

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ORIGEM
GEOGRÁFICA DE MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO DO BRASIL
UTILIZANDO A RAZÃO ISOTÓPICA DO C, H, O e N**

SILVIA JANINE VEIGA

Botucatu – SP
Junho de 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ORIGEM
GEOGRÁFICA DE MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO DO BRASIL
UTILIZANDO A RAZÃO ISOTÓPICA DO C, H, O e N**

SILVIA JANINE VEIGA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária para obtenção
do título de mestre.

Orientador: Prof. Ass. Dr. José Paes
de Almeida Nogueira Pinto

Junho de 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Veiga, Silvia Janine.

Detecção de adulteração e determinação da origem geográfica de méis de abelhas sem ferrão do Brasil utilizando a razão isotópica do C, H, O e N / Silvia Janine Veiga. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Paes de Almeida Nogueira Pinto
Capes: 50505009

1. Mel. 2. Isótopos estáveis. 3. Melipona. 4. Abelha sem ferrão - Criação - Brasil. 5. Alimentos - Adulteração e inspeção.

Palavras-chave: Isótopos estáveis; Mel; Meliponicultura.

Nome da autora: Silvia Janine Veiga

Título: DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA ORIGEM GEOGRÁFICA DE MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO DO BRASIL UTILIZANDO A RAZÃO ISOTÓPICA DO C, H, O e N

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto
Presidente e Orientador
Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública
FMVZ – UNESP Botucatu

Prof. Dr. Ricardo Seiti Yamatogi
Membro
Departamento de Veterinária
DVT – UFV Viçosa

Dr. Jean Guilherme Fernandes Joaquim
Membro
Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
UTRA - Botucatu

Data do exame: 24 de Abril de 2017.

DEDICATÓRIA

Ao saudoso Prof. Dr. Carlos Ducatti, pelos questionamentos, ensinamentos, pela parceria e acima de tudo por me incentivar e mostrar que é possível seguir em frente e que sempre existe uma saída independente do obstáculo.

AGRADECIMENTOS

A minha família, por ser minha base, meu porto seguro, por demonstrar a todo tempo o quanto me amam e mesmo distante todos esses anos continuar me apoiando. Agradeço a minha mãe em especial, por ser o meu maior exemplo, por ter lutado a vida toda e me ensinado que através do estudo e esforço não haverá barreiras que me impeçam de crescer.

Ao Marcelo, o meu grande amor, pelo simples fato de existir, por mesmo depois de tantos anos ser o motivo pelo qual meu coração acelera e o único que consegue me acalmar pelo simples fato de ouvir sua voz.

Aos amigos, por terem feito a diferença em minha vida durante todos esses anos e por participarem ativamente no meu crescimento quanto pessoa e pesquisadora.

Ao meu orientador Prof. Paes, pela confiança, pelo apoio, por me receber e me ajudar mesmo na correria dos dias mais tumultuados, por ser a pessoa que sempre tive orgulho de chamar de orientador.

Ao prof. Ricardo Orsi, pela sua gentileza e disponibilidade em todos os momentos.

Ao prof. Vladimir, por ter me oferecido sua ajuda e suporte em um momento tão difícil mesmo sem me conhecer muito bem.

Aos produtores e cooperativas que disponibilizaram as amostras de méis de abelhas sem ferrão para essa pesquisa.

A toda equipe do CIE e do SOAP, pela ajuda, companheirismo, amizade genuína e pela acolhida sem exigir nada em troca.

A UNESP e todos os professores que tive a honra de conhecer, por terem mudado a minha vida.

A CAPES por conceder a bolsa de mestrado.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Classificação zoológica das abelhas sem ferrão.....	4
Tabela 2-	Principais espécies de abelhas sem ferrão criadas para produção de mel no Brasil.....	6
Tabela 3-	Métodos de colheita do mel de abelhas sem ferrão.....	7
Tabela 4-	Parâmetros físico-químicos para mel de abelhas sem ferrão e <i>Apis mellifera</i>	8
Tabela 5-	Isótopos dos elementos leves CHON'S (Hidrogênio, Carbono, Nitrogênio, Oxigênio e Enxofre).....	12
Tabela 6-	Composições Isotópicas dos Padrões de Referência Internacional.....	13
Tabela 7-	Características dos locais de coleta das amostras de méis de abelhas sem ferrão.....	31
Tabela 8-	Valores isotópicos ($\delta^{13}\text{C}$) do mel e sua respectiva proteína e designação da qualidade do mel de abelhas sem ferrão das cinco regiões brasileiras.....	35
Tabela 9-	Distribuição de valores [$\delta^{13}\text{C}_{\text{prot}}$ - $\delta^{13}\text{C}_{\text{mel}}$] entre grupos.....	35
Tabela 10-	Orientações de referência para $\delta^{13}\text{C}$ de méis de abelhas sem ferrão.....	36
Tabela 11-	Classificação das amostras de méis de abelhas sem ferrão do Brasil em cinco diferentes regiões e percentual de observações corretamente classificadas.....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Diagrama dos objetivos da meliponicultura.....	5
Figura 2-	Esquema de um espectrômetro de massa de razão isotópica....	15
Figura 3-	Locais de coleta das amostras de méis de abelhas sem ferrão nas cinco regiões do Brasil.....	30
Figura 4-	Valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ em amostras de méis de abelhas sem ferrão das cinco regiões do Brasil.....	37
Figura 5-	Análise de componentes principais de méis de abelhas sem ferrão das cinco regiões do Brasil.....	38

SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO.....	2
REVISÃO DE LITERATURA.....	4
– Abelhas sem ferrão: caracterização e qualidade do mel.....	4
– Isótopos estáveis ambientais e a espectrometria de massas de razão isotópica.....	11
– Discriminação isotópica pelas plantas e pesquisa de isótopos em méis.....	15
OBJETIVOS.....	20
REFERÊNCIAS.....	21
CAPÍTULO 2 – Méis de abelhas sem ferrão do Brasil: Detecção de adulteração e determinação da origem geográfica utilizando análise de isótopos estáveis ambientais (C, N, H e O).....	26
INTRODUÇÃO.....	28
MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
– Amostras.....	30
– Reagentes.....	31
– Extração da proteína do mel.....	32
– Pesagem e análise isotópica.....	32
– Análise estatística.....	34
RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO.....	39
CONCLUSÃO.....	43
REFERÊNCIAS	44
FOOD CHEMISTRY - Guide for Authors	47

VEIGA, S.J. **Detecção de adulteração e determinação da origem geográfica de méis de abelhas sem ferrão do Brasil utilizando a razão isotópica do C, H, O e N.** Botucatu, 2017. 78p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

O trabalho teve como objetivo identificar adulterações e a origem geográfica dos méis de abelhas nativas sem ferrão das cinco regiões brasileiras por meio da análise isotópica do carbono, nitrogênio, hidrogênio e oxigênio, e assim, tentar estabelecer um parâmetro para possível autenticação destes produtos. Foram utilizadas 50 amostras de méis, dez amostras de cada região, Norte (Manaus), Nordeste (Mata de São João), Centro-Oeste (Sinop), Sudeste (São José do Rio Preto) e Sul (Guaraqueçaba). As amostras foram analisadas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências - UNESP/Botucatu. Os dados dos quatro elementos foram gerados por meio de análise de componentes principais (ACP) e análise discriminante (AD) pelo software estatístico Minitab[®] 17. Análises descritivas e ANOVA foram realizadas pelo programa GraphPad Prism[®] 5.01. Através da análise isotópica do carbono observou-se que das amostras de méis de abelhas sem ferrão coletadas nas cinco regiões do Brasil, 80% foram consideradas puras por conter menos de 7% de adulterante proveniente de plantas C₄. Apresentaram-se adulteradas 10% das amostras da região Norte, 30% das amostras da região Centro-Oeste e 60% das amostras da região Sul. As amostras da região Nordeste e Sudeste não apresentaram méis fraudados. Por meio da ACP e AD, 98% das amostras foram classificadas corretamente conforme seu Estado de origem. A análise de isótopos estáveis tem sido utilizada por vários países e pesquisas demonstram a eficiência da técnica para detecção de fraudes em mel e para determinação da origem geográfica de várias matrizes alimentares.

Palavras-chave: Isótopos estáveis, meliponicultura, fraude, rastreabilidade.

VEIGA, S.J. **Adulteration detection and geographical origin determination of honey from stingless bees in Brazil utilizing C, H, O and N ratio.** Botucatu, 2017. 78p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The project aimed to characterize honey from native stingless bees from five Brazilian regions using stable isotopic ratio (carbon, nitrogen, hydrogen and oxygen) and therefore, try to establish a parameter for a possible authentication of these products. 50 honey samples were used, 10 from each region, North (Manaus), Northeast (Mata de São João), Midwest (Sinop), Southeast (São José do Rio Preto) and South (Guaraqueçaba). The samples were analyzed at the Stable Isotope Center of the Institute of Biosciences - UNESP / Botucatu. After analyzing four elements, the generated data were analyzed by Principal Component Analysis (PCA) and Discriminant analysis (DA) using the statistical software Minitab 17. The descriptive analyses and ANOVA were done by GraphPad PRISM® 5.01 program. The carbon isotope analysis showed that out of the 50 stingless bee honey samples collected in five regions of Brazil, 80% were considered pure as they contained less than 7% of adulterants from C4 plants. 10% of the samples from the northern region, 30% from the Midwest, and 60% from the South were tampered. The samples from the Northeast and Southeast did not present defrauded honey. Through ACP and AD, 98% of the samples were classified correctly according to their native state. The stable isotope analysis has been utilized by several countries and research studies have shown the technical efficiency in honey fraud detection and determination of the geographical origin of various food matrices.

Keywords: Stable isotopes, beekeeping, fraud, traceability.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Produto alimentício muito apreciado, o mel pode ser alvo de freqüentes adulterações devido ao seu alto valor agregado, sendo comum encontrar imitações em estabelecimentos comerciais. Assim também ocorre com o mel de meliponíneos, cuja venda de falsificações é facilitada pelo desconhecimento de muitos de seus compradores do sabor original.

As adulterações mais comuns resumem-se à adição de açúcar comercial ou xaropes, sendo que as detecções das mesmas podem ser feitas pela quantificação de hidroximetilfurfural (HMF). Esse composto, resultante da degradação da hexose, pode ser encontrado no mel natural em pequena quantidade. A sua presença em níveis maiores pode ser resultado de fraude por adição de açúcar comercial ou açúcar invertido rico em HMF (ARAUCO *et al.*, 2008). À medida que novos tipos de adulterações (adição de HFCS – High Fructose Corn Syrup) foram ocorrendo, métodos analíticos foram se desenvolvendo com o intuito de detectá-los, como a análise da variabilidade natural dos isótopos estáveis do carbono (WHITE JUNIOR e DONER, 1978), tarefa cada vez mais difícil, dado à sofisticação cada vez maior observada nas adulterações.

É importante destacar que a composição exata de qualquer mel depende, principalmente, das fontes vegetais das quais ele é derivado, mas também do clima, solo e outros fatores, e dois méis nunca são iguais (CRANE, 1983), estando suas características diretamente relacionadas ao local de produção. Este fato dificulta a proposição de uma única norma para todo o Brasil, país rico em espécies de meliponíneos e caracterizado por um grande mosaico de habitats e formações vegetais (VILLAS-BOAS e MALASPINA, 2005).

Segundo Salomé (2009), as exigências de mercado para produtos apícolas, principalmente aqueles que são exportados, incluem uma série de controles sugeridos pelos compradores, como a certificação da produção e monitoramento de análises. No momento em que o produto não se encontra em conformidade com as exigências do comprador, a sua comercialização é dificultada. Exemplo disso ocorreu durante o embargo europeu ao mel brasileiro em 2006 motivado pela falta de controle de qualidade com análises

laboratoriais e presença de resíduos, como glúten (glicose), no alimento produzido pelas abelhas (FERNANDES, 2006). A ideia de regionalização das áreas de produção brasileira começou então a ser discutida, a exemplo do que ocorreu com a pecuária para contornar os embargos à carne de estados livres da febre aftosa.

São escassos os conhecimentos sobre as características físico-químicas específicas dos méis de todo o país. Os parâmetros propostos neste trabalho visam criar um perfil dos méis de abelhas sem ferrão das cinco regiões do Brasil englobando o mel de todas as espécies e habitats e estabelecer uma metodologia capaz de rastreá-lo, conferindo-lhe uma “impressão isotópica”. Assim, poderiam ser minimizados e/ou evitados os problemas com o embargo do produto. Por outro lado, a tomada de decisões seria facilitada, visto a possibilidade de identificação do problema de forma rápida e eficiente, com o emprego de uma técnica analítica capaz de assegurar a qualidade e pureza do produto. Como efeitos indiretos, teríamos ainda a valorização da meliponicultura e o incentivo ao seu crescimento.

REVISÃO DE LITERATURA

Abelhas sem ferrão: caracterização e qualidade do mel

Meliponicultura é a criação racional de abelhas nativas sem ferrão também conhecidas como Meliponíneos. Estas abelhas pertencem à família Apidae, que se subdivide em quatro subfamílias: Apinae, Meliponinae, Bombinae e Euglossinae. Os Meliponinae, por sua vez, se dividem em duas tribos: Meliponini e Trigonini (KERR *et al.*, 1996). A classificação zoológica completa destas abelhas pode ser visualizada na Tabela 1:

Tabela 1. Classificação zoológica das abelhas sem ferrão.

Reino:	Animália
Classe:	Insecta
Ordem:	Hymenoptera
Subordem:	Apocrita
Superfamília:	Apoidea
Família:	Apidae
Subfamília:	Meliponinae
Tribos:	Meliponini e Trigonini

Fonte: Nogueira-Neto (1997).

Existem 52 gêneros dentro da subfamília Meliponinae com um total de mais de 300 espécies espalhadas em todo o mundo (KERR *et al.*; 1996). A Tabela 2 lista as principais espécies criadas nas cinco regiões do Brasil para a produção de mel. Os meliponíneos ocorrem em grande parte das regiões tropicais da Terra, ocupando praticamente toda a América Latina e África, além do sudeste asiático e norte da Austrália. Entretanto, é nas Américas que a cultura de criação destes insetos se manifesta de forma mais intensa (VILLAS-BÔAS, 2012).

Os objetivos da criação de abelhas sem ferrão são vários. A Figura 1 indica os principais objetivos da meliponicultura:

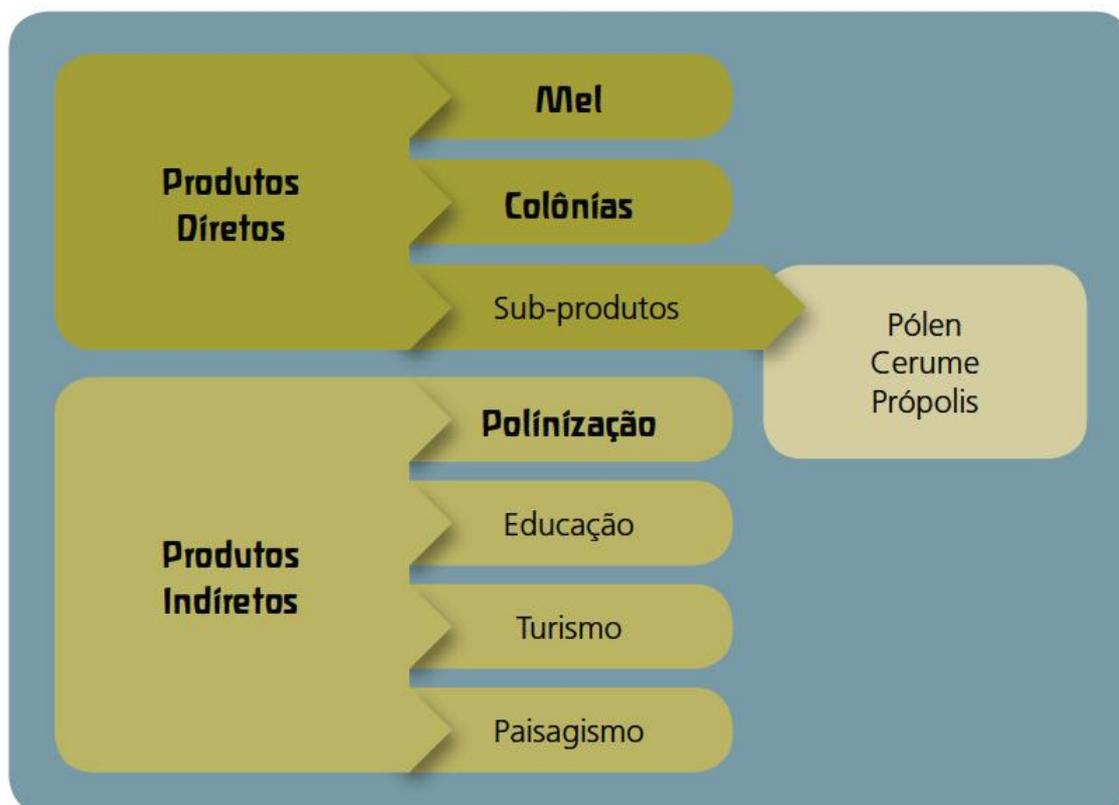


Figura 1. Diagrama dos objetivos da meliponicultura.
Fonte: Villas-Bôas (2012)

Segundo Villas-Bôas (2012), antes da chegada da abelha *Apis mellifera* no continente americano, ou da exploração da cana para fabricação de açúcar, o mel das abelhas nativas caracterizava-se como principal adoçante natural. Muito do conhecimento tradicional acumulado pela população nativa foi gradativamente assimilado pelas diferentes sociedades pós-colonização, tornando a domesticação das abelhas sem ferrão uma tradição popular que se difundiu principalmente nas regiões norte e nordeste do Brasil. A herança indígena presente na lida com as abelhas pode ser evidenciada pelos nomes populares de muitas espécies, como Jataí, Uruçu, Tiúba, Mombuca, Irapuá, Tataíra, Jandaíra, Guarupu, Manduri e tantas outras.

Tabela 2. Principais espécies de abelhas sem ferrão criadas para produção de mel no Brasil.

REGIÃO	NOME CIENTÍFICO	NOME POPULAR	ESTADOS
NORTE	<i>Melipona compressipes</i>	Jupará, Jandaira, Jandaira-Preta	AC, AM, AP, PA, RO, RR, TO
	<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba, Uruçu-Cizenta	PA, TO
	<i>Melipona seminigra</i>	Uruçu-Boca-de-Renda, Jandaíra-Amarela	AM, PA
	<i>Scaptotrigona sp.</i>	Canudo	AC, AM, AP, PA, RO, RR, TO
NORDESTE	<i>Melipona asilvai</i>	Monduri, Rajada	AL, BA, CE, PB, PE, PI, RN, SE
	<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba	MA, PI
	<i>Melipona mandacaia</i>	Mandaçaia	AL, BA, CE, PB, PE, PI, RN, SE
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	AL, BA, PB, PE, SE
	<i>Melipona scutellaris</i>	Uruçu, Uruçu-Nordestina, Uruçu-Verdadeira	AL, BA, CE, PB, PE, RN, SE
	<i>Melipona subnitida</i>	Jandaíra, Uruçu	AL, BA, CE, MA, PB, PE, PI, RN, SE
CENTRO-OESTE	<i>Melipona compressipes</i>	Uruçu, Jandaíra	GO, MS, MT
	<i>Melipona rufiventris</i>	Uruçu-Amarela	GO, MS, MT
	<i>Melipona seminigra</i>	Uruçu	MT
	<i>Scaptotrigona sp.</i>	Canudo	GO, MS, MT
	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	GO, MS, MT
SUDESTE	<i>Melipona bicolor</i>	Guarupú, Guaraipo	ES, MG, RJ, SP
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	ES, MG, RJ, SP
	<i>Melipona rufiventris</i>	Uruçu-Amarela	MG, SP
	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	ES, MG, RJ, SP
SUL	<i>Melipona bicolor</i>	Guarupú, Guaraipo	PR, RS, SC
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	PR, RS, SC
	<i>Melipona mondury</i>	Monduri	PR, RS, SC
	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	PR, RS, SC

Fonte: Villas-Bôas (2012).

Entre as abelhas indígenas sem ferrão, a Jataí (*Tetragonisca angustula*), pode ser considerada a mais conhecida no Brasil, produzindo um dos méis mais consumidos e alcançando elevado preço em estabelecimentos comerciais. Esta abelha possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo em

todo território nacional e, apesar da baixa quantidade de mel produzido por colônia (aproximadamente 1 litro de mel por ano), já vem sendo manejada há muito tempo em diversas regiões do país, caracterizando-se como espécie protagonista da meliponicultura no sudeste e sul. Muitos produtores chegam a ter centenas de colmeias de Jataí (VILLAS-BÔAS e MALASPINA, 2005).

As abelhas sem ferrão guardam o mel dentro dos seus ninhos, no interior de potes feitos de cerume. Existem diversas maneiras de colher o mel destas abelhas (Tabela 3). O método mais higiênico consiste em abrir bem os potes de mel que vão ser objeto de extração, recolhê-lo por meio de um instrumento adequado e depositá-lo em seguida num recipiente devidamente limpo e esterilizado (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Tabela 3. Métodos de colheita do mel de abelhas sem ferrão.

MÉTODO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Compressão/Perfuração	Simplicidade, acessibilidade, baixo custo e eficiência	Potencial de contaminação e possibilidade de influência do pólen no aroma do mel
Sucção com seringas	Simplicidade, acessibilidade, baixo custo e eficiência	Pouca eficiência
Bombas elétricas de sucção	Eficiência, assepsia e compatibilidade com grandes recipientes de coleta	Custo relativamente elevado, dependência de energia elétrica e fluxo contínuo e acelerado, o que proporciona oxigenação do mel
Bombas de sucção manual	Custo intermediário, assepsia, compatibilidade com grandes recipientes de coleta e independência de energia elétrica.	Eficiência intermediária

Fonte: Villas-Bôas (2012).

No que se refere aos produtos das abelhas, o Brasil dispõe apenas de legislação para a comercialização do mel das abelhas *Apis mellifera* que é a Instrução Normativa Nº 11, de 20 de outubro de 2000

Um dos maiores desafios daqueles que produzem mel de meliponíneos é garantir estabilidade e longevidade, ou seja, tempo de validade, a um produto muito suscetível à fermentação. O mel de abelhas sem ferrão tem elevado teor de umidade, que costuma variar de 25% a 35% de sua composição (NOGUEIRA-NETO, 1997). É importante lembrar que as abelhas *Apis mellifera* naturalmente produzem mel com baixa umidade, próximo ou abaixo de 20%. Esta imposição, portanto, não deve ser aplicada ao mel das abelhas nativas sem ferrão.

Atualmente vem sendo aprovado pelo mercado consumidor o mel fermentado (ou maturado) como produto final por possuir um sabor mais ácido e com leves traços alcoólicos. Pesquisadores constataram que depois de algum tempo de armazenamento, a fermentação do mel se estabiliza e conseguiram colocar para venda um produto estável, ou seja, um alimento que não deteriora na prateleira do consumidor. Trata-se de um método que não luta contra a fermentação, mas se aproveita dela. A estratégia parece ter dado certo, pois o mel maturado produzido por diversas comunidades do Maranhão tem ganhado destaque em feiras, eventos e revistas de gastronomia (VILLAS-BÔAS, 2012).

Visando padronizar o mel de abelhas sem ferrão, Villas-Bôas e Malaspina (2005) propuseram valores de parâmetros físico-químicos para méis de abelhas sem ferrão baseados nas análises exigidas pela legislação vigente (Tabela 4) para o mel de *Apis mellifera* (BRASIL, 2000).

Tabela 4. Parâmetros físico-químicos para mel de abelhas sem ferrão e *Apis mellifera*.

PARÂMETRO	Meliponinae (Brasil)	<i>Apis mellifera</i>
Açúcares Redutores (%)	Min 50,0	Min 65,0
Umidade (%)	Max 35,0	Max 20,0
Sacarose (%)	Max 6,0	Max 6,0
Sólidos Insolúveis (%)	Max 0,4	Max 0,1
Sais Minerais (%)	Max 0,6	Max 0,6
Acidez (mEq/Kg)	Max 85,0	Max 50,0
Atividade diastásica	Min 3,0	Min 8,0
HMF (mg/Kg)	Max 40,0	Max 60,0

Fonte: Villas-Bôas e Malaspina, (2005).

O teor de umidade no mel de meliponíneos é considerado o grande diferencial deste produto em relação ao mel de *Apis mellifera*, como evidenciou a maioria dos trabalhos brasileiros. Dessa forma, Villas-Bôas *et al.* (2005) propuseram que 35% de umidade sejam permitidos para o comércio do mel das abelhas sem ferrão no Brasil, valor superior aos 20% de umidade permitido para *Apis*.

Os valores aceitos para açúcares redutores foram diminuídos para o mínimo de 50%, diferente dos 65% mínimos para o mel de *Apis mellifera* (VILLAS-BÔAS e MALASPINA, 2005).

A acidez do mel das abelhas sem ferrão costuma ser muito alta em relação ao de *Apis mellifera*, constituindo um dos parâmetros que define a preferência do consumidor pelo mel das abelhas nativas. Entretanto, a acidez pode estar diretamente relacionada ao estado de maturação do mel, aumentando com a fermentação. O valor proposto por Villas-Bôas e Malaspina, (2005) estabelece o máximo de 85 meq/kg de mel para o mel de meliponíneos fresco. Pela legislação vigente, o mel de *Apis mellifera* não deve ultrapassar 50 meq/kg.

O conteúdo de sólidos insolúveis aumentou para 0,4% para o controle do mel de abelhas sem ferrão, diferindo dos 0,1% permitido para o comércio do mel de *Apis mellifera* (VILLAS-BÔAS e MALASPINA, 2005).

O hidroximetilfurfural, comumente chamado de HMF, é o principal composto analisado para o controle de qualidade do mel. Este composto resulta da quebra de hexoses, tais como glicose e frutose, na presença de um ácido (CRANE, 1983). O seu teor no produto tem assumido grande importância no controle de qualidade de méis, uma vez que sua quantidade está relacionada aos processos de beneficiamento e armazenagem.

Méis muito aquecidos ou armazenados por muito tempo costumam apresentar altos teores de HMF, assim como as adulterações feitas com xarope de milho ou beterraba também o elevam a níveis acima do limite imposto pela legislação. O mel de meliponíneos costuma apresentar quantidade menor de HMF em relação ao mel de *Apis*. A legislação vigente permite a comercialização do mel de *Apis mellifera* com 60 mg/kg de HMF. O mel de abelhas sem ferrão deve apresentar no máximo 40mg/kg.

A diastase é uma das enzimas do mel, que tem a função de digerir a molécula de amido, sendo muito sensível ao calor, podendo assim indicar o grau de conservação e superaquecimento do produto (WHITE JR, 1978). O valor mínimo de atividade diastásica para o mel de meliponíneos do Brasil deve corresponder a 3,0 na Escala Gothe segundo Villas-Bôas e Malaspina (2005). O mínimo permitido para o mel de *Apis mellifera* corresponde a 8,0.

A composição do mel depende, basicamente, da composição do néctar da espécie vegetal produtora e da espécie de abelha que o produz, conferindo-lhe características específicas, sendo que as condições edafo-climáticas e o manejo do apicultor têm menor influência nesta composição (WHITE JR, 1978).

Os resultados apresentados por Villas-Bôas e Malaspina (2005) demonstram que a legislação atual, referente ao mel de *Apis mellifera* (BRASIL, 2000), não é adequada para todos os caracteres analisados e não pode ser extrapolada para méis de outras espécies melíferas, reforçando a necessidade de um padrão próprio para os méis de meliponíneos, a fim de evitar as constantes fraudes e possibilitar sua comercialização no mercado formal.

Souza *et al.*, (2004) quando pesquisaram méis de *Melipona asilvai* no estado da Bahia encontravam valores médios de 29,49% de umidade, 2,44 mg/Kg de HMF, 73,84% de açúcares totais, 68,89% de açúcares redutores e 41,64 MEq/kg de acidez.

Almeida-Muradian e Matsuda (2007) pesquisaram méis de quatro diferentes espécies de abelhas do gênero *Melipona* na região da Amazônia e a média dos resultados encontrados foram de 30,13% de umidade, acidez de 24,57 mEq/Kg, 31,91% de frutose, 29,30 de glicose e 0,19% de sacarose.

Amostras de méis de *Melipona fulva* Lepelletier, 1836 de Macapá (AP) foram pesquisadas por Chaves *et al.*, (2012) onde encontraram valores médios de 30,93% de umidade, 1,36% de cinzas, acidez de 0,105 mEq/Kg, HMF de 448,38 mg/kg e pH de 2,87.

O mel de *Melipona mandacaia* provenientes do município de São Gabriel na Bahia pesquisados por Alvez *et al.*, (2004) apresentaram valores médios de 28,78% de umidade, 5,79 mg/kg de HMF, 74,82% de açúcares redutores e acidez de 43,48 mEq/kg.

Borsato *et al.*, (2010) pesquisaram méis de três diferentes espécies do gênero *Melipona* provenientes de Curitiba (PR) e os valores máximos encontrados foram de 32,76% de umidade, 62,66% de açúcares redutores, 3,02% de sacarose aparente, 2,81% de cinzas, pH de 4,93, acidez de 180,82 mEq/kg e 24,95 mg/kg de HMF.

Sousa *et al.*, (2013) analisaram méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão da região do Seridó no Rio Grande do Norte e os valores observados foram de (17,2 – 35,4%) para umidade, açúcares (47,8 – 69%), cinzas (0,1 – 1,1%), acidez (27,4 – 86,2 mEq/kg) e pH (3,5 – 5,1).

Isótopos Estáveis e a Espectrometria de Massas de Razão Isotópica

A palavra “isótopo” tem relação com a tabela periódica dos elementos, e significa que todos os isótopos de um elemento ocupam o mesmo (*iso*) lugar (*topos*) na tabela. Nesse sentido, isótopos são famílias inteiras do mesmo elemento compactadas dentro das caixas da tabela periódica (FRY, 2006).

Segundo Fry (2006), isótopos são formas do mesmo elemento que se diferenciam pelo número de nêutrons em seu núcleo. Nêutrons extras no núcleo de um elemento concedem apenas diferenças químicas sutis. Um número moderado de nêutrons, geralmente igual ou um pouco maior que o número de prótons, é o ingrediente chave para a estabilidade a longo prazo dos isótopos e seu elementos. Apenas os elementos hidrogênio (H) e Hélio (He) têm isótopos estáveis com menos nêutrons do que prótons.

Cientistas reconhecem ou suspeitam da existência de aproximadamente 120 elementos e 3100 formas isotópicas. Porém, a maioria dos 3100 são radioisótopos com vidas muito curtas. Dentre eles, existem apenas 283 isótopos estáveis que não sofrem decaimento radioativo; portanto, os estáveis compreendem < 10% de todos os isótopos conhecidos (FRY, 2006).

Os isótopos estáveis do Carbono, Hidrogênio, Oxigênio, Nitrogênio e Enxofre (CHON'S) ocorrem naturalmente na atmosfera, hidrosfera, litosfera, biosfera e cada um desses elementos apresenta um isótopo leve que é dominante (^{12}C , ^1H , ^{16}O , ^{14}N , ^{32}S) e um ou dois isótopos pesados (^{13}C , ^2H , ^{17}O ,

^{18}O , ^{15}N , ^{33}S , ^{34}S), com abundância natural, de alguns poucos per centos ou menos (DUCATTI, 2012).

Os isótopos estáveis sobreviveram bilhões de anos geológicos aqui na Terra. Eles fornecem os raros registros restantes do início da vida em nosso planeta e da ecologia daquela época. Isótopos estáveis são isótopos seguros, não sofrem empobrecimento e, diferentemente dos radioativos, não são prejudiciais à saúde humana. Na verdade, isótopos estáveis são bem abundantes e são partes naturais de cada um de nós (FRY, 2006).

Tabela 5. Isótopos dos elementos leves CHON'S (Hidrogênio, Carbono, Nitrogênio, Oxigênio e Enxofre).

Elemento	Abundância Isotópica				Diferença de Massa (Relativa)	Intervalo em δ (%)
	Massa Menor		Massa Maior			
Hidrogênio	^1H	99.984	^2H	0.016	2.00	700
Carbono	^{12}C	98.89	^{13}C	1.11	1.08	110
Nitrogênio	^{14}N	99.64	^{15}N	0.36	1.07	90
Oxigênio	^{16}O	99.76	^{18}O	0.20	1.13	100
Enxofre	^{32}S	95.02	^{34}S	4.21	1.06	150

Fonte: Fry, 2006.

Elementos particularmente interessantes no ambiente de hoje são aqueles que fazem o ciclo firmemente com matéria orgânica, especialmente H, C, N, O e S (Tabela 5). Todos estes elementos são agraciados com dois ou mais isótopos estáveis, isso é, gêmeos, trigêmeos e quadrigêmeos isotópicos. Os elementos CHON'S são geralmente leves dentre os elementos, mas consistem na maioria da massa presente nos elementos orgânicos (FRY, 2006).

Valores isotópicos têm a sua própria notação especial, a notação δ que significa diferença relativa a um padrão. As composições isotópicas dos padrões internacionais são apresentadas na Tabela 5, e a medida relativa expressa na terminologia delta, é calculada através da expressão:

$$R_{\text{PADRÃO}}: \delta^{\text{H}}\text{X} = [(R_{\text{AMOSTRA}}/R_{\text{PADRÃO}}) - 1] * 1000.$$

Tabela 6. Composições Isotópicas dos Padrões de Referência Internacional.

	Razão H/L ^a	Valor H/L ^a	%H	%L
<i>Standart</i>	² H/ ¹ H	0.00015576	0.015574	99.984426
<i>Mean Ocean Water (SMOW)</i>	¹⁷ O/ ¹⁶ O	0.0003799	0.03790	99.76206
	¹⁸ O/ ¹⁶ O	0.0020052	0.20004	99.76206
<i>PeeDee Belemnite (PDB) e Vienna-PDB (VPDB)</i>	¹³ C/ ¹² C	0.011180	1.1056	98.8944
	¹⁷ O/ ¹⁶ O	0.0003859	0.0385	99.7553
	¹⁸ O/ ¹⁶ O	0.0020672	0.2062	99.7553
<i>Ar</i>	¹⁵ N/ ¹⁴ N	0.0036765	0.36630	99.63370
<i>Canyon Diablo Troilite (CDT) e Vienna-CDT (VCDT)</i>	³³ S/ ³² S	0.0078772	0.74865	95.03957
	³⁴ S/ ³² S	0.0441626	4.19719	95.03957
	³⁶ S/ ³² S	0.0001533	0.01459	95.03957

^aH e L indicam componentes de isótopos pesados e leves, respectivamente. Fonte: Barrier *et al.* (1996).

Na equação, a notação δ é especificada para um elemento em particular (X = H, C, N, O ou S), o sobrescrito H representa a massa do isótopo pesado deste elemento (²H, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁸O ou ³⁴S), e R é a razão entre o isótopo pesado e o isótopo leve do elemento, ²H/¹H, ¹³C/¹²C, ¹⁵N/¹⁴N, ¹⁸O/¹⁶O, ou ³⁴S/³²S (FRY, 2006).

A definição δ envolve uma multiplicação final por 1000, e esta multiplicação amplifica diferenças bem pequenas medidas entre amostras e padrões. Pequenas diferenças de 1 por cento se torna 10 per mil de unidades δ , devido à multiplicação final por 1000. Portanto, a definição de δ faz com que as pequenas diferenças relacionadas ao isótopo de neutro pareçam grandes. As unidades de δ são “‰” ou “per mil”, do latim de partes por mil. Uma amostra que mede 10‰ (dez per mil) é apenas 1% (um por cento) diferente do padrão, e até mesmo uma aparentemente grande diferença de 100‰ ainda é apenas uma diferença de 10% (FRY, 2006).

As medições isotópicas são atualmente feitas, geralmente com um espectrômetro de massa de razão isotópica. Primeiro coleta-se uma amostra de planta, animal, solo ou gás da natureza ou laboratório, e em seguida, a mesma, quando necessário, é moída, secada e queimada para produção de

um gás que a máquina de isótopos pode convenientemente analisar. Para este trabalho de preparação, pode-se usar um analisador elementar, um cromatógrafo a gás ou a laser. Estes dispositivos diferentes somados a diversas interfaces de combustão são as máquinas principais que convertem as amostras em gases denominadores comuns. Para as medições dos isótopos CHONS, os gases denominadores comuns são geralmente o hidrogênio (H_2), o dióxido de carbono (CO_2), nitrogênio (N_2), e dióxido de enxofre (SO_2) (PRESTON, 1992).

O espectrômetro de massa ioniza as moléculas gasosas e separa os feixes de íons em um espectro de massas de acordo com a relação massa/carga, utilizando um campo elétrico e magnético (Figura 2). As abundâncias relativas (concentrações) das moléculas isotópicas de diferentes massa/carga são determinadas pelas medidas das correntes elétricas geradas por estes feixes iônicos (DUCATTI, 2012).

De acordo com Fry (2006), na região da fonte, as moléculas de gás são ionizadas. Os íons carregados são acelerados via campos elétricos por meio de um tubo de deslocamento de aço inoxidável e mantido sob vácuo. No campo magnético central, íons carregados são separados de acordo com a inércia, e dispersos para coletores para contagem automatizada feita por computadores. Devido a sua massa pequena e conseqüente baixa inércia, os feixes de íons de hidrogênio são desviados por ímãs focalizados.

O princípio fundamental da separação pelo espectrômetro de massa é a inércia, simples inércia. As moléculas de gás com os nêutrons extras requerem mais força para serem dispersas dos seus caminhos de deslocamento. Deste modo, seus caminhos de deslocamento são mais diretos do que seus isótopos leves (Figura 2) (FRY, 2006).

No final, computadores registram as contagens dos múltiplos coletores e calculam os valores isotópicos finais. E os cálculos são feitos por *softwares* específicos na maioria dos laboratórios modernos.

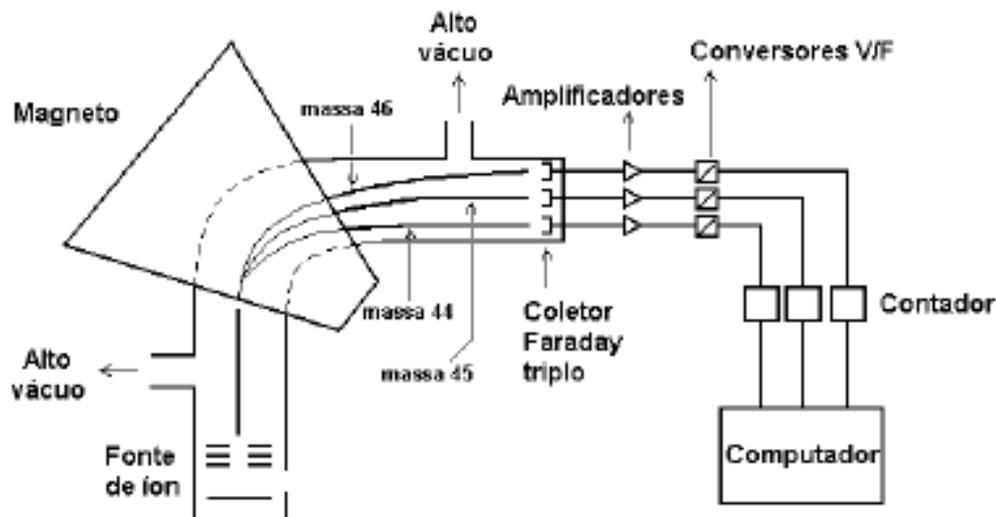


Figura 2. Esquema de um espectrômetro de massa de razão isotópica usado para fazer determinações isotópicas.

Fonte: Boutton (1991).

Discriminação Isotópica Pelas Plantas e Pesquisa de Isótopos em Méis

A utilização das razões isotópicas em estudos ambientais baseia-se na existência de diferenças na composição isotópica dos compostos que participam do processo em estudo, sensíveis o suficiente para serem detectados pelo espectrômetro de massa. Tais diferenças ocorrem na natureza como consequência de reações físico-químicas e/ou biológicas, possibilitando a discriminação de um dos isótopos, também chamado de fracionamento isotópico, que pode ser tanto um enriquecimento ou um empobrecimento do isótopo pesado da amostra em estudo em relação a sua fonte. Um exemplo de fracionamento isotópico é o do carbono durante a fotossíntese (PEREIRA *et. al*; 2007).

As plantas que possuem ciclo bioquímico onde o primeiro composto orgânico sintetizado possui três átomos de carbono são denominadas de planta do ciclo fotossintético C_3 e pertencem a esse grupo cerca de 85% das espécies vegetais. Por outro lado, as plantas em que o primeiro composto orgânico formado possui quatro átomos de carbono são denominadas de plantas do ciclo fotossintético C_4 (maioria das monocotiledôneas como o milho e a cana-de-açúcar) (DUCATTI, 2012).

Nas plantas C_3 , o fracionamento do carbono ocorre nos dois passos do processo fotossintético: difusão/ dissolução e carboxilação. No segundo passo desse processo, a carboxilação pela enzima ribulose-1,5 bifosfato carboxilase (RUBISCO) causa um elevado fracionamento, pois essa enzima tem grande afinidade por $^{12}CO_2$, conseqüentemente a planta C_3 é muito empobrecida em carbono pesado ($\delta^{13}C = -34$ a -22%) (PEREIRA *et al.*, 2007).

Já as plantas C_4 usam a via fotossintética Hatch-Slack, em que a enzima de carboxilação fosfenolpiruvato (PEP) carboxilase reduz o CO_2 a ácido aspártico ou málico, discriminando menos contra o ^{13}C . Os valores isotópicos das plantas C_4 demonstram que o seu $\delta^{13}C$ permanece aproximadamente em -14% (de -7 a -16%) (PEREIRA *et al.*, 2007).

No mel, as pesquisas utilizando isótopos estáveis começaram a partir da década de 70 quando um novo tipo de adulteração mais sofisticada começou a ser realizada nos Estados Unidos por meio da adição de HFCS (High Fructose Corn Syrup) ao mel, produto com um custo de produção muito baixo, obtido a partir de tratamento enzimático do xarope de milho e que possui a glicose (50%) e a frutose (42%) como principais elementos de sua composição. A adição de HFCS ao mel não pôde mais ser detectada pela análise do hidroximetilfurfural (HMF), análise oficial recomendada (WHITE JR. *et al.*, 1978). Como resposta a esse novo tipo de adulteração, novos métodos analíticos começaram a ser pesquisados. Após algumas tentativas sem sucesso, iniciou-se o estudo do uso da análise da relação de isótopos estáveis de carbono como técnica analítica para detecção da adulteração em questão (WHITE JR *et al.*, 1978).

A aparente homogeneidade dos dados relativos à composição isotópica do mel era um indicativo para que as pesquisas tivessem continuidade e a nova técnica fosse aprovada. Em 1989 foi estabelecida a utilização de um padrão interno (proteína) para cada amostra, de maneira que se a amostra fosse adulterada a composição isotópica do padrão interno não se alteraria, mas a da amostra como um todo sim (WHITE JR., 1992), tornando-se uma ferramenta analítica de grande importância para a detecção de adulteração no mel.

No Brasil essa técnica tem sido muito pouco empregada, inclusive por desconhecimento de seu potencial como método analítico por parte dos órgãos competentes.

Espectrometria de massa de razão isotópica é considerada uma metodologia precisa que pode detectar baixos a elevados níveis de adulteração. Ela é determinada pela relação isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, o qual é diferente nas plantas com ciclo fotossintético Hatch-Slack (C_4) como a cana-de-açúcar e o milho, e as plantas com ciclo fotossintético Calvin-Benson (C_3) que incluem a maioria daquelas com flores a partir das quais as abelhas recolhem o néctar e o transformam em mel (PADOVAN *et al.*, 2003).

O valor isotópico do ^{13}C encontrado nos méis é reflexo primário da alimentação das abelhas em plantas com Ciclo Fotossintético C_3 . As plantas ao absorver o CO_2 da atmosfera discriminam átomos de ^{13}C e, portanto, terão mais átomos de ^{12}C que o ar atmosférico. As plantas que seguem o Ciclo Fotossintético C_3 fazem essa discriminação isotópica diferenciada (o primeiro composto orgânico sintetizado durante a fotossíntese possui três átomos de carbono) das plantas que seguem o Ciclo Fotossintético C_4 (o primeiro composto orgânico formado durante a fotossíntese possui quatro átomos de carbono). Assim sendo, os valores de $\delta^{13}\text{C}$ ‰ desses dois tipos de plantas são distintos. (WHITE JR *et al.*, 1978).

Arauco *et al.* (2008) ao pesquisarem 211 amostras de méis de *Apis mellifera* de diferentes estados brasileiros encontraram uma variação isotópica do $\delta^{13}\text{C}$ ‰ entre $-23,8$ e $-28,3$ ‰ e de sua proteína entre $-23,1$ e $-28,0$ ‰. Através da metodologia de determinação da razão isotópica do carbono, observou-se que, das 211 amostras de méis dos estados brasileiros, 92% delas foram consideradas puras.

Rossi *et al.* (1999) efetuaram a análise isotópica de 61 amostras de méis de *Apis mellifera*, encontrando como resultados médios: $-24,6$ ‰ para mel de flores de laranjeira, $-25,5$ ‰ floral, $-25,5$ ‰ eucalipto, $-25,1$ ‰ sem origem conhecida, sendo o valor médio para todas as amostras de $-25,4$ ‰. Entre essas, cinco amostras encontravam-se adulteradas.

Padovan *et al.* (2003), avaliaram quarenta amostras de méis de *Apis mellifera* do Brasil e oito importadas da Argentina, Canadá e Estados Unidos.

Das quarenta analisadas encontraram seis amostras de méis brasileiros adulteradas.

Pesquisas relacionadas com a determinação da origem geográfica de alimentos têm aumentado ao longo dos anos e das diferentes interfaces disponíveis, a Espectrometria de Massas de Razão Isotópica acoplada a um Analisador Elementar (IRMS-EA) é a mais comumente usada (GONZALEZ *et al.*, 2009), demonstrando que não se trata apenas de uma tendência de mercado, mas também uma mudança no hábito alimentar dos consumidores, cada vez mais exigentes em obter alimentos seguros e de qualidade.

O teor de Hidrogênio e de Oxigênio são considerados indicadores de confiança de características climáticas, assim como a razão isotópica do Nitrogênio e do Carbono estão relacionadas com as práticas agrícolas locais e dietas dos animais. Assim, a razão de isótopos estáveis tem demonstrado ser um bom descritor para diferentes produtos alimentares, proporcionando única e impressões digitais únicas e representativas que tornam possível diferenciar as amostras de alimentos (GONZALEZ *et al.*, 2009).

Sacco *et al.* (2009) utilizou a espectrometria de massa de razão isotópica para diferenciar amostras de leite do sul da Itália de leites estrangeiros. Amostras de queijos da França, Itália e Espanha foram caracterizadas por Camin *et al.* (2004) utilizando a análise de isótopos estáveis do carbono, oxigênio, nitrogênio e enxofre, onde 90% das amostras foram classificadas corretamente conforme sua região de origem.

Com relação aos produtos carneos, Zhao *et al.* (2013) utilizou a análise de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio para determinar a origem de carnes provenientes de quatro diferentes regiões da China, onde 100% das amostras foram classificadas corretamente. A análise de isótopos estáveis (C,H,O,N e S) também foi utilizada por Boner e Forstel (2004) como ferramenta para determinar a autenticidade de amostras de carne orgânica provenientes da Alemanha.

Amostras de méis de diferentes regiões da Europa foram analisadas por Schellenberg *et al.* (2010) utilizando a análise de isótopos estáveis de carbono, oxigênio, nitrogênio e enxofre, onde mais de 70% das amostras foram classificadas corretamente em 7 regiões. Kropf *et al.* (2010) analisaram méis de de três diferentes floradas em quatro regiões da Eslovênia, utilizando a análise

de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio, onde todos os três tipos de méis apresentaram classificação correta acima de 95% de acordo com sua origem geográfica.

OBJETIVOS

Com base nas considerações apresentadas, o presente trabalho tem os seguintes objetivos:

- Determinar a adulteração dos méis de abelhas sem ferrão das cinco regiões do Brasil.
- Estabelecer parâmetros isotópicos que seja capaz de determinar a origem do mel analisado.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; MATSUDA, A.H. Physicochemical parameters of amazon melipona honey. **Química Nova**. 2007, 30, p. 707 – 708.

ALVES, R.M.O.; CARVALHO, C.A.L.; SOUZA, B.A.; SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE AMOSTRAS DE MEL DE *Melipona mandacaia* SMITH (HYMENOPTERA: APIDAE). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2005, 25, p. 644 – 650.

ARAUCO, E.M.R.; FUNARI, S. R. C.; DUCATTI, C.; SILVA, E. T.; VENTURINI FILHO, W. G.; VANDERLINDE, R. Variabilidade isotópica do carbono ($\delta\%^{13}\text{C}$) em méis brasileiros utilizando sua proteína como padrão interno. **Brazilian Journal of Food Technology**. 2008, 11, p. 299-304.

BARRIER, A. PROSSER, S. Automated analysis of light element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: **Mass spectrometry of soils**. Edited by Thomas W. Boutton and Shin-ichi Yamasaki. Marcel Dekker, Inc. p. 1 – 46, 1996.

BONER, M.; FÖRSTEL, H. Stable isotope variation as a tool to trace the authenticity of beef. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 2004, 379, p. 301 – 310.

BORSATO, D.M.; BOLZAN, B.H; BORSATO, A. V; ALMEIDA, M.M. FARAGO, P.V. MIGUEL, O.G. Características físico-químicas de meis produzidos por espécies de meliponíneos. **Cadernos de Agroecologia**. 2010, 5, p. 1 – 4.

BOUTTON, T. W. Stable carbon isotope ratios of natural materials. In: **Carbon Isotope Techniques**. Edited by David C. Coleman and Brian Fry. Academic Press Inc. Chapter 10. p. 155 – 171.1991.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade

e qualidade do mel. Diário Oficial da União. Brasília, 23/10/2000, Seção 1, p. 16 - 17, 2000.

CAMIN, F.; WIETZERBIN, K.; CORTES, A.B.; HABERHAUER, G.; LEES, M.; VERSINI, G. Application of multielement stable isotope ratio analysis to the characterization of French, italian, and spanish cheeses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2004, 52, p. 6592 - 6601.

CHAVES, A.F.A.; GOMES, J.E.H.; COSTA, A.J.S. Caracterização físico-química do mel de *Melipona fulva* Lepeletier, 1836 (Himenoptera: Apidae: Meliponinae) utilizada na meliponicultura por comunidades tradicionais do entorno da cidade de Macapá-AP. **Biota Amazônia**. 2012,2, p. 1 – 9.

CRANE, E. Constituintes e característica do mel. In: CRANE, E. **O livro do Mel**. São Paulo: Nobel, 1983.

DUCATTI, C. **Isótopos Estáveis Ambientais**. Botucatu: UNESP, 2012.

FERNANDES, A. Uberlândia: Embargo ao mel brasileiro provoca crise na região do Triângulo Mineiro. **Página Rural**. 2006. Disponível em: <http://www.paginarural.com.br/noticia/37885/uberlandia-embargo-ao-mel-brasileiro-provoca-crise-na-regiao-do-triangulo-mineiro>. Acessado em: Setembro de 2016.

FRY, B. **Stable Isotope Ecology**. Baton Rouge: Springer, 2006.

GONZALEZ, A.; ARMENTA, S.; DE LA GUARDIA, M. Trace-element composition and stable-isotope ratio for discrimination of foods with Protected Designation of Origin. **Trends in Analytical Chemistry**. 2009, 28, p. 1295-1311.

KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V.A. **Abelha urucu: biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte : Acangaú, 1996.

KROPF, U.; KOROSEC, M.; BERTONCELJ, C.; OGRINC, N.; NECEMER, M.; KUMP, P.; GOLOB, T. Determination of the geographical origin of Slovenian black locust, lime and chesnut honey. **Food Chemistry**. 2010, 121, p. 839-846.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997.

PADOVAN, G. J.; DE JONG, D.; RODRIGUES, L. P.; MARCHINI, J. S. Detection of adulteration of commercial honey samples by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio. **Food Chemistry**. 2003, 82, p. 633 – 636.

PEREIRA, A. L.; BENEDITO, E. Isótopos estáveis em estudos ecológicos: métodos, aplicações e perspectivas. **Revista Biociências**. 2007, 13, p. 16 -27.

PRESTON, T. The measurement of stable isotope natural abundance variations. In: **Plant, cell and environment**. V.15, p. 1091-1097, 1992.

ROSSI, N. F.; MARTINELLI, L. A.; LACERDA, T. H. M.; CAMARGO, P. B.; VICTORIA, R. L. Análise da adulteração de méis por açucares comerciais utilizando-se a composição isotópica de carbono. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 1999, 19, p. 199-204.

SACCO, D.; BRESCIA, M.A.; SGARAMELLA, A.; CASIELLO, G.; BUCCOLIERI, A.; OGRINC, N.; SACCO, A. Discrimination between Southern Italy and foreign milk samples using spectroscopic and analytical data. **Food Chemistry**. 2009, 114, p. 1559 – 1563.

SALOMÉ, J. A. Novas tecnologias e sua absorção por grupos de pequenos apicultores “O caso do rastreamento do mel. **Mensagem doce**. 2009, 103. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/103/artigo2.htm>. Acessado em: Setembro de 2016.

SCHELLENBERG, A.; CHMIELUS, S., SCHILICHT, C.; CAMIN, F.; PERINI, M.; BONTEMPO, L.; HEINRICH, K.; KELLY, S.D.; ROSSMANN, A.; THOMAS, F.; JAMIN, E.; HORACEK, M. Multielement stable isotope ratios (H, C, N, S) of honey from different European regions. **Food Chemistry**. 2010, 121, p. 770-777.

SOUSA, J.M.B.; AQUINO, I.S.; MAGNANI, M.; ALBUQUERQUE, J.R.; SANTOS, G.G.; SOUZA, E.L. Aspectos físico-químicos e perfil sensorial de méis de abelhas sem ferrão da região do Seridó, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**. 2013, 34, p. 1765 – 1774.

SOUZA, B.A.; CARVALHO, C.A.L.; SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Rural**. 2004, 34, p. 1623 – 1624.

VILLAS-BOAS, J. K.; MALASPINA, O. Parâmetros físico-químicos propostos para controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil. **Mensagem Doce**, 2005, 82, p. 6-16.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico: Mel de abelhas sem ferrão**. Brasília: ISPN, 2012.

WHITE JR. W., DONER L. W. Mass spectrometric detection of high-fructose corn syrup in honey by use of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. 1978, 61, p. 746-50.

WHITE JR. W. Internal standard stable carbon isotopic ratio method for determination of C4 plant surges in honey: collaborative study, and evaluation of improved protein preparation procedure. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. 1992, 75, p. 543-8.

ZHAO, Y.; ZHANG, B.; CHEN, G.; CHEN, A.; YANG, S.; YE, Z. Tracing the geographic origin of beef in China on the basis of the combination of stable isotopes and multielement analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2013, 61, p. 7055 - 7060.

Capítulo 2

Artigo a ser submetido para a revista Food Chemistry, ISSN 0308-8146

MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO DO BRASIL

Detecção de adulteração e determinação da origem geográfica utilizando análise de isótopos estáveis ambientais (C, N, H e O).

Silvia Janine Veiga^{a*}; Nádia dos Reis Carvalho^b; Cibele Regina de Souza-Kruliski^b; Evandro Tadeu da Silva^b; Vladimir Eliodoro Costa^b; José Paes de Almeida Nogueira Pinto^a

^aDepartamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista – UNESP. Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, Brasil. CEP 18.618-970.

^bCentro de Isótopos Estáveis “Professor Carlos Ducatti”, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP. Distrito de Rubião Júnior, s/n, Botucatu, SP, Brasil. CEP 18618-689.

Palavras-chave: Isótopos estáveis, meliponicultura, fraude, rastreabilidade.

*Autor para correspondência.

Tel: +55 14 981971379; fax: +55 14 38802090

E-mail: silvia.veiga27@gmail.com (S.J. Veiga)

INTRODUÇÃO

A meliponicultura, termo utilizado para designar a criação de abelhas sem ferrão, pouco explorada no Brasil é geralmente associada como uma atividade extra realizada por produtores. Esse cenário vem modificando ao longo dos anos por meio de pesquisas (ALMEIDA MURADIAN e MATSUDA, 2009; SOUZA *et al.*, 2004; CHAVES *et al.*, 2012; BORSATO *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2013) sobre as técnicas de produção e comercialização desse tipo de mel, que possui alto valor agregado e o seu principal diferencial está no paladar. Além das características únicas do mel, o fator ecológico tem impulsionado a criação dessas abelhas devido a sua importância na polinização de culturas e espécies nativas.

As abelhas sem ferrão ocorrem em grande parte das regiões tropicais da Terra; porém, é nas Américas que a grande maioria das espécies são encontradas e no Brasil são aproximadamente 300 as espécies descritas. Cada região do Brasil possui características edafo-climáticas que propiciam a criação de determinada espécie (FREITAS, 2003). Por exemplo, na região sul e sudeste as espécies mais criadas são a jataí e a mandaçaia enquanto que no nordeste, as espécies jandaíra e urucu são as mais comuns (NUNES, 2015).

A preferência dos consumidores por produtos naturais e puros, sem aditivos ou conservantes, tem elevado o consumo do mel dessas espécies promovendo oscilações do mercado que propicia o aparecimento de produtos fraudados, uma vez que o mel de abelhas nativas sem ferrão possui um alto valor agregado e sua produção é notavelmente inferior quando comparada com as abelhas *Apis mellifera*, fazendo com que um produto mais barato se passe por mais caro, adicionando componentes de baixa qualidade, como xaropes e adoçantes a base de cana-de-açúcar.

A adulteração do mel pode ocorrer por meio da alimentação das abelhas com diferentes xaropes de açúcar durante a produção de mel ou a adição de diferentes xaropes de açúcar em determinados volumes após a produção (TOSUN, 2013). Como os fraudadores tornam-se cada vez mais sofisticados, tanto no tipo de fraude e formas utilizadas para encobri-las, ferramentas como a espectrometria de massa de razão isotópica acoplada a um analisador

elementar são necessárias, sendo fundamentais para combater e prevenir as fraudes.

Espectrometria de massa de razão isotópica é considerada uma metodologia precisa que pode detectar baixos a elevados níveis de adulteração em méis nobres como o de abelhas sem ferrões do Brasil. Ela é determinada pela relação isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, o qual é diferente nas plantas com ciclo fotossintético Hatch-Slack (C_4) como a cana-de-açúcar e o milho, onde os valores de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ variam de -9 a -15,5, e as plantas com ciclo fotossintético Calvin-Benson (C_3) que incluem a maioria das plantas com flores a partir das quais as abelhas recolhem o néctar, onde os valores de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ variam de -23 a -28,5 (PADOVAN *et al.*, 2003).

Outro objetivo importante na utilização da análise de isótopos estáveis está na capacidade de determinar a origem geográfica de diferentes matrizes alimentares e poder classificá-la. Um registro é conferido a produtos que são característicos do seu local de origem, com indicação geográfica (IG), o que lhes atribui reputação, valor intrínseco e identidade própria, além de distingui-los em relação aos seus similares disponíveis no mercado. São produtos que apresentam qualidade única em função de recursos naturais como solo, vegetação, clima e saber fazer (INPI, 2016).

A importância da determinação da origem geográfica de alimentos como ferramenta de rastreabilidade ganhou destaque em 2005 devido a problemas com casos de Encefalopatia Espongiforme Bovina (BSE), exigindo maior controle dos processos produtivos por parte do mercado nacional e internacional.

No Brasil, o mel do Pantanal e o mel de Ortigueira/PR ganharam denominação de origem em 2015, além da própolis dos Manguezais do Alagoas em 2012. O sistema de rastreabilidade existente constitui em um código de barras no rótulo do produto que quando escaneado permite detalhar o trajeto percorrido pelo produto até o consumidor. Entretanto, esse sistema possui entraves, uma vez que por acidente o código seja danificado ou por erros humanos no fornecimento das informações para o sistema, sendo fundamental uma análise que possa dar suporte e comprovar a verdadeira origem do produto.

Levando em consideração todos esses aspectos, o presente trabalho teve como objetivo determinar a qualidade dos méis de abelhas sem ferrão e a origem geográfica dos méis pesquisados nas cinco regiões brasileiras.

MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAS

Um total de 50 amostras de méis de abelhas sem ferrão de cinco diferentes regiões geográficas do Brasil foram analisadas – dez amostras de cada região (Figura 5). As amostras foram coletadas diretamente com o produtor e por meio de cooperativas durante o período de setembro de 2015 a fevereiro de 2016, período que compreende as estações de Primavera e Verão no Brasil. Características edafo-climáticas do local no período de coleta das amostras estão representadas na Tabela 10.



Figura 3. Locais de coleta das amostras de méis de abelhas sem ferrão nas cinco regiões do Brasil.

Na região nordeste, as amostras foram coletadas cidade de Mata de São João, que no período de coleta apresentou a menor quantidade de chuvas entre as cinco regiões analisadas. Na região norte, as amostras foram coletadas na cidade de Manaus e assim como na cidade de Sinop (região centro-oeste), apresentou grandes quantidades de chuva e temperaturas elevadas no período da coleta. As amostras da região Sudeste foram coletadas na cidade de São José do Rio Preto, que no período de coleta apresentou os valores mais extremos com temperaturas oscilando entre 16,8°C a 41,8°, baixa quantidade de chuvas e umidade relativa mínima chegando a 10%. Na região Sul, as amostras foram coletadas no litoral, na cidade de Guaraqueçaba, local que apresentou grandes quantidades de chuva e umidade relativa mais alta das cinco regiões pesquisadas.

Tabela 7. Características edafo-climáticas dos locais de coleta das amostras de méis de abelhas sem ferrão.

Local	Temp ¹ (°C)		Precip ² (mm)	UR ³ (%)		Alt ⁴ (m)	Data ⁵	Amostras
	Max	Min		Max	Min			
Mata de São João	34	22,8	40,8	93	47	26	Fev/2016	10
Manaus	35,2	23,2	215	94	44	92	Fev/2016	10
Sinop	33	21,2	305,8	96	51	384	Jan/2016	10
São José do Rio Preto	41,8	16,8	74,2	95	10	489	Set/2015	10
Guaraqueçaba	27	15	230,4	97	69	20	Out/2015	10

¹Temperatura máxima e mínima no mês de coleta das amostras.

²Precipitação acumulada no mês de coleta das amostras.

³Umidade relativa máxima e mínima no mês de coleta das amostras.

⁴Altitude da região de coleta das amostras.

⁵Mês e ano em que as amostras foram coletadas.

Fonte: (INMET; 2016)

As amostras foram obtidas diretamente com o produtor, com exceção das amostras de Guaraqueçaba que foram obtidas através de uma cooperativa de produtores e armazenadas em temperatura ambiente até a realização da análise no Centro de Isótopos Estáveis “Professor Carlos Ducatti” do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – Botucatu/SP.

REAGENTES

- Solução a 10% de Tungstato de Sódio: 30g de Tungstato de Sódio em 300 mL de água destilada.

- Solução a 2N Ácido Sulfúrico: 10 mL de Ácido Sulfúrico em 500 mL de água destilada.

EXTRAÇÃO DA PROTEÍNA DO MEL

A metodologia utilizada para análise isotópica do carbono no mel foi baseada na metodologia oficial da Association of Official Analytical Chemists 998.12 (AOAC, 2005). Foram pesados 20 a 22g de cada amostra em tubo falcon de 50 mL, adicionado 8 mL de água destilada, sendo a mistura homogeneizada em vortex. Em seguida foram adicionados 4 mL de solução de Tungstato de Sódio e 4 mL de Ácido Sulfúrico com posterior homogeneização novamente. A mistura foi então mantida em banho-maria a 80 °C por 3 a 4 horas até a formação do precipitado de proteínas. Após esse período as amostras foram deixadas por 1 hora a temperatura ambiente para diminuir a temperatura. Para purificá-las e obter a fração pura de proteína do mel, as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm por 5 minutos. Após cada centrifugação era desprezado o sobrenadante, completado o volume com água destilada, seguindo-se uma homogeneização da mistura em *vortex*, sendo esse processo repetido até cinco vezes. A fração pura de proteína depositada no fundo do tubo *falcon* foi mantida em estufa em torno de 35 °C de um dia pro outro para retirar o excesso de umidade antes da pesagem.

PESAGEM E ANÁLISE ISOTÓPICA

Para determinar a presença de contaminantes por fonte C₄, uma alíquota de 50-70µg da amostra de mel e 450-550µg da proteína correspondente foi pesada em cápsulas de estanho (Elemental Microanalysis). Para a determinação do valor isotópico do Nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) foram pesados em cápsula de estanho de 6 a 8 mg da fração proteica extraída do mel e 250-300µg para mensurar o valor isotópico do oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e do hidrogênio ($\delta^2\text{H}$) em cápsulas de prata. Como a proteína do mel pode ser influenciada pelo vapor de água e oxigênio ambiente, antes da pesagem para analisar $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$, os tubos *falcon* contendo a proteína do mel foram mantidos em aparelho a vácuo por 4 a 5 dias para liofilizar as amostras e tirar toda a água existente.

Após a pesagem, as amostras foram mantidas em dissecador de vidro até a análise para não haver influência do oxigênio ambiente. Todas as amostras foram pesadas em duplicata em ultra-micro balança analítica (Mettler Toledo MX5).

As cápsulas de estanho e prata contendo as amostra de mel (para determinação de adulteração) e sua proteína foram submetidas à combustão em Analisador Elementar (EA 1108 CHN - Fisons Instruments, Rodano, Itália) e queimada sem presença de oxigênio em um reator de oxidação à 1020 °C e o gás gerado foi transportado pelo hélio 6.0 e analisado em espectrômetro de massa de razão isotópica (Finnigan MAT DELTA-S, Bremen, Alemanha). A razão isotópica de cada elemento foi determinada pela seguinte equação (PADOVAN *et al.*, 2003):

$$\delta^{13}C_{(amostra, padrão)} = \left[\left(\frac{R_{amostra}}{R_{padr\tilde{a}o}} \right) - 1 \right] \times 10^3 \text{ ,}$$

Onde:

R_a é a razão de $^{13}C/^{12}C$ da amostra

R_p é a razão do padrão internacional utilizado

A porcentagem de C_4 foi determinada pela equação (WHITE e WINTERS, 1989):

$$\% C_4 = \left[\left(\frac{\delta^{13}C_{proteina} - \delta^{13}C_{mel}}{\delta^{13}C_{proteina} - \delta^{13}C_{adulterante}} \right) \right] \times 100$$

Na equação, foi utilizado como valor de adulterante, aquele correspondente ao do HFCS – *High Fructose Corn Syrup* (-9,7‰) por ser o indicado pela metodologia oficial AOAC 998.12 (2005). A diferença de 1‰ (um per mil) no valor isotópico $\delta^{13}C$ entre a proteína e o mel, corresponde à uma faixa de incerteza, devido as variedades das plantas C_3 (silvestre, eucalipto e laranja), acima de 1‰ os méis são classificados como adulterados com uma porcentagem de 7% proveniente de plantas de ciclo fotossintético C_4 .

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados ANOVA foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism[®] 5.01. Teste de Tukey foi realizado para determinar diferença significativa entre as regiões individuais. A análise de componentes principais (ACP) e análise discriminante (AD) foram realizadas utilizando o software estatístico Minitab[®] 17. A ACP foi realizada com o objetivo de selecionar isótopos que apresentassem maior discriminação, possibilitando assim reduzir o número de análises e consequentemente os custos. O primeiro componente principal descreve a variação máxima possível e o segundo componente principal, o segundo mais variável e assim sucessivamente. A AD foi realizada para avaliar a diferença estatística entre os grupos e avaliar a capacidade de predição das diferentes origens pelos isótopos analisados. Capacidade de predição é expressa como a capacidade das amostras serem classificadas corretamente com relação a todo conjunto de dados.

RESULTADOS

Os valores médios e respectivos desvios-padrões da razão de isótopos de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) de méis de abelhas sem ferrão estão dispostos na Tabela 8. Todas as amostras de mel ($\delta^{13}\text{C}_{\text{mel}}$) e suas respectivas frações protéicas ($\delta^{13}\text{C}_{\text{prot}}$) apresentaram diferenças médias semelhantes entre os seus valores, com exceção daquelas da cidade de Guaraqueçaba onde foi encontrado uma diferença superior a 1‰ dos valores médios. As médias dos valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{prot}}$ variaram entre -25,44‰ a -27,75‰, enquanto que os valores médios de $\delta^{13}\text{C}_{\text{mel}}$ variaram de -25,77‰ a -27,30‰. A diferença entre os valores médios da razão de isótopos de carbono da proteína e do mel ($\delta^{13}\text{C}_{\text{prot}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{mel}}$) variaram entre -1,25‰ a 0,75‰. A diferença foi dada negativa quando o valor médio de $\delta^{13}\text{C}_{\text{prot}}$ foi mais negativo do que o valor médio de $\delta^{13}\text{C}_{\text{mel}}$. Das amostras analisadas, 10% das amostras de Manaus, 30% amostras de Sinop e 60% amostras de Guaraqueçaba foram constatadas adulteradas, configurando 20% de todas as amostras analisadas.

Tabela 8. Valores isotópicos médios ($\delta^{13}\text{C}$) do mel e sua respectiva proteína, número e porcentagem de amostras consideradas adulteradas no mel de abelhas sem ferrão das cinco regiões brasileiras.

Localidade	$\delta^{13}\text{C}_{\text{prot}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{mel}}$ (‰)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{prot}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{mel}}$ (‰)	Amostras adulteradas (%)
Manaus	-27,72±0,4	-27,30±0,8	-0,42±0,6	10%
Mata de São João	-25,44±0,2	-26,19±0,2	0,75±0,2	0%
Sinop	-26,74±0,3	-25,77±0,5	-0,97±0,4	30%
São José do Rio Preto	-26,25±0,3	-25,87±0,2	-0,38±0,3	0%
Guaraqueçaba	-27,75±0,4	-26,50±0,2	-1,25±0,3	60%

Das 50 amostras de méis de abelhas sem ferrão pesquisadas, 36 apresentaram a razão isotópica do carbono da fração protéica relativamente mais negativa que o mel enquanto que 14 restantes apresentaram o $\delta^{13}\text{C}_{\text{mel}}$ mais negativos do que a sua proteína (Tabela 9). A diferença de $\delta^{13}\text{C}_{\text{prot}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{mel}}$ de 28% das amostras foi de 1,0‰ a 0,1‰; 52% das amostras apresentaram diferença de 0,0 a -1,0‰. Como pode ser visto as amostras que variaram de 1,0‰ a -1,0‰ somaram 80% das amostras enquanto os 20% das amostras consideradas adulteradas apresentaram uma diferença de -1,1‰ a -1,9‰.

Tabela 9. Distribuição de valores [$\delta^{13}\text{C}_{\text{prot}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{mel}}$] entre grupos.

[$\delta^{13}\text{C}_{\text{prot}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{mel}}$] Valores	Número de amostras	Proporção de amostras (%)
De 1,0 a 0,1 ‰	14	28
De 0,0 a -1,0 ‰	26	52
De -1,1 a -1,3 ‰	4	8
De -1,4 a -1,9 ‰	6	12
Total	50	100

Os níveis de variação, os valores médios e o intervalo de confiança (95%) dos resultados para referência de méis puros são demonstrados na Tabela 10. Os valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{prot}}$ dos méis de abelhas sem ferrão variaram de -28,32‰ a -25,16‰ enquanto que os valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{mel}}$ variaram entre -28,53‰ e -25,54‰. Quando observado os valores de porcentagem de adulteração os valores variaram de 0,0 a 6,47% de presença de fonte C_4 .

Tabela 10. Orientações de referência para $\delta^{13}\text{C}$ de méis puros de abelhas sem ferrão.

Razão Isotópica	Nível de Variação	Média	Intervalo de Confiança (95%)
$\delta^{13}\text{C}_{\text{prot}}$ (‰)	(-28,32) – (-25,16)	-26,59±0,9	(-26,88) – (-26,30)
$\delta^{13}\text{C}_{\text{mel}}$ (‰)	(-28,53) – (-25,54)	-26,39±0,7	(-26,63) – (-26,15)
Açúcar C_4 (%)	0,0 – 6,47	2,41±2,16	1,72 – 3,10

DIFERENÇA DOS ISÓTOPOS ESTÁVEIS ENTRE AS REGIÕES

A composição de isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$), nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), oxigênio ($\delta^{18}\text{O}$) e hidrogênio ($\delta^2\text{H}$) na fração protéica do mel de abelhas sem ferrão estão representados na figura 4. As amostras de méis de Mata de São João – BA (-25,16 a -25,67‰) e de São José do Rio Preto – SP (-25,92 a -26,80‰) foram caracterizadas por valores mais elevados de $\delta^{13}\text{C}$ quando comparadas com as outras cidades. Com relação ao $\delta^{15}\text{N}$, Mata de São João apresentou valores extremamente mais baixos que as outras regiões, de 0,33 a 0,59 ‰, enquanto que as amostras de Manaus – MA e Sinop – MT apresentaram os valores mais elevados (5,69 a 7,86‰ e 6,5 a 7,87‰, respectivamente) e não foi possível diferenciá-los estatisticamente. A análise de $\delta^2\text{H}$ foi a que se apresentou mais homogênea entre os grupos pesquisados, com valores muito semelhantes, não sendo possível diferenciar um grupo estatisticamente. A cidade de Mata de São João apresentou o valor mais elevado (-62,6‰) enquanto que São José do Rio Preto apresentou o menor valor (-96,04‰) de $\delta^2\text{H}$. Para a análise de $\delta^{18}\text{O}$, Guaraqueçaba – PR apresentou os valores mais elevados (-14,64 a -26,81‰) enquanto que Manaus apresentou menores valores (-34,22 a -48,31‰). As cidades de Mata de São João, Sinop e São José do Rio Preto não foram diferenciados estatisticamente para $\delta^{18}\text{O}$.

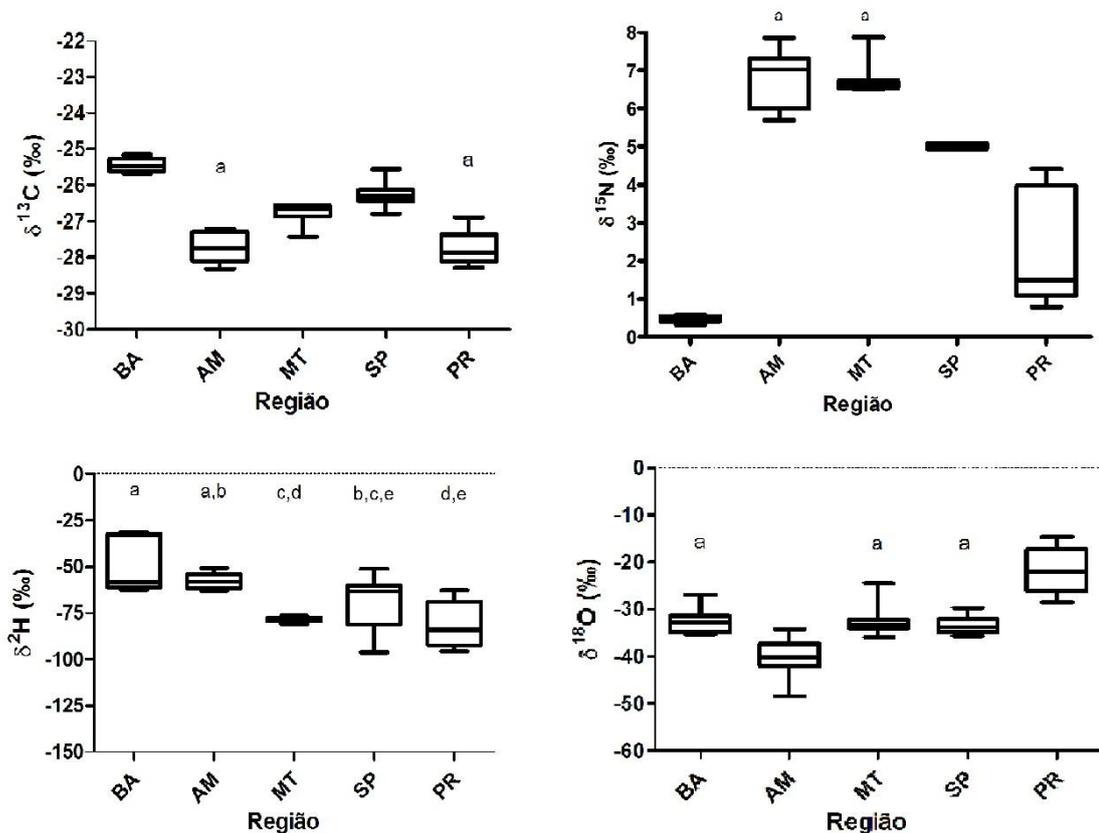


Figura 4. Valores de $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ em amostras de méis de abelhas sem ferrão das cinco regiões do Brasil. Valores com as mesmas letras não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey ($P < 0,05$).

ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS E ANÁLISE DISCRIMINANTE

Os quatro isótopos estáveis $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ foram analisados nas amostras de méis (fração proteica) de abelhas sem ferrão das cinco regiões do Brasil, utilizando-se ACP (Figura 5).

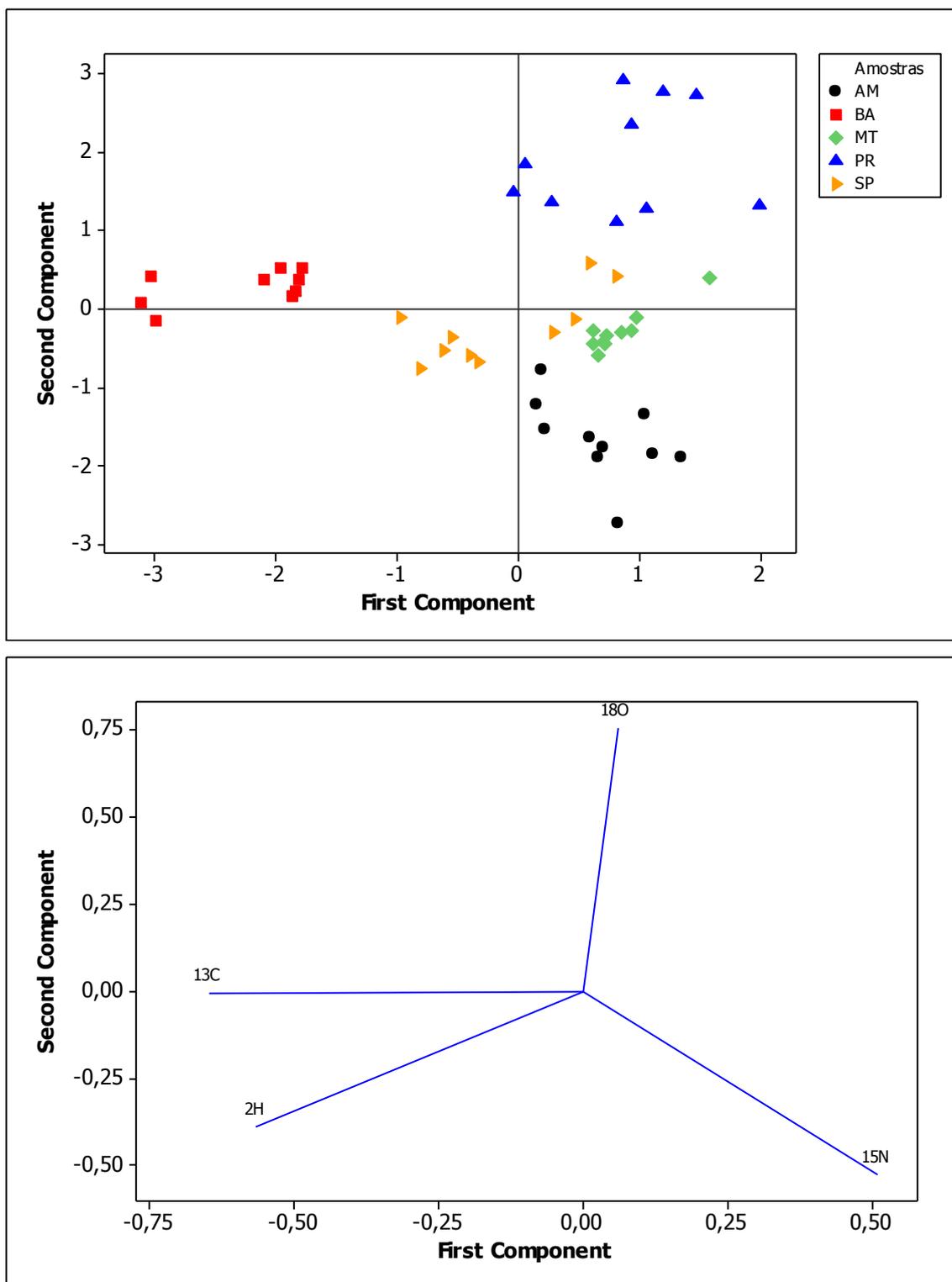


Figura 5. Análise de componentes principais de méis de abelhas sem ferrão das cinco regiões do Brasil.

Os dois primeiros componentes explicaram 80,5% da variabilidade total. Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^2\text{H}$ apresentaram maior peso no primeiro componente (41,6% de variabilidade), sendo possível distinguir a região da Bahia e o $\delta^{15}\text{N}$ e

$\delta^{18}\text{O}$ apresentaram maior influência no segundo componente (38,9%) distinguindo as regiões do Amazonas e Paraná.

Para melhor compreender a eficiência discriminante de cada elemento, a análise discriminante linear foi utilizada com base nos quatro isótopos estáveis presentes no mel de abelhas sem ferrão. A capacidade de predição foi considerada satisfatória visto que por meio da análise, 98% das amostras foram classificadas corretamente conforme seu local de origem (Tabela 11).

Tabela 11. Classificação das amostras de méis de abelhas sem ferrão do Brasil em cinco diferentes regiões e percentual de observações corretamente classificadas.

Grupo Predito	Grupo Verdadeiro				
	AM	BA	MT	PR	SP
AM	10	0	0	0	0
BA	0	10	0	0	0
MT	0	0	10	0	0
PR	0	0	0	9	0
SP	0	0	0	1	10
Amostras	10	10	10	10	10
Amostras corretas	10	10	10	9	10
Proporção	100%	100%	100%	90%	100%

DISCUSSÃO

O mel de abelhas sem ferrão aqui analisado apresentou, de maneira geral, qualidade semelhante aquele de abelhas *Apis mellifera* anteriormente investigado por outros pesquisadores, onde 80% das amostras foram consideradas puras.

Em períodos de baixa floração, apicultores utilizam alimentação artificial contendo produtos açucarados de fonte C_4 para não perder as colmeias, por isso, recomenda-se que um mês antes do início da florada e posterior colheita do mel para comercialização, a alimentação seja suspensa. Um erro no manejo da alimentação artificial pode resultar em méis adulterados (20% das amostras), além da adição direta de produtos de baixo custo como xaropes de milho e fontes derivadas de cana-de-açúcar com intuito de aumentar o volume, principalmente se tratando em méis de abelhas sem ferrão onde a produção gera em torno de 1 litro de mel/ano/colméia.

Não foram encontrados na literatura resultados de análises isotópicas de carbono em méis de abelhas sem ferrão do Brasil, porém, Padovan *et al.* (2003) analisaram 40 amostras de méis de abelhas brasileiras, onde não foi especificada a espécie e observou-se 15% das amostras adulteradas pela análise isotópica do carbono, resultado semelhante ao encontrado nessa pesquisa.

Arauco *et al.* (2008) observaram que das 211 amostras de méis de abelhas *Apis mellifera* coletadas em todo o Brasil, 92% eram puras e diferentemente do observado nesse estudo, o estado do Paraná apresentou apenas 12,5% das amostras adulteradas. Cenário semelhante foi observado em pesquisa realizada por Souza-Kruliski *et al.* (2010) onde das 7 amostras do estado do Paraná analisadas nenhuma encontrava-se adulterada.

Os resultados das análises isotópicas de carbono dos méis provenientes de São Paulo demonstraram que a qualidade dos mesmos melhorou com relação a estudos anteriores, visto que em 2008 foram encontradas 25,8% das amostras analisadas adulteradas (ARAUCO *et al.*, 2008) e em 2010, observou-se 31,58% das amostras adulteradas (SOUZA-KRULISKI *et al.*, 2010) e no presente trabalho em nenhuma das amostras de méis de abelhas sem ferrão do estado de São Paulo foi detectada adulteração.

O valor de $\delta^{13}\text{C}$ encontrado no mel é altamente dependente do tipo de planta onde a abelha coletou o néctar para transformar em mel. Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ podem ser usados para detectar contaminação dos méis com fontes de plantas C_4 , produtos derivados principalmente a partir do milho e cana-de-açúcar. De acordo com os resultados obtidos, todas as amostras foram derivadas de plantas C_3 , que incluem a maioria das plantas que produzem flores.

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ foram superiores em Mata de São João e em São José do Rio Preto, as duas regiões apresentaram baixa umidade do ar, poucas chuvas e altas temperaturas no período de coleta, dados que concordam com os observado por Schellenberg *et al.* (2010) que avaliaram méis de diferentes regiões da Europa e concluíram que os méis amostrados de regiões com aumento de dias mais claros, maior temperatura e diminuição da umidade apresentaram valores de $\delta^{13}\text{C}$ mais elevados.

No Brasil, pesquisas com análise $\delta^{13}\text{C}$ em mel de abelhas *Apis mellifera* já foram realizadas por alguns pesquisadores. Padovan *et al.* (2003) encontraram valores de $\delta^{13}\text{C}$ para proteína de mel que variaram de -11,47 a -26,73‰, valores com variação bem superior ao observado na atual pesquisa. Arauco *et al.* (2008) pesquisando méis de diversos estados brasileiros encontraram uma variação de $\delta^{13}\text{C}$ na proteína do mel de -23,1 a -28,0‰ e assim como na atual pesquisa, o estado de São Paulo demonstrou os maiores valores de $\delta^{13}\text{C}$ quando comparados com os outros estados. Souza-Kruliski *et al.* (2010) pesquisando amostras de méis da região sul e sudeste do Brasil encontraram variação de $\delta^{13}\text{C}$ de -24,24 a -27,81‰ para o estado de São Paulo, também superiores aos outros estados pesquisados. Todavia, nenhum dos autores relatou as condições climáticas ou período do ano no momento da coleta.

Manaus e Guaraqueçaba não diferiram significativamente e a faixa de valores de $\delta^{13}\text{C}$ foi próxima. Ambos os estados apresentaram grandes quantidades de chuva no período de coleta, conseqüentemente dias menos claros e umidade relativa mais elevada.

O nitrogênio encontra-se no solo essencialmente na forma orgânica (aproximadamente 98%). A outra pequena parte encontra-se nas formas minerais de amônio, nitrato e nitrito (ALFAIA, 2006). O nitrogênio é um parâmetro importante para a nutrição das plantas, e as espécies foram adaptadas de forma diferente a este elemento. Algumas fixam o nitrogênio do ar atmosférico e por isso seus valores de $\delta^{15}\text{N}$ ficam em torno de 0‰ (SCHELLENBERG *et al.*, 2010). A composição isotópica do Nitrogênio presente na proteína do mel está relacionada com as condições do solo da área onde se encontra a planta a partir da qual o néctar foi coletado pela abelha. Outro fator que influencia nos valores de $\delta^{15}\text{N}$ indicado por pesquisadores seria a altitude da região onde a amostra foi coletada. Zhao *et al.* (2013) ao pesquisarem a origem geográfica de carne bovina na China verificaram que regiões de alta altitude apresentaram os menores valores de $\delta^{15}\text{N}$, assim como Bomtempo *et al.* (2012) encontraram valores de $\delta^{15}\text{N}$ <4‰ quando pesquisaram leite e queijos alpinos. Segundo Schellenberg *et al.* (2010), fatores tais como, estresse hídrico, proximidade com o mar e o tipo de fertilizante usado já provaram afetar os valores de $\delta^{15}\text{N}$ de plantas e alimentos.

Entre as regiões pesquisadas, Manaus (5,69 a 7,86‰) e Sinop (6,5 a 7,87‰) apresentaram os maiores valores de $\delta^{15}\text{N}$, ambas as regiões de coleta se encontram dentro da Floresta Amazônica Legal, em um período de grande volume de precipitação e altas temperaturas, além de que as duas regiões foram as mais distantes do mar amostradas. Em contrapartida, Mata de São João (0,33 a 0,59‰) e Guaraqueçaba (1,1 a 4,42‰), ambas regiões litorâneas, obtiveram os menores valores de $\delta^{15}\text{N}$ e se encontram dentro de área de Mata Atlântica. São José do Rio Preto, região amostrada de maior altitude demonstrou valores de $\delta^{15}\text{N}$ homogêneos, que variaram de 4,93 a 5,11‰.

Os valores de $\delta^2\text{H}$ e $\delta^{18}\text{O}$ são conhecidos por serem altamente dependentes das condições climáticas, vento predominante, precipitação e composição isotópica do ar ambiente na região amostrada (CHIOCCHINI *et al.*, 2016). Segundo Schellenberg *et al.* (2010) o valor isotópico tende a diminuir com o aumento da distância para o mar, aumento de altitude e diminuição da temperatura da região, enquanto que os valores mais altos estão associados com baixa elevação, localização costeira e clima mais quente. Esses fatores são observados na planta onde abelha coleta o néctar por meio da assimilação da água durante a fotossíntese e são conservadas na composição isotópica do hidrogênio e oxigênio na proteína do mel.

Os resultados de $\delta^2\text{H}$ demonstraram faixa de valores semelhantes entre as regiões, não sendo possível diferir uma região particular. As amostras foram coletadas durante as estações de primavera e verão no Brasil, período caracterizado por grande quantidade de chuvas e temperaturas elevadas. A cidade de Mata de São João, situada em região litorânea, com altas temperaturas e baixa altitude apresentou o valor mais alto para $\delta^2\text{H}$ (-31,32‰) e a cidade de São José do Rio Preto, região de maior altitude amostrada apresentou o valor mais baixo (-96,04‰).

Schellenberg *et al.* (2010) pesquisando méis na Europa encontraram valores de $\delta^2\text{H}$ que variaram de - 32 a -149‰, sendo que os valores mais baixos foram encontrados em regiões alpinas ou longe do mar e os valores mais altos em amostras coletadas em regiões próximas ao oceano atlântico. Luo *et al.* (2016) encontraram valores de $\delta^2\text{H}$ que variaram de -153.45 a - 185.43‰ para méis puros de diferentes regiões da China. Em comparação, os

resultados da atual pesquisa demonstraram valores superiores que variaram de -31,32‰ a -96,04‰, evidenciando a influência do clima quente e úmido do Brasil no período de amostragem.

Com relação aos valores de $\delta^{18}\text{O}$, Guaraqueçaba, região costeira com baixa altitude apresentou os maiores valores (-14,64 a -28,58‰) de $\delta^{18}\text{O}$ enquanto que Manaus, região mais distante do mar amostrada apresentou os menores valores (-34,22 a -48,31‰) de $\delta^{18}\text{O}$.

Kropf *et al.* (2010) pesquisaram a origem geográfica de três tipos de mel de origem botânica diferentes da Eslovênia utilizando análise isotópica de carbono e nitrogênio com análise de componentes principais e análise discriminante linear e classificaram corretamente 100% dos méis de lima, 94,6% dos méis de castanheira e 98,2% dos méis de *black locust*. Schellenberg *et al.* (2010) classificaram corretamente 70% das amostras de mel de sete regiões diferentes da Europa utilizando análise isotópica do carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxofre com análise canônica discriminante.

CONCLUSÃO

A análise isotópica do Carbono mostrou-se uma ferramenta eficaz para determinar adulterações em méis de abelhas sem ferrão do Brasil. Destaca-se o encontro de um número elevado de amostras na região sul do Brasil (Guaraqueçaba) que mostraram-se adulteradas, necessitando uma maior atenção por parte do órgão de fiscalização oficial. A pesquisa também demonstrou a eficiência da análise de isótopos estáveis juntamente com as ferramentas estatísticas na determinação da origem geográfica dos méis de abelhas nativas sem ferrão do Brasil, além de apresentar dados isotópicos ainda não conhecidos para o mel de abelhas nativas brasileiro oferecendo uma base para novas pesquisas e extrapolando para diferentes matrizes alimentares.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; MATSUDA, A.H. Physicochemical parameters of amazon melipona honey. **Química Nova**. 2007, 30, p. 707 – 708.

ALFAIA, S.S. Caracterização e distribuição das formas do nitrogênio orgânico em três solos da Amazônia Central. **Acta Amazonica**. 2006, 36, p. 135-140.

AOAC 998.12. C-4 plant sugars in honey. Internal standart stable carbon isotope retio method. **Official methods os analysis**. 2005, 44, 33.

ARAUCO, E.M.R.; FUNARI, S. R. C.; DUCATTI, C.; SILVA, E. T.; VENTURINI FILHO, W. G.; VANDERLINDE, R. Variabilidade isotópica do carbono ($\delta^{13}\text{C}$) em méis brasileiros utilizando sua proteína como padrão interno. **Brazilian Journal of Food Technology**. 2008, 11, p. 299-304.

BONTEMPO, L.; LOMBARDI, G.; PAOLETTI, R.; ZILLER, L.; CAMIN, F.H. C, N and O stable isotope characteristics of alpine forage, Milk and cheese. **International Dairy Journal**. 2012, 23, p. 99-104.

BORSATO, D.M.; BOLZAN, B.H; BORSATO, A. V; ALMEIDA, M.M. FARAGO, P.V. MIGUEL, O.G. Características físico-químicas de meis produzidos por espécies de meliponíneos. **Cadernos de Agroecologia**. 2010, 5, p. 1 – 4.

CHAVES, A.F.A.; GOMES, J.E.H.; COSTA, A.J.S. Caracterização físico-química do mel de *Melipona fulva* Lepeletier, 1836 (Himenoptera: Apidae: Meliponinae) utilizada na meliponicultura por comunidades tradicionais do entorno da cidade de Macapá-AP. **Biota Amazônia**. 2012,2, p. 1 – 9.

CHIOCCHINI, F.; PORTARENA, S.; CIOLFI, M.; BRUGNOLI, E.; LAUTERI, M. Isoscapes of carbon and oxygen stable isotope compositions in tracing authenticity and geographical origin of Italian extra-virgin olive oils. **Food Chemistry**. 2016, 202, p. 291-301.

FREITAS, B. M. **Meliponíneos**. Fortaleza: UFC, 2003.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática. Disponível em:< <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesautomaticas>> Acesso em: setembro. 2016.

INPI. Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Guia básico de indicação geográfica. Disponível em:< <http://www.inpi.gov.br/menu-servicos/indicacao-geografica/guia-basico-de-indicacao-geografica>>. Acesso em: setembro. 2016.

KROPF, U.; KOROSK, M.; BERTONCELJ, C.; OGRINC, N.; NECEMER, M.; KUMP, P.; GOLOB, T. Determination of the geographical origin of Slovenian black locust, lime and chesnut honey. **Food Chemistry**. 2010, 121, p. 839-846.

LUO, D.; LUO, H.; DONG, H.; XIAN, Y. GUO, X. WU, Y. Hydrogen ($2\text{H}/1\text{H}$) combined with Carbon ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) isotope ratios analysis to determine the adulteration of commercial honey. **Food Analytical Methods**. 2016, 9, p. 255-262.

NUNES, O. Abelha sem ferrão produz mel refinado. **Imprensa oficial do estado de São Paulo**. 2015, 125, p – 4.

PADOVAN, G. J.; DE JONG, D.; RODRIGUES, L. P.; MARCHINI, J. S. Detection of adulteration of commercial honey samples by $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio. **Food Chemistry**. 2003, 82, p. 633 – 636.

SCHELLENBERG, A.; CHMIELUS, S., SCHILICHT, C.; CAMIN, F.; PERINI, M.; BONTEMPO, L.; HEINRICH, K.; KELLY, S.D.; ROSSMANN, A.; THOMAS, F.; JAMIN, E.; HORACEK, M. Multielement stable isotope ratios (H, C, N, S) of honey from different European regions. **Food Chemistry**. 2010, 121, p. 770-777.

SOUSA, J.M.B.; AQUINO, I.S.; MAGNANI, M.; ALBUQUERQUE, J.R.; SANTOS, G.G.; SOUZA, E.L. Aspectos físico-químicos e perfil sensorial de méis de abelhas sem ferrão da região do Seridó, Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**. 2013, 34, p. 1765 – 1774.

SOUZA, B.A.; CARVALHO, C.A.L.; SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Rural**. 2004, 34, p. 1623 – 1624.

SOUZA-KRULISKI, C.R.; DUCATTI, C.; VENTURINI FILHO, W.G.; ORSI, R.O.; SILVA, E.T. Estudo de adulteração em méis brasileiros através de razão isotópica de carbono. **Ciência Agronômica**. 2010, 34, p. 434-439.

TOSUN, M. Detection of adulteration in honey samples added various sugar syrups with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope ratio analysis method. **Food Chemistry**. 2013, 138, p 1629-1632.

WHITE, J. W.; WINTERS, K. Honey protein as internal standart for stable carbon isotope ratio detection of adulteration honey. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**. 1978, 72, p. 907 – 911.

ZHAO, Y.; ZHANG, B.; CHEN, G.; CHEN, A.; YANG, S.; YE, Z. Tracing the geographic origin of beef in China on the basis of combination of stable isotopes and multielement analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2013, 61, p. 7055-7060.

FOOD CHEMISTRY

Guide for Authors

Disponível em: <https://www.elsevier.com/journals/food-chemistry/0308-8146?generatepdf=true>

INTRODUCTION

The manuscript fits the Aims and Scope of the journal (<http://www.journals.elsevier.com/food-chemistry>) Manuscript is in accordance with ARTICLE TYPE – GUIDELINES (<http://www.elsevier.com/journals/food-chemistry/0308-8146/guide-for-authors#14000>) The text is written in good English. Authors who feel their manuscript may require editing to conform to correct scientific English may wish to use an English Language Editing service such as the one available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>). Manuscript text is divided into numbered sections; line and page numbers are added and text is double spaced An ethical statement is required for experiments involving humans or animals Conflict of interest statement is included at the end of the manuscript The number of figures and tables combined does not exceed a total of 6; additional tables and figures can be submitted as supplementary material. All relevant references should be provided in the Reference list. Cover letter is prepared, introducing your article and explaining the novelty of the research Highlights are prepared (a birds' eye view of your article in 3-5 points, 85 characters each).

Submission checklist

1) Study contents:

The Authors should ensure that The manuscript fits within Aims & Scope of Food Chemistry. The research is **novel** and has **not been published previously** - please see "Responsible research publication: international standards for authors" from COPE for more information

[http://publicationethics.org/files/International%20standards_authors_for%20web site_11_Nov_2011_0.pdf](http://publicationethics.org/files/International%20standards_authors_for%20web%20site_11_Nov_2011_0.pdf)

Ethical consent has been obtained in case of work on animals and/or humans.

2) Manuscript preparation:

The Authors should ensure that The number of words and of figures/tables is within limits:

- Research article: 7500 words, 6 tables and figures combined
- Review article: 10 000 words, 6 tables and figures combined
- Short communication: 3000 words, 6 tables and figures combined

More tables and figures: Submit as supplementary material.

The **title page** contains title, author names, affiliations and corresponding author telephone. **Email addresses are required for ALL authors. Authors must provide and use an e-mail address unique to themselves and not one that is shared with another author registered in EES, or a department.** The **highlights** are provided (3-5 bullet points, max 85 characters each including spaces). The manuscript contains a **conflict of interest** statement (before references). The language follows the requirements of the Guide for Authors. The formatting of the manuscript follows the requirements of the Guide for Authors . Continuous **line numbering** is provided throughout the manuscript (including captions and references); **page numbering** is provided. All relevant references are provided in alphabetical order Figures and tables (6 combined) include clear **labels** and are prepared as **individual files**. The manuscript contains appropriate **ethical approval** and **informed consent** (if applicable, include statement).

3) Before submission:

Manuscript file is provided as a Microsoft Word file. Figures and tables are provided as **individual files**. A **cover letter** is included. 3 or more suggested **reviewers** are provided (including affiliation and professional email address), **at least 2 of which are from a different country than the Authors**. **Keywords** are provided.

Types of paper

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.

1. Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including no more than 6 tables - additional tables and figures can be submitted as supplementary material). Research papers should not contain more than 40 references.

2. Review articles - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations). Review articles should not contain more than 80 references).

If it is felt absolutely necessary to exceed this number, please contact the editorial office for advice before submission.

3. Rapid communications - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor.

4. Short communications - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication. These papers should not contain more than 30 references.

5. Viewpoints - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.

6. Letters to the Editor - Letters are published from time to time on matters of topical interest.

7. Book reviews

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Another useful source of guidance is "Responsible research publication: international standards for authors" from COPE (http://publicationethics.org/files/International%20standards_authors_for%20website_11_Nov_2011_0.pdf).

Guidelines in the US and Canada, Europe and Australia specifically state that hypothermia (use of ice slurries) is not an acceptable method for killing fish in the research environment.

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding**

author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement'. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement'. Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2600**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees

Authors are required to submit with their articles, the names, complete affiliations (spelled out), country and contact details (including current and valid (preferably business) e-mail address) of three potential reviewers. Email addresses and reviewer names will be checked for validity. **Your potential reviewers should not be from your institute, and at least two should be**

from different countries. Authors should not suggest reviewers with whom they have collaborated within the past two years. Your submission will be rejected if these are not supplied. Names provided may be used for other submissions on the same topic. Reviewers must have specific expertise on the subject of your article and/or the techniques employed in your study. Briefly state the appropriate expertise of each reviewer.

Review Policy

A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is:

- 1) on a topic outside the scope of the Journal;
- 2) lacking technical merit;
- 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance;
- 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or
- 5) is poorly written.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal and email addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers.

Article structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions. Do not import the Figures or Tables into your text, figures and tables should be submitted as separate files. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address'

(or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 150 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article:

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.

- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please insert the following text before the standard text - Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Example: CTAHR (College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii). Tea (*Camellia sinensis*) a New Crop for Hawaii, 2007. URL http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/tea_04_07.pdf. Accessed 14.02.11.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style.

If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-chemistry>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. See Types of Paper for reference number limits. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual

of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered online or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK. (2003). <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>
Accessed 13.03.03.

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving

readers access to underlying data that give them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a datafile.

Additional information

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity.

The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing,

completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.