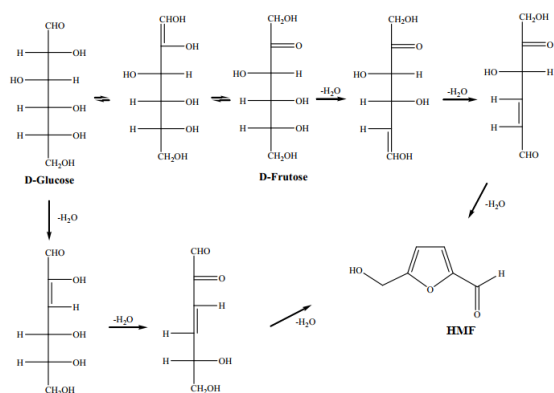


Figura 1 – Desidratação da frutose e da glucose em 5-hidroximetilfurfural (HMF) (Fonte: GOMES, 2009).

A presença no mel de açúcares simples e água em meio ácido fornece condições favoráveis a formação desse composto. Esse processo de formação é acelerado com a elevação de temperatura (<30°C) e a concentração de HMF tende a aumentar de acordo com o tempo de estocagem. Portanto, tal molécula passou a ser utilizada como indicador de aquecimento e longo tempo de estocagem, processamento inadequado e até possível adulteração com xaropes (ALVIM, 2004; MELO et al., 2008; SILVA et al., 2008; LEMOS et al., 2010).

O estudo do HMF em alimentos é de grande importância e tem recebido atenção por se tratar de um composto com atividade citotóxica, genotóxica, mutagênica e carcinogênica (SILVA et al., 2008; LEMOS et al., 2010).

Mesmo sabendo que o aquecimento do mel favorece a formação do HMF, alguns produtores e/ou estabelecimentos usam esse procedimento para reduzir a viscosidade, impedir a cristalização, fermentação do produto e também para destruir micro-organismos contaminantes.

Diferentes composições e diferentes valores de pH do mel também podem influenciar nos níveis de HMF (SILVA et al., 2008).

O *Codex Alimentarius* e a União Européia estabeleceram um nível máximo de 40 mg.Kg⁻¹, exceto para méis provenientes de países tropicais (80 mg.Kg⁻¹), pois nos países mais quentes, o teor de HMF tende a aumentar mais rapidamente durante o armazenamento. A legislação brasileira estabelece o limite para HMF de 60 mg.Kg⁻¹ (BRASIL, 2000; SIVA et al., 2008).

Existem alguns métodos para a determinação de HMF em mel, de caráter qualitativo e quantitativo. O método de Fiehe é uma prova qualitativa, onde o HMF existente na amostra reage com a resorcina em meio ácido, apresentando um composto de condensação de coloração vermelha (LANARA, 1981)

Em análise quantitativa, temos a Reação de Winkler, que consiste na reação do ácido barbitúrico em meio ácido, que se condensa com o HMF, formando um composto também de coloração vermelha (LANARA, 1981). A outra análise quantitativa muito utilizada pelos laboratórios de ensaios é o Método White (método 980.23 da AOAC) (AOAC, 1998; RODRIGUES, 2005; SILVA et al., 2008).

A *International Honey Commission* e a *European Honey Commission* recomendam oficialmente, três métodos quantitativos de análises: dois de caráter espectrofotométrico (WHITE e WINKLER) que geralmente são usados para análises de rotina, e um terceiro método de caráter cromatográfico, o HPLC, sigla em inglês para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Esse último é um método prático e simples, mas ainda não é recomendado pela legislação brasileira (ZAPPALÀ et al., 2004; SILVA et al., 2008).

Com base nessas informações, o presente trabalho tem como objetivo avaliar os diferentes métodos quantitativos e qualitativo de determinação de HMF em diferentes tipos de méis.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

As amostras de méis de diferentes tipos foram de laranjeira, eucalipto e mel com própolis. As amostras foram provenientes da região sudoeste do Estado de São Paulo, Brasil. As

amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Química e Bioquímica das Faculdades Integradas Regionais de Avaré na Fundação Regional Educacional de Avaré, cidade de Avaré, São Paulo, Brasil. Os méis ficaram armazenados ao abrigo da luz e do sol, para que não houvesse qualquer tipo de alteração das amostras. Foram analisadas setenta e cinco amostras de méis.

Análise qualitativa de HMF – Reação de Fiehe

Pesou-se 5 gramas de mel em um béquer de vidro de 50 mL. Adicionou-se 5 mL de éter etílico, homogeneizando com o auxílio de bastão de vidro. A camada etílica foi transferida para uma cápsula de porcelana. Esperou evaporar e adicionou 0,5 mL de solução clorídrica de resorcina a 1%. Interpretação da reação: a presença de coloração vermelha indicou a presença de alta concentração de HMF.

Análise quantitativa de HMF – Reação de Winkler

Pesou-se 5 g de amostra em um balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com água destilada. Tal solução foi usada imediatamente. Separaram-se dois tubos de ensaio. Em um deles, foi adicionado 2 mL da solução de mel, 5 mL de solução de para-toluidina (g/10 mL) e 1 mL de solução de ácido barbitúrico (0,5 g/100 mL). No outro tubo (considerado branco), colocou-se 2 mL da solução de mel, 5 mL de solução de para-toluidina (g/10 mL) e 1 mL de água destilada. A sequência da colocação dos reagentes foi feita dentro de 2 minutos. Aguardou-se 4 minutos e realizou-se a leitura de absorvância em espectrofotômetro a 550 nm.

Fórmula:

$$\text{mg de HMF/kg} = 190 \times \text{absorvância/espessura da cubeta (1 cm de caminho óptico)}$$

Análise quantitativa de HMF – Reação de White

Pesou-se 5,0 g de amostra de mel em um béquer de 50 mL e com água destilada, transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL. Foi adicionado 0,5 mL da solução de Carrez I (3 g de ferrocianeto de potássio/20 mL) e homogeneizou-se. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL da solução de Carrez II (3 g de acetato de zinco/20 mL), e

completou-se o volume do balão com água destilada. Esse volume foi filtrado em papel de filtro, descartando os primeiros 10 mL. Foram pipetados 5 mL do resto do filtrado em cada um dos dois tubos de ensaio. Adicionou-se 5 mL de água destilada em um dos tubos (amostra) e 5 mL da solução de bissulfito de sódio a 2% no outro tubo (referência). Esses tubos foram levados ao banho de ultrassom por 3 minutos, para sua total homogeneização, e em seguida, foi determinado a absorvância da amostra em espectrofotômetro nos comprimentos de onda a 284 nm e a 336 nm em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Fórmula:

$$\text{mg de HMF/100 g} = (A_{284} - A_{336}) \times 14,97 \times 5/\text{massa da amostra.}$$

Análise estatística

O estudo estatístico das variáveis foi realizado através da ANOVA e complementado com o teste de comparações múltiplas de Tukey para contraste entre médias dos tratamentos. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão da média com 5% de significância.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 01 demonstra que os tipos de méis (laranjeira, silvestre e mel com própolis) e as análises quantitativas (reações de Winkler e de White) não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) nos teores de HMF devido a elevada variabilidade.

Na Tabela 02 apresenta uma tendência de valores altos de HMF (≥ 40 mg/kg) em porcentagem nos tipos de méis (silvestre e mel com própolis) e de determinações espectrofotométricas (Winkler e White). Entretanto, o mel de laranjeira apresentou uma tendência contrária dos demais tipos de méis. Na análise qualitativa (Reação de Fiehe), a positividade foi maior para o mel silvestre comparado com os demais tipos de méis (Tabela 03).

Tabela 01. Média \pm desvio padrão de HMF (mg/kg) através das determinações espectrofotométricas UV/Visível em diferentes floradas de méis (laranjeira, silvestre e mel com própolis). Análise estatística e teste de Tukey.

Análise quantitativa	Tipo de mel (mg/kg)		
	Laranjeira	Silvestre	Mel com própolis
Reação de Winkler	20,18 \pm 2,60 Aa ¹	186,60 \pm 92,75 Aa	150,61 \pm 50,28 Aa
Reação de White	81,04 \pm 62,16 Aa	147,35 \pm 75,84 Aa	116,63 \pm 51,05 Aa

¹Análise estatística (Anova) e teste de Tukey ($p>0,05$).

Tabela 02. Porcentagem (%) de valores < 40 mg/kg e ≥ 40 mg/kg de HMF em diferentes tipos de méis (laranjeira, silvestre e mel com própolis) nas reações de Winkler e White.

Análise quantitativa	< 40 mg/kg HMF			≥ 40 mg/kg HMF		
	L ¹	S ²	MP ³	L ¹	S ²	MP ³
Reação de Winkler	100%	20%	0%	0%	80%	100%
Total	40%			60%		
Reação de White	80%	20%	20%	20%	80%	80%
Total	47%			53%		

¹ Mel de laranjeira, ² Mel silvestre, ³ Mel com própolis.

Tabela 3. Porcentagem (%) de amostras de méis positivas e negativas da análise qualitativa de HMF (reação de Fiehe).

Reação de Fiehe	Tipos de méis (%)			Total de amostra (%)
	Laranjeira	Silvestre	Mel com própolis	
Positivo	0	33	0	11
Negativo	100	67	100	89

No trabalho, constatamos que as análises quantitativas pelo espectrofotômetro UV/Visível (Reações de Winkler e White) não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) nos valores de HMF mesmo com alta variabilidade. Tal constatação condiz com a recomendação de

metodologias oficiais pela *International Honey Commission* e a *European Honey Commission* de caráter espectrofotométrico (White e Winkler) (ZAPPALÁ et al., 2004; SILVA et al., 2008).

Para a análise da concentração de HMF em diferentes tipos de méis (laranjeira, silvestre e mel com própolis) neste trabalho, consideramos os valores de normalidade recomendados pelo *Codex Alimentarius* e a pela União Européia que estabeleceram um nível máximo de 40 mg/Kg. Tal parâmetro foi adotado porque o produto mel é exportado para muitos países europeus (BRASIL, 2000; SIVA et al., 2008).

O mel do tipo silvestre apresentou uma tendência de valores superiores de 40 mg/kg de HMF comparado com os demais tipos de méis. Esses valores altos de HMF ocorreram pelo tempo de armazenagem e/ou do aquecimento do produto. Lemos et al. (2010) relataram que a alteração do HMF ocorre com o aquecimento com altas temperaturas e pelo tempo de validade do produto. Provavelmente, o mel do tipo silvestre analisado foi exposto ao calor elevado por um tempo indeterminado durante a produção.

A análise qualitativa do HMF (reação de Fiehe) confirmou que o mel do tipo silvestre apresentou um alto índice positivo. Entretanto, essa análise não é robusta e precisa. Conjuntamente, requer outras determinações quantitativas para precisar o teor de HMF em méis.

IV. CONCLUSÃO

Com base neste trabalho, podemos concluir que:

- Os métodos quantitativos (Reações de Winkler e de White) são adequados para determinar o teor de HMF.
- O método qualitativo (Reação de Fiehe) não apresentou resultados precisos para sugerir altas concentrações de HMF.
- O mel do tipo silvestre apresentou um teor elevado de HMF comparado com os demais tipos de méis analisados.

V. REFERÊNCIAS

1. AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of official analytical chemistry**. 16^a Ed. Maryland, 1998.
2. ALVIM, N. C. **O mel e suas características**. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. 2004.
3. BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. Instrução Normativa Nº 11 de 20 de outubro de 2000.
4. BRASIL. LANARA - **Métodos Analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Ministério da Agricultura, Brasília, DF. 1981.
5. GOMES, M. D. **Síntese de poliésteres a partir do ácido 2,5 furanodicarboxílico**. Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestre em Materiais Derivados de Recursos Renováveis. Universidade de Aveiro – Departamento de Química. 2009.
6. LEMOS, G. S.; Santos, J. S.; SANTOS, M. L. P. **Validação do método para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto**. Química Nova. 2010. 33 (8): 1682-1685.
7. MELO, Z. F. N. et al. **Estudos das alterações do hidroximetilfurfural e da atividade diastásica em méis de abelha em diferentes condições de armazenamento**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande. 2003. 5 (1): 89-99.
8. RODRIGUES, A. E. et al. **Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no estado da Paraíba**. Ciência Rural. 2005. 35 (5): 116-1171.
9. SILVA, S. J. N. et al. **Determinação de 5-hidroximetilfurfural em méis utilizando cromatografia eletrocínética capilar micelar**. Ciên. Tecnol. Aliment., Campinas. 2008. 28 (Supl.): 46-50.
10. ZAPPALA, M. **Methods for the determination of HMF in honey: a comparison**. Food Control. 2004. 16 (2005): 273-277.