UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA
PPGQ/UNICENTRO
MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DE MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS E EXTRAÇÃO POR HEADSPACE ESTÁTICO

PATRICIA DE LIMA MORAIS DA SILVA

GUARAPUAVA/PARANÁ
2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA
PPGQ/UNICENTRO
MESTRADO EM QUÍMICA APLICADA

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DE MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS E EXTRAÇÃO POR HEADSPACE ESTÁTICO

PATRICIA DE LIMA MORAIS DA SILVA
ORIENTADORA: DR (A). YOHANDRA REYES TORRES

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação em Química, Mestrado em Química Aplicada, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, para obtenção do grau de Mestre em Química.

GUARAPUAVA/PARANÁ
2016

Catalogação na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

Silva, Patricia de Lima Morais da
S586d Determinação da composição volátil de méis de abelhas sem ferrão através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e extração por headpace estático / Patricia de Lima Morais da Silva. – – Guarapuava, 2016
xi, 85 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, 2016

Orientadora: Yohandra Reyes Torres
Banca examinadora: Yohandra Reyes Torres, Liliane Schier de Lima, Luciana Boer Pinheiro de Souza

Bibliografia

1. Química. 2. Química aplicada. 3. Mel. 4. Abelha sem ferrão. 5. Headspace. 6. Composição volátil. 7. Análise multivariada. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 542

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS, por todas as bênçãos em minha vida, pelo dom da sabedoria e inteligência e pela força de vontade e determinação na realização deste trabalho.

À minha amada mãe Marlene e meu padrasto Marcos, que me deram todo o incentivo em começar o mestrado e durante o decorrer de todo o trabalho. Obrigada também pela educação, conselhos, amor, carinho que tenho recebido sempre.

Ao restante de minha família que tem me motivado tanto.

Ao Lucas pelo apoio, amor e companheirismo em todos os momentos.

Aos meus amigos, por terem torcido tanto por mim, principalmente à Barbara e Cristiane que estão ao meu lado desde curso de Bacharel em Química.

Aos meus colegas do CRONAT por toda ajuda e parceria, principalmente a Christiane que me ensinou muito. Também à Liliane que não poupava esforços em me auxiliar.

À minha orientadora Professora Yohandra Reyes Torres que mesmo com muitos orientandos, se sensibilizou em abrir mais uma vaga pra me orientar no mestrado, muito obrigada por essa oportunidade, por ter acreditado e confiado em mim para realização deste trabalho. Também por todos os ensinamentos e dedicação concedidos durante esses dois anos.

Também a professora Dra. Ísis K. Caetano pela disposição em me ajudar com o tratamento dos dados estatísticos.

À CAPES e FINEP pelo indispensável auxílio financeiro.

RESUMO

A composição volátil de méis brasileiros de oito espécies de abelhas sem ferrão, provenientes de regiões diferentes do estado do Paraná foi analisada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) utilizando como método de extração a técnica por headspace estático. A extração foi realizada em meio salino, com incubação do headspace por 10 min a 60 °C seguido da injeção no CG-EM. A análise dos componentes principais (ACP) foi empregada como técnica multivariada para comparação da composição química da fração volátil de méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão e diferentes origens geográficas. Um total de 44 compostos voláteis foi identificado com base na comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles disponíveis na biblioteca NIST. A identificação foi confirmada, em sua maioria, pelo índice de retenção de Kovats em relação a uma série de *n*-alcanos (C_8–C_{40}). Monoterpenos, sesquiterpenos, ésteres, álcoois, cetonas e aldeídos foram as principais classes dos compostos encontradas na fração volátil dos méis de abelhas sem ferrão e os óxidos de linalol (cis e trans) foram detectados em todas as amostras. Os resultados da ACP mostraram que o perfil de compostos voláteis nos méis de abelhas sem ferrão varia de acordo com a região geográfica de origem e pela a espécie de abelha produtora.

Palavras-chave: mel; abelha sem ferrão; headspace; composição volátil, análise multivariada.

ABSTRACT

The volatile composition of Brazilian honeys from eight species of stingless bees, which occurred in Paraná state, was analyzed by gas chromatographic–mass spectrometric (GC-MS) using the static headspace technique as extraction method. The extraction was carried out in saline solution with headspace incubation for 10 min at 60 °C followed by injection in the GC-MS. Principal Component Analysis (PCA) was performed as a multivariate technique to compare the chemical composition of the volatile fraction of honeys from different stingless bee species and different geographic origins. A total of 44 volatile compounds were identified based on comparison of the obtained spectra with those of the NIST library and were confirmed, when possible, by using Kovats retention index relative to a series of *n*-alkanes (C_8–C_{40}). Monoterpenes, sesquiterpenes, esters, alcohols, ketones and aldehydes were the major classes of compounds in the volatile fraction of stingless bees honey and linalool oxides (cis e trans) occurred in all samples. The results of ACP demonstrated that volatile compounds in honeys from stingless bees differ according to geographic region and the species of producer bees.

Keywords: honey; stingless bee; headspace; volatile composition; multivariate analysis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

2. FUNDAMENTEÇÃO TEÓRICA 3

2.1. Abelhas 3
2.2. Produtos produzidos pelas abelhas 8
2.3. Mel 11
2.4. Composição Química dos Méis 12
2.5. Atividade farmacológica dos méis 15
2.6. Métodos de Extração dos componentes voláteis do mel 19
2.6.1. Extração líquido-líquido (LLE) 20
2.6.2. Extração em fase sólida (SPE) 21
2.6.3. Headspace 22
2.6.4. Micro-extração em fase sólida (SPME) 24
2.7. Otimização do método de extração por *HEADSPACE* estático 26
2.8. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) 28
2.9. Índices de retenção em cromatografia gasosa 29
2.10. Análise exploratória de méis 30

3. OBJETIVOS 36

3.1. Objetivo geral 36
3.2. Objetivos Específicos 36

4. MATERIAIS E MÉTODOS 37

4.1. Amostras de mel 37
4.2. Otimização do método de extração por *HEADSPACE* 39
4.3. Extração por *HEADSPACE* estático 40
4.4. Condições cromatográficas para análise por CG-EM 40
4.5. Identificação dos compostos voláteis 41
4.6. Análise dos componentes principais 41

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 43

5.1. Otimização do método de extração por *HEADSPACE* 43
5.2. Compostos voláteis em méis de abelhas sem ferrão 46
5.3. Análise dos componentes principais 55

6. CONCLUSÃO 59

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 60

ANEXOS 74

LISTA DE ABREVIATURAS

ACP	Análise dos componentes principais
BHA	Butilhidroxianasil
BHT	Butilhidroxitolueno
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
Bo	Borá
CG	Cromatógrafo a gás
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
C/N	Carbono/Nitrogênio
CP	Componente principal
CP1	Primeira componente principal
CP2	Segunda componente principal
FID	Detector de ionização em chamas
Go	Guairapó
DCE	Detector de captura de elétrons
EM	Espectrômetro de massas
HCA	Análise de agrupamentos hierárquicos
He	Hélio
HS-SPME	Micro-extração em fase sólida com headspace
HMF	Hidroximetilfurfural
ID	Identificação
IK	Índice de Kovats
IR	Índice de retenção
IRL	Índice de retenção linear
Ja	Jataí
LLE	Extração líquido-líquido
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Md	Mandaçaia
Mi	Mandurí
NIST	National Institute of Standards and Technology
PLS-DA	Análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais
SPME	Micro-extração em fase sólida
Tb	Tubuna

TCD	Detector de condutividade térmica
TDN	1,1,5-Trimetil-1,2-dihidronaftaleno
Tj	Tujumirim
t_r	Tempo de retenção
Ur	Uruçu

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais espécies produtoras de mel criadas no Brasil 6
Tabela 2. Valores dos parâmetros físico-químicos nos méis de *Apis mellifera* e *Scaptotrigona bipunctata* 13
Tabela 3. Dados das amostras de mel em estudo 38
Tabela 4. Fatores e seus níveis do planejamento fatorial 2^3 para otimização da extração por *headspace* 40
Tabela 5. Compostos voláteis identificados em méis multiflorais brasileiros de abelhas sem ferrão 47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação das Abelhas 3
Figura 2. Abelha *Apis mellifera* 4
Figura 3. Abelhas pertencentes a subfamília Meliponíneos: (a) *Tetragonisca angustula* Lat., (b) *Melipona bicolor* Lep., (c) *Trigona spinipes* Fab., (d) *Melipona scutellaris* Lat., (e) *Melipona quadrifasciata* Lep., (f) *Tetragona clavipes* Fab., (g) *Melipona marginata* Lep., (h) *Scaptotrigona bipunctata* Lep. e (i) *Scaptotrigona xanthotricha* Mou. 5
Figura 4. Abelha pertencente à subfamília Bombinae 7
Figura 5. Abelha pertencente à subfamília Euglossinae 7
Figura 6. Colmeias de abelhas Tiúba e Uruçu: (1) Geoprópolis depositado nas frestas, (2) Potes de alimento, (3) Favos de cria, (4) Invólucro. 8
Figura 7. Potes de mel da abelha Jataí 9
Figura 8. Potes de pólen da abelha Jataí 9
Figura 9. Entrada da colmeia da abelha Jataí construído de cerume, o qual é fechado durante a noite, deixando-se pequenos orifícios na parede a fim de permitir o arejamento interno. 9
Figura 10. Alguns compostos voláteis de diversas classes químicas encontrados em méis de *Apis mellifera* 14
Figura 11. Exemplos de alguns ácidos fenólicos e flavonoides identificados em mel. 17
Figura 12. Principais etapas envolvidas na SPE 21
Figura 13. Frasco hermeticamente fechado com a amostra 22
Figura 14. Procedimento de extração de compostos voláteis por *headspace* estático. Em (a) Frasco contendo a amostra com os analitos voláteis; (b) saturação do *headspace* após aquecimento e agitação; (c); coleta dos voláteis no *headspace* do frasco pela seringa; (d) os voláteis são coletados; (d) dessorção dos voláteis na porta de injeção do CG. 23
Figura 15. Procedimento de extração de compostos voláteis por *Headspace* Dinâmico 24
Figura 16. Procedimento básico para micro-extração em fase sólida através do *headspace*. Primeira etapa: (A) saturação do headspace, (B) exposição da fibra de SPME para extração dos analitos, e (C) retração da fibra para o interior da agulha. Segunda etapa: (D) perfuração do septo do injetor do cromatógrafo a gás, (E) exposição da fibra para dessorção dos analitos, e (F) retração da fibra para o interior da agulha. . 25
Figura 17. Mapa do estado do Paraná dividido em mesorregiões 37

Figura 18. Amostras comerciais de méis multiflorais de abelhas sem ferrão da cidade de Guaraqueçaba-PR. 38
Figura 19. Amostras comerciais de méis multiflorais de abelhas sem ferrão da cidade de Cambará-PR. 39
Figura 20. Amostras comerciais de méis multiflorais de abelhas sem ferrão da cidade de Prudentópolis-PR 39
Figura 21. Diagrama de Pareto padronizado em p = 0,05 para a área do pico do composto principal dos cromatogramas obtidos para méis de abelhas sem ferrão, em função do meio, temperatura e tempo de extração por *headspace* estático. 43
Figura 22. Cromatogramas obtidos na otimização do método de extração dos compostos voláteis de méis de abelhas sem ferrão usando *headspace* estático 45
Figura 23. Ampliação dos cromatogramas obtidos nos ensaios de otimização do método de extração dos compostos voláteis de méis de abelhas sem ferrão por extração por *headspace* estático a 60°C por 10 min, em meio aquoso e salino. 46
Figura 24. Cromatograma de uma mistura de padrões de alcanos lineares (C_8–C_{40}) injetada na mesma rampa de aquecimento que as amostras foram analisadas 47
Figura 25. Estruturas dos compostos identificados nos méis multiflorais de abelhas sem ferrão usando extração por *headspace* estático 51
Figura 26. Cromatogramas representativos do *headspace* das amostras de méis de abelhas sem ferrão: (a) cromatograma do mel da abelha Mandurí da cidade de Guaraqueçaba, (b) cromatograma do mel da abelha Borá da cidade de Guaraqueçaba e em (c) cromatograma do mel da abelha Mandaçaia da cidade de Prudentópolis. 52
Figura 27. Gráfico de escores de CP1 *versus* CP2 codificado de acordo com a legenda e a Tabela 3 55
Figura 28. Gráfico de pesos das variáveis estudadas 56

1. INTRODUÇÃO

O mel é um produto natural produzido pelas abelhas, composto principalmente por açúcares e outros componentes minoritários que combinados às características da origem floral e também da espécie da abelha que o originou, atribui-lhe um alto teor nutritivo e propriedades medicinais [1]. Para a produção de mel floral, o néctar das flores, coletado pelas abelhas, é transformado, armazenado e amadurecido nos favos da colmeia. Existem também os méis ditos extraflorais cuja origem provém de excreções de plantas e insetos [2].

A abelha *Apis mellifera* é a principal espécie produtora do mel utilizado para o consumo humano principalmente por sua domesticação remota, por ser nativa dos principais países consumidores, pela alta produtividade e rentabilidade [3]. Entretanto, em regiões tropicais e subtropicais, especialmente na América do Sul, existem mais de 400 espécies de abelhas nativas sociais que produzem mel. Essas abelhas são conhecidas como abelhas indígenas, nativas, sem ferrão ou meliponíneos [4,5]. Em relação à quantidade produzida de mel, as abelhas sem ferrão apresentam menor produtividade quando comparadas às abelhas *Apis mellifera.* Por outro lado, essas abelhas elaboram um mel diferenciado principalmente pela doçura e aroma peculiares, tais características conferem-lhe valor comercial mais elevado aos méis de abelhas sem ferrão [5,6].

A procura pela conveniência, autenticidade, qualidade, segurança, bem como a crescente preocupação com o meio ambiente e a saúde, são algumas das principais exigências dos consumidores na aquisição de produtos apícolas [7]. Dessa forma, com o objetivo de garantir a qualidade do mel, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através da Instrução Normativa n. 11 de Outubro de 2000, estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade, como características sensoriais, físico-químicas e ainda critérios macro e microbiológicos, destinado ao mel usado para o consumo humano direto [2]. A necessidade de garantia de qualidade do mel também é muito importante para a sua venda em mercados internacionais. Países como Estados Unidos, Canadá, Alemanha e Espanha exigem como condição, que sejam observados requisitos técnicos de qualidade do mel do respectivo país importador [8].

Outro fator importante que visa à qualidade do mel é sua rastreabilidade. Para isso a norma NBR 15654 de 08/01/2009 – Apicultura – Mel – Sistema de

rastreabilidade [9], apresenta os princípios e especifica os requisitos básicos para planejar e implementar um sistema de rastreabilidade, que garante a qualidade do mel nas diversas etapas de produção e consequentemente do produto final, desde o apiário, durante as etapas de transporte e manipulação e posterior processamento (entreposto). Este sistema permite uma identificação, elaboração e manutenção de registros e facilidade na obtenção da informação sobre o mel produzido [10].

Nos últimos anos, o mel tem se tornado alvo de vários estudos científicos e atualmente se faz mais presente na alimentação humana [11]. Além de estudos envolvendo sua caracterização química através do perfil de fenólicos e de suas propriedades antioxidantes, outro fator importante é o perfil de compostos voláteis que contribui significativamente para seu característico sabor e aroma [12]. Os méis possuem aromas diferentes devido à presença de compostos voláteis específicos que podem ser considerados como marcadores químicos ou impressões digitais do sabor e aroma [13]. Por exemplo, compostos de linalol têm sido comumente citados como marcadores químicos de méis cítricos [14–17], enquanto que, o fenilacetaldeído é destacado como característico de méis de lavanda [18]. Em sua maioria esses marcadores químicos são derivados da flora de origem, que por sua vez é influenciada por fatores geográficos e sazonais, dessa forma [12], diferentes perfis de voláteis são esperados em méis de diferentes regiões [19].

O aroma de mel pode envolver dezenas de compostos voláteis. Atualmente, mais de 300 compostos voláteis foram identificados em méis de *Apis mellifera* de diferentes tipos florais. Entre as moléculas encontradas na composição volátil do mel podemos citar hidrocarbonetos, compostos aromáticos, ácidos, terpenos, cetonas, aldeídos, ésteres e álcoois [20]. Entretanto, novos compostos devem ampliar esse número em função da existência de diversos méis ainda não estudados [21], principalmente os méis de abelhas sem ferrão, onde os estudos ainda são escassos.

O interesse na caracterização de méis brasileiros em termos de composição química ainda é recente e pouco se tem estudado sobre o mel de abelhas sem ferrão, principalmente em relação ao perfil de voláteis. Esse trabalho teve a finalidade de avaliar a composição química da fração volátil de méis de abelhas sem ferrão produzidos no Paraná, utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e extração por *headspace* estático.

2. FUNDAMENTEÇÃO TEÓRICA

2.1. Abelhas

As abelhas são insetos da ordem Hymenoptera, pertencentes à superfamília Apoidea, que por sua vez é constituída por diversas famílias, entre elas a Apidae é a família que possui hábitos sociais mais avançados. A família Apidae possui 4 subfamílias: a dos Apíneos, dos Meliponíneos, Bombíneos e Euglossíneos [5]. Essa classificação é mostrada na Figura 1.

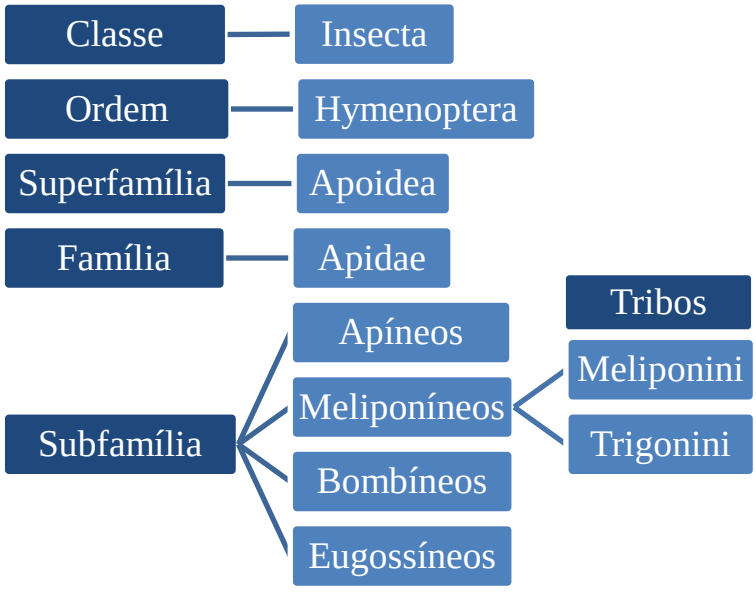


Figura 1. Classificação das Abelhas

Na subfamília de Apíneos, a espécie de abelha mais popular é a *Apis mellifera* Lin. (Figura 2). As abelhas europeias da espécie *Apis mellifera* foram introduzidas no Brasil em 1840 trazidas da Espanha e Portugal pelo Padre Antônio Carneiro onde as subespécies *Apis mellifera carnica* e *Apis mellifera mellifera*, também introduzidas por imigrantes alemães em 1945, provavelmente foram as primeiras abelhas a chegar no país. Em 1956, com objetivo de melhorar a genética das abelhas, aumentando a produção de mel associada à baixa agressividade, as abelhas africanas *Apis mellifera scutellata* foram introduzidas no Brasil. Entretanto, no ano seguinte devido a um acidente durante os experimentos, enxames destas abelhas escaparam e cruzaram

com as abelhas de origem europeia que haviam sido trazidas pelos imigrantes. Com isso surgiram as populações híbridas denominadas abelhas africanizadas [22].

Figura 2. Abelha *Apis mellifera*
Fonte: Terrain, (2015) [23].

Hoje, as abelhas africanizadas são consideradas como as responsáveis pelo desenvolvimento apícola do país. A agressividade destas abelhas, ao contrário do que muitos pensam, é considerada por muitos apicultores como uma forte aliada nesta atividade. Pois acaba dificultando possíveis roubos e também as abelhas acabam sendo tolerantes a vários tipos de pragas e doenças [22].

Quando uma abelha (operária) se sente ameaçada, ela utiliza o ferrão. Porém, a ferroada em humanos pode ser fatal para abelha na maioria dos casos, devido à perda das farpas (parte posterior do abdômen) que fica ligada ao ferrão. Já ao picar insetos, a abelha, muitas vezes, consegue retirar as farpas da vítima e ainda sobreviver. A ferroada em humanos não causa muitos danos, a não ser em casos que a pessoa seja alérgica à apitoxina que é o veneno das abelhas que fica ligado ao ferrão. Hoje em dia, esse veneno tem sido usado eventualmente com valor terapêutico possuindo efeitos positivos na região em que é injetado [24].

Os Meliponíneos são as abelhas indígenas sem ferrão, também conhecidas como abelhas nativas (Figura 3). Esta subfamília é dividida em duas tribos: Meliponini, que é constituída apenas pelo gênero Melipona e os Trigonini que constituem um grupo muito diversificado, com dezenas de gêneros [5].

Essas abelhas são sociais, dóceis, de fácil manejo, sua criação necessita de pouco investimento, são de grande diversidade e ampla distribuição geográfica. A maioria das abelhas sem ferrão se encontram em regiões de climas tropicais, temperado e subtropicais da Terra, dessa forma, elas são encontradas em grande parte no território Latino-Americano, também na África, sudeste asiático e norte da Austrália [4,5,25].

Sua criação consiste na Meliponicultura, onde a obtenção do mel é um dos principais objetivos dessa atividade que foi inicialmente desenvolvida pelos índios [5]. A herança indígena é destacada pelos nomes populares de muitas espécies como, por exemplo, Jataí, Uruçu, Tiúba, Mombuca, Irapuá, Tataíra, Jandaíra, Guarupu, Manduri, entre outras [4].

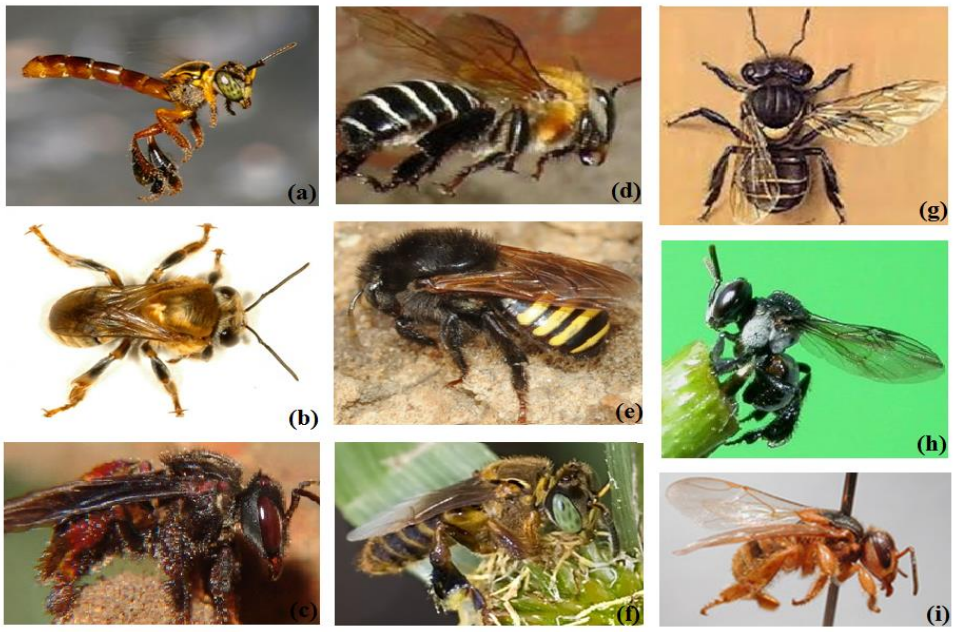


Figura 3. Abelhas pertencentes a subfamília Meliponíneos: (a) *Tetragonisca angustula* Lat., (b) *Melipona bicolor* Lep., (c) *Trigona spinipes* Fab., (d) *Melipona scutellaris* Lat., (e) *Melipona quadrifasciata* Lep., (f) *Tetragona clavipes* Fab., (g) *Melipona marginata* Lep., (h) *Scaptotrigona bipunctata* Lep. e (i) *Scaptotrigona xanthotricha* Mou.
Fontes: Grupo Abena [26], IB/USP [27,28], Centro de Produções Técnicas [29], Instituto Rã-Bugio [30], American Insects [31], Wildthings [32] (2015).

Existem cerca de 400 espécies de Meliponíneos, 90% são responsáveis pela polinização dos vegetais nativos e a maioria produz mel de boa qualidade. Mesmo que sua produção seja em menor quantidade quando comparado a *Apis mellifera* , as abelhas sem ferrão fornecem um mel de qualidade diferenciada, principalmente na doçura e aroma peculiar, o que resulta num preço comercial mais elevado [3,5]. Dessa forma seu mel possui muitos apreciadores e existem regiões do planeta onde o mel de abelhas sem ferrão é mais apreciado que o mel das *Apis mellifera*, não somente pelo seu paladar, mas principalmente porque pode ser obtido em certas regiões em melhores condições de produção, por exemplo, em trópicos úmidos ou encharcados, principalmente em terras baixas e em florestas de neblina. Nessas condições as abelhas europeias, assim como, as africanizadas geralmente fracassam na produção de seu mel [5].

Os Meliponíneos ocorrem em todo Brasil, e as espécies Guaraipó, Mandaçaia, Manduri e a Jataí, são as principais produtoras criadas na região Sul, como relacionado na Tabela 1 [4].

Tabela 1. Principais espécies produtoras de mel criadas no Brasil

Região	Nome científico	Nome popular	Estados
Norte	*Melipona fasciculata* Smi.	Tiúba	PA/TO/AM
	Melipona seminigra Fri.	Uruçu-Boca-de-Renda	AM/PA
	Scaptotrigona sp.[a]	Canudo	AC/AM/AP/PA/ RO/RR/TO
Nordeste	*Melipona asilvai* Mou.	Munduri	AL/BA/CE/PB PE/PI/RN/SE
	Melipona fasciculata Smi.	Tiúba	MA/PI/AL
	Melipona quadrifasciata Lep.	Mandaçaia	AL/BA/CE/PB PE/PI/RN/SE
	Melipona scutellaris Lat.	Uruçu	AL/BA/CE/PB PE/RN/SE
	Melipona subnitida Duc.	Jandaíra	AL/BA/CE/MA PB/PE/PI/RN/SE
Centro-oeste	*Melipona rufiventris* Lep.	Uruçu-Amarela	GO, MS, MT
	Melipona seminigra Fri.	Uruçu-Boca-de-Renda	MT
	Scaptotrigona sp.[a]	Canudo	GO, MS, MT
	Tetragonisca angustula Lat.	Jataí	GO, MS, MT
Sudeste	*Melipona bicolor* Lep.	Guairapó	ES, MG, RJ, SP
	Melipona quadrifasciata Lep.	Mandaçaia	ES, MG, RJ, SP
	Melipona rufiventris Lep.	Uruçu-amarela	MG, SP, ES
	Tetragonisca angustula Lat.	Jataí	ES, MG, RJ, SP
Sul	*Melipona bicolor* Lep.	Guairapó	PR, RS, SC
	Melipona quadrifasciata Lep.	Mandaçaia	PR, RS, SC
	Melipona marginata Lep.	Mandurí	PR, RS, SC
	Tetragonisca angustula Lat.	Jataí	PR, RS, SC

[a] Espécies da tribo Trigonini.
Fonte: Villas-Bôas, 2012 [4].

Outras abelhas, pertencentes à família dos Apídeos, são os Bombíneos, conhecidas como mamangabas, elas apresentam a característica de terem corpos grandes e cobertos de pelos (Figura 4). No Brasil, as abelhas dos Bombíneos são negras, e frequentemente apresentam áreas amarelas no corpo. Quando sociais, vivem em colmeias que podem ser pequenas ou grandes, onde para esta última o ninho envolve centenas de abelhas. Por fim temos os Euglossíneos (Figura 5), conhecidos também como abelhas das orquídeas, que são abelhas grandes com cores metálicas, às vezes verdes, vináceas ou arroxeadas [5].

Figura 4. Abelha pertencente à subfamília Bombinae
Fonte: Wikipedia, (2015) [33].

Figura 5. Abelha pertencente à subfamília Euglossinae
Fonte: Bugs and Beyond in Belize, (2015) [34].

Entre essas 4 subfamílias, somente os Meliponíneos não têm ferrão. Com algumas exceções, a característica comum dos Apídeos é ter nas tíbias das patas traseiras das abelhas operárias uma concavidade chamada corbícula, onde elas carregam pólen das flores e outras substâncias para suas colmeias. As rainhas e os machos dos Apíneos e dos Meliponíneos não possuem corbícula. Outra característica desta família é que a colmeia, células de cria e depósitos de alimento são construídos pelas abelhas com cera ou cerume [5].

O principal papel das abelhas na natureza é como polinizadoras, pois em numerosos casos as plantas necessitam de um agente que ajude a fecundar as flores. Então como as abelhas dependem essencialmente de néctar (fonte de energia) e também do pólen (fonte proteica) como alimentos, elas acabam visitando diversas plantas no dia-a-dia para suprir suas necessidades tornando-se os principais agentes polinizadores da natureza [5,35].

As abelhas normalmente são criadas para produção de mel, porém elas também produzem diversos produtos em suas colmeias de grande importância comercial [36]. Estes produtos são abordados no tópico a seguir.

2.2. Produtos produzidos pelas abelhas

As colmeias são construídas pelas abelhas com diversas matérias-primas que podem ser extraídas da natureza, por exemplo, o barro e a própolis. Outros materiais de construção são produzidos e processados pelas abelhas dentro da colmeia, como a cera, o cerume e o geopropolis [5].

A colmeia de abelhas sem ferrão é formada por duas estruturas principais: o ninho e potes de alimento, além de estruturas auxiliares como o invólucro, o batume, a entrada e o túnel de ingresso [4] (Figura 6).

Figura 6. Colmeias de abelhas Tiúba e Uruçu: (1) Geoprópolis depositado nas frestas, (2) Potes de alimento, (3) Favos de cria, (4) Invólucro.
Fonte: Villas- Bôas (2012) [4].

A maior parte da colmeia é formada de cerume e suas características variam conforme a espécie de abelha. O cerume é uma mistura de cera branca, pura com própolis. A cor do cerume dos meliponíneos pode variar de amarelo bem claro, a uma cor quase negra, essa coloração depende da quantidade e qualidade da própolis utilizada na mistura. Ele é usado no ninho quando construído em forma de cachos que é quando as células de criação ficam esparsas e conectadas entre si por pequenos pilares de cerume. Os potes de alimentos também são construídos com cerume, eles normalmente têm forma oval, o tamanho varia conforme a espécie de abelha e os potes são divididos em dois tipos: potes de mel (Figura 7) e potes de pólen (Figura 8) [5].

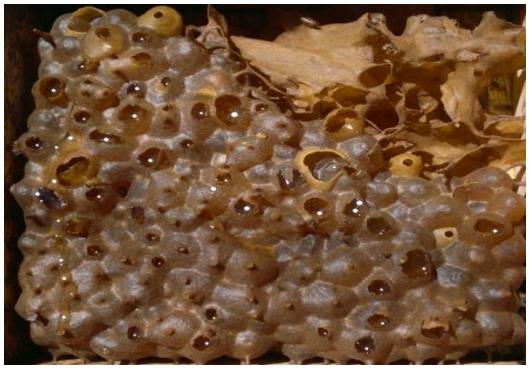


Figura 7. Potes de mel da abelha Jataí
Fonte: Meliponário Montesco [37].

Figura 8. Potes de pólen da abelha Jataí
Fonte: Meliponário do Sertão [38]

O cerume também é usado na construção dos invólucros que é uma espécie de manta de aquecimento que envolve o ninho para manter sua temperatura. O cerume nos invólucros também auxilia na passagem das abelhas ao redor do ninho [5].

A entrada das colmeias de abelhas sem ferrão possui formas diversificadas específicas de cada espécie de abelha (Figura 9). Ela pode ser construída de barro, cera, cerume ou geoprópolis. Após a entrada, as abelhas passam por um tubo de ingresso até o interior da colmeia geralmente ligado através do invólucro [4].

Figura 9. Entrada da colmeia da abelha Jataí construído de cerume, o qual é fechado durante a noite, deixando-se pequenos orifícios na parede a fim de permitir o arejamento interno.
Fonte: Meliponário da Serra [39].

A cera é um produto produzido pelas abelhas nas colmeias. Ela é secretada pelas abelhas jovens através de glândulas existentes no dorso do abdome. Essa secreção então resulta em uma pequena placa de cera branca que são armazenadas em depósitos nos ninhos de alguns meliponíneos. Outras espécies como a Mirim preguiça (*Friesella schrottky* Fri.) usam, com frequência, a cera branca na entrada do seu ninho sem misturar com própolis [5]. As abelhas também utilizam a cera na construção dos favos e

no fechamento das células de criação. A cera é utilizada comercialmente para produção de velas, produtos cosméticos e também em tecelagens [40].

A própolis por sua vez, vem da natureza, e é constituída por resinas vegetais coletadas pelas abelhas nas plantas e trazidas para as colmeias. A própolis pode ser trabalhada pela abelha em sua forma pura, ou mista que é quando ela é misturada com um pouco de cera. Geralmente, a própolis mais utilizada hoje em dia no comércio é retirada dos ninhos de *Apis mellifera*, porém os meliponíneos também coletam quantidades importantes de própolis. Às vezes essas resinas são misturadas à cera, constituindo o cerume, como foi mencionado anteriormente, e também os meliponíneos costumam misturá-la com terra ou barro formando o geoprópolis [5].

A Própolis além de ser usada para construir a entrada do ninho de muitas espécies, é usada principalmente para construção de batumes que são massas preparadas pelas abelhas para vedar frestas da colmeia e para delimitar cavidades [4]. Em certas espécies a própolis constitui a maior parte ou a totalidade dos batumes da colmeia que é o caso da tribo trigonini onde seus batumes costumam ser constituídos com uma grande quantidade de resina e pouca cera. Enquanto que o batume da tribo meliponini é constituído com geoprópolis [4,5].

Os meliponíneos costumam também usar a própolis como um método de defesa muito eficiente contra moscas, parasitas, formigas, etc., essas abelhas retiram pelotinhas de seus depósitos viscosos de própolis para colocar sobre a cabeça e outras partes do corpo desses inimigos. Outro fato interessante é que a própolis armazenada pelas abelhas das espécies Jataí e Mirin (*Plebeia spp*) é extremamente viscosa, muito mais do que as armazenadas por outras espécies de meliponíneos [5].

Atualmente a própolis é usada no comércio em produtos cosméticos e em medicamentos pelos seus efeitos cicatrizantes, considerada um antibiótico natural [40]. A própolis também é conhecida por suas diversas propriedades farmacológicas tais como antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória, antitumoral, antiviral, antifúngica, entre outras [41].

A geoprópolis é uma mistura da própolis com barro, usada para construção de batumes nas colmeias, como mencionado anteriormente. Sua coloração, assim como o cerume, também varia conforme a quantidade e qualidade da própolis e também com o barro ou terra utilizado [4]. Esse material é principalmente usado pelas abelhas da tribo meliponini [5].

Estudos sobre composição química e ação farmacológica de geoprópolis são escassos. Bankova et al. [42] identificaram, em geoprópolis brasileira de abelhas *Melipona compressipes*, *Melipona quadrifasciata* e *Tetragona clavipes,* mais de cinquenta compostos, principalmente fenóis e terpenos que atribuem efeitos terapêuticos à geoprópolis. Resultados obtidos por Liberio et al. [43] indicaram que a geoprópolis produzida pela espécie *Melipona fasciculata* pode apresentar atividade antimicrobiana contra *S. mutans* e *C. albicans.* Também foi observado um aumento de citocinas anti-inflamatórias em ratos, mostrando que a geoprópolis tem o potencial de ser utilizada para o controle ou prevenção de doenças da cavidade oral, especialmente cárie e candidíase, bem como para o tratamento de processos inflamatórios.

2.3. Mel

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel (Instrução Normativa nº 11 de 20/10/00) estabelecido pelo MAPA "*entende-se por mel, o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia*" [2]. Apesar da Legislação Brasileira só atender às características do mel de *Apis mellifera*, não contemplando o mel das abelhas nativas do país, vários estudos tem sido realizados com diferentes tipos de méis de abelhas sem ferrão, colaborando dessa forma com sua padronização para uma futura Legislação Brasileira [44–48].

Durante a elaboração do mel, o néctar sofre duas modificações, uma delas física, pela desidratação, e a outra química, pela inversão de açúcar composto em açúcar simples [1]. As abelhas chegam à colmeia trazendo o néctar, e normalmente entregam a outras abelhas que o desidratam. Neste processo, essas abelhas expõem e retraem uma gotícula de néctar na ponta da língua durante certo tempo, com isso o néctar vai ficando mais denso com a evaporação da água. Além desta desidratação, grande quantidade de sacarose é invertida em frutose e glucose com a ação de enzimas. Também ocorre a produção de peróxido de oxigênio e substâncias antibióticas e antimicrobianas. Dessa forma, o néctar vai se transformando em mel [5].

Quanto a sua origem, o mel pode adquirir a denominação de mel floral, quando obtido a partir do néctar das plantas. O néctar é constituído principalmente por água e sacarose resultando em um líquido açucarado, também pode conter outros açúcares, sais minerais, substâncias antibióticas etc. A abelha também pode colher a seiva das plantas ou excreções adocicadas de outros insetos sugadores dessas seivas, neste caso, o mel produzido com esse tipo de matéria prima é chamado mel extrafloral ou melato [2,5].

O mel de flores pode ser classificado como: unifloral ou monofloral, quando a maior parte do néctar é coletada de uma única espécie de planta; multifloral ou polifloral, quando mais de uma espécie botânica contribui com o néctar [2].

Os méis multiflorais são mais encontrados, enquanto que os monoflorais são mais raros e apresentam aromas característicos que indicam a origem floral. Porém na prática não é possível produzir um mel 100% monofloral, dessa forma, como não são fáceis de produzir o seu preço é, na maioria dos casos, superior ao multifloral [15,20].

O mel foi praticamente a única fonte de substâncias açucaradas durante boa parte da existência humana, e até hoje ele está presente na alimentação humana como adoçante natural, principalmente por suas propriedades bioativas [5,11], que são mostradas no tópico 2.5.

Atualmente o Brasil é o 8º maior exportador de mel do mundo [49], e isso só tende a aumentar, pois o país apresenta condições climáticas favoráveis para produção de mel durante o ano todo, além de uma extensa flora diferenciada, o que permite uma variedade de méis com propriedades únicas e sabores e aromas diferenciados [50].

As propriedades físico-químicas do mel são influenciadas pelo néctar e pólen da origem floral, cor, aroma, teor de umidade, bem como teor de proteínas e açúcares. Dessa forma, a qualidade desse produto natural é avaliada principalmente por suas características sensoriais, químicas e físicas [51]. No tópico a seguir é abordada a composição química dos méis.

2.4. Composição Química dos Méis

A composição do mel é variável e depende de fatores como a origem geográfica, origem floral, o clima, solo, condições meteorológicas na época da colheita, espécie de abelha produtora, estado fisiológico da colônia, estado de maturação do mel, dentre outros fatores [1,19].

O mel é constituído essencialmente por água e açúcares. Possui também em sua composição pequenas quantidades de outras substâncias como, minerais, proteínas, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos, flavonoides, ácidos fenólicos, enzimas e uma extensa variedade de compostos orgânicos, que contribuem para sua cor, odor e sabor [2,52]

A Tabela 2. mostra a comparação realizada por Oliveira e Santos [48] dos parâmetros físico-químicos de méis de *Apis mellifera* com méis de meliponíneos da espécie *Scaptotrigona bipunctata*, criadas no estado do Ceará.

Tabela 2. Valores dos parâmetros físico-químicos nos méis de *Apis mellifera* e *Scaptotrigona bipunctata*

Parâmetros Físico-Químicos	**Mel de Abelhas africanizadas**	**Mel de Abelhas sem ferrão**
HMF (mg/Kg)	49,93	4,85
Sólidos Insolúveis (%)	0,73	0,27
Açúcares Redutores (%)	72,02	60,01
Sacarose Aparente (%)	1,88	4,65
Cinzas (%)	0,36	0,83
Acidez Livre (mEq/Kg)	45,64	38,57
Umidade (%)	19,07	24,71
pH	3,50	3,97

Fonte: Oliveira e Santos (2011) [48].

Os pesquisadores atribuíram o baixo teor de Hidroximetilfurfural (HMF) no mel da abelha sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata*, ao fato dos méis terem sido colhidos prematuramente [48]. Entretanto, podemos observar que alguns dos parâmetros físico-químicos apresentados podem diferenciar os méis, principalmente a umidade que é bastante elevada para o mel de abelhas sem ferrão, tornando-se menos denso quando comparada ao mel das abelhas africanizadas [53].

Os méis de abelhas sem ferrão possuem menor teor de açucares, onde os principais açucares encontrados são frutose e glicose. O gosto desses méis é mais doce e um dos fatores responsáveis por essa característica é a predominância de frutose nesses méis juntamente com sua alta capacidade de absorver água [1]. Em relação à quantidade de sacarose, as abelhas sem ferrão possuem teor maior do que o mel de abelhas

africanizadas, entretanto, o teor elevado desse açúcar significa na maioria das vezes uma colheita prematura do mel [48].

As propriedades medicinais dos méis ocorrem principalmente pela presença de compostos fenólicos, ácidos fenólicos e flavonoides, que são considerados como alguns dos responsáveis pela capacidade antioxidante do mel [54]. Muitos estudos demonstraram que o mel serve como uma fonte de antioxidantes naturais, os quais são eficazes na prevenção de diversas doenças [55]. O mel também apresenta propriedade antibacteriana associada principalmente à enzima glicose-oxidase, que ataca microrganismos pela catálise da oxidação da glicose com produção de peróxido de hidrogênio [56].

O aroma é um dos atributos mais apreciados pelos consumidores de mel, essa característica deve-se à presença de compostos voláteis, em sua maioria derivados do néctar de origem [12,20]. Dessa forma, a origem floral de um mel pode ser determinada pela concentração de certos compostos voláteis chamados de marcadores químicos ou impressão digital do aroma [13,57], como no caso de compostos de Linalol que têm sido comumente citados como marcadores químicos de méis cítricos [14–17], enquanto que, o fenilacetaldeído é destacado como característico de méis de lavanda [18].

O perfil de compostos voláteis é uma forma de mostrar os compostos representativos desse aroma e também atestar a autenticidade de méis monoflorais. Entre as moléculas encontradas na composição volátil em mel de diferentes origens botânicas podemos citar hidrocarbonetos, componentes aromáticos, ácidos, diácidos, terpenos, cetonas, aldeídos, ésteres e álcoois (Figura 10) [20].

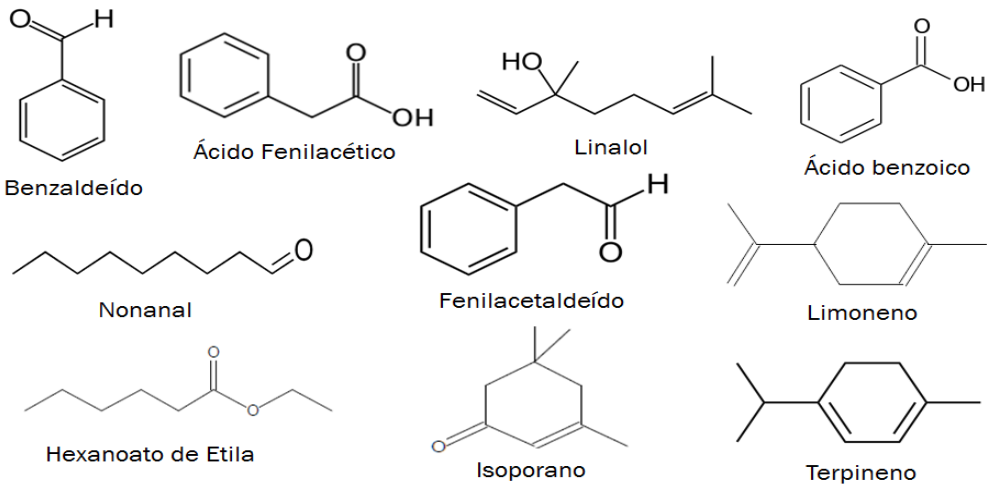


Figura 10. Alguns compostos voláteis de diversas classes químicas encontrados em méis de *Apis mellifera*

Os compostos voláteis podem ser originados das seguintes fontes:

1- Das plantas ou flores: terpenos, derivados do Linalol entre outros são encontrados tanto nas flores como no mel;

2- Das abelhas: ácidos voláteis como ácido acético e butírico podem ser produzidos durante o metabolismo da abelha;

3- Dos constituintes das plantas convertidos pela abelha: enzimas da classe redutase, oriundas das abelhas, poderiam catalisar reações de redução onde, por exemplo, o fenilacetaldeído poderia ser convertido em álcool feniletílico;

4- Pela ação de microrganismos durante a maturação do mel: a presença de leveduras contaminantes é responsável pelo alto teor de etanol e isobutanol, bem como de aldeídos ramificados;

5- Durante o processamento pós-colheita: a presença de aldeídos ramificados, como isobutanal e 2-metil-butanal, produzidos durante a reação de *Strecker* e compostos heterocíclicos contendo oxigênio, como 2-metil-furano e furfural, oriundos da caramelização de açúcares, são exemplos de artefatos produzidos com armazenamento em temperaturas inadequadas [20].

Diversos estudos apontam constituintes do aroma de méis como marcadores florais. Entre os estudos brasileiros podemos citar o de Bastos et al. [58], onde o nonanal e o nonanol foram relatados como constituintes do aroma de méis de Eucalipto e fenilacetaldeído e benzaldeído para méis de Laranja. Moreira e de Maria [59] relataram o benzaldeído, ácido-2,3-metilbutanóico, benzonitrila, 2-feniletanol, 1-fenil-1,2-propanodiona, ácido benzóico e ácido fenilacético como importantes contribuintes do aroma e sabor do mel de Cambará. Adicionalmente, Moreira et al. [60] identificaram furfuril mercaptana, álcool benzílico, δ-octalactona, γ- decalactona, eugenol, ácido benzóico, ácido isovalérico, 2-feniletanol e 2-metoxifenol como contribuintes para o aroma característico dos méis de cajueiro e ácido isovalérico, γ-decalactona, ácido benzóico e vanilina para méis de marmeleiro.

2.5. Atividade farmacológica dos méis

Há milhares de anos o mel tem sido utilizado em tratamentos de doenças respiratórias, infecções gastrointestinais, queimaduras e feridas [54]. Além do

conhecimento popular, estudos indicam que alguns méis atuam com benefícios específicos de acordo com sua florada, por exemplo:

- Mel de eucalipto: ajuda a combater a bronquite, a tosse e asma.
- Mel de laranja: regulador do intestino, tranquilizante natural.
- Mel de Assa Peixe: tônico e depurativo do sangue, calmante.
- Mel silvestre: recomendado para o sistema nervoso, vias respiratórias e pele; é também calmante, laxante, desintoxicante [61]

Dessa forma, têm se comprovado a ação terapêutica do mel, existindo principalmente o interesse em avaliar a sua capacidade antioxidante [11,62–65]. Para méis de abelhas sem ferrão também têm sido reportadas diversas substâncias bioativas, como ácidos fenólicos e flavonoides em geral, sendo entre os mais comuns o ácido gálico, cinâmico, vanílico, cumárico e quercitina [66–68].

Um antioxidante impede a oxidação de outras substâncias químicas. Eles são "*um conjunto heterogêneo de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais e, ainda, enzimas, que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres*" [69]. O organismo humano gera radicais livres de oxigênio no curso normal do metabolismo. O excesso e os efeitos adversos desses radicais sobre o funcionamento fisiológico normal nos seres humanos são minimizados pela ação dos antioxidantes. É essencial que haja equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes para um funcionamento normal do organismo [7,70,71].

Os antioxidantes podem ser sintéticos, como o butilhidroxianasil (BHA) e o butilhidroxitolueno (BHT), bastante utilizados na indústria, ou podem ser naturais, substância bioativas como organosulfurados, fenólicos e terpenos presentes em diversos alimentos [69]. Os antioxidantes também podem ser classificados em enzimáticos (glucose oxidase e a catalase) e não enzimáticos (compostos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas, produtos da reação de *Maillard*, entre outros) [72].

Nos últimos anos, os antioxidantes têm sido alvo de muitos estudos focados principalmente nos efeitos benéficos nas fontes naturais, evidenciando a função que eles desempenham na prevenção de diversas doenças associadas ao envelhecimento, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares e o aparecimento de câncer [55]. Os antioxidantes também atuam, como conservantes alimentares em reações de oxidação responsáveis pela degradação de alimentos [54].

O mel apresenta compostos que lhe conferem propriedades antioxidantes, tais como os compostos fenólicos e os flavonóides. A quantidade destes componentes varia muito de acordo com a origem botânica e geográfica do mel, o processamento, manipulação e o armazenamento do mel também podem influenciar nesta quantidade [64,73]. Algumas destas substâncias já foram identificadas no mel, como por exemplo, os ácidos cinâmico, cafeico, ferúlico e para-cumárico, a quercetina, a crisina e o canferol (Figura 11) [66,74,75].

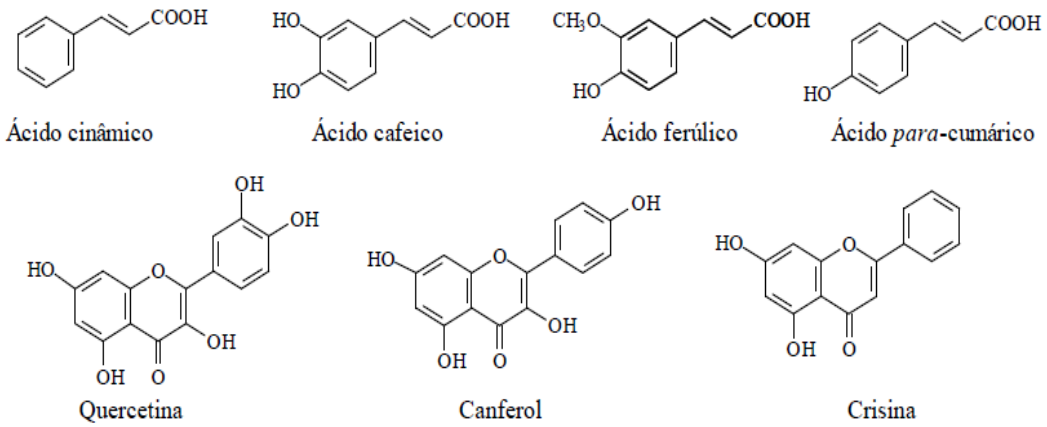


Figura 11. Exemplos de alguns ácidos fenólicos e flavonoides identificados em mel
Fonte: Pereira (2010) [50].

Alguns estudos verificaram também uma forte correlação entre a atividade antioxidante e a cor do mel, onde os méis de cor escura apresentam um teor maior em compostos fenólicos e, consequentemente uma atividade antioxidante mais elevada [76,77].

A existência dessa propriedade antioxidante em méis pode contribuir na sua valorização econômica pelo seu uso tradicional como adoçante e ainda favorecer sua utilização como conservante alimentar, minimizando reações oxidativas deteriorantes em alimentos [78,79]

Muitos estudos tem levantado também a capacidade antibacteriana do mel contra bactérias resistentes a antibióticos, bactérias patogênicas e contra bactérias responsáveis pela deterioração de alimentos [54,77,80,81].

A maior substância antibacteriana do mel é o peróxido de hidrogênio que é produzido pela enzima glucose-oxidase [82,83]. A glucose-oxidase é uma enzima expelida pelas abelhas que transforma o néctar em mel, que na presença de água e oxigênio converte a glucose em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Dessa forma,

a acidez e o peróxido de hidrogênio resultante inibem o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos no mel durante o processo de amadurecimento [5,83]. Por outro lado, a enzima catalase, responsável por destruir o peróxido de hidrogênio não vem das abelhas e sim das plantas, portanto o nível de peróxido de hidrogênio e, consequentemente, a propriedade antimicrobiana num mel são essencialmente determinados pela quantidade de catalase derivada da planta de origem do mel [83].

A reação enzimática de oxidação de glucose e algumas de suas propriedades físicas são consideradas como fatores principais do mel que contribuem para sua atividade antibacteriana. Porém também temos outros fatores como: pressão osmótica alta, baixa atividade de água, acidez, baixa quantidade de proteínas, elevado teor de açúcares redutores, relação carbono/nitrogênio alta e também a influência de agentes químicos como pinocembrina, lisozima, terpenos, ácidos fenólicos, álcool benzílico e substâncias voláteis [84].

A aplicação do mel como agente antibacteriano pode ser tanto externa (pele, feridas e infecções) quanto interna (doenças na garganta ou estômago) [83]. Em relação à aplicação em feridas e infecções o mel apresenta excelentes bioatividades mostradas a seguir:

- A viscosidade do mel proporciona uma barreira protetora na ferida, prevenindo contaminação cruzada e também fornecendo uma interface entre a ferida e o curativo;
- A osmolaridade do mel puxa o fluído dos tecidos, fornecendo um ambiente úmido para cicatrização de feridas;
- A preferência bacteriana do açúcar em vez de proteína (aminoácidos) produz ácido láctico no lugar de compostos de mau odor;
- O número de células inflamatórias pode ser reduzido em feridas tratadas com mel, mostrando seu poder anti-inflamatório;
- As propriedades antissépticas do mel são eficazes contra uma variedade de micróbios;
- A cicatrização das feridas é estimulada com o mel junto com outras medicações [85].

Um trabalho muito importante sobre a ação antibacteriana dos méis de meliponíneos foi realizado por Cortopassi-Laurino e Gelli [86], que examinaram 14 amostras de méis de meliponíneos das espécies Borá, Jataí, Jandaíra, Mandaçaia, Mirins e Uruçu do Brasil. O resultado foi uma atividade antibacteriana que variou de mediana a

quase máxima, ou seja, foi de 2,50 a 4,96 em uma escala de 1 a 5. Mostrando um resultado claramente superior, em termos de média de atividade antibacteriana, ao obtido em 20 amostras de *Apis mellifera scutellata*.

Outra funcionalidade do mel em tratamentos clínicos é como repositor de glicose na reidratação, auxiliando no aumento da absorção de sódio e água, dessa forma ele pode auxiliar no tratamento de gastroenterites e diarreias infantis, por exemplo, que são geralmente tratadas com reidratação. Dessa forma, junto à atividade antibacteriana, o mel pode promover e reparar danos à mucosa intestinal, incitando o crescimento de novos tecidos e funcionando como um agente anti-inflamatório [87].

2.6. Métodos de Extração dos componentes voláteis do mel

O desenvolvimento e aplicação de metodologias para a determinação da composição química de voláteis, principalmente em uma matriz complexa como a do mel, não é uma tarefa fácil [20,57,88,89], uma vez que os compostos voláteis possuem características químicas diferentes e estão presentes em quantidades pequenas. Outro fator importante é que a técnica aplicada deve ser capaz de isolar os compostos voláteis enquanto limita a formação de compostos indesejáveis causados, principalmente, pelo aquecimento [12,90,91].

Normalmente, as técnicas empregadas para análise dos compostos voláteis envolvem a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) ou com outras detecções, como espectrometria de absorção no infravermelho [92]. O perfil químico obtido através do CG-EM pode ser considerado como uma "impressão digital" do mel, pois a natureza e a quantidade relativa dos compostos voláteis são características distintas de cada mel devido às diferentes fontes florais, bem como diferentes regiões geográficas e espécies de abelhas [13].

Em uma matriz complexa como a do mel onde a concentração dos compostos voláteis é muito baixa, é recomendado primeiramente que se faça uma extração desses compostos, isolando e pré-concentrando, dessa forma, o analito de interesse. Isso é importante principalmente porque os açúcares podem interferir na análise devido a sua alta concentração [93].

Existem muitas técnicas de isolamento de componentes voláteis, que podem ser aplicados ao mel e a composição da fração volátil obtida depende do procedimento

utilizado [12]. Dentre as técnicas utilizadas para isolamento e concentração da fração volátil em méis temos técnicas tradicionais como: extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE), e outros métodos baseados em destilação analítica, como a hidrodestilação e a extração e destilação simultânea que utiliza a aparelhagem de Likens-Nickerson [88]. Essas técnicas tradicionais tem um problema em comum que é o uso de solventes orgânicos. Grandes quantidades de solventes orgânicos utilizados em separações analíticas tornaram-se uma importante preocupação ambiental, além de que amostras aquosas podem ser contaminadas com esses solventes e a concentração por evaporação dos extratos polui o ar com vapores orgânicos, e ainda, um descarte adequado de solventes orgânicos usados tornou-se problemático e caro [94]. Dessa forma, hoje em dia existem técnicas mais modernas de extração que usam pouco ou nenhum solvente orgânico que é o caso das extrações por headspace e a micro extração em fase sólida (SPME). Nas seções seguintes, são abordadas algumas técnicas de extração dos compostos voláteis usadas para o mel.

2.6.1. Extração líquido-líquido (LLE)

A LLE é um meio tradicional de extração de compostos baseada na solubilidade relativa dos analitos presentes na amostra em um solvente puro ou mistura deles. Nesta técnica dois solventes imiscíveis, um orgânico e outro aquoso são colocados juntamente com a amostra a se analisar. Idealmente, o analito de interesse ou é muito hidrofílico ou muito hidrofóbico, e consequentemente com agitação é transferido para uma das fases. Posteriormente a camada em que o analito encontra-se é recolhida [95].

Uma vantagem deste método é que todos os compostos voláteis (de baixa, média e alta volatilidade) podem ser analisados, mas o método pode necessitar da evaporação do solvente, o que, em alguns casos, resulta na perda ou degradação de alguns compostos voláteis e formação de outros [91]. E ainda temos como desvantagens: formação de emulsões, fase separada pobre, consumo de solvente elevado, bem como, o difícil manuseio [96].

Apesar da sua simplicidade, A LLE vem sendo substituída nos últimos anos por outras técnicas [88]. Dessa forma é difícil encontrar estudos recentes que utilizam esta extração para determinação dos voláteis em méis [97–100].

2.6.2. Extração em fase sólida (SPE)

Segundo a definição de Lanças [101] "*A Extração em Fase Sólida é uma técnica de separação líquido-sólido, baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão também conhecida como cromatografia líquida clássica*". Nesta técnica usa-se um cartucho de extração o qual contém a fase sólida (fase estacionária).

Em geral, o procedimento de extração em fase sólida contêm quatro etapas (Figura 12):

1. **Condicionamento:** ativamento do cartucho por solvatação. Usa-se um solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra;
2. **Adição da Amostra**: a amostra, contendo o analito de interesse, é colocada no topo do cartucho e aspirada com pequeno vácuo ou pressionada levemente com uma seringa, de forma que a amostra possa penetrar no cartucho.
3. **Lavagem:** a limpeza da coluna é realizada para retirar os interferentes menos retidos que o analito, nessa etapa deve-se utilizar um solvente que tenha força suficiente para arrastar os interferentes, e não os analitos.
4. **Eluição do analito:** pode ser realizado em uma ou vários etapas, normalmente usa-se um solvente com características similares ao solvente no qual a amostra está dissolvida [94,101–104].

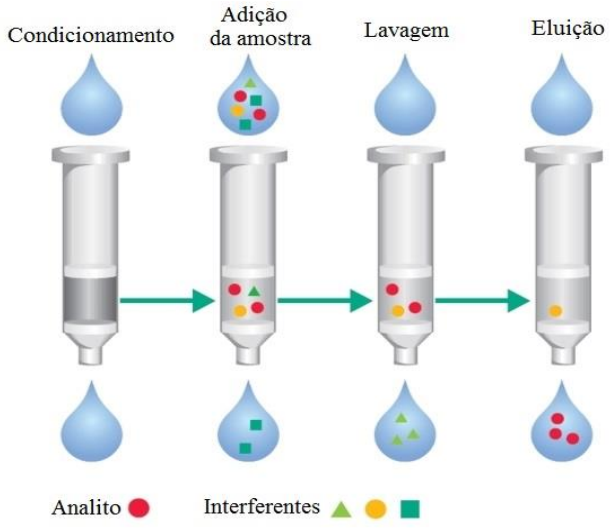


Figura 12. Principais etapas envolvidas na SPE
Fonte: Gilson (2015) traduzido [104]

A SPE apresenta algumas vantagens em relação LLE como: maior recuperação do analito, concentração mais efetiva, uso de menor volume de solvente orgânico, não há formação emulsão, menor tempo de preparação da amostra, fácil operação e incorporação mais simples para um processo automatizado [105]. Apesar de todas as vantagens mencionadas acima, a SPE é demorada, os custos dos cartuchos podem ser relativamente caros, pois são fabricados para uma única utilização, e às vezes têm fraca reprodutibilidade de lote para lote. E ainda, exige uma quantidade relativamente grande de solvente orgânico, mesmo sendo uma quantidade menor que a LLE [96].

2.6.3. Headspace

O termo "*headspac*e" é usado para denominar a fase gasosa acima da fase sólida ou líquida, armazenada em um recipiente hermeticamente fechado [20], como mostra a Figura 13.

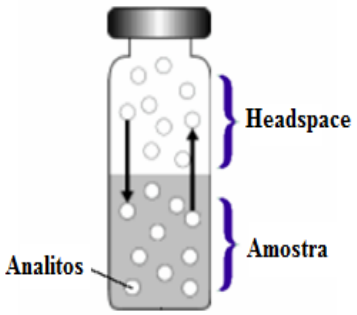


Figura 13. Frasco hermeticamente fechado com a amostra
Fonte: Kubota (2007). [106]

A técnica de extração por *headspace* envolve a partição dos analitos numa fase gasosa, ou seja, a transferência de componentes voláteis de uma matriz para a fase gasosa. A extração por *headspac*e não usa solventes orgânicos e o sistema é totalmente automatizado. Esta técnica pode ser executada em sua configuração estática ou dinâmica [57,107].

No modo estático (Figura 14), a amostra é armazenada e selada em um frasco hermético e os analitos voláteis são coletados no *headspace* do frasco por meio de uma seringa após um tempo de volatilização, agitação, e aquecimento controlado. Posteriormente os analitos retirados são analisados diretamente no cromatógrafo a gás (CG) [89,107,108].

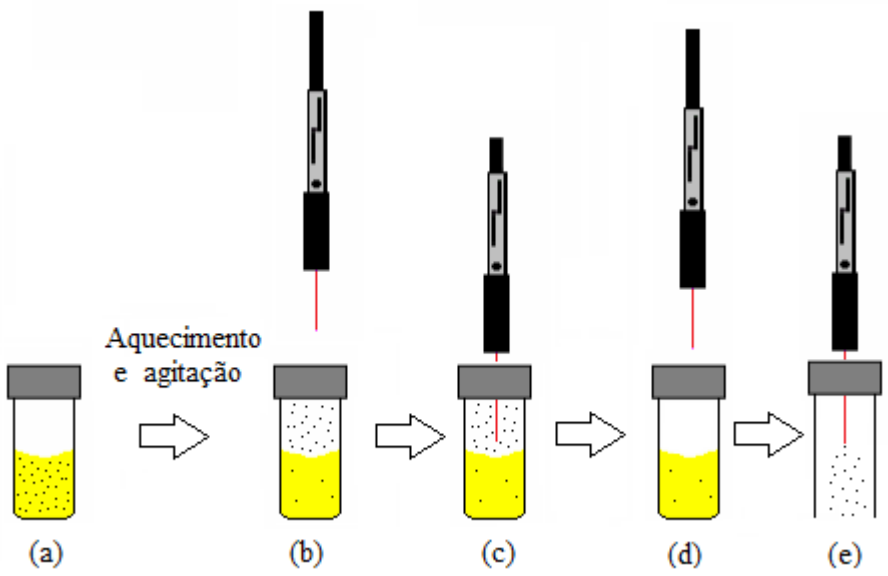


Figura 14. Procedimento de extração de compostos voláteis por *headspace* estático. Em (a) Frasco contendo a amostra com os analitos voláteis; (b) saturação do *headspace* após aquecimento e agitação; (c); coleta dos voláteis no *headspace* do frasco pela seringa; (d) os voláteis são coletados; (d) dessorção dos voláteis na porta de injeção do CG.

A técnica de *headspace* estático apresenta elevada detectabilidade e sensibilidade para compostos altamente voláteis, porém apresenta detectabilidade limitada para compostos voláteis presentes na amostra em baixas concentrações. Outra desvantagem é a necessidade de grandes volumes de injeção [107].

No procedimento dinâmico, conhecido também como (*purge-and-trap*) (Figura 15), um fluxo de gás inerte é passado pela amostra e os analitos voláteis são retidos numa armadilha de coleta (*trap*), que pode ser criogênica ou adsorvente. O *trap* é aquecido e os voláteis são dessorvidos na porta de injeção do CG [89,107]. As principais vantagens dessa técnica são: elevada sensibilidade e detectabilidade para o fracionamento de compostos altamente voláteis, ausência de tempos de aquecimento prolongados e a reprodutibilidade associada a um sistema totalmente automatizado [57]. Porém como a instrumentação requer monitoramento de várias etapas, válvulas, zonas de aquecimento e assim por diante, essa técnica é mais complexa do que em modo estático, além do seu custo ser mais elevado. O modo dinâmico também requer um pouco mais de tempo para a análise, para purgar, secar e transferir o *trap*. Entretanto, como não existe um tempo de equilíbrio, esse processamento pode ser feito enquanto o CG ainda até analisando a amostra anterior [109].

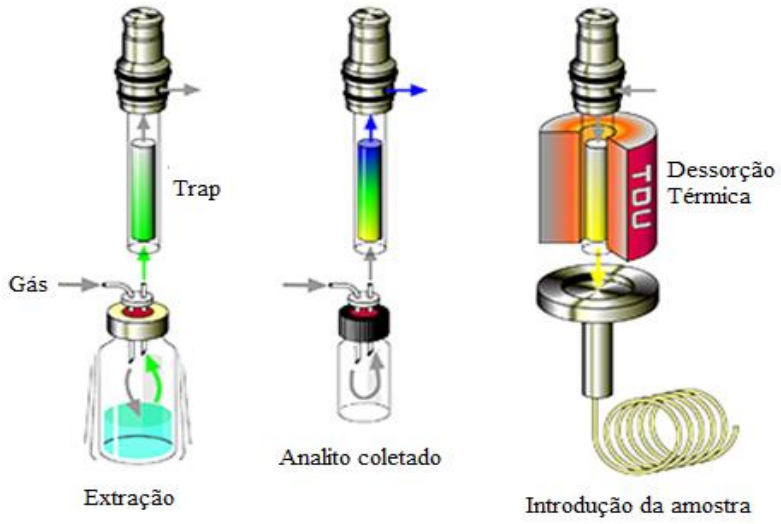


Figura 15. Procedimento de extração de compostos voláteis por *Headspace* Dinâmico
Fonte: Gerstel (2015) traduzido e com modificações [110].

No geral, o método de extração por *headspace* busca reduzir a formação de compostos indesejados e evitar a destruição da fração volátil causada muitas vezes pelas técnicas tradicionais de extração [88,90]. Dessa forma, o sistema *headspace* tem sido utilizado por vários autores para determinação de compostos voláteis em mel [13,58,97,111].

2.6.4. Micro-extração em fase sólida (SPME)

A micro-extração em fase sólida (SPME) utiliza uma fibra de sílica fundida e revestida com um polímero adsorvente que pode ser mergulhada diretamente na amostra ou no *headspace* do frasco para extração dos analitos, que dessa forma, ficam concentrados na fibra. Após a extração, a fibra é transferida ao injetor de um CG para dessorção térmica dos analitos (Figura 16). O princípio por trás da SPME é o processo de equilíbrio de partição do analito entre o revestimento de fibra e a solução aquosa. [112].

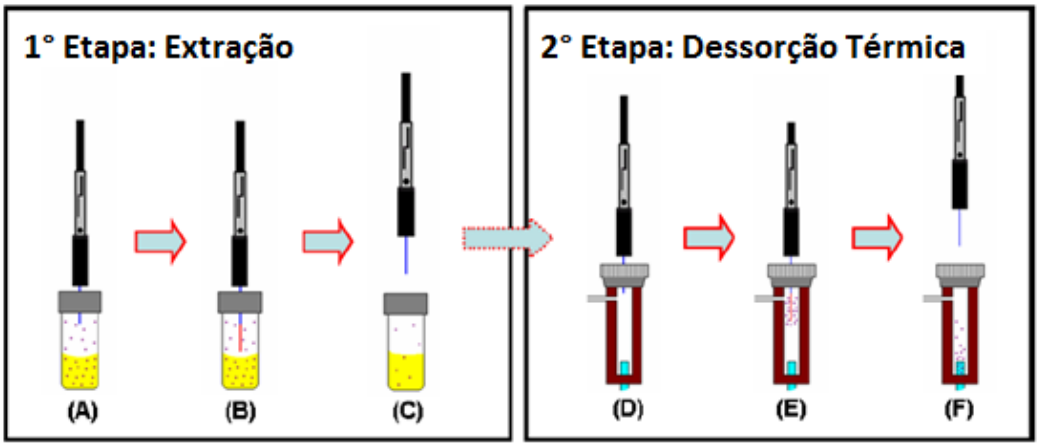


Figura 16. Procedimento básico para micro-extração em fase sólida através do *headspace*. Primeira etapa: (A) saturação do headspace, (B) exposição da fibra de SPME para extração dos analitos, e (C) retração da fibra para o interior da agulha. Segunda etapa: (D) perfuração do septo do injetor do cromatógrafo a gás, (E) exposição da fibra para dessorção dos analitos, e (F) retração da fibra para o interior da agulha.
Fonte: Silva (2006). [113]

Nesta extração a quantidade de compostos extraídos depende também da polaridade e da espessura da fibra. Especificamente, a extração dos voláteis do mel é melhor quando a polaridade da fibra corresponde à polaridade dos voláteis [57].

A técnica SPME oferece mais vantagens quando comparada às outras técnicas convencionais de extração: é simples, rápida, livre de solvente, facilmente automatizada e segura [92,114]. Também podem ser utilizados para amostrar os compostos menos voláteis, onde agitação e aquecimento da amostra ajudam a diminuir o tempo de equilíbrio [108]. No entanto, apresenta a desvantagem do alto custo da fibra e sistema necessário para sua implantação.

Recentemente a técnica de SPME tem sido utilizada especialmente como uma alternativa aos métodos de headspace [88]. O tempo de equilíbrio é muito menor com a extração realizada através do *headspace* da amostra, já que a propagação dos analitos na fase de vapor é quatro vezes maior do que na fase aquosa [112].

Por estas razões, o *headspace* com micro-extração em fase sólida (HS-SPME) vem sendo considerado como a melhor opção disponível para o isolamento da fração volátil em alimentos [89], e durante os últimos anos, a HS-SPME em combinação com CG-EM, tem sido amplamente aplicada para análise de compostos voláteis de mel [115–120]. No entanto, o fato dessa técnica ser relativamente nova, mais estudos são necessários para compreensão de parâmetros como temperatura, tipo de fibra, agitação entre outros [114].

2.7. Otimização do método de extração por *headspace* estático

A sensibilidade de um método extração por *headspace* estático é limitada pela concentração de compostos voláteis no *headspace* do frasco. Dessa forma a eficiência dos métodos de extração por *headspace* estático sofre a influência de alguns parâmetros experimentais, por exemplo, salinidade, temperatura, tempo de extração e volume de extração. O *headspace* estático é uma técnica de equilíbrio, portanto, o tempo de equilíbrio desempenha um papel importante nesta extração. A sensibilidade máxima é obtida quando é alcançado o equilíbrio entre a concentração dos solutos presentes na amostra em fase condensada e a concentração dos solutos em fase de gasosa. Da mesma forma, a temperatura também é outro fator importante no equilíbrio da amostra-*headspace* [121], uma vez que com o aumento da temperatura tem se um aumento na pressão de vapor e portanto aumentará a concentração dos compostos voláteis na fase gasosa.

Uma otimização do método de extração do analito de interesse é importante pra avaliar todos esses parâmetros que envolvem a extração por *headspace* estático, com o objetivo de obter as melhores condições de extração. Dessa forma vários estudos tem realizado essa otimização do método como, por exemplo, Heleno et al. [122], que otimizou as condições analíticas para extração de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) em água com *headspace* estático. Os parâmetros otimizados foram: massa de cloreto de sódio utilizada na amostra, volume de amostra dentro do frasco *headspace*, tempo e temperatura de extração. Os resultados indicaram que a influência da temperatura foi muito superior aos demais fatores para todos os compostos analisados. Também foi observado que um volume de amostra muito maior do que o espaço ocupado pela fase de vapor acima dele foi desfavorável para a extração por *headspace* estático da maioria dos compostos avaliados.

Em Jacq et al. [121] o método de *headspace* estático foi otimizado para a determinação de compostos orgânicos voláteis em água. Os resultados mostraram um ganho médio de sensibilidade por adição de sal, onde para os solutos mais voláteis o ganho de sensibilidade foi pequeno, mas para os compostos de média volatilidade a sensibilidade foi aumentada significativamente. Em relação ao tempo de equilíbrio que foi usado, entre 10 e 60 min, os autores não observaram diferenças significativas sobre a área dos picos para os diferentes compostos voláteis, indicando que o equilíbrio é

atingido em menos de 10 minutos. Em relação à temperatura de incubação, entre 40 e 70 °C a resposta obtida (área do pico) para solutos de alta volatilidade foi quase constante. Em temperaturas superiores a 70 °C a resposta diminuiu. Os pesquisadores concluíram que, para os solutos investigados, a extração por headspace estático em baixas temperaturas de equilíbrio foi eficiente. Para solutos de média e baixa volatilidade, a sensibilidade analítica foi aumentada em 70 °C. Para todos os solutos, incluindo os de alta volatilidade, as respostas diminuíram de 50 a 60% com o aumento da temperatura de equilíbrio de 70 a 100 °C. Os pesquisadores atribuíram esse fato ao aumento da pressão dentro do frasco, ocorrendo maior diluição durante o carregamento da amostra (descompressão) no frasco do headspace.

Gan et al. [123] otimizaram a extração de fumigantes 1,3-dicloropropeno e isotiocianato de metila no solo e na água por *headspace* estático. A resposta aumentou à medida que a concentração de NaCl foi aumentada de 0 a 30%. Dessa forma a concentração ideal de NaCl foi determinada como 30% (solução saturada). Em relação à quantidade de solução de NaCl 30%, a resposta diminuiu à medida que a quantidade de solução foi aumentada de 2 a 11 mL. No entanto, quando o volume de solução de NaCl 30% foi de 2 ou 3 mL foi observada maior variação da resposta, dessa forma o volume ótimo selecionado foi de 5 mL.

Em seguida, o tempo e a temperatura de equilíbrio foram otimizados, e os resultados mostraram que na medida em que a temperatura foi aumentada, a resposta diminuiu. As respostas para ambos os compostos foram maiores em 85 °C. Quando o tempo de equilíbrio foi aumentado com temperatura constante em 85 °C, a resposta aumentou em primeiro lugar e, em seguida, diminuiu. A maior resposta foi observada com 30 min.

Yilmazcan et al. [124], que otimizaram o método de extração de BTEX em água do mar por *headspace* estático, observaram que o equilíbrio era atingido depois de 5 min de extração. Após este tempo, a eficiência da extração não alterou significativamente para a maioria dos analitos. A temperatura de extração investigada em 5 minutos foi de 40 a 70 °C. A quantidade de compostos BTEX extraídos aumentou com temperatura.

2.8. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

O CG é utilizado para a separação e determinação de componentes voláteis [90]. O fundamento da separação trata-se da repartição dos analitos de interesse da amostra entre uma fase estacionária, que pode ser sólida ou líquida e uma fase móvel que é gasosa [125]. Dentre os detectores usados para cromatografia gasosa, o espectrômetro de massas, que ioniza os analitos e separa os íons formados de acordo com sua relação massa/carga, é um detector ideal, pois pode ser universal ou seletivo, dependendo do modo de operação e do analito em questão. Outra grande vantagem em se usar o cromatográfo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas é a existência da biblioteca de dados NIST, contendo milhares de espectros de massas de substâncias conhecidas. Dessa forma, pela comparação do espectro de massas obtido para os analitos contidos na amostra analisada e aqueles existentes na biblioteca de espectros, é possível a identificação dos componentes da amostra com maior grau de certeza se comparado aos detectores convencionais [107,125]. Também temos detecção por Ionização em chamas (FID) e condutividade térmica (TCD), que são detectores universais que respondem na presença de todos os compostos orgânicos, onde o FID é o detector mais utilizado depois do EM para determinação de voláteis em mel [116,126–128]. Existem também outros detectores classificados como seletivos como no caso do detector de captura de elétrons (DCE) que detecta qualquer substância que apresente grupo atômico capaz de captar elétrons. O ECD também é encontrado em alguns estudos com mel [103].

Na análise por CG-EM, a amostra é injetada e arrastada pela fase móvel através da coluna contendo a fase estacionária onde ocorre a separação dos componentes. De acordo com suas propriedades e afinidade com a fase estacionária, as substâncias são eluídas em tempos determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes. As substâncias separadas no CG são então transferidas para o EM. No EM as moléculas são bombardeadas com um feixe de elétrons, ionizam-se e quebram-se em muitos fragmentos (íons), que são detectados, gerando um espectro de massas que possibilita a determinação do peso molecular do composto e detalhes de sua estrutura. Cada espécie de íons possui determinado valor da razão da massa/carga (m/z) [125].

A CG-EM é uma técnica bastante eficaz para a análise dos componentes voláteis do mel. Entre suas vantagens destacam-se o alto poder de resolução, tornando

possível a análise de centenas de substâncias em uma mesma amostra, alta eficiência de separação e sensibilidade, onde quantidades pequenas de amostra já proporcionam uma boa detecção, além de fornecer dados qualitativos e quantitativos para esses compostos [114].

2.9. Índices de retenção em cromatografia gasosa

A identificação de compostos por cromatografia gasosa através de comparação entre espectros de massas obtidos com os de uma biblioteca de espectros de substância conhecidas é um problema quando espectros de massas são extremamente semelhantes entre os isômeros presentes em uma amostra. Dessa forma o uso de índices de retenção (IR) como ferramentas auxiliares é uma forma de atestar a identificação desses compostos [129,130].

O IR de um composto é um número, obtido por interpolação, relacionando o tempo de retenção do composto em estudo com o tempo de retenção de dois padrões (geralmente hidrocarbonetos) eluídos antes e após o pico do composto de interesse [131,132].

Dentre os índices de retenção encontrados na literatura os mais conhecidos são o índice Kovats (IK) e o índice de retenção linear (IRL). O IK é sempre calculado sob condições isotérmicas de temperatura empregando-se a equação 1. Quando se utilizam temperaturas programadas de coluna, um valor similar pode ser calculado utilizando os números extraídos de seus algoritmos como mostra a equação 2, sendo que este valor é chamado de IRL [129].

$$IK = 100n + 100\left(\frac{\log\ tr(x) - \log\ tr(n)}{\log\ tr(n+1) - \log\ tr(n)}\right) \qquad \text{(eq. 1)}$$

$$IRL = 100n + 100\left(\frac{tr(x) - tr(n)}{tr(n+1) - tr(n)}\right) \qquad \text{(eq. 2)}$$

Onde:

n = o número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção do composto de interesse;

tr(x) = tempo de retenção do composto de interesse;

tr(n) = tempo de retenção do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção do composto de interesse;
tr(n+1) = tempo de retenção do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção do composto de interesse. [129]

Após o índice ser calculado ele é comparado com valores encontrados na literatura para colunas de mesma polaridade. Existem diversos estudos que aplicam os índices de retenção para identificação de compostos, inclusive de compostos voláteis do mel [58,60,93,133–135] .

2.10. Análise exploratória de méis

A análise exploratória de méis tem sido realizada em diversos trabalhos com o objetivo de observar as semelhanças e diferenças entre diversas amostras de méis [17,66,67,115,119,135–149]. Para tal, diferentes características dos méis são analisadas como, por exemplo, propriedades físico-químicas (acidez, teor de água, teores de açúcares, cor, pH, cinzas, etc), atributos sensoriais (sabor, aroma), composição fenólica, análise polínica, perfil de compostos voláteis, etc.

Alguns estudos tem sido realizados utilizando análise exploratória para comparação de méis de abelhas sem ferrão com os méis de *Apis mellifera* utilizando diversas variáveis, como em Ferreira et al. [136] que usou análise multivariada para discriminar as amostras de méis dessas abelhas pelos seus atributos sensoriais. Os resultados mostraram que os méis de *Scaptotrigona depilis* e *Melipona scutelaris* foram discriminados principalmente pelos atributos de aroma e sabor incomuns, como vinho, uva, coco e fermentado. Enquanto que o mel de *Melipona scutelaris* foi diferenciado como mais amarelado, com aroma ácido e sabor azedo. O mel de *Apis mellifera* e o mel de *Melipona subnitida* assemelharam-se em relação ao aroma e *flavour,* mas se diferenciaram nos atributos de aparência, sendo o mel de *Apis* caracterizado por sua coloração caramelo, enquanto que, o mel de *Melipona* foi descrito como amarelo e menos viscoso.

Oliveira et al. [66] estudaram méis das espécies *Melipona flavolinea*ta (uruçu-amarela), *Melipona fasciculata* (uruçu-cinzenta) e *Apis mellifera* da região nordeste do

Pará. A análise multivariada foi aplicada usando análise dos componentes principais (ACP) e análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) para discriminação das amostras em relação ao seu perfil de compostos fenólicos. Ambos os métodos foram capazes de distinguir os méis das espécies de abelhas estudadas em cinco grupos bem definidos caracterizando uma diferença entre as espécies de abelhas com e sem ferrão e suas respectivas regiões de coleta através da composição fenólica dos méis analisados, fator que indica possível seletividade das espécies em relação à origem floral dos méis.

Silva et al. [67] realizou a análise exploratória de méis de abelhas da espécie *Melipona seminigra merrillae* de sete municípios do estado do Amazonas com base nos resultados do tipo polínico dos méis. As amostras dos municípios de Coari (região central) e de Lábrea (região sul) tiveram uma correlação negativa com o restante das amostras devido ao pólen de *Tapirira guianensis* e *Myrcia* que foi identificado somente nas respectivas amostras. As amostras dos municípios de Rio Preto da Eva e Maués (região central) e do município de Boca do Acre (região sul) ficaram agrupadas devido à predominância do pólen de *Clidemia*. Nos méis dos municípios de Pauini (região sul) e de Manaus (região central), que formaram outro agrupamento, o pólen *Clidemia* também foi encontrado, porém em quantidades menores quando comparados ao primeiro grupo.

Em de Sousa et al.[138] quatro diferentes méis monoflorais (juazeiro, malícia, jurema branca e velame branco) produzidos por duas espécies de abelhas sem ferrão (Jandaíra e Uruçu*)* da região semi-árida do nordeste Brasileiro foram analisados. Uma ACP foi realizada usando como variáveis os parâmetros físico-químicos e sensoriais das amostras. Na primeira componente principal, o teor de água, teor de acidez total e glicose foram as variáveis mais importantes que explicaram a separação do mel de malícia, das duas espécies de abelhas, do restante das amostras. Esta componente também explica a discriminação dos méis de juazeiro produzido pela abelha Uruçu que foi relacionada com os maiores valores de cor, sabor de mel e sabor doce quando comparado com os méis das outras fontes florais estudadas. O mel de juazeiro, produzido pelas abelhas Jandaíra, também apresentou valores mais elevados para estes mesmos parâmetros. Os méis de juazeiro não apresentaram diferenças quando produzidos por diferentes espécies de abelhas em relação à acidez total. Pela segunda componente foi observado uma semelhança entre o mel de jurema branca e velame branco produzido por Jandaíra. Estas amostras apresentaram as menores quantidades de sacarose, quando comparado a outras amostras de mel avaliadas.

Em relação ao mel de *Apis mellifera* existem estudos que utilizam análise multivariada para relacionar as amostras com seus parâmetros físico-químicos como mostra Moreti et al. [137] que fez ACP em méis do Ceará. Os resultados mostraram que os parâmetros que mais influenciaram no agrupamento das amostras de méis foram a acidez e o índice de formol na primeira componente e pH e cinzas no segunda componente.

Em Soria et al. [139] os dados medidos da caracterização físico-química de méis coletados em Madrid (Espanha) foram aplicados numa ACP. Embora nenhuma separação clara em grupos foi encontrada, a primeira componente foi relacionada com a origem do mel: méis de melato apresentaram escores altos nesta componente, méis florais foram plotados em baixos valores na componente, amostras contendo misturas dos dois tipos de mel foram dispersas pelo centro da ACP. Uma análise discriminante também foi aplicada, onde os méis de melato foram discriminados dos outros méis pelo teor de cinzas, condutividade elétrica e absorção líquida. Enquanto que os méis florais foram caracterizados por baixos valores dos parâmetros da EC_{1075}, acidez lactônica, espectrofotometria e pH.

Em relação à análise exploratória aplicada a composição volátil de méis, não há trabalhos com abelhas sem ferrão, porém existem vários estudos para os méis de *Apis mellifera.* A origem botânica do mel tem se mostrado a principal característica na diferenciação dos méis em relação a seus compostos voláteis. Como vemos, por exemplo, em Castro-Vázquez et al. [140] que analisaram méis espanhóis de diferentes origens florais: citrinos, alecrim, eucalipto, lavanda, tomilho e urze. A ACP agrupou a maioria dos méis de acordo com sua fonte floral. O agrupamento de méis de eucalipto ocorreu pela forte correlação com compostos terpenoides e derivados de álcool. Por outro lado, o os méis cítricos ficaram agrupados principalmente pela concentração de derivados de linalol. Para o agrupamento de méis lavanda, o óxido nerolidol e a cumarina ficaram entre os compostos mais fortemente correlacionados. Méis de Urze ficaram agrupados com base no seu maior conteúdo de compostos fenólicos, em comparação com outros méis. A ACP não diferenciou os méis de tomilho e de alecrim que ficaram agrupados entre si.

Escriche et al. [17] analisaram méis de laranja e limão do Mediterrâneo Espanhol. Os resultados da ACP mostraram que os dois tipos de méis diferenciam-se de acordo com sua origem botânica. Aldeídos "lilac" e benzenoacetaldeído foram abundantes no mel de laranja, enquanto que, o 2-metil-1-butanol e a 3-hepten-2-ona

descriminaram o mel de limão. Também foi realizada uma ACP para avaliar o efeito global do tipo de mel na fração de flavonoides e fenólicos, que também diferenciou muito bem os méis pela origem botânica. Em outro estudo desses mesmos autores [141] uma ACP foi usada para avaliar o tipo de mel e efeitos de tratamentos térmicos sobre a fração volátil. A primeira componente principal diferenciou os méis florais dos méis de melato, e a segunda componente separou os três tipos de mel floral. Como as amostras foram agrupadas de acordo com o tipo de mel, o tipo de tratamento térmico (liquefação ou pasteurização) não exerceu um forte efeito sobre compostos voláteis.

Kús et al. [142] analisaram méis de seis origens florais da Polônia. Os resultados da ACP mostraram alguns agrupamentos de acordo com a origem floral. Os méis que mostraram claramente diferenças em relação às outras amostras, bem como, maiores concentrações de voláteis foram os de limão, trigo sarraceno e de urze. As amostras de mel de outras origens florais (colza, *Robinia pseudoacacia* e *Centaurea cyanus*) mostraram diferenças menores entre si.

Em de la Fuente et al. [145] méis Espanhóis de eucalipto, de alecrim, de urze e cítricos foram analisados. A ACP mostrou um grupo, composto principalmente de méis de eucalipto, caracterizado por valores positivos na segunda componente. Um grupo similar correspondente a méis cítricos teve escores positivos na primeira componente. Concentrações relativamente elevadas de cetonas e cetoálcools foram responsáveis pelo agrupamento dos méis de eucalipto, e a presença de aldeídos “lilac” e antranilato de metila para as amostras de cítricos.

Pérez et al. [147] estudaram méis espanhóis de várias fontes florais, aplicando análise canônica discriminante. As análises mostraram diferenças muito significativas entre os valores médios de todas as variáveis em relação ao tipo de mel. Os méis de lavanda e de eucalipto foram claramente separados dos outros méis pela primeira função canônica, onde 3-metil-2-buten-1-ol e 2,3-butanodiol foram os compostos importantes para distinguir mel de lavanda, e o 3-hidroxi-2-butanona para o mel de Eucalipto. Os méis de tomilho e de laranja diferenciaram-se das outras amostras pela terceira função canônica discriminante, o mel de laranja foi caracterizado por aldeídos “lilac” e o mel de tomilho por etanol e 2-butanol. Por fim, os méis de alecrim foram distinguidos dos outros méis, pela quarta função canônica discriminante, devido aos valores negativos elevados de etanol.

Soria et al. [143] analisaram méis espanhóis comerciais de diferentes origens botânicas (alecrim, eucalipto, cítricos, tomilho, urze, lavanda, melado e multifloral), a

ACP mostrou que os méis de eucalipto foram os únicos que se distinguiram pela origem floral, enquanto que, o restante das amostras analisadas mostrou uma distribuição uniforme, sem agrupamento de amostras de acordo com sua origem botânica.

Da mesma forma, a origem geográfica também tem sido um dos principais contribuintes na diferenciação do perfil volátil dos méis. Como mostra Castro-Vázquez et al. [135] que realizaram a ACP com méis de castanha de três regiões da Espanha (noroeste, nordeste e sudeste). A análise separou totalmente as amostras de mel das três regiões, apresentando diferenças significativas na concentração de vários compostos voláteis. Os méis da região noroeste mostraram uma forte correlação com ésteres e derivados de benzeno, enquanto que os méis da região nordeste foram relacionados com hexanal, octanal, 3-metil-1-butanol, (Z) -3-hexen-1-ol e 2-etil-1-hexanol. E os méis da região Sudeste foram agrupados devido às altas concentrações de eucarvona, β-isoforona, 4-oxoisophorona e 2,6,6-trimetil-4-oxo-2-ciclo-hexen-1-carbaldeído.

Moniruzzaman et al. [144] estudaram méis monoflorais e multiflorais, obtidos em três diferentes áreas geográficas do mundo (Galícia: Noroeste da Espanha, Malásia e Bangladesh), a ACP mostrou uma clara separação entre as amostras a partir das 3 áreas geográficas, mostrando que a origem botânica e a região de origem do mel são fatores que influenciam a composição química do mel.

Nos estudos de Gasić et al. [146], a ACP e análise discriminante com método de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foram realizadas, a fim de delinear as diferenças entre méis multiflorais da Sérvia de acordo com sua origem regional. As amostras obtidas a partir das regiões de Voivodina e Zlatibor foram claramente distinguidas do restante das amostras de outras regiões devido à presença de ácido dicafeoilquínico, ácido elágico, éster de fenetilo, ácido cafeico e ácido clorogênico.

Karabagias et al. [119,149] em ambos os trabalhos fizeram análise linear discriminante em méis monoflorais (Pinheiro e Tomilho) de diferentes regiões da Grécia. Os méis foram satisfatoriamente classificados de acordo com a origem geográfica utilizando compostos voláteis e parâmetros físico-químicos para a discriminação das amostras. Em outro trabalho [148] estes autores aplicaram a mesma análise multivariada para discriminação de méis de pinheiro, tomilho, abeto e cítricos, que foram satisfatoriamente classificadas de acordo com sua origem botânica.

Em Aliferis et al. [115], méis de 7 origens botânicas provenientes de diferentes regiões geográficas da Grécia foram sujeitos a análises multivariadas. Os resultados revelaram uma excelente separação entre amostras de mel de acordo com sua origem

botânica. Por outro lado, para a classificação das amostras de acordo com a região geográfica, que foi realizada para os méis cítricos e de tomilho, os modelos mostraram uma capacidade discriminativa bastante variável, o que já era esperado pelos pesquisadores, uma vez que as regiões de onde as amostras foram coletadas compartilham o clima e vegetação semelhante.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a composição química da fração volátil de méis de abelhas sem ferrão do estado do Paraná.

3.2. Objetivos Específicos

- Otimizar a metodologia de extração dos compostos voláteis e semivoláteis de méis de abelhas sem ferrão empregando a técnica de *headspace* estático, seguido de análise por CG-EM;
- Identificar compostos voláteis presentes em méis de abelhas sem ferrão;
- Utilizar ferramenta de análise multivariada para a comparação de méis de abelhas sem ferrão.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras de mel

Este estudo foi realizado com 17 méis brasileiros multiflorais de oito espécies de abelha sem ferrão de três cidades do estado do Paraná: Guaraqueçaba (região metropolitana de Curitiba), Prudentópolis (Região Sudeste) e Cambará (região Norte Pioneiro) (Figura 17).

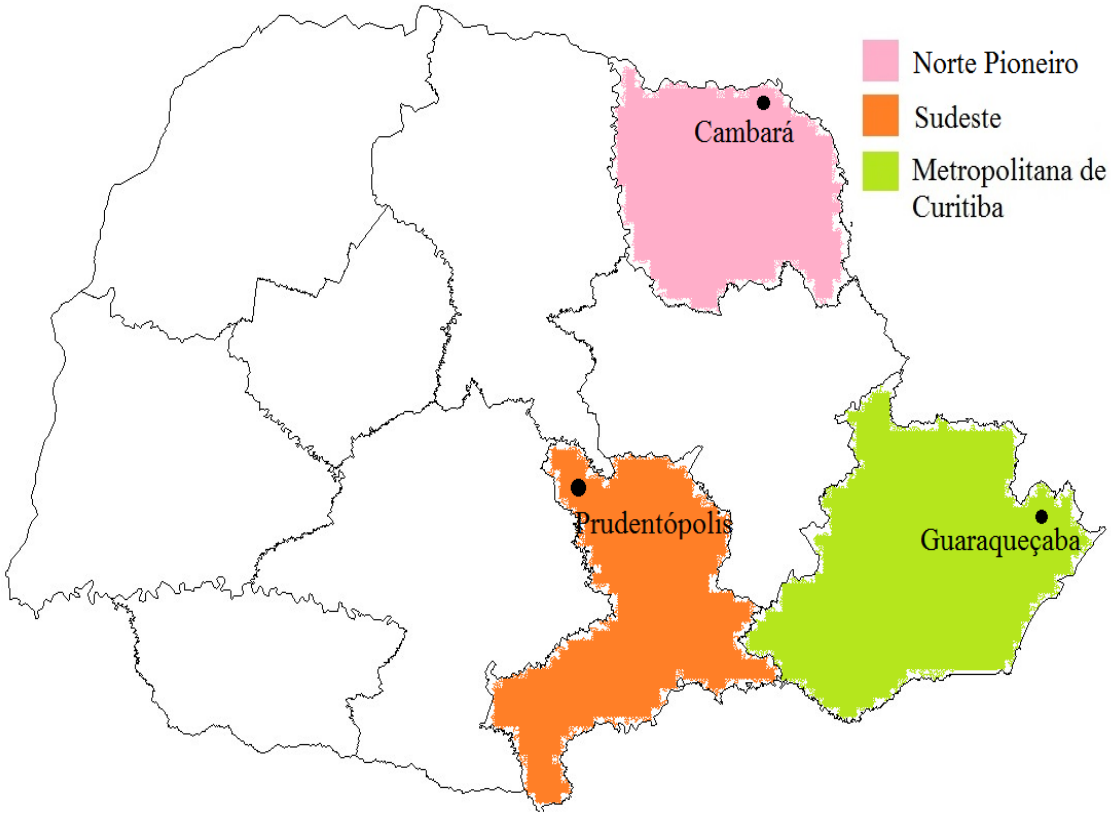


Figura 17. Mapa do estado do Paraná dividido em mesorregiões

Na Tabela 3 é apresentado o número de amostras de mel de cada espécie de abelha junto, a região de produção e data de envase especificada no rótulo da embalagem. São apresentados também os nomes populares e científicos das espécies de abelhas sem ferrão, bem como, as siglas adotadas no presente estudo. Todas as amostras (Figuras 18, 19 e 20) foram armazenadas em refrigerador a 5 °C até análise.

Tabela 3. Dados das amostras de mel em estudo

Méis	Espécie de abelha sem ferrão		Local de produção	Data de envase	Cód.
	Nome Popular	Nome Científico			
02	Guairapó	*Melipona bicolor* Lep.	Guaraqueçaba Cambará	Nov/2013 Out/2014	Go
02	Mandurí	*Melipona marginata* Lep.	Guaraqueçaba Cambará	Jun/2013 Out/2014	Mi
02	Uruçu	*Melipona scutellaris* Lat.	Guaraqueçaba Cambará	Mar/2014 Out/2014	Ur
03	Mandaçaia	*Melipona quadrifasciata* Lep.	Guaraqueçaba Cambará Prudentópolis	Ago/2013 Out/2014 Mar/2015	Md
02	Borá	*Tetragona clavipes* Fab.	Guaraqueçaba Cambará	Set/2013 Out/2014	Bo
03	Jataí	*Tetragonisca angustula* Lat.	Guaraqueçaba Cambará Prudentópolis	Mai/2014 Fev/2014 Mar/2015	Ja
02	Tubuna	*Scaptotrigona bipunctata* Lep.	Guaraqueçaba Prudentópolis	Mar/2014 Fev/2014	Tb
01	Tujumirim	*Scaptotrigona xanthotricha* Mou.	Guaraqueçaba	Mar/2014	Tj

Figura 18. Amostras comerciais de méis multiflorais de abelhas sem ferrão da cidade de Guaraqueçaba-PR.

Figura 19. Amostras comerciais de méis multiflorais de abelhas sem ferrão da cidade de Cambará-PR.

Figura 20. Amostras comerciais de méis multiflorais de abelhas sem ferrão da cidade de Prudentópolis-PR

4.2. Otimização do método de extração por *headspace*

Um Planejamento Fatorial 2^3 foi delineado para determinar as condições ótimas de extração por *headspace* estático, em relação às variáveis tempo, temperatura e meio de extração, resultando em 8 experimentos realizados em duplicata (Tabela 4).

Tabela 4. Fatores e seus níveis para otimização da extração de compostos voláteis do mel por *headspace* através de planejamento fatorial 2^3

Fatores	Nível (-)	Nível (+)
A. Tempo	10 min	30 min
B. Temperatura	45 °C	60 °C
C. Meio	Aquoso	Salino

A amostra utilizada para otimização das condições de extração foi o mel da abelha Guairapó da cidade de Guaraqueçaba, escolhido de forma aleatória.

Como resposta ao planejamento foi utilizada a área do pico principal dos cromatogramas obtidos por CG-EM. Os efeitos principais e de interação das variáveis sobre a área do pico, considerando o intervalo de confiança de 95%, foram calculados com o auxílio do *software* Minitab versão 16.2.2. [150].

4.3. Extração por *headspace* estático

A extração seguiu-se a partir da condição ótima obtida pela otimização do método, onde 2 g do mel foram dissolvidos em 2 mL de solução saturada de NaCl e transferido para um frasco de *headspace* de 20 mL. O frasco foi incubado a 60 °C durante 10 min. Após a incubação, os componentes voláteis do *headspace* da amostra foram analisados por CG-EM.

4.4. Condições cromatográficas para análise por CG-EM

As análises por CG-EM em méis de abelhas sem ferrão foram feitas em um aparelho da marca AGILENT, modelo 7890A GCSystem, com detector de massas EM, modelo 5975C. A injeção foi realizada no modo *splitless* com temperatura do injetor de 150 ºC. Os componentes voláteis foram injetados diretamente no cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas, equipado com uma coluna capilar marca Agilent HP-5/MS (5% fenil- 95% dimetilpolisiloxano) de dimensões 30,0 m × 250 μm × 0,25 μm (temperatura máxima de trabalho: 325 ºC). Foi empregado o hélio (He) como gás de arraste com vazão de 1 mL min^{-1}. O programa de temperatura do forno foi baseado na metodologia de Rowland et al. [97] com modificações. A temperatura do

forno teve início em 40 °C com taxa de aquecimento de 8 °C min^{-1} até 150 °C. A partir dessa temperatura foi aumentada a taxa de aquecimento em 15 °C min^{-1} até a temperatura final de 200 °C. O tempo total de análise foi de 18,08 min. O EM foi programado para realizar varredura de 50 a 550 unidades de massa atômica. As temperaturas da fonte e do quadrupolo do EM foram de 230 ºC e 150 ºC, respectivamente.

4.5. Identificação dos compostos voláteis

A identificação dos compostos foi feita por comparação dos espectros de massas obtidos para cada pico cromatográfico com os espectros armazenados na biblioteca de espectros NIST e confirmado, pelo índice de retenção Linear (IRL) em relação a uma mistura de padrões de alcanos lineares.

Para o calculo do índice de retenção de Kovats, uma mistura de padrões de alcanos lineares (C_8–C_{40}) foi injetada no CG-EM na mesma rampa de aquecimento em que as amostras foram analisadas. A partir deste cromatograma, o IRL de cada composto foi calculado pela equação 2 da seção 2.9.

O IRL calculado de cada composto foi comparado com várias fontes da literatura [151–164], e a identificação foi afirmada quando o IRL calculado foi igual ou próximo ao valor encontrado na literatura.

4.6. Análise dos componentes principais

A comparação entre as amostras de méis foi realizada utilizando a ferramenta quimiométrica ACP (Análise dos Componentes Principais) com o auxílio do *software* Statistica versão 7.0 [165].

Uma matriz de dados 17 × 15 foi montada utilizando 17 amostras de méis de abelhas sem ferrão como casos e tendo como variáveis os tempos de retenção de 15 compostos voláteis. Os picos cromatográficos selecionados foram aqueles cujas áreas relativas apresentaram uma abundância acima de 3% da área total dos picos nos cromatogramas de todas as amostras.

As observações para cada tempo de retenção foram as áreas absolutas. Os dados foram pré-processados por normalização pelo valor máximo, que consiste em

dividir área dos picos pela área do pico máximo do cromatograma de cada amostra, de forma que todas as variáveis passam a ter a mesma variância. O *software* utilizado para o pré-processamento dos dados foi o Origin versão 6.0 [166].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização do método de extração por *headspace*

Os resultados da otimização do método de extração dos compostos voláteis do mel são apresentados no diagrama de Pareto na Figura 21, onde é possível interpretar o nível de influência e significância das variáveis experimentais sobre a área do pico pelos efeitos principais e de interação.

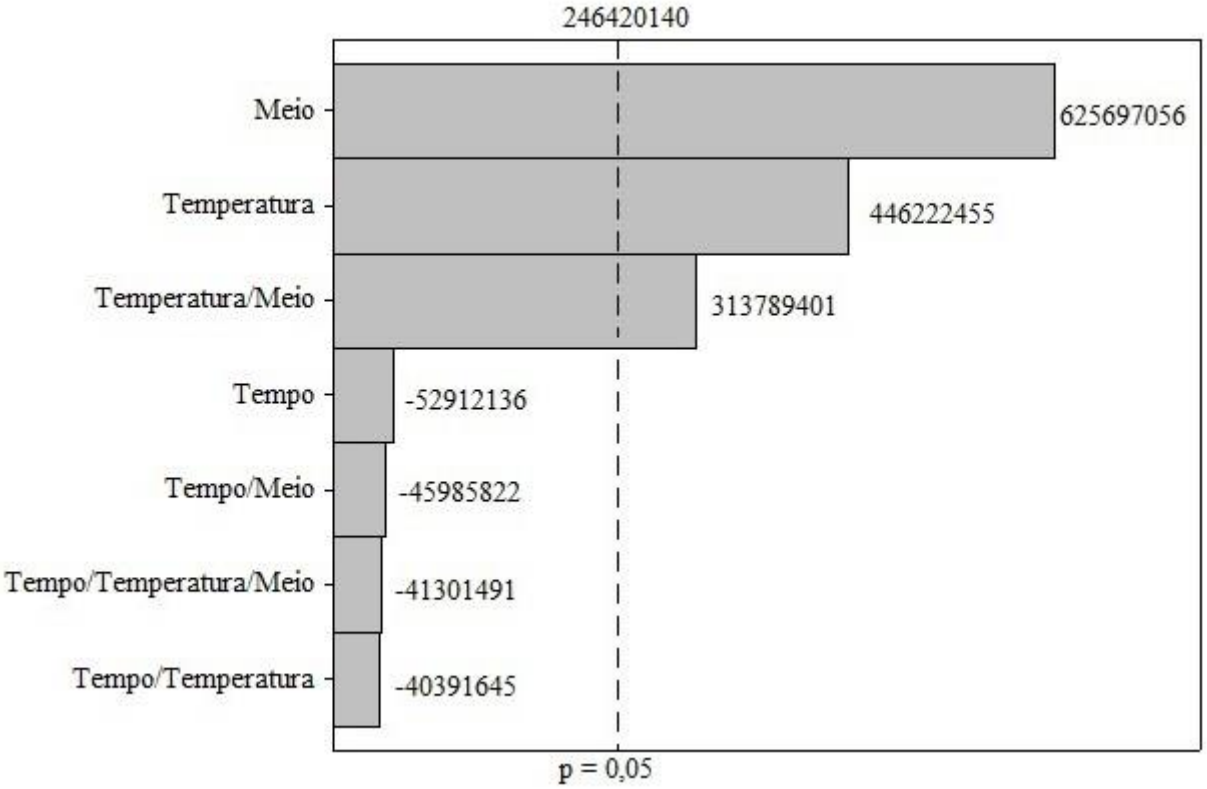


Figura 21. Diagrama de Pareto padronizado em p = 0,05 para a área do pico do composto principal dos cromatogramas obtidos para méis de abelhas sem ferrão, em função do meio, temperatura e tempo de extração por *headspace* estático.

Pela análise dos efeitos dos fatores sobre a área do pico verificou-se que os fatores principais, meio e temperatura, bem como, o efeito secundário de interação Temperatura/Meio foram significativos ao nível de 95% de confiança (p < 0,05). Em outras palavras, a mudança de nível desses fatores resultou em uma mudança significativa da área do pico principal, acima de 246420140 que é o limiar estabelecido para o nível de 95% de confiança (p = 0,05). O meio e a temperatura de extração, bem como a interação entre esses fatores, tiveram influência positiva na extração dos

compostos voláteis do mel, ou seja, a área do pico é aumentada com o aumento do valor da respectiva variável. No caso do meio de extração o nível máximo utilizado é o meio salino, e a melhor extração dos compostos voláteis nesse meio se deve ao efeito "*salting-out*" onde a saturação da solução aquosa com NaCl diminui a solubilidade de uma substância orgânica na água e, consequentemente, aumenta a distribuição deste composto orgânico em um solvente orgânico [116,167]. O fato da temperatura mais elevada aumentar a área do pico deve-se ao aumento da pressão de vapor dos componentes voláteis presentes na solução aquosa com o aumento da temperatura [168].

O tempo de extração não foi significativo no nível de confiança estudado, além de influenciar de forma negativa a área do pico. Isso ocorre por causa da perda de compostos mais voláteis por volatilização, devido ao maior tempo de extração. Dessa forma pode-se usar o tempo de extração em seu nível mínimo, o que acaba sendo uma vantagem, pois diminui o tempo de análise.

Portanto a condição ótima de extração dos compostos voláteis do mel de abelhas sem ferrão por *headspace* foi definida em meio salino, a 60 °C por 10 min.

Esses resultados também podem ser observados pelos cromatogramas obtidos (Figura 22), onde verificou-se claramente um aumento significativo na intensidade e área do pico principal com o aumento da temperatura e mudança do meio, de forma que os cromatogramas apresentaram picos mais intensos resultando em uma relação sinal/ruído maior. A obtenção de picos cromatográficos mais intensos aumenta a qualidade dos espectros obtidos para cada pico resultando em uma análise qualitativa mais confiável. Por causa da elevada intensidade do pico principal, os picos minoritários só aparecem no cromatograma quando ampliamos a imagem (Figura 23).

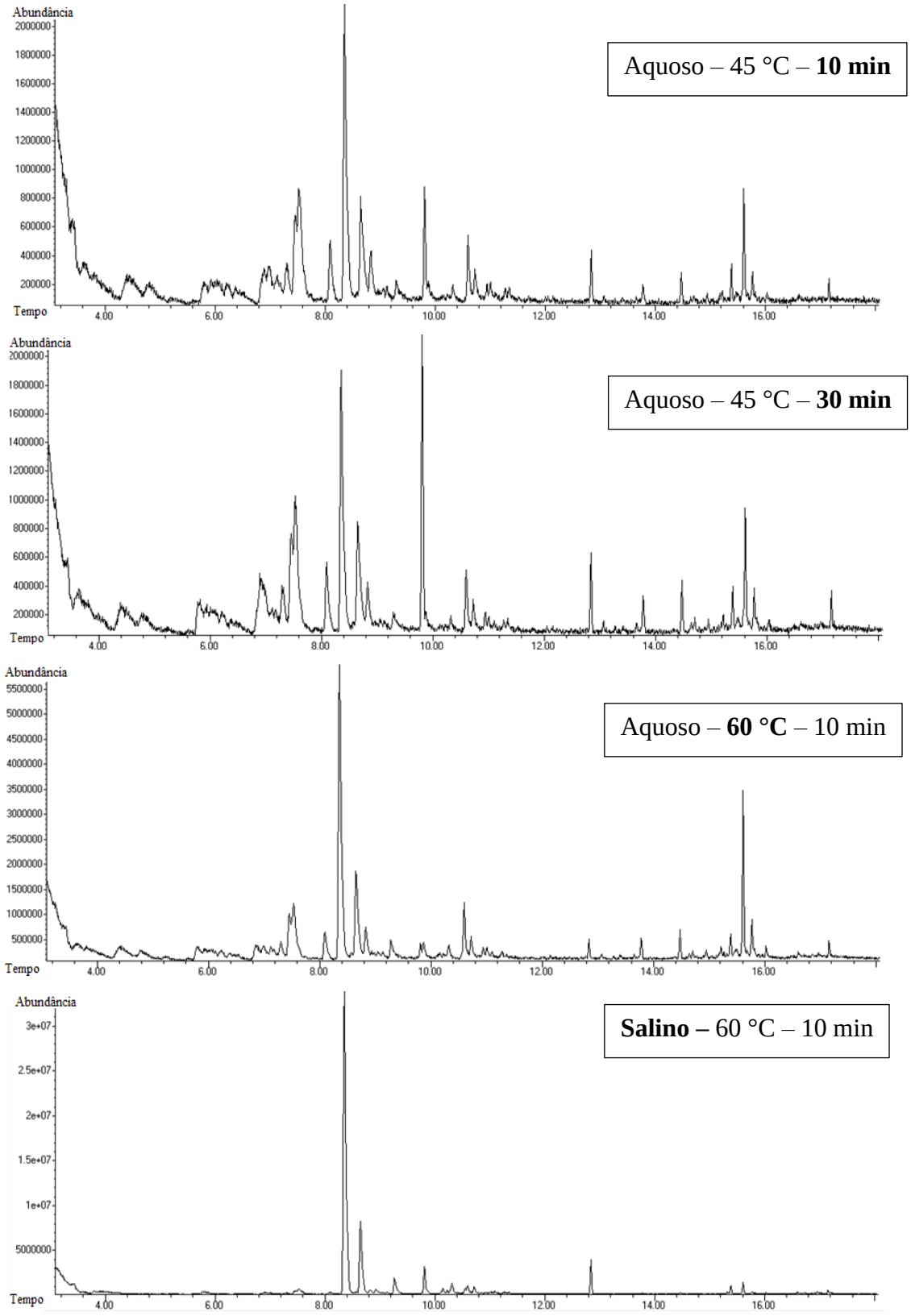


Figura 22. Cromatogramas obtidos na otimização do método de extração dos compostos voláteis de méis de abelhas sem ferrão usando *headspace* estático

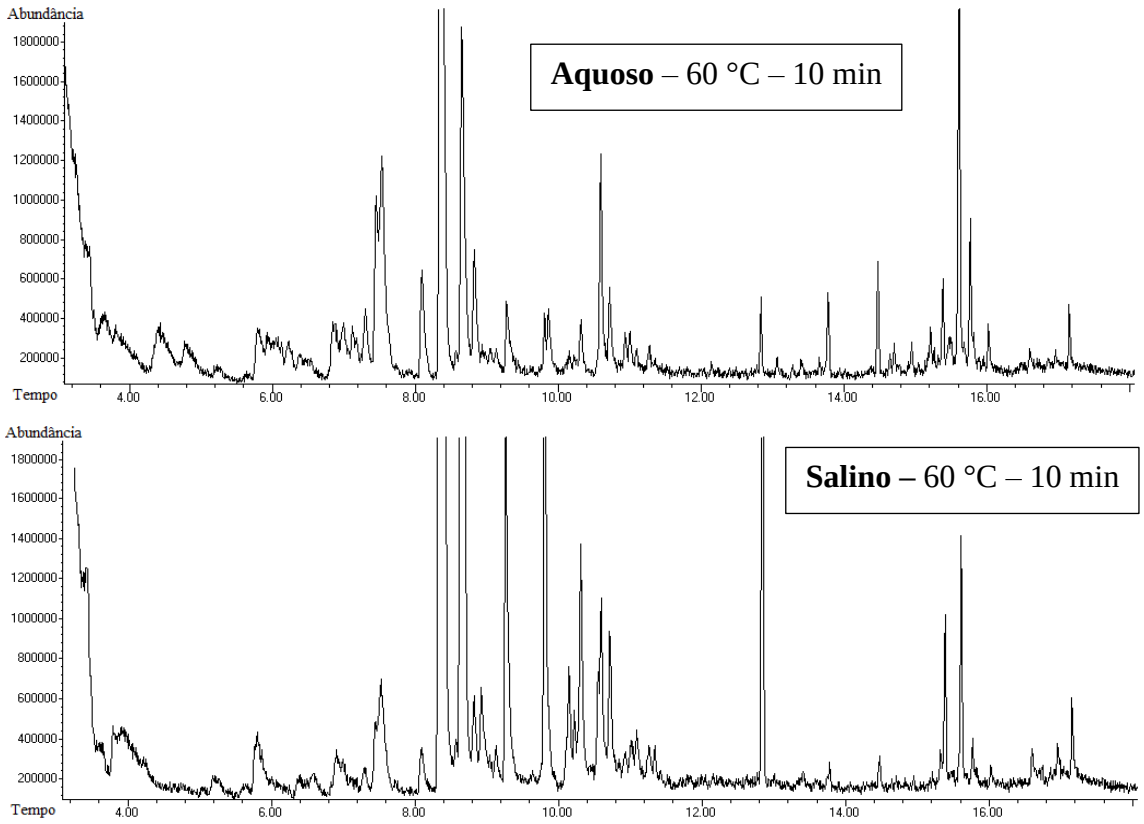


Figura 23. Ampliação dos cromatogramas obtidos nos ensaios de otimização do método de extração dos compostos voláteis de méis de abelhas sem ferrão por extração por *headspace* estático a 60°C por 10 min, em meio aquoso e salino.

5.2. Compostos voláteis em méis de abelhas sem ferrão

Um total de 44 compostos voláteis pertencentes a várias classes químicas, incluindo monoterpenos, sesquiterpenos, ésteres, acetonas e aldeídos, foram identificados nas amostras de méis de abelhas sem ferrão.

A identificação dos compostos foi baseada na comparação de espectros obtidos com aqueles da biblioteca NIST, e em sua maioria, o Índice de Kovats foi calculado e comparado com a literatura, com a finalidade de certificar a atribuição realizada. O cálculo do índice de Kovats foi baseado no cromatograma de um padrão de *n*-alcanos (C_8–C_{40}) (Figura 24).

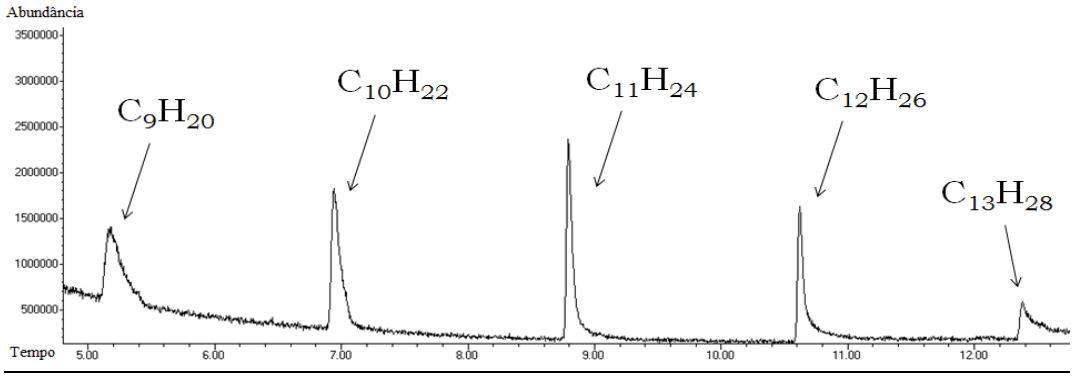


Figura 24. Cromatograma de uma mistura de padrões de alcanos lineares (C_8–C_{40}) injetada na mesma rampa de aquecimento que as amostras foram analisadas

Não foi possível calcular o IRL para os compostos que tiveram tempo de retenção acima de 13 min, pois na rampa de aquecimento trabalhada, nenhum alcano eluiu depois dos 13 min de corrida, e o cálculo necessita de um hidrocarboneto com tempo de retenção posterior ao tempo de retenção do composto de interesse. Dessa forma, para esses compostos somente a comparação com a biblioteca NIST foi usado para identificação. Os compostos identificados são apresentados na Tabela 5 e suas estruturas moleculares apresentadas na Figura 25.

Tabela 5. Compostos voláteis identificados em méis multiflorais brasileiros de abelhas sem ferrão

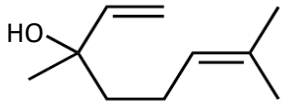
	Composto	ID[a]	t_R[b]	IRL[c]	IRL_{lit}[d]
1	2-heptanona	EM, IRL	4,9	891	894
2	2-heptanol	EM, IRL	5,1	899	900
3	Thuja-2,4(10)-dieno	EM, IRL	6,1	954	959
4	Benzaldeído	EM, IRL	6,3	966	965
5	Tetrahidro-2,2,6-trimetil-6-vinil-2H-pirano	EM, IRL	6,4	973	971
6	β-Mirceno	EM, IRL	6,8	993	989
7	Hexanoato de etila	EM, IRL	6,9	1002	1001
8	α-Terpineno	EM, IRL	7,3	1020	1018
9	p-Cimeno	EM, IRL	7,4	1026	1026
10	Limoneno	EM, IRL	7,4	1030	1031
11	Acetato de heptila	EM, IRL	7,7	1041	1043
12	γ-Termineno	EM, IRL	8,0	1060	1062
13	Trans-óxido de linalol (Furanóide)	EM, IRL	8,3	1075	1074

14	Cis-óxido de linalol (Furanóide)	EM, IRL	8,6	1091	1092
15	Linalol	EM, IRL	8,8	1100	1097
16	Hotrienol	EM, IRL	8,8	1105	1101
17	2,2,6-Trimetil-3-ceto-6-viniltetrahidro-pirano	EM, IRL	8,9	1109	1107
18	Fenchol	EM, IRL	9,1	1118	1121
19	Isoporano	EM, IRL	9,2	1125	1120
20	Octanoato de metila	EM, IRL	9,3	1126	1125
21	Ciclohexanoato de etila	EM, IRL	9,4	1135	1130
22	(E,E)-2,6-Dimetil-1,3,5,7-octatetraene	EM, IRL	9,5	1144	1134
23	Óxido de nerol	EM, IRL	9,8	1157	1153
24	Epoxilinalol (Piranóide)	EM, IRL	10,1	1173	1174
25	Benzoato de etila	EM, IRL	10,2	1175	1172
26	Terpinen-4-ol	EM, IRL	10,3	1181	1182
27	α-Terpinol	EM, IRL	10,5	1198	1192
28	Octanoato de etila	EM, IRL	10,6	1196	1197
29	Safranal	EM, IRL	10,6	1204	1201
30	β-Ciclocitral	EM, IRL	11,0	1225	1223
31	Benzenoacetato de etila	EM, IRL	11,4	1248	1247
32	Octanoato de propila	EM, IRL	12,2	1292	1290
33	Octanoato isobutílico	EM	13,1	-	-
34	1,1,5-Trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN)	EM	13,3	-	-
35	Decanoato de etila	EM	13,9	-	-
36	Cariofileno	EM	14,4	-	-
37	Aloaromadendreno	EM	14,7	-	-
38	Germacreno D	EM	15,0	-	-
39	Octanoato de isoamila	EM	15,1	-	-
40	Hidroxitolueno butilado (BHT)	EM	15,5	-	-
41	Cis-Muurola-4(14),5-dieno	EM	15,6	-	-
42	δ-Cadineno	EM	15,7	-	-
43	Dodecanoato de etila	EM	16,4	-	-
44	Epi-biciclosesquifelandreno	EM	17,0	-	-

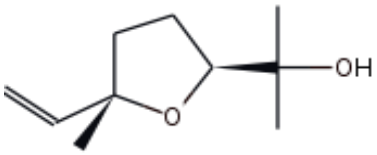
[a] Método de Identificação: EM, identificação por comparação com biblioteca de espectros NIST. IRL, identificação por comparação do Índice de Retenção Linear calculado com o reportado na literatura.
[b] Tempo de retenção em minutos.
[c] Índice de Retenção Linear calculado através da injeção de uma mistura de alcanos lineares (C_8 a C_{40}).
[d] Índice de Retenção Linear encontrado na literatura.

TERPENOS

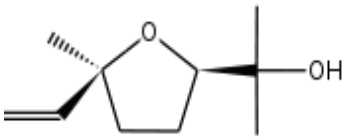
Linalol



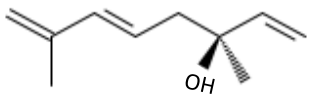
trans-óxido de Linalol



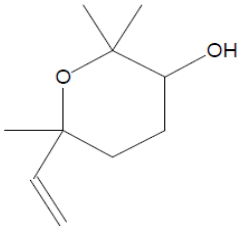
cis-óxido de Linalol



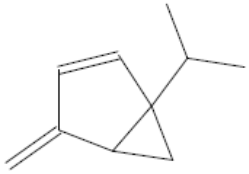
Hotrienol



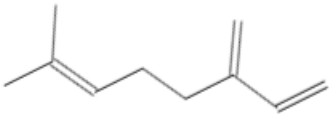
Epoxilinalol



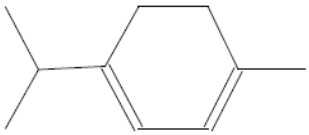
Thuja-2,4(10)-dieno



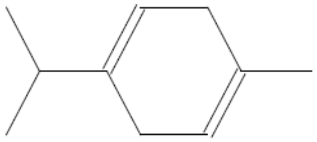
β-Mirceno



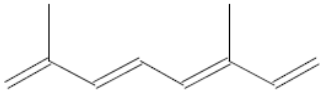
α-Terpineno



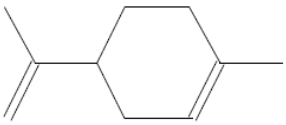
γ-Terpineno



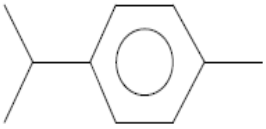
(*E*,*E*)-2,6-Dimetil-1,3,5,7-octatetraeno



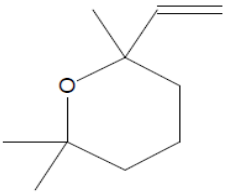
Limoneno



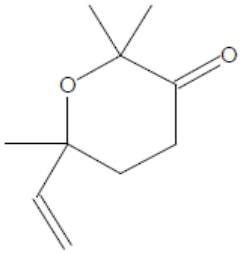
p-Cimeno



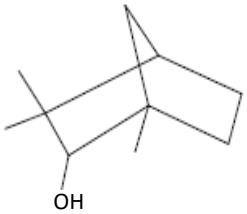
Tetrahidro-2,2,6-trimetil-6-vinil-2H-pirano



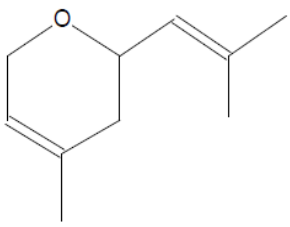
2,2,6-trimetil-3-ceto-6-viniltetrahidropirano



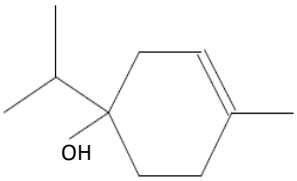
Fenchol



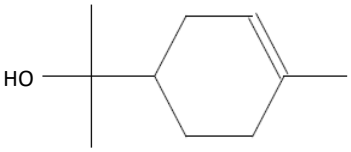
Óxido de nerol



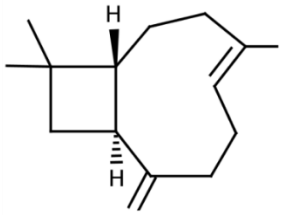
Terpinen-4-ol



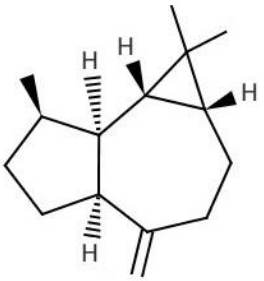
α-Terpineol



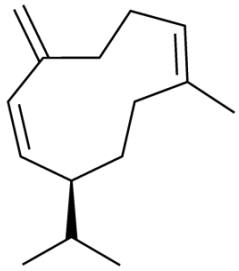
Cariofileno



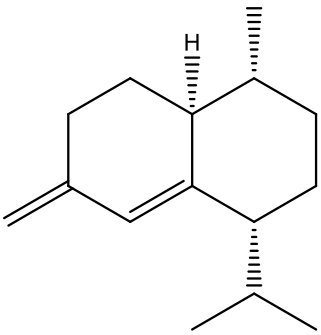
Aloaromadendreno



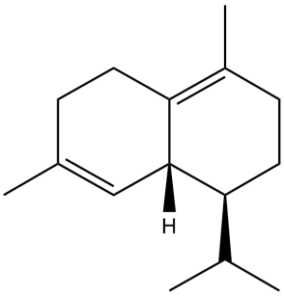
Germacreno D



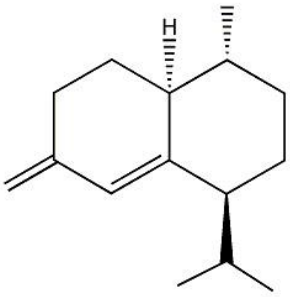
cis-Muurola-4(14),5-dieno



δ-Cadineno

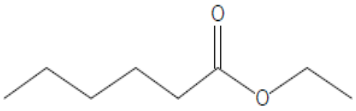


Epi-Biciclosesquifelandreno

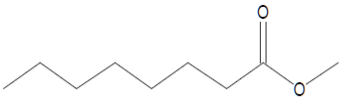


ÉSTERS

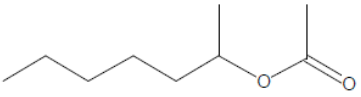
Hexanoato de Etila



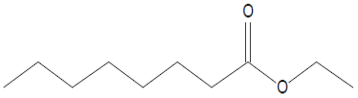
Octanoato de Metila



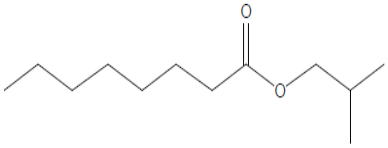
Acetato de Heptila



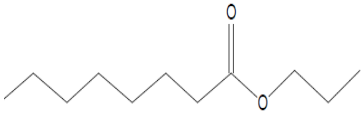
Octanoato de Etila



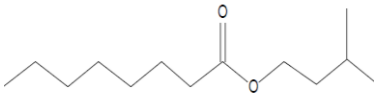
Octanoato Isobutílico



Octanoato de propila



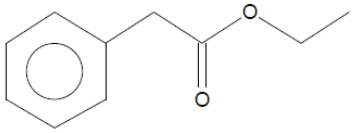
Octanoato de isoamila



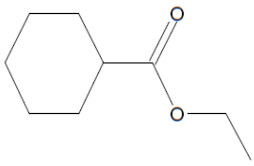
Decanoato de Etila

Dodecanoato de Etila

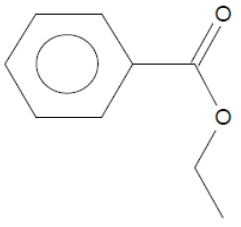
Benzenoacetato de Etila



Ciclohexanoato de Etila



Benzoato de Etila



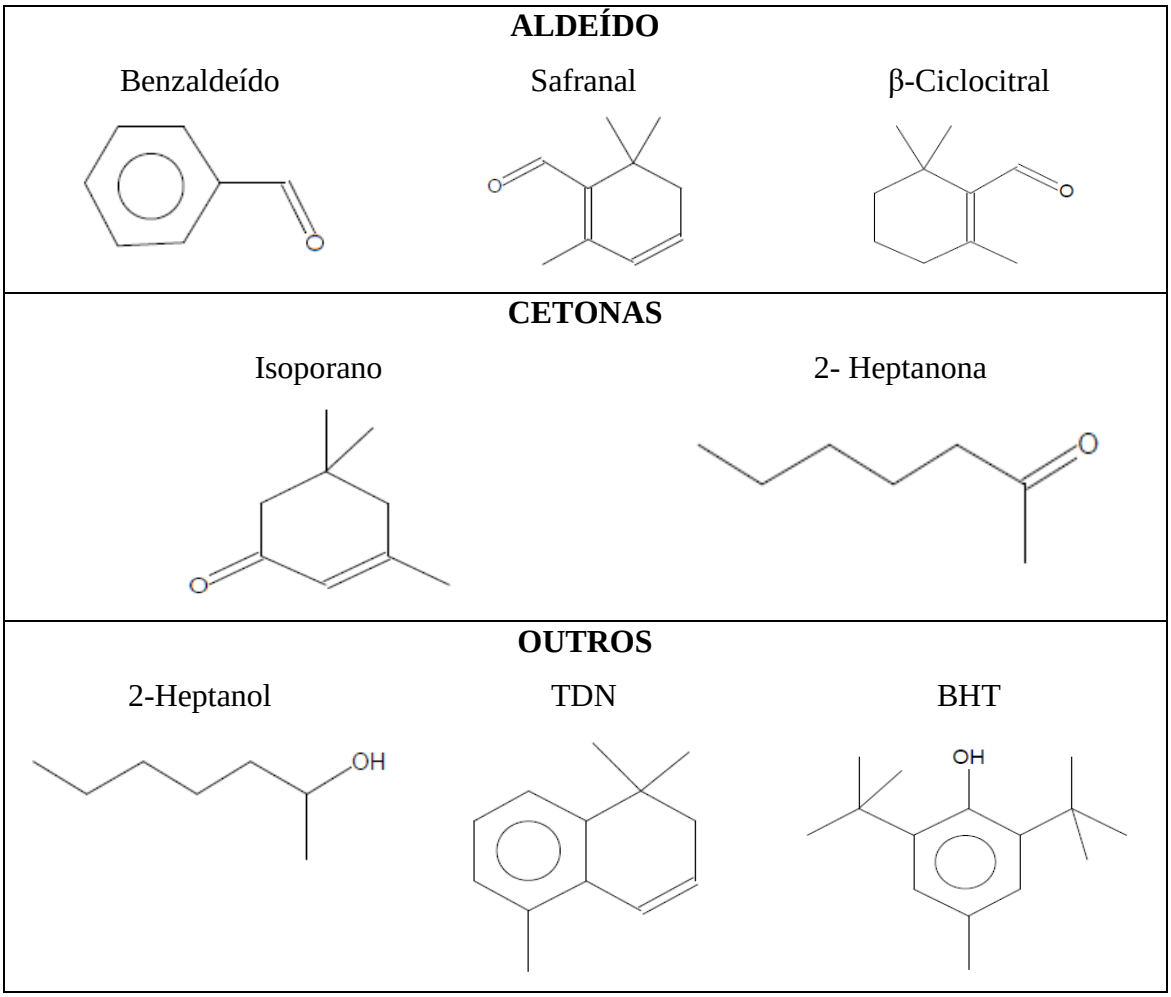


Figura 25. Estruturas dos compostos identificados nos méis multiflorais de abelhas sem ferrão usando extração por *headspace* estático

Os óxidos de linalol (*cis* e *trans*) foram detectados em todas as amostras, sendo também, juntamente com o hotrienol, os compostos mais abundantes no *headspace* da maioria dos méis, e o composto de maior intensidade foi o *trans*-óxido de linalol, como mostra a Figura 26a. Entretanto, para as amostras de méis da abelha Borá, o perfil cromatográfico não seguiu o mesmo padrão. Nestas amostras os compostos mais abundantes foram ésteres, tendo o octanoato de etila como composto de maior intensidade, seguido pelo decanoato de etila (Figura 26b). Já para a amostra de mel da abelha Mandaçaia da cidade de Prudentópolis o composto em maior abundância foi o *p*-cimeno (Figura 26c).

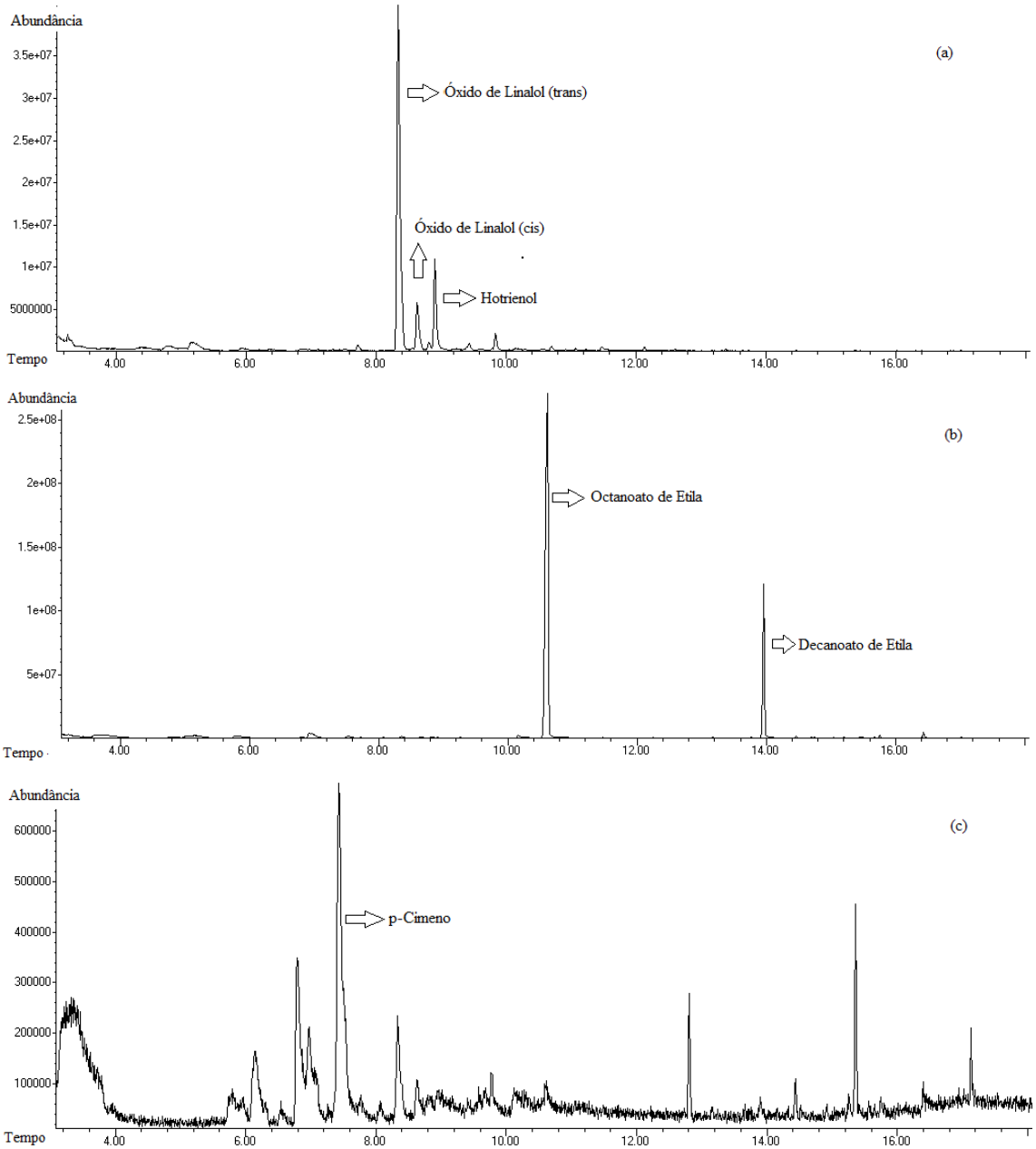


Figura 26. Cromatogramas representativos do *headspace* das amostras de méis de abelhas sem ferrão: (a) cromatograma do mel da abelha Mandurí da cidade de Guaraqueçaba, (b) cromatograma do mel da abelha Borá da cidade de Guaraqueçaba e em (c) cromatograma do mel da abelha Mandaçaia da cidade de Prudentópolis.

Em um estudo realizado por Borsato et al. [169], que realizaram análise dos tipos polínicos encontrados em méis produzidos por abelhas Guairapó, Mandurí, Mandaçaia e Borá dos municípios de Curitiba, Guaraqueçaba e Boa Esperança do Iguaçu do estado do Paraná, foi observado que o mel de abelha Borá foi o que apresentou a maior diversidade polínica, onde foram identificados 15 tipos polínicos diferentes, dentre eles o tipo Delonix foi classificado como pólen dominante. Os pesquisadores conjeturaram a possibilidade de que o perfil volátil diferenciado do mel

de Borá poderia influenciar no seu sabor peculiar, pois o mel de abelha Borá é bastante conhecido por ser azedo [170]. Os autores argumentaram que para melhor entendimento dos motivos que levaram o mel dessa abelha a se diferenciar significativamente dos méis de outras espécies seriam necessários estudos que investigassem a fisiologia e comportamento da abelha na coleta de néctar e elaboração do mel, pois há uma carência de dados na literatura em relação a esse assunto.

O linalol e seus derivados têm sido reportados como constituintes de diversos méis de *Apis mellifera.*[13,143,145]. Em um estudo feito por Alissandrakis et al. [14], quatro espécies de cítricos apresentaram o linalol como composto predominante (11,3% no limão, 51,6% na laranja, 80,6% em laranja azeda e 75,2% em tangerina). Esses pesquisadores concluíram que o mel cítrico é caracterizado pela predominância de derivados de linalol, uma vez que, mais de 80% dos constituintes químicos voláteis do extrato do mel foram identificados como derivados de Linalol. A presença desses compostos em méis cítricos já foi reportada em diversos estudos [15–17]. Como esses compostos ficaram entre os mais abundantes do perfil volátil da maioria das amostras podemos deduzir que grande quantidade do néctar utilizado para produção de méis de abelhas sem ferrão dessas regiões vem de cítricos. Por outro lado, Castro-Vazquez et al. [140] reportaram o linalol como composto mais representativo de mel de tomilho, com uma concentração semelhante à encontrada no mel de citrinos. No Brasil derivados de linalol foram identificados em mel de laranja e marmeleiro [58,60,171].

Alguns autores afirmam que o hotrienol tem sido comumente citado como produto de degradação térmica em méis [14,97]. Entretanto, estudos de Jerkovic et al. [128] mostram que este composto pode ocorrer no mel de maneira natural. Devido às condições de temperatura e pH dentro da colmeia e também pela ação enzimática das abelhas no mel. A concentração do hotrienol pode aumentar de forma muito significativa durante o amadurecimento do mel por meio de degradação oxidativa do linalol ou clivagem de ligações glicosídicas. Rowland et al. [97] detectaram proporções muito menores em méis verdes do que em mel maduro e sugeriram que o hotrienol é provavelmente formado durante a maturação de mel.

Embora presente em méis de *Apis mellifera* de várias origens florais, o hotrienol também tem sido detectado em méis de lavanda [13,140], devido a sua alta concentração neste tipo de mel quando comparados a outros.

Cerca de 45% dos compostos identificados na fração volátil dos méis analisados são terpenos. A presença desses compostos normalmente é associada ao

néctar de origem [128]. Monoterpenos como *β*-mirceno, *α*-terpineno, *p*-cimeno, limoneno, *γ*-terpineno e (*E*,*E*)-2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno, têm sido reportados em diversos tipos de méis como, de castanheira [172–174], de pinheiro [175], de eucalipto [98,140,176], de alecrim [141], de tomilho [119,148], de cítricos [13,134,177], dentre outros [93,177,178]. Terpenos oxidados como óxido de nerol, *α*-terpineol e tetrahidro-2,2,6-trimetil-6-vinil-2H-pirano foram anteriormente relatados em méis cítricos [12,177,179]. Sesquiterpenos como Germancreno D e *δ*-Cadineno também foram relatados em méis de *Apis mellifera* de diferentes origens florais [21,167].

Dois dos terpenos emcontrados nos méis de abelha sem ferrão, o carieofileno e o terpinen-4-ol foram relatados anteriormente em geoprópolis da abelha *Tetragonula carbonari* [180].

Os compostos 2-heptanona e 2-heptanol foram detectados somente no mel da abelha Tubuna da cidade de Prudentópolis. Estudos anteriores relataram esses compostos em méis europeus de *Apis mellifera* [167,175,177] e em mel de eucalipto Brasileiro [58].

Os ésteres também se mostraram significativos no perfil químico dos compostos voláteis dos méis de abelha sem ferrão, representando cerca de 27% dos compostos identificados, a maioria deles foram relatados anteriormente em méis de *Apis mellifera* de várias origens florais [148,181].

Entre os aldeídos identificados, o benzaldeído é o mais comum em méis de *Apis mellifera* e tem sido relatado em estudos com diferentes tipos de méis europeus, principalmente em méis cítricos [12,173]. Em méis brasileiros, o benzaldeído tem sido reportado para méis de cambará [59], de laranjeira [58], de “assa-peixe” [111] e em méis multiflorais [127]. O safranal foi relatado em méis multiflorais de vários lugares do mundo [181], e o *β*-ciclocitral em própolis Italiana [153].

Outros compostos também identificados incluem o isoporano, bastante comum em méis europeus de *Apis mellifera* [141,143,145], 1,1,5-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN), composto derivado do naftaleno, encontrado em méis multiflorais de vários lugares do mundo [181]. Por fim, o composto fenólico hidroxitolueno butilado (BHT), é um antioxidante sintético amplamente utilizado pela indústria alimentícia [69], indicando ser um possível contaminante nas amostras de méis. Por outro lado, esse composto também já foi relatado anteriormente em alguns estudos com méis cítricos, de eucalipto, de alecrim, de urze [145] e multiflorais [181].

5.3. Análise dos componentes principais

Foi realizada uma ACP para todas as amostras analisadas, a fim de verificar se a fração volátil do mel permite discriminar entre as amostras de mel produzidas por abelhas de espécies diferentes e coletadas em locais de produção diferentes. Um total de 7 componentes principais foi responsável por 94,3% da variância total. As componentes principais (CP) 1 e 2, com porcentagem de variância cumulativa de 44,2%, foram suficientes para avaliar as semelhanças e diferenças entre as amostras, onde a CP1 explica 24,87% e a CP2 explica 19,37% da variância total dos dados. Os resultados da ACP são mostrados nas Figuras 27 e 28.

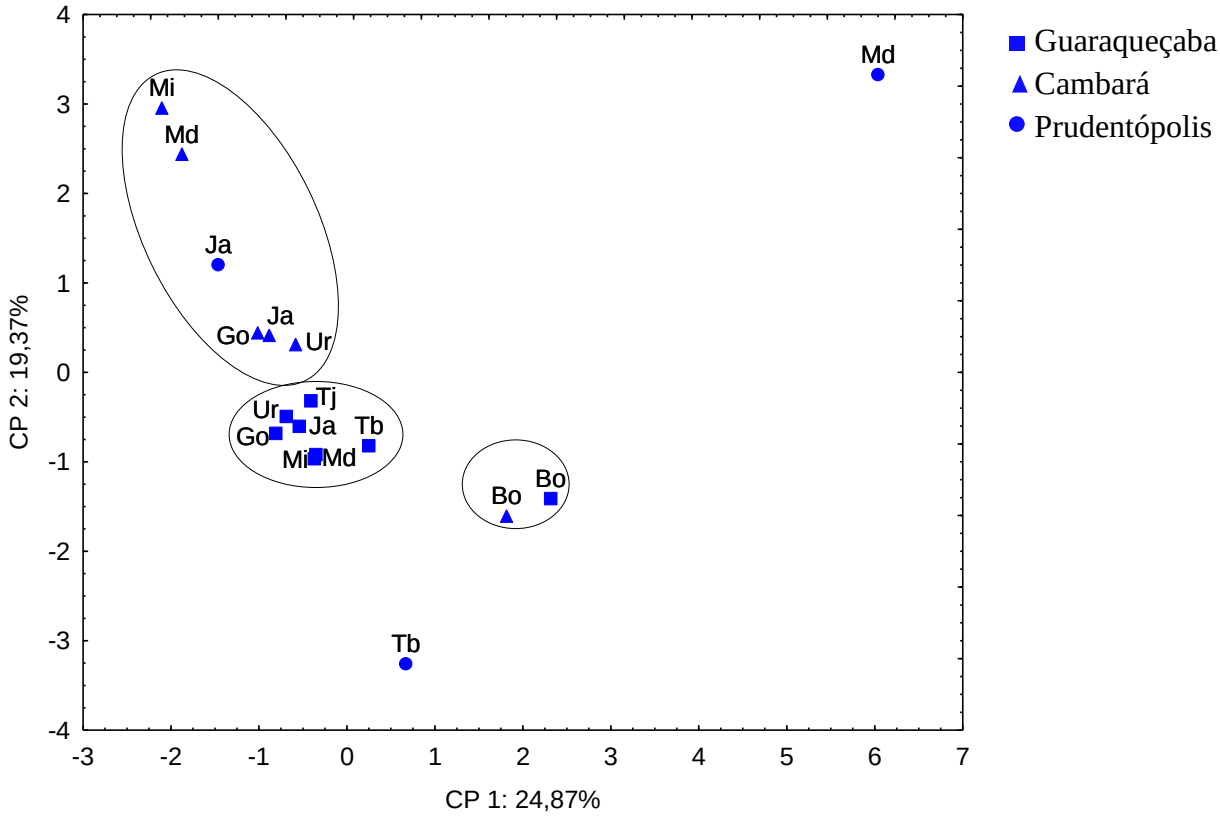


Figura 27. Gráfico de escores de CP1 *versus* CP2 codificado de acordo com a legenda e a Tabela 3.

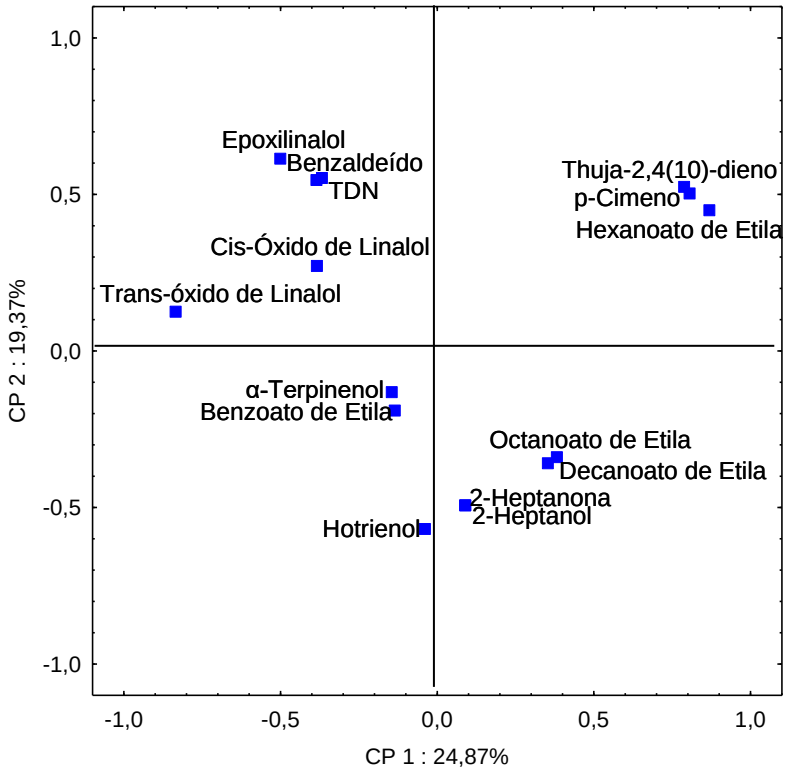


Figura 28. Gráfico de pesos das variáveis estudadas

A Figura 27 mostra o gráfico de escores das duas primeiras componentes principais (CP1 e CP2), representando a relação entre as amostras, onde a proximidade entre os pontos reflete suas semelhanças em relação às variáveis estudadas. A Figura 28 apresenta o gráfico de pesos, também das duas primeiras componentes principais (CP1 e CP2), que mostra a influência do peso das variáveis consideradas neste estudo e a relação entre os compostos voláteis com as amostras.

Podemos observar que há separação dos méis principalmente pela região de origem. As amostras da cidade de Guaraqueçaba ficaram agrupadas no quadrante negativo da CP2 enquanto que as amostras da cidade de Cambará ficaram no quadrante positivo da mesma componente. O agrupamento das amostras da cidade Guaraqueçaba deve-se principalmente ao alto teor do composto hotrienol em relação à área normalizada. Já o agrupamento das amostras da cidade de Cambará ocorreu pela presença de epoxilinalol, e por maiores valores da área normalizada de benzaldeído e TDN. As amostras da cidade de Guaraqueçaba eram mais antigas em comparação com as outras amostras, o que pode explicar a maior concentração do composto hotrienol nesses méis, pois a concentração de hotrienol pode aumentar significativamente durante o amadurecimento do mel, como estudado em Jerkovic et al. [128].

Porém, de maneira geral, méis da mesma espécie tem composição química semelhante independentemente da região, como no caso das amostras Go, Ur e Ja que ficaram com escores muito próximos na CP1 mesmo sendo de regiões diferentes. Os méis da abelha Borá, que ao contrário das outras amostras de suas regiões, foram agrupados pela espécie da abelha produtora, diferenciam-se do restante das amostras devido à alta concentração dos compostos octanoato de etila e decanoato de etila.

As amostras Mi e Md, que possuem o mesmo gênero (*Melipona*), são semelhantes entre si. Entretanto, as amostras Mi e Md da cidade de Guaraqueçaba possuem composição volátil diferente das amostras Mi e Md da cidade de Cambará. Nesse caso podemos sugerir que as abelhas adaptaram-se a flora da região para a produção de seu mel, não sendo seletivas quanto suas fontes florais. Em um estudo realizado por Kleinert-Giovannini e Imperatriz-Fonseca [182], foram encontrados 173 tipos de pólen, pertencentes a 38 famílias de plantas em amostras de pólen e mel de colmeias da abelha Mandurí, dessa forma esta abelha poderia ser considerada como generalista na coleta de néctar. Wilms e Wiechers [183] estudaram pólen e néctar colhidos nas colônias de Mandaçaia durante um ano, os resultados mostraram que essa espécie é mais restritiva quanto à coleta de pólen, porém para coleta de néctar, ela diversifica suas fontes de coleta.

Podemos observar também, que o composto *trans*-óxido de linalol foi o responsável pela separação das amostras na CP1, onde as amostras que estão no lado negativo das CP1, junto com a amostra Tb de Guaraqueçaba, apresentam o *trans*-óxido de linalol como composto com área máxima, enquanto que, as amostras que estão do lado positivo da CP1 possuem outro composto com maior área.

As amostras da cidade de Prudentópolis também se distinguiram pela espécie de abelha produtora, pois ficaram muito afastadas entre si. Além disso, a amostra Md de Prudentópolis teve escores bem altos tanto pela CP1 quanto pela CP2, isolando-se das demais amostras, podendo ser considerada uma amostra de mel atípica. Isso ocorreu pela presença do composto thuja-2,4(10)-dieno e pelos maiores teores de p-cimeno e hexanoato de etila em relação à área normalizada. O mesmo ocorre para a amostra Tb da mesma cidade, que se diferencia do restante das amostras pela presença dos compostos 2-heptanol e 2-heptanona. Em dados pertencentes ao Atlas dos Municípios da Mata Atlântica, divulgado em 11 de Novembro de 2015 pela SOS Mata Atlântica e pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) [184], Prudentópolis está em 5° lugar nas cidades paranaenses que mais desmataram a Mata Atlântica entre 2000 e 2014 e em 1° lugar

entre 2013-2014. Enquanto que Guaraqueçaba foi a cidade do estado do Paraná que mais preservou o bioma no período de 2000-2014, que mantém 80,1% de vegetação natural, comparado com a área original. Esse pode ser um indicativo dessa diferença no perfil volátil dos méis da cidade de Prudentópolis, onde a escassez da flora original leva a abelha em busca de fontes alternativas para produção do mel.

6. CONCLUSÃO

A extração por *headspace* estático seguida por análise no CG-EM mostrou-se apropriada para caracterizar os compostos voláteis nos méis de abelhas sem ferrão. Entretanto, esta técnica é indicada apenas para detecção de compostos com alta volatilidade, suprimindo os voláteis de baixa concentração. No total foram identificados 44 compostos nos méis de abelhas sem ferrão. Esses voláteis, em sua maioria, foram caracterizados em diversos estudos como compostos florais contribuintes do *flavour* de méis de *Apis mellifera*.

A otimização da extração por *headspace* estático mostrou-se eficiente para obtenção da condição ótima de extração, que resultou ser em meio salino com incubação de 10 min a 60 °C.

Através da análise dos componentes principais podemos concluir que a composição química dos méis de abelhas sem ferrão está relacionada tanto à região de origem quanto à espécie de abelha produtora. As amostras de méis das cidades de Guaraqueçaba e Cambará separaram-se de acordo com sua região de origem. Por outro lado, as abelhas Guairapó, Uruçu, Jataí e Borá mostraram um mel cuja composição volátil foi semelhante independentemente da região de origem. Já os méis de Mandaçaia e Mandurí de Guaraqueçaba tiveram composição volátil diferente dos méis de Mandaçaia e Mandurí da cidade de Cambará. Todos esses méis apresentaram como principais constituintes os óxidos de Linalol (*cis e trans*). Entretanto, os méis da abelha Borá tiveram como principal constituinte o octanoato de etila, diferenciando-se do restante das amostras de sua região. As amostras da cidade de Prudentópolis foram separadas pela espécie de abelha produtora, ficando afastadas entre si na ACP, onde a amostra Mandaçaia, desta região, diferenciou-se significativamente das demais amostras, tendo como composto mais abundante em seu perfil volátil o *p*-cimeno.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CRANE, E. **O livro do mel**. 2 ed. São Paulo: Nobel, 226p, 1983.

2. BRASIL Instrução Normativa 11 de 20 de outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. **Diário Oficial da União**, n. 204, 2000. Seção 1, p. 16, p. 23, 2000.

3. CARVALHO, C.A.L. de; SOUZA, B.D.A.; SODRÉ, G.D.S.; MARCHINI, L.C.; ALVES, R.M.D.O. **Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização.** Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA, 2005.

4. VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico: Mel de abelhas sem ferrão**. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza, 2012.

5. NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997.

6. ALVES, R.M.D.O.; SOUZA, B.D.A.; CARVALHO, C.A.L.D.; JUSTINA, G.D. **Custo de produção de mel : uma proposta para abelhas africanizadas e meliponíneos**. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA, 2005.

7. RIBEIRO, L. **Avaliação da qualidade do mel: atividade antioxidante, análise polínica e perceção do consumidor**. Porto, 2012. 88p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências - Universidade do Porto.

8. INMETRO. Exigências Técnicas (Países x Produtos). Disponível em: http://inmetro.gov.br/barreirastecnicas/exigencias/index.asp. Acesso em: 25 de Nov. de 2015.

9. ABNT NBR15654 - Apicultura - Mel - Sistema de rastreabilidade. Publicada em: 08 de Jan. de 2009.

10. EMBRAPA. Rastreabilidade na cadeia produtiva apícola. Disponível em: http://www.cpamn.embrapa.br/apicultura/rastreabilidade.php. Acesso em: 25 de Nov de 2015.

11. LIANDA, R.; SANT' ANA, L.; ECHEVARRIA, A.; CASTRO, R. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Brazilian Honey and their Extracts. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 618–627, 2012.

12. ALISSANDRAKIS, E.; TARANTILIS, P.A.; HARIZANIS, P.C.; POLISSIOU, M. Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 1, p. 91–97, 2005.

13. RADOVIC, B.S.; CARERI, M.; MANGIA, A.; MUSCI, M.; GERBOLES, M.; ANKLAM, E. Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. **Food Chemistry**, v. 72, n. 4, p. 511–520, 2001.

14. ALISSANDRAKIS, E.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P.A.; POLISSIOU, M.; HARIZANIS, P.C. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. **Food Chemistry**, v. 82, n. 4, p. 575–582, 2003.

15. ALISSANDRAKIS, E.; TARANTILIS, P.A.; HARIZANIS, P.C.; POLISSIOU, M. Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction

coupled to gas chromatographic-mass spectrometric analysis. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p. 396–404, 2007.

16. VERZERA, A.; TRIPODI, G.; CONDURSO, C.; DIMA, G.; MARRA, A. Chiral volatile compounds for the determination of orange honey authenticity. **Food Control**, v. 39, n. 1, p. 237–243, 2014.

17. ESCRICHE, I.; KADAR, M.; JUAN-BORRÁS, M.; DOMENECH, E. Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1504–1513, 2011.

18. GUYOT-DECLERCK, C.; RENSON, S.; BOUSETA, A.; COLLIN, S. Floral quality and discrimination of *Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia*, and *Lavandula angustifolia* x *latifolia* honeys. **Food Chemistry**, v. 79, n. 4, p. 453–459, 2002.

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

20. MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. Compostos voláteis em méis florais. **Quimica Nova**, v. 26, n. 1, p. 90–96, 2003.

21. BENTIVENGA, G.; D'AURIA, M.; FEDELI, P.; MAURIELLO, G.; RACIOPPI, R. SPME-GC-MS analysis of volatile organic compounds in honey from Basilicata. Evidence for the presence of pollutants from anthropogenic activities. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 1079–1086, 2004.

22. EMBRAPA. Sistema de Produção - Produção de Mel. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/historico2.htm. Acesso em: 20 de Out. de 2015.

23. TARANAKI EDUCATIONAL RESOURCE: RESEARCH, ANALYSIS AND INFORMATION NETWORK. Bee (Honey) *Apis mellifera*. Disponível em: http://www.terrain.net.nz/friends-of-te-henui-group/local-flies/honey-bee.html. Acesso em: 19 de Out. de 2015.

24. COMO TUDO FUNCIONA. As pernas e os ferrões das abelha. Disponível em: http://ciencia.hsw.uol.com.br/abelha2.htm. Acesso em: 20 de Out de 2015.

25. VENTURIERI, G.C.; RAIOL, V.F.O.; PEREIRA, C.A.B. Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona fasciculata* (Apidae: Meliponina), entre os agricultores familiares de Bragança-PA, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 3, n. 2, p. 1–7, 2003.

26. GRUPO ABENA. As Abelhas. Disponível em: http://www.grupoabena.com.br/site/as-abelhas. Acesso em: 24 de Nov. de 2015.

27. IB/USP. Projeto VINCES/FAPESP. Disponível em: http://www.ib.usp.br/vinces/weblabs/abelhas/imagens/Melipona%20bicolor%20worker%20white%20backgr2.jpg. Acesso em: 24 de Nov. de 2015.

28. IB/USP. Guia Ilustrado das Abelhas sem Ferrão do Estado de São Paulo. Disponível em: http://www.ib.usp.br/beesp/scaptotrigona_xanthotricha.htm. Acesso em: 24 de Nov. de 2015.

29. CENTRO DE PRODUÇÕES TÉCNICAS. Abelhas sem ferrão - Irapuã (Trigona spinipes). Disponível em: http://www.cpt.com.br/cursos-

criacaodeabelhas/artigos/abelhas-sem-ferrao-irapua-trigona-spinipes. Acesso em: 24 de Nov. de 2015.

30. INSTITUTO RÃ-BUGIO. Invertebrados - Abelhas, Vespas & Formigas. Disponível em: http://www.ra-bugio.org.br/ver_especie.php?id=778. Acesso em: 24 de Nov. de 2015.

31. AMERICAN INSECTS. *Tetragona cf. clavipes*. Disponível em: http://www.americaninsects.net/hy/tetragona-cf-clavipes.html. Acesso em: 24 de Nov. de 2015.

32. WILDTHINGS. Stingless Bee Pollination. Disponível em: http://wildthings.org.au/index.php/programs-2/tetragonula-carbonaria/tetragonula-faq/. Acesso em: 24 de Nov. de 2015.

33. WIKIPEDIA. Mamangaba. Disponível em: https://pt.wikipedia.org/wiki/Mamangaba. Acesso em: 19 de Out. de 2015.

34. BUGS AND BEYOND IN BELIZE. Portait gallery of bugs 2. Disponível em: http://www.bugsandbeyondatcavesbranch.com. Acesso em: 19 de Out. de 2015.

35. RECH, A.R. **Biologia da Polinização**. 1 ed. Rio de Janeiro: Projeto Cultural, 532p, 2014.

36. WEBBEE. Tópicos em Biologia de Abelhas. Disponível em: http://www.webbee.org.br/beelife/biolo.htm. Acesso em: 20 de Out. de 2015.

37. MELIPONÁRIO MONTE SECO. Saiba mais sobre a abelha Jataí. Disponível em: http://meliponariomonteseco.blogspot.com.br. Acesso em 19 de Out de 2015.

38. MELIPONÁRIO DO SERTÃO. Abelha Jataí, pequenas... mas muito produtivas. Disponível em: http://meliponariodosertao.blogspot.com.br/2012/04/abelha-jati-pequenas-mas-muito.html. Acesso em: 18 de Nov. de 2015.

39. MELIPONÁRIO DA SERRA. *Tetragonisca angustula* latreille 1811. Disponível em: http://meliponariodaserra.blogspot.com.br. Acessado em: 21 de Out. de 2015.

40. EMBRAPA. **ABC da Agricultura Familiar - Criação de abelhas (apicultura)**. 1 ed. Brasília: Emprapa Informações Tecnológica, 112p, 2007.

41. MARCUCCI, M.C. Biological and therapeutic properties of chemical propolis constituents. **Quimica Nova**, v. 19, n. 5, p. 529–536, 1996.

42. BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, C.; POPOV, S. Constituents of Brazilian geopropolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 53c, n. 1, p. 402–406, 1998.

43. LIBERIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A.; DUTRA, R.P.; REIS, A.S.; ARAÚJO, M.J.A.; MATTAR, N.S.; SILVA, L.A.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; GUERRA, R.N.; MONTEIRO-NETO, V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 1, p. 108, 2011.

44. SOUZA, B.A.; MARCHINI, L.C.; ODA-SOUZA, M.; CARVALHO, C.A.L. de; ALVES, R.M.O. Caracterização do mel produzido por espécies de *Melipona Illiger*, 1806 (Apidae: Meliponini) da região nordeste do Brasil: 1. Características físico-químicas. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 303–308, 2009.

45. ALVES, R.M.O.; CARVALHO, C.A.L. de; 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**, v. 25, n. 4, p. 644–650, 2005.

46. EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E.; BESERRA, E.; RODRIGUES, M. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1166–1171, 2005.

47. BENDINI, J.; SOUZA, D. Caracterização físico-química do mel de abelhas proveniente da florada do cajueiro. **Ciência Rural**, v. 38, n. 2, p. 565–567, 2008.

48. OLIVEIRA, E.N.A. de; SANTOS, D.C. Análise físico-química de méis de abelhas africanizada e nativa. **Revista Institto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 2, p. 132–138, 2011.

49. GLOBO RURAL. Brasil sobe no ranking e é o 8º maior exportador de mel. Disponível em: http://revistagloborural.globo.com/Noticias/Criacao/noticia/2015/07/brasil-sobe-no-ranking-e-e-o-8-maior-exportador-de-mel.html. Acesso em: 20 de Out. de 2015.

50. PEREIRA, M.A. **Perfil cromatográfico das substâncias fenólicas presentes em extratos de mel de assa peixe e avaliação de seu poder antioxidante.** Seropédica, 2010. 77p. Monografia - Instituto de Ciências Exatas - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

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

52. VILHENA, F.; ALMEIDA-MURADIAN, L.B. Análises físico-químicas de méis de São Paulo. **Mensagem Doce**, v. 53, p. 17–19, 1999.

53. SOUZA, B.; ROUBIK, D.; BARTH, O.; HEARD, T.; ENRÍQUEZ, E.; CARVALHO, C.; VILLAS-BÔAS, J.; MARCHINI, L.; LOCATELLI, J.; PERSANO-ODDO, L.; ALMEIDA-MURADIAN, L.; BOGDANOV, S.; VIT, P. Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. **Interciencia**, v. 31, n. 12, p. 867–875, 2006.

54. GOMES, S.P.M. **Caracterização e avaliação biológica de méis comerciais**. Bragança, 2009. 60p. Dissertação de Mestrado - Instituto Politéctico de Bragaça - Escola Superior Agrária.

55. STICH, H.F. The beneficial and hazardous effects of simple phenolic compounds. **Mutation Research**, v. 259, n. 3-4, p. 307–324, 1991.

56. DONER, L.W. The sugars of honey--a review. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 28, n. 5, p. 443–456, 1977.

57. JERKOVIĆ, I.; MARIJANOVIĆ, Z. A short review of headspace extraction and ultrasonic solvent extraction for honey volatiles fingerprinting. **Croatian Journal of Food Science and Tecnology**, v. 1, n. 2, p. 28–34, 2009.

58. BASTOS, D.H.M.; FRANCO, M.R.B.; SILVA, M.A.A.P. da; JANZANTTI, N.S.; MARQUES, M.O.M. Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 122–129, 2002.

59. MOREIRA, R.F.A.; MARIA, C.A.B. de. Investigation of the aroma compounds from headspace and aqueous solution from the cambará (*Gochnatia Velutina*) honey. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, n. 1, p. 13–17, 2005.

60. MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C.; PIETROLUONGO, M.; MARIA, C.A.B. de. Flavor composition of cashew (*Anacardium occidentale*) and marmeleiro (*Croton* species) honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 7616–7621, 2002.

61. MENDES, B.A.; COELHO, E.M. Considerações sobre características de mel de abelhas – Análises e critérios de inspeção. **Informe Agropecúario**, v. 9, n. 106, p. 56–67, 1983.

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

63. MUÑOZ, O.; COPAJA, S.; SPEISKY, H.; PEÑA, R.; MONTENEGRO, G. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 848–851, 2007.

64. WANG, X.; GHELDOF, N.; ENGESETH, N. Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 2, p. 96–101, 2004.

65. FERREIRA, I.C.F.R.; AIRES, E.; BARREIRA, J.C.M.; ESTEVINHO, L.M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1438–1443, 2009.

66. OLIVEIRA, P.; MULLER, R.; DANTAS, K.; ALVES, C.; VASCONCELOS, M.; VENTURIERI, G. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculat*a, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1728–1732, 2012.

67. SILVA, I.A.A.; SILVA, T.M.S.; CAMARA, C.A.; QUEIROZ, N.; MAGNANI, M.; NOVAIS, J.S.; SOLEDADE, L.E.B.; LIMA, E.O.; SOUZA, A.L.; SOUZA, A.G. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3552–3558, 2013.

68. SILVA, T.M.S.; SANTOS, F.P. dos; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E.M.S. da; SILVA, G.S. da; NOVAIS, J.S. de; SANTOS, F.A.R. dos; CAMARA, C.A. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 10–18, 2013.

69. DAVY, H. Os antioxidantes. **Food Ingredients Brasil**, v. 6, n. 6, p. 16–31, 2009.

70. SILVA, I. **Perfil de fenólicos e propriedades bioativas dos méis de abelhas sem ferrão (*Melipona seminigra* merrillae) produzidos no Estado do Amazonas**. João Pessoa, 2013. 107p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal da Paraíba.

71. ARUOMA, O.I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 7, p. 671–683, 1994.

72. SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Bochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213–219, 1993.

73. AL, M.L.; DANIEL, D.; MOISE, A.; BOBIS, O.; LASLO, L.; BOGDANOV, S.

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

74. TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; MARTOS, I.; FERRERES, F.; RADOVIC, B.S.; ANKLAM, E. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 5, p. 485–496, 2001.

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

76. ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A.P.; MOREIRA, L.; DIAS, L.G.; PEREIRA, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3774–3779, 2008.

77. TAORMINA, P.J.; NIEMIRA, B.A.; BEUCHAT, L.R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 217–225, 2001.

78. CHEN, L.; MEHTA, A.; BERENBAUM, M.; ZANGERL, A.R.; ENGESETH, N.J. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4997–5000, 2000.

79. ANTONY, S.; RIECK, J.R.; DAWSON, P.L. Effect of dry honey on oxidation in turkey breast meat. **Poultry Science**, v. 79, n. 12, p. 1846–50, 2000.

80. MELLIOU, E.; STRATIS, E.; CHINOU, I. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece - Antimicrobial activity. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 375–380, 2007.

81. BORSATO, D.; ESMERINO, L.; FARAGO, O.; MIGUEL, M.; MIGUEL, O. Atividade antimicrobiana de méis produzidos por meliponíneos nativos do Paraná (Brasil). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 57–66, 2013.

82. WHITE, J.W.; SUBERS, M.H.; SCHEPARTZ, A.I. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. **Biochimica et Biophysica ACTA**, v. 73, n. 1, p. 57–70, 1963.

83. WESTON, R.J. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: A review. **Food Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 235–239, 2000.

84. SNOWDON, J.A.; CLIVER, D.O. Microorganisms in honey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 1–26, 1996.

85. CUTTING, K.F. Honey and contemporary wound care: An overview. **Ostomy Wound Management**, v. 53, n. 11, p. 49–54, 2007.

86. CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI, D.S. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. **Apidologie**, v. 22, n. 1937, p. 61–73, 1990.

87. SILVA, R.A. da; MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M. de; COSTA, J.M.C. da. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição**, v.

17, n. 1, p. 113–120, 2008.

88. AUGUSTO, F.; LOPES, A.L.; ZINI, C.A. Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 160–169, 2003.

89. SIDES, A.; ROBARDS, K.; HELLIWELL, S. Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 322–329, 2000.

90. FRANCO, M.R.B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. 1 ed. São Paulo: Varela, 246p, 2003.

91. MAMEDE, M.E.O.; PASTORE, G.M. Study of methods for the extraction of volatile compounds from fermented grape must. **Food Chemistry**, v. 96, n. 4, p. 586–590, 2006.

92. AUGER, J.; ROUSSET, S.; THIBOUT, E.; JAILLAIS, B. Solid-phase microextraction–gas chromatography–direct deposition infrared spectrometry as a convenient method for the determination of volatile compounds from living organisms. **Journal of Chromatography A**, v. 819, n. 1, p. 45–50, 1998.

93. KAŠKONIENE, V.; VENSKUTONIS, P.R.; CEKSTERYTE, V. Composition of volatile compounds of honey of various floral origin and beebread collected in Lithuania. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 988–997, 2008.

94. FRITZ, J.S.; MACKA, M. Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 902, n. 1, p. 137–166, 2000.

95. DELINSKY, A.D.; BRUCKNER, J. V; BARTLETT, M.G. A review of analytical methods for the determination of trichloroethylene and its major metabolites chloral hydrate, trichloroacetic acid and dichloroacetic acid. **Biomedical Chromatography**, v. 19, n. 8, p. 617–639, 2005.

96. NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1-2, p. 8–35, 2009.

97. ROWLAND, C.Y.; BLACKMAN, A.J.; D'ARCY, B.R.; RINTOUL, G.B. Comparison of organic extractives found in leatherwood (*Eucryphia lucida*) honey and leatherwood flowers and leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 3, p. 753–763, 1995.

98. D'ARCY, B.R.; RINTOUL, G.B.; ROWLAND, C.Y.; BLACKMAN, A.J. Composition of Australian Honey Extractives . 1 . Norisoprenoids , Monoterpenes , and Other Natural Volatiles from Blue Gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and Yellow Box (*Eucalyptus melliodora*) Honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 5, p. 1834–1843, 1997.

99. CAMPOS, G.; NAPPI, G.U.; RASLAN, D.S.; AUGUSTI, R. Substâncias voláteis em mel floral e mel de melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 18–22, 2000.

100. VIT, P.; ROJAS, L.; USUBILAGA, A.; APARICIO, R.; MECCIA, G.; MUIÑO, M.; SANCHO, M. Presencia de ácido láctico y otros compuestos semivolátiles en mieles de Meliponini. **Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel,"** v.

42, n. 1, p. 58–63, 2011.

101. LANÇAS, F.M. Avanços Recentes e Tendências Futuras das Técnicas de Separação : uma visão pessoal. **Scientia Chromatographica**, v. 0, n. 0, p. 17–44, 2008.

102. JARDIM, I.C.S.F. Extração em Fase Sólida : Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

103. BARRIONUEVO, W.; LAÇAS, F. Solid-phase extraction (SPE) and solid-phase microextraction of pyrethroids in water. **Quimica Nova**, v. 24, n. 2, p. 172–175, 2001.

104. GILSON, I. **Gilson Guide To SPE Automation**. 34p, 2005.

105. KATAOKA, H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 232–244, 2003.

106. KUBOTA, T. **Contribuição à química dos compostos voláteis de frutos do nordeste: *Hancornia Speciosa* Gomes**. São Cristóvão, 2007. 143p. Dissertação de Mestrado - Núcleo de Pós-Graduação em Química - Universidade Federal de Sergipe.

107. FREIRE, M.T. de A.; BOTTOLI, C.B.G.; FABRIS, S.; REYES, F.G.R. Contaminantes voláteis provenientes de embalagens plásticas: desenvolvimento e validação de métodos analíticos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1522–1532, 2008.

108. NOGUEIRA, P.C.L. **Contribuição a quimica dos compostos volateis e interações com os organismos receptores**. Campinas, 2002. 245p. Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas.

109. MARSILI, R. **Techniques for analyzing food aroma**. 1 ed. New York: Marcel Dekker, 400p, 1996.

110. GERSTEL. Headspace dinâmico. Disponível em: http://www.gerstel.com/en/Headspace_dinamico_pt.htm. Acesso em: 29 de Out. de 2015.

111. RIBEIRO, M.C.; MOREIRA, R.F.A.; MARIA, C.A.B. de. Volatile profile of the headspace fraction of “assa-peixe” (*Vernonia* sp.) honeys. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 169–171, 2008.

112. ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Headspace solid-phase microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 65, n. 14, p. 1843–1852, 1993.

113. SILVA, A.C.L. da. **Tipificação de méis brasileiros por micro-extração em fase sólida combinada com cromatografia gasosa (SPME-CG)**. Campinas, 2006. 136p. Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas.

114. CUEVAS-GLORY, L.F.; PINO, J.A.; SANTIAGO, L.S.; SAURI-DUCH, E. A review of volatile analytical methods for determining the botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 1032–1043, 2007.

115. ALIFERIS, K.A.; TARANTILIS, P.A.; HARIZANIS, P.C.; ALISSANDRAKIS, E. Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 856–862, 2010.

116. BIANCHI, F.; MANGIA, A.; MATTAROZZI, M.; MUSCI, M. Characterization of the volatile profile of thistle honey using headspace solid-phase microextraction and

gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1030–1036, 2011.

117. JERKOVIĆ, I.; KASUM, A.; MARIJANOVIĆ, Z.; TUBEROSO, C.I.G. Contribution to the characterisation of honey-based Sardinian product abbamele: Volatile aroma composition, honey marker compounds and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 401–410, 2011.

118. YANG, Y.; BATTESTI, M.J.; PAOLINI, J.; MUSELLI, A.; TOMI, P.; COSTA, J. Melissopalynological origin determination and volatile composition analysis of Corsican "*Erica arborea* spring maquis" honeys. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 37–47, 2012.

119. KARABAGIAS, I.K.; BADEKA, A.; KONTAKOS, S.; KARABOURNIOTI, S.; KONTOMINAS, M.G. Characterization and classification of *Thymus capitatus* (L.) honey according to geographical origin based on volatile compounds, physicochemical parameters and chemometrics. **Food Research International**, v. 55, n. 1, p. 363–372, 2014.

120. BIANCHIN, J.N.; NARDINI, G.; MERIB, J.; DIAS, A.N.; MARTENDAL, E.; CARASEK, E. Screening of volatile compounds in honey using a new sampling strategy combining multiple extraction temperatures in a single assay by HS-SPME-GC-MS. **Food Chemistry**, v. 145, n. 1, p. 1061–1065, 2014.

121. JACQ, K.; DAVID, F.; SANDRA, P.; KLEE, M.S. Analysis of Volatile Organic Compounds in Water Using Static Headspace-GC/MS. **Research Institute for Chromatography**, 2008.

122. HELENO, F.F.; LIMA, A.C.; AFONSO, R.J.C.F. Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de btex em água utilizando extração por headspace e microextração em fase sólida. **Quimica Nova**, v. 33, n. 2, p. 329–336, 2010.

123. GAN, J.; PAPIERNIK, S.; YATES, S.R. Static Headspace and Gas Chromatographic Analysis of Fumigant Residues in Soil and Water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 986–990, 1998.

124. YILMAZCAN, O.; OZER, E.T.; IZGI, B.; GUCER, S. Optimization of Static Head-Space Gas Chromatography - Mass Spectrometry-Conditions for the Determination of Benzene, Toluene, Ethyl benzene, Xylene, and Styrene in Model Solutions. **Ekoloji**, v. 22, n. 89, p. 76–83, 2013.

125. SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 836p., 2006.

126. JERKOVIĆ, I.; KUŚ, P.M.; TUBEROSO, C.I.G.; ŠAROLIĆ, M. Phytochemical and physical-chemical analysis of Polish willow (*Salix* spp.) honey: Identification of the marker compounds. **Food Chemistry**, v. 145, n. 1, p. 8–14, 2014.

127. RIVELLINO, S.R.; HANTAO, L.W.; RISTICEVIC, S.; CARASEK, E.; PAWLISZYN, J.; AUGUSTO, F. Detection of extraction artifacts in the analysis of honey volatiles using comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1828–1833, 2013.

128. JERKOVIC, I.; HEGIC, G.; MARIJANOVIC, Z.; BUBALO, D. Organic extractives from *mentha* spp. Honey and the bee-stomach: Methyl syringate, vomifoliol,

terpenediol i, hotrienol and other compounds. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2911–2924, 2010.

129. MÜHLEN, C. V. Índices de Retenção Em Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente. **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 3, p. 21–29, 2009.

130. DAVID, F.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 54–69, 2007.

131. VIEGAS, M.C.; BASSOLI, D.G. Utilizaçãoo do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-innowax. **Quimica Nova**, v. 30, n. 8, p. 2031–2034, 2007.

132. INCZÉDY, J.; LENGYEL, T.; URE, A.M. **Compendium of analytical nomenclature (definitive rules 1997)**. 3 ed. Oxford: Blackwell Science, 964p, 1998.

133. ALISSANDRAKIS, E.; TARANTILIS, P.A.; HARIZANIS, P.C.; POLISSIOU, M. Comparison of the volatile composition in thyme honeys from several origins in Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8152–8157, 2007.

134. JUAN-BORRÁS, M.; DOMENECH, E.; HELLEBRANDOVA, M.; ESCRICHE, I. Effect of country origin on physicochemical, sugar and volatile composition of acacia, sunflower and tilia honeys. **Food Research International**, v. 60, n. 1, p. 86–94, 2014.

135. CASTRO-VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; TORRES, C. de; PÉREZ-COELLO, M.S. Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys. **Food Research International**, v. 43, n. 10, p. 2335–2340, 2010.

136. FERREIRA, E.L.; LENCIONI, C.; BENASSI, M.T.; BARTH, M.O.; BASTOS, D.H.M. Descriptive Sensory Analysis and Acceptance of Stingless Bee Honey. **Food Science and Technology International**, v. 15, n. 3, p. 251–258, 2009.

137. MORETI, A.; SODRÉ, G.; MARCHINI, L.; OTSUK, I. Características físico-químicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L. do estado do Ceará, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 1, p. 191–199, 2009.

138. SOUSA, J.M.B. de; SOUZA, E.L. de; MARQUES, G.; BENASSI, M.T.; GULLÓN, B.; PINTADO, M.M.; MAGNANI, M. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, n. 1, p. 645–651, 2016.

139. SORIA, A.C.; GONZÁLEZ, M.; LORENZO, C. de; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; SANZ, J. Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. **Food Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 121–130, 2004.

140. CASTRO-VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; GONZÁLEZ-VIÑAS, M.A.; PÉREZ-COELLO, M.S. Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 1022–1030, 2009.

141. ESCRICHE, I.; VISQUERT, M.; JUAN-BORRÁS, M.; FITO, P. Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 329–338, 2009.

142. KUŚ, P.M.; RUTH, S. VAN Discrimination of Polish unifloral honeys using overall PTR-MS and HPLC fingerprints combined with chemometrics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 69–75, 2015.

143. SORIA, A.C.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; SANZ, J. Some aspects of dynamic headspace analysis of volatile components in honey. **Food Research International**, v. 41, n. 8, p. 838–848, 2008.

144. MONIRUZZAMAN, M.; RODRÍGUEZ, I.; RAMIL, M.; CELA, R.; SULAIMAN, S.A.; GAN, S.. Assessment of gas chromatography time-of-flight accurate mass spectrometry for identification of volatile and semi-volatile compounds in honey. **Talanta**, v. 129, n. 1, p. 505–515, 2014.

145. FUENTE, E.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; SANZ, J. Characterization of Spanish unifloral honeys by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 9-10, p. 1093–1100, 2005.

146. GAŠIĆ, U.; KEČKEŠ, S.; DABIĆ, D.; TRIFKOVIĆ, J.; MILOJKOVIĆ-OPSENICA, D. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. **Food Chemistry**, v. 145, n. 1, p. 599–607, 2014.

147. PÉREZ, R.A.; SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; CALVO, R.M.; TADEO, J.L. Analysis of volatiles from Spanish honeys by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 9, p. 2633–7, 2002.

148. KARABAGIAS, I.K.; BADEKA, A. V.; KONTAKOS, S.; KARABOURNIOTI, S.; KONTOMINAS, M.G. Botanical discrimination of Greek unifloral honeys with physico-chemical and chemometric analyses. **Food Chemistry**, v. 165, n. 1, p. 181–190, 2014.

149. KARABAGIAS, I.; BADEKA, A.; KONTAKOS, S. Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. **Food chemistry**, v. 146, n. 1, p. 148–557, 2014.

150. Minitab Incorporation; Minitab versão 16.2.2; 2010.

151. WEISSBECKER, B., HOLIGHAUS, G., SCHÜTZ, S. Gas chromatography with mass spectrometric and electroantennographic detection: Analysis of wood odorants by direct coupling of insect olfaction and mass spectrometry. In: **Journal of Chromatography A**. v.1056.2004, p. 209–216.

152. BOULANGER, R.; CROUZET, J. Free and bound flavour components of Amazonian fruits: 2. cupuacu volatile compounds. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, n. 4, p. 251–257, 2000.

153. FRATINI, F.; CASELLA, S.; LEONARDI, M.; PISSERI, F.; EBANI, V.V.; PISTELLI, L.; PISTELLI, L. Antibacterial activity of essential oils, their blends and mixtures of their main constituents against some strains supporting livestock mastitis. **Fitoterapia**, v. 96, n. 1, p. 1–7, 2014.

154. PINO, J.; MARBOT, R.; ROSADO, A.; VÁZQUEZ, C. Volatile constituents of fruits of *Garcinia dulcis* Kurz. from Cuba. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, n. 4, p. 271–274, 2003.

155. BERTOLI, A.; LEONARDI, M.; KRZYZANOWSKA, J.; OLESZEK, W.;

PISTELLI, L. *Mentha longifolia* in vitro cultures as safe source of flavouring: Ingredients. **Acta Biochimica Polonica**, v. 58, n. 4, p. 581–587, 2011.

156. CAVEN-QUANTRILL, D.J.; BUGLASS, A.J. Aroma volatile constituents of Colombian varieties of mango (*Mangifera indica* L.). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 206–213, 2007.

157. COLE, R.A.; HABER, W.A.; SETZER, W.N. Chemical composition of essential oils of seven species of *Eugenia* from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 12, p. 877–886, 2007.

158. FLAMINI, G.; CIONI, P.L.; MORELLI, I.; CECCARINI, L.; ANDOLFI, L.; MACCHIA, M. Composition of the essential oil of *Medicago marina* L. from the coastal dunes of Tuscany, Italy. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, n. 5, p. 460–462, 2003.

159. BALBONTÍN, C.; GAETE-EASTMAN, C.; VERGARA, M.; HERRERA, R.; MOYA-LEÓN, M.A. Treatment with 1-MCP and the role of ethylene in aroma development of mountain papaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 43, n. 1, p. 67–77, 2007.

160. FLAMINI, G.; CIONI, P.L.; MORELLI, I. Differences in the fragrances of pollen and different floral parts of male and female flowers of *Laurus nobilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4647–4652, 2002.

161. CAMPO, E.; CACHO, J.; FERREIRA, V. Multidimensional chromatographic approach applied to the identification of novel aroma compounds in wine. Identification of ethyl cyclohexanoate, ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate and ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate. **Journal of Chromatography A**, v. 1137, n. 2, p. 223–230, 2006.

162. ROSA, M.; BEN, M.; SENATORE, F.; BRUNO, M.; MENICHINI, F.; TUNDIS, R. Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 586–594, 2013.

163. ENGEL, E.; RATEL, J. Correction of the data generated by mass spectrometry analyses of biological tissues: Application to food authentication. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, n. 1-2, p. 331–341, 2007.

164. JAVIDNIA, K.; MIRI, R.; KAMALINEJAD, M.; NASIRI, A. Composition of the essential oil of *Salvia mirzayanii* Rech. f. & esfand from Iran. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, n. 6, p. 465–467, 2002.

165. StatSoft Incorporation; Statistica versão 7.0; Tulsa, USA; 2004.

166. OriginLab Corporation; Origin versão 6.0; Northamptom, USA; 1999.

167. PONTES, M.; MARQUES, J.C.; CÂMARA, J.S. Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry. **Talanta**, v. 74, n. 1, p. 91–103, 2007.

168. ATKINS, P.; JONES, L. **Principios de Química : Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. Porto Alegre: Bookman, 2011.

169. BORSATO, D.M.; BORSATO, A. V.; LUZ, C.F.P.; FARAGO, P. V.; MIGUEL, O.G. Espectro polínico de amostras de mel de meliponíneos provenientes do Estado do

Paraná. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 1–5, 2011.

170. MONTEIRO, W.R. Abelha Borá (*Tetragona clavipes* Fabricius). **Mensagem Doce**, n. 61, p. 13, 2001.

171. MOREIRA, R.F.A.; MARIA, C.A.B. de; PIETROLUONGO, M.; TRUGO, L.C. Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 697–704, 2010.

172. JERKOVIĆ, I.; MASTELIĆ, J.; MARIJANOVIĆ, Z.; KLEIN, Ž.; JELIĆ, M. Comparison of hydrodistillation and ultrasonic solvent extraction for the isolation of volatile compounds from two unifloral honeys of *Robinia pseudoacacia* L. and Castanea sativa L. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, n. 6, p. 750–756, 2007.

173. GUYOT, C.; BOUSETA, A.; SCHEIRMAN, V.; COLLIN, S. Floral Origin Markers of Chestnut and Lime Tree Honeys. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 2, p. 625–633, 1998.

174. YANG, Y., BATTESTI, M.J., DJABOU, N., MUSELLI, A., PAOLINI, J., TOMI, P., COSTA, J. Melissopalynological origin determination and volatile composition analysis of Corsican "chestnut grove" honeys. In: **Food Chemistry**. v.132.2012, p. 2144–2154.

175. TANANAKI, C.; THRASYVOULOU, A.; GIRAUDEL, J.L.; MONTURY, M. Determination of volatile characteristics of Greek and Turkish pine honey samples and their classification by using Kohonen self organising maps. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1687–1693, 2007.

176. ALISSANDRAKIS, E.; TARANTILIS, P.A.; PAPPAS, C.; HARIZANIS, P.C.; POLISSIOU, M. Investigation of organic extractives from unifloral chestnut (*Castanea sativa* L.) and eucalyptus (*Eucalyptus globulus* Labill.) honeys and flowers to identification of botanical marker compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 4, p. 1042–1051, 2011.

177. PLUTOWSKA, B.; CHMIEL, T.; DYMERSKI, T.; WARDENCKI, W. A headspace solid-phase microextraction method development and its application in the determination of volatiles in honeys by gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1288–1298, 2011.

178. STANIMIROVA, I.; ÜSTÜN, B.; CAJKA, T.; RIDDELOVA, K.; HAJSLOVA, J.; BUYDENS, L.M.C.; WALCZAK, B. Tracing the geographical origin of honeys based on volatile compounds profiles assessment using pattern recognition techniques. **Food Chemistry**, v. 118, n. 1, p. 171–176, 2010.

179. CASTRO-VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; PÉREZ-COELLO, M.S. Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 601–606, 2007.

180. MASSARO, C.F.; KATOULI, M.; GRKOVIC, T.; VU, H.; QUINN, R.J.; HEARD, T.A.; CARVALHO, C.; MANLEY-HARRIS, M.; WALLACE, H.M.; BROOKS, P. Anti-staphylococcal activity of C-methyl flavanones from propolis of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*) and fruit resins of *Corymbia torelliana* (Myrtaceae). **Fitoterapia**, v. 95, n. 1, p. 247–257, 2014.

181. MONIRUZZAMAN, M.; RODRÍGUEZ, I.; RAMIL, M.; CELA, R.; SULAIMAN, S.A.; GAN, S.H. Assessment of gas chromatography time-of-flight accurate mass

spectrometry for identification of volatile and semi-volatile compounds in honey. **Talanta**, v. 129, n. 1, p. 505–515, 2014.

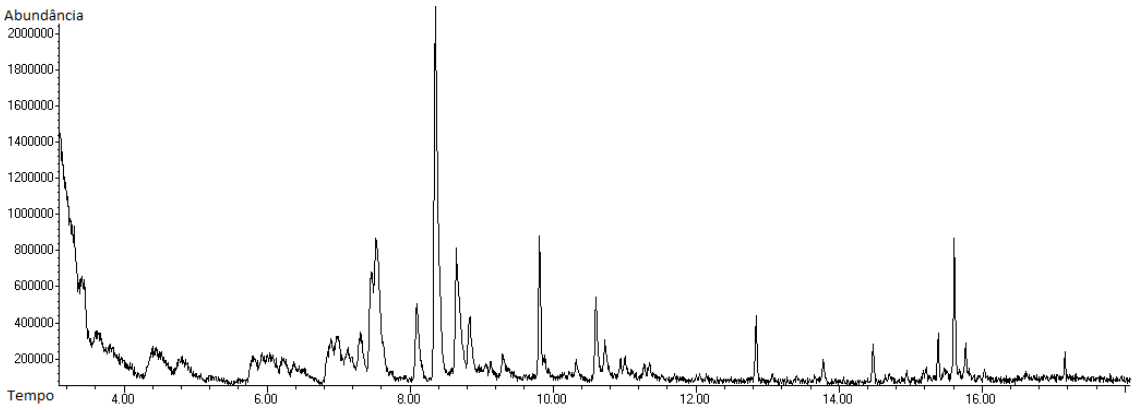
182. KLEINERT-GIOVANNINI, A. IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. Aspects of the Trophic Niche of *Melipona Marginata Marginata* Lepeletier (Apidae, Meliponinae). **Apidologie**, v. 18, n. 1, p. 69–100, 1987.

183. WILMS, W.; WIECHERS, B. Floral resource partitioning between native *Melipona* bees and the introduced Africanized honey bee in the Brazilian Atlantic rain forest. **Apidologie**, v. 28, n. 6, p. 339–355, 1997.

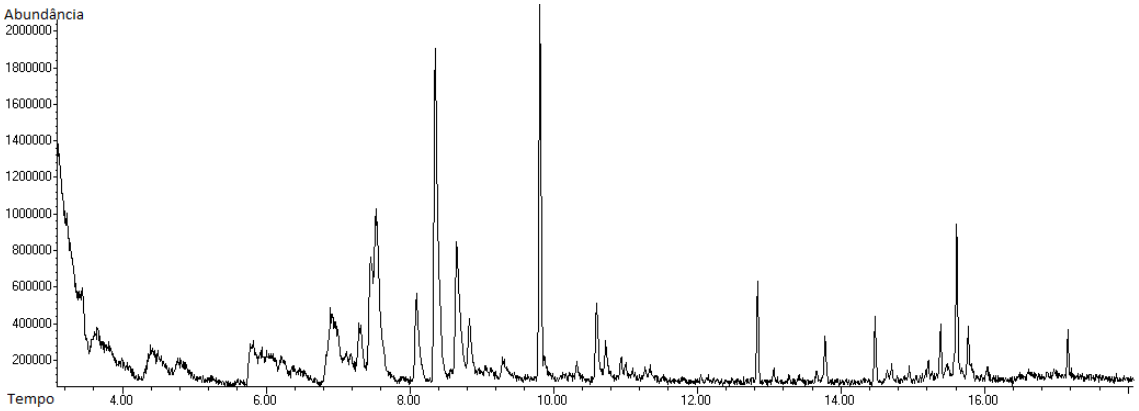
184. SOS MATA ATLÂNTICA. Atlas da Mata Atlântica. Disponível em: https://www.sosma.org.br/projeto/atlas-da-mata-atlantica/dados-mais-recentes/atlas-dos-municipios. Acesso em: 05 de Mar. de 2016.

ANEXOS

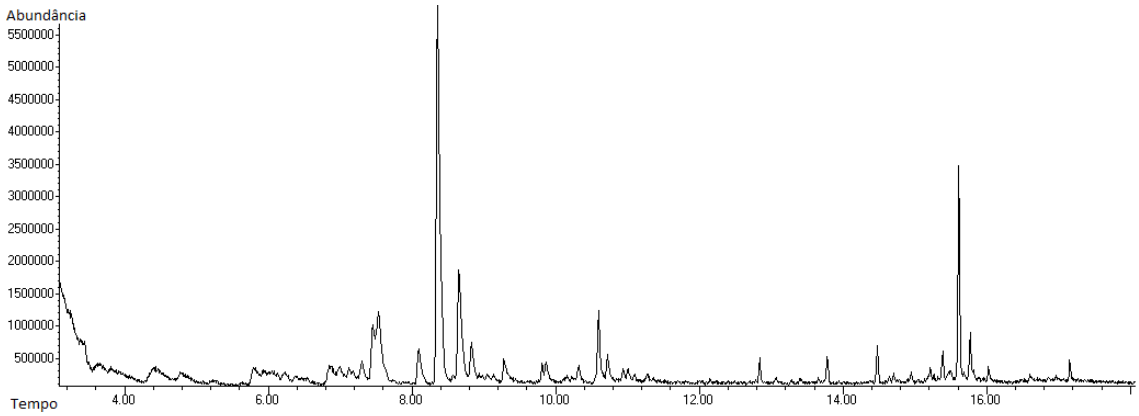
Anexo 1. Cromatogramas obtidos da otimização do método de extração dos compostos voláteis de méis de abelhas sem ferrão por *headspace* estático com a amostra de mel de abelha Guairapó da cidade de Guaraqueçaba-PR.



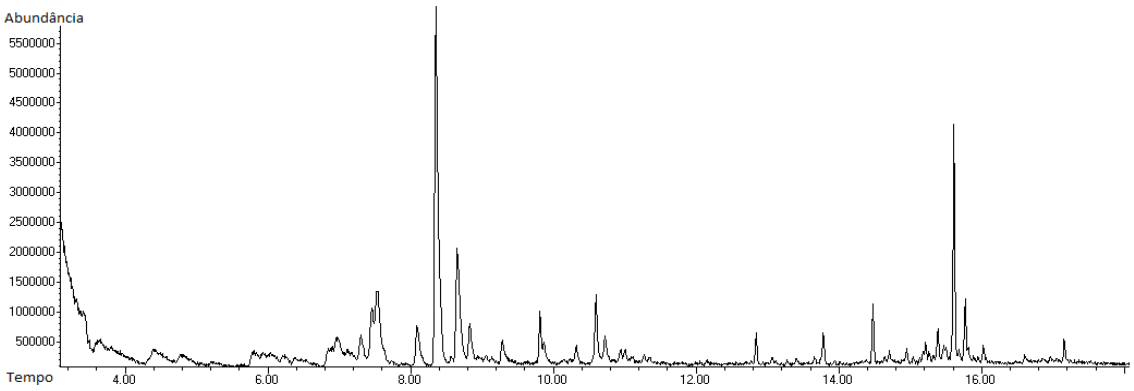
Meio: Aquoso; Temperatura: 45 °C; Tempo: 10 min.



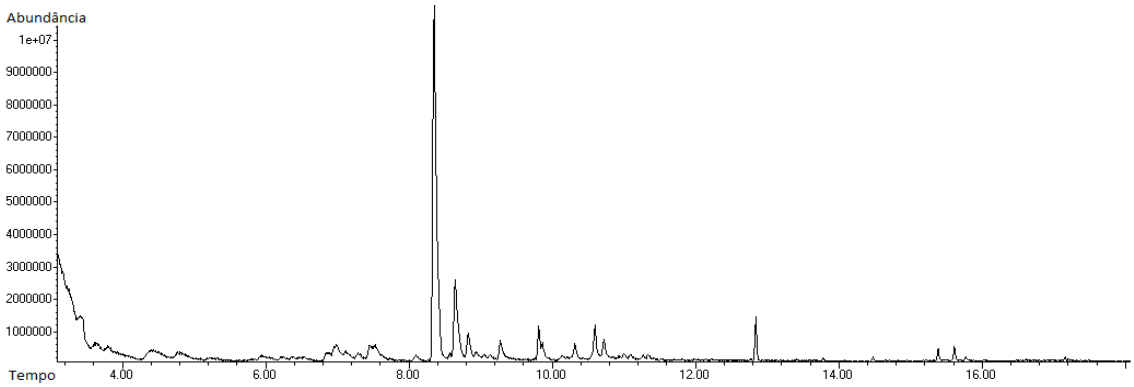
Meio: Aquoso; Temperatura: 45 °C; Tempo: 30 min.



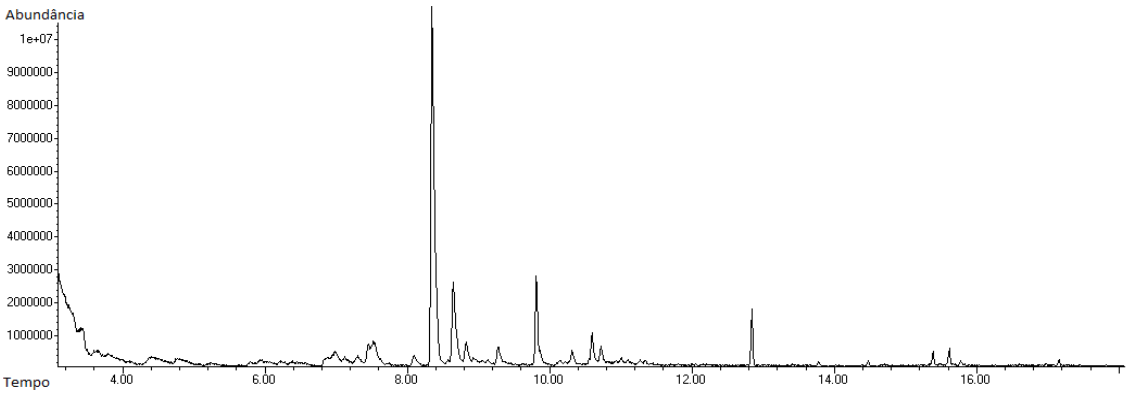
Meio: Aquoso; Temperatura: 60 °C; Tempo: 10 min.



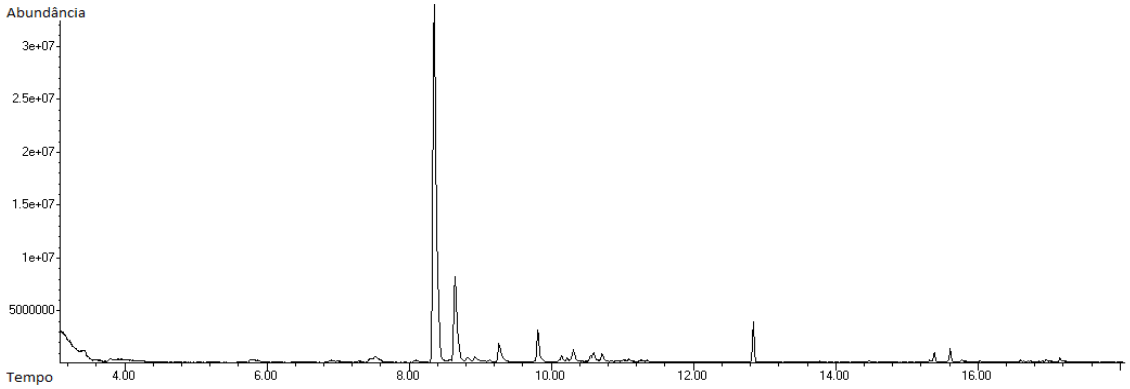
Meio: Aquoso; Temperatura: 60 °C; Tempo: 30 min.



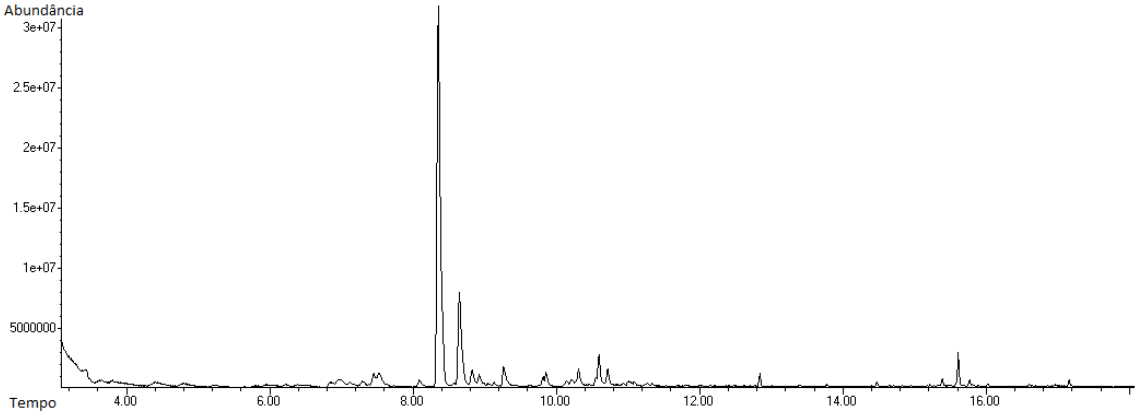
Meio: Salino; Temperatura: 45 °C; Tempo: 10 min.



Meio: Salino; Temperatura: 45 °C; Tempo: 30 min.

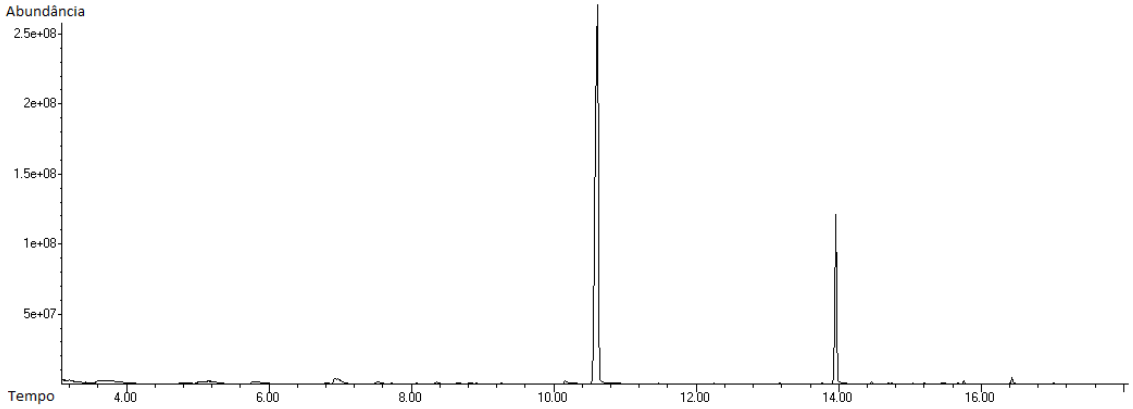


Meio: Salino; Temperatura: 60 °C; Tempo: 10 min.

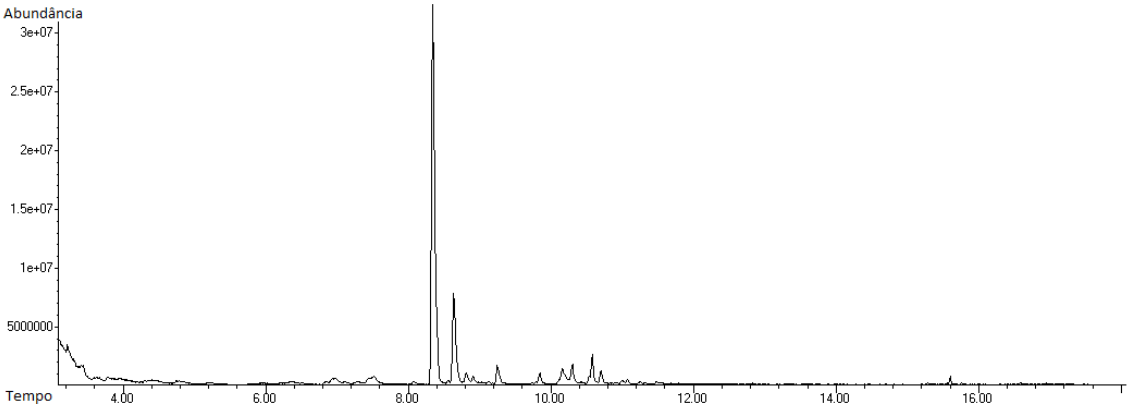


Meio: Salino; Temperatura: 60 °C; Tempo: 30 min.

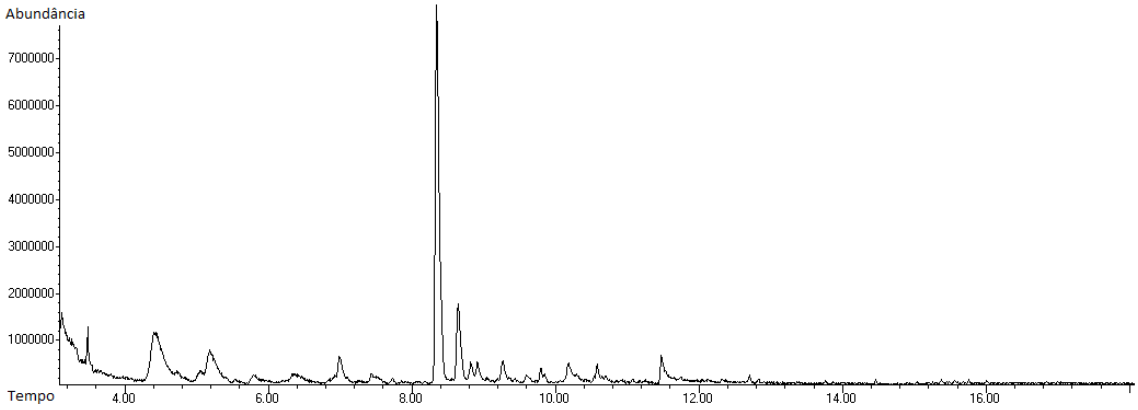
Anexo 2. Cromatogramas obtidos de 17 amostras de méis de abelhas sem ferrão do estado do Paraná.



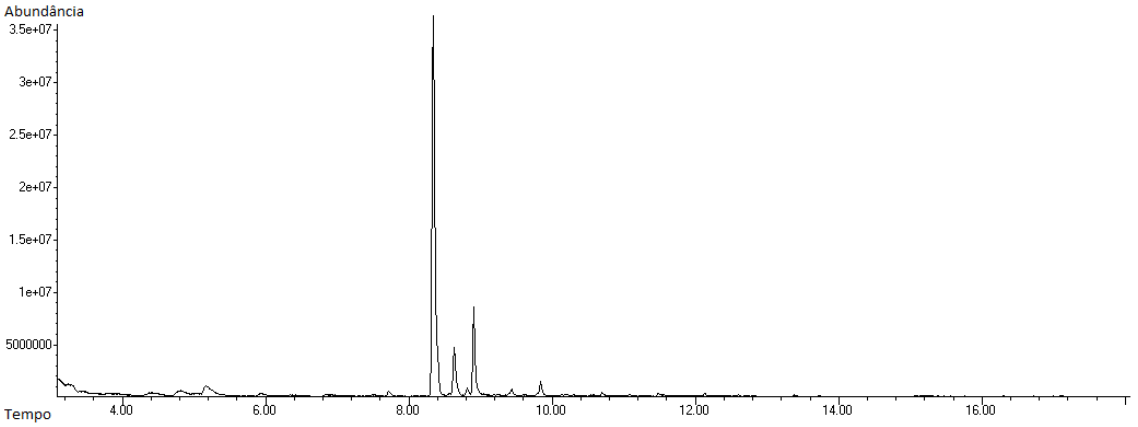
Amostra de mel da abelha Borá da cidade de Guaraqueçaba-PR



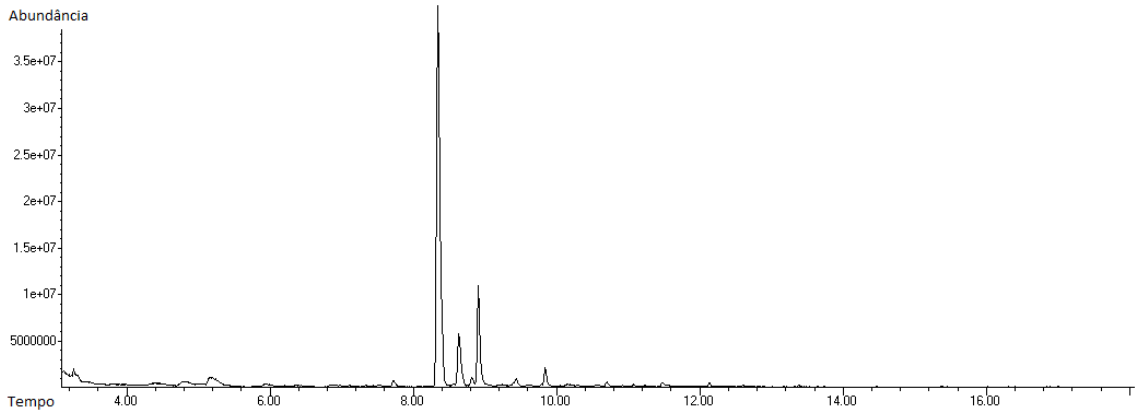
Amostra de mel da abelha Guairapó da cidade de Guaraqueçaba-PR



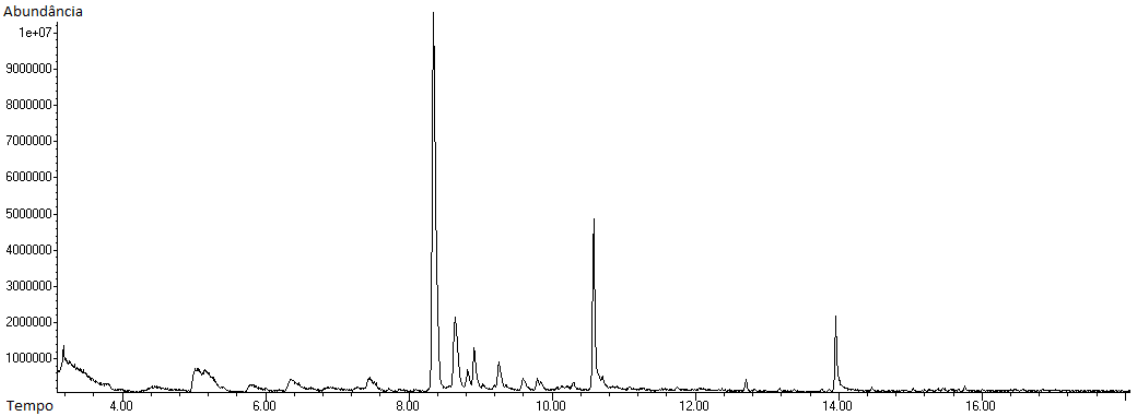
Amostra de mel da abelha Jataí da cidade de Guaraqueçaba-PR



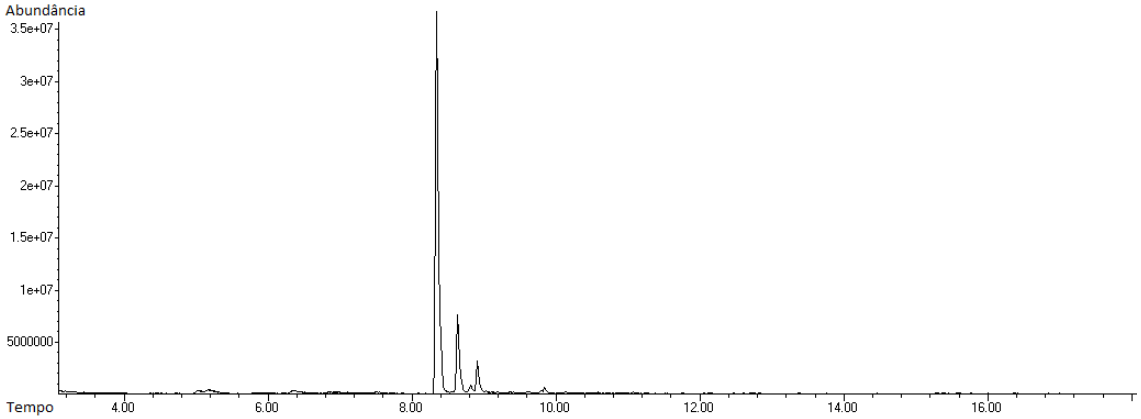
Amostra de mel da abelha Mandaçaia da cidade de Guaraqueçaba-PR



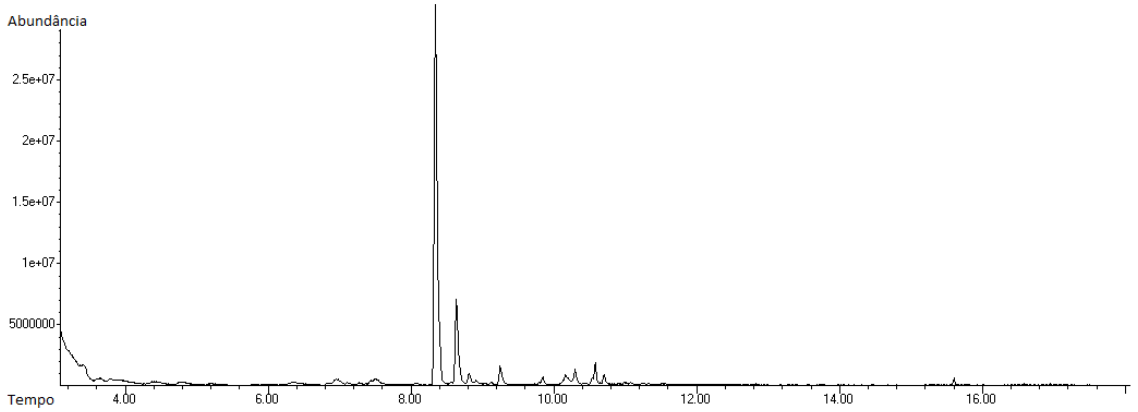
Amostra de mel da abelha Mandurí da cidade de Guaraqueçaba-PR



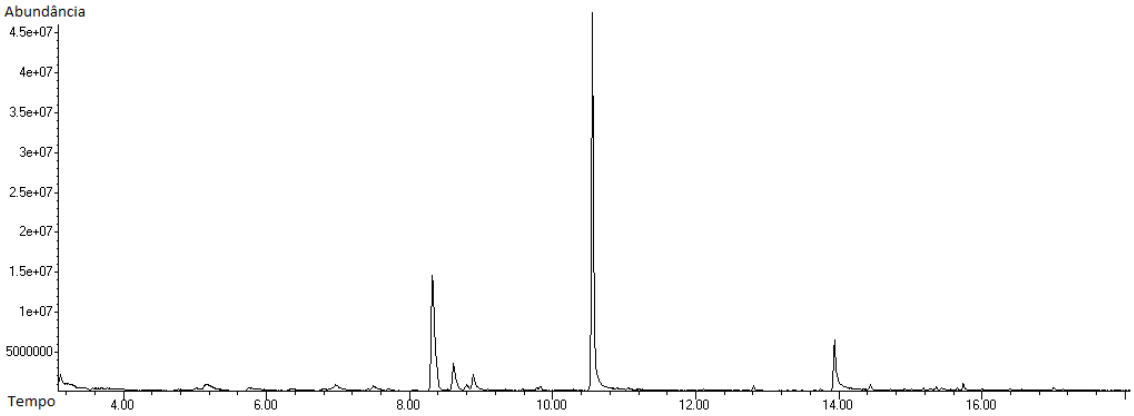
Amostra de mel da abelha Tubuna da cidade de Guaraqueçaba-PR



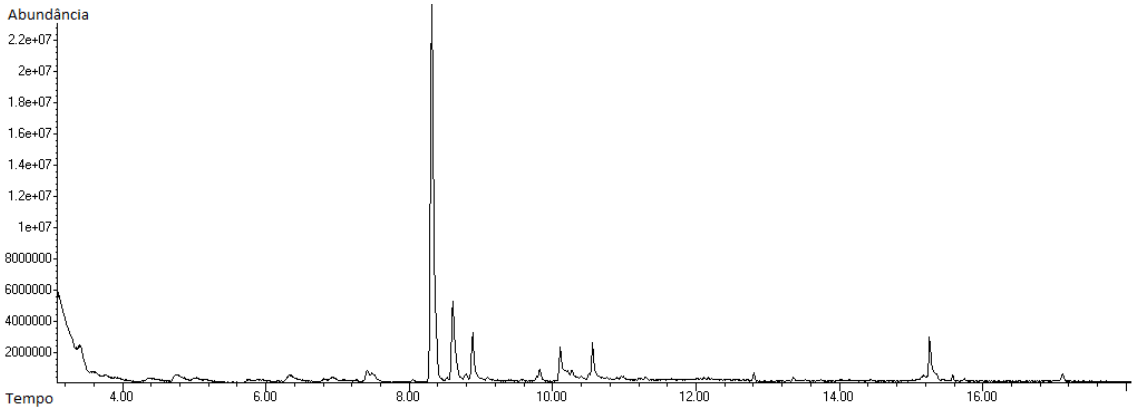
Amostra de mel da abelha Tujumirim da cidade de Guaraqueçaba-PR



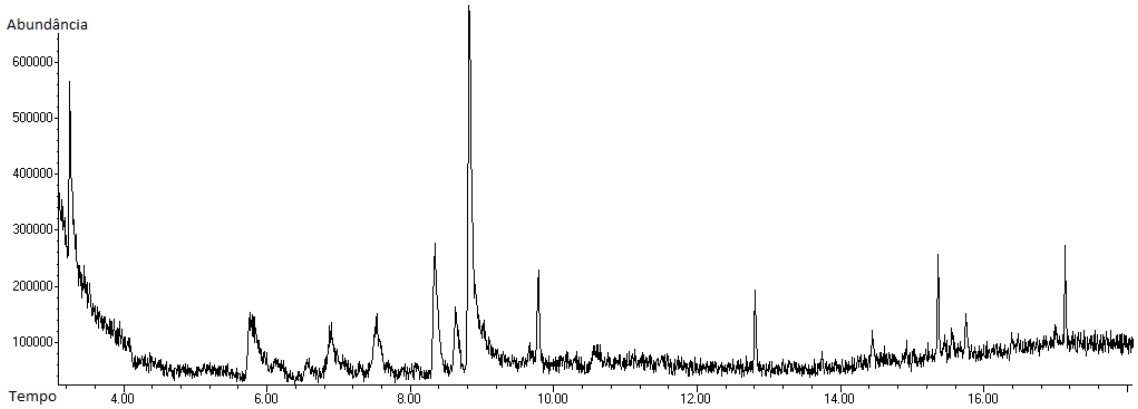
Amostra de mel da abelha Uruçu da cidade de Guaraqueçaba-PR



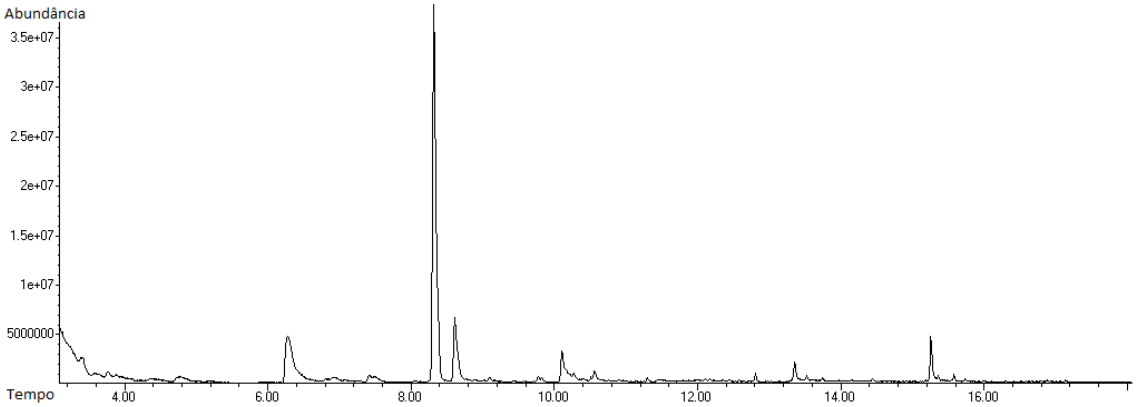
Amostra de mel da abelha Borá da cidade de Cambará-PR



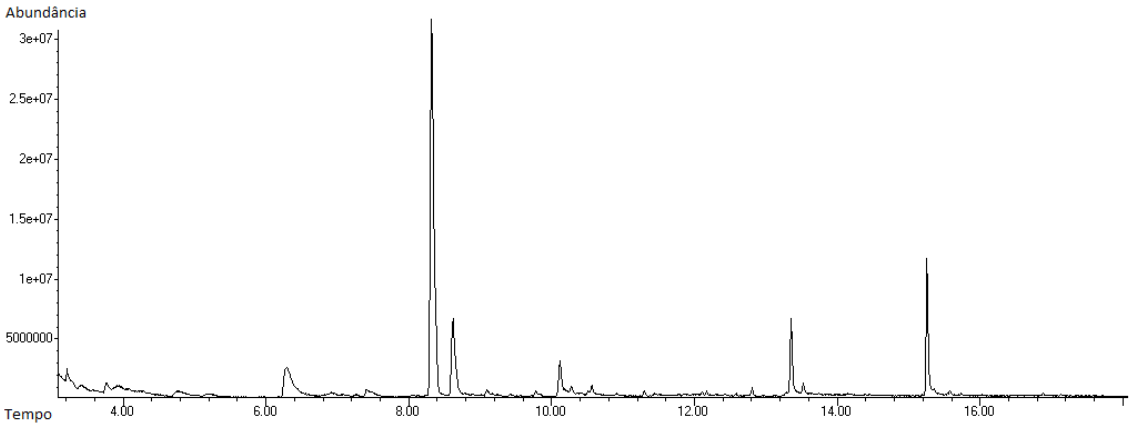
Amostra de mel da abelha Guairapó da cidade de Cambará-PR



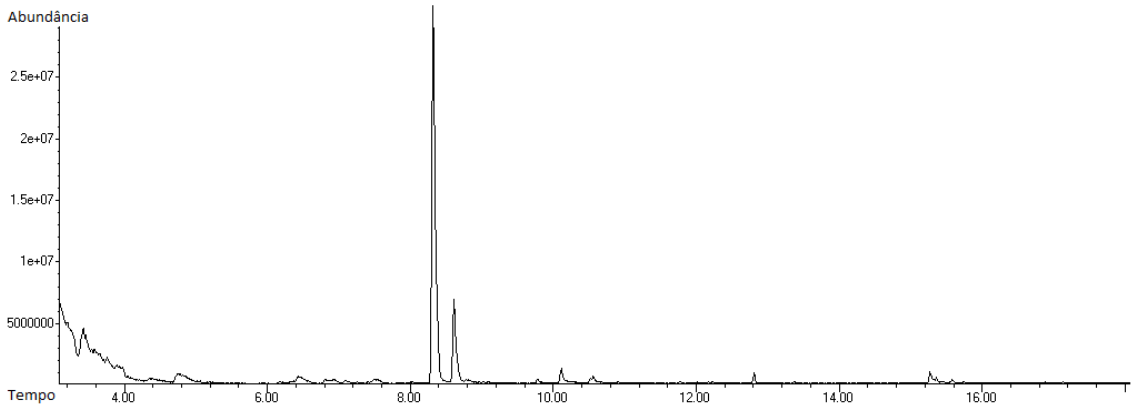
Amostra de mel da abelha Jataí da cidade de Cambará-PR



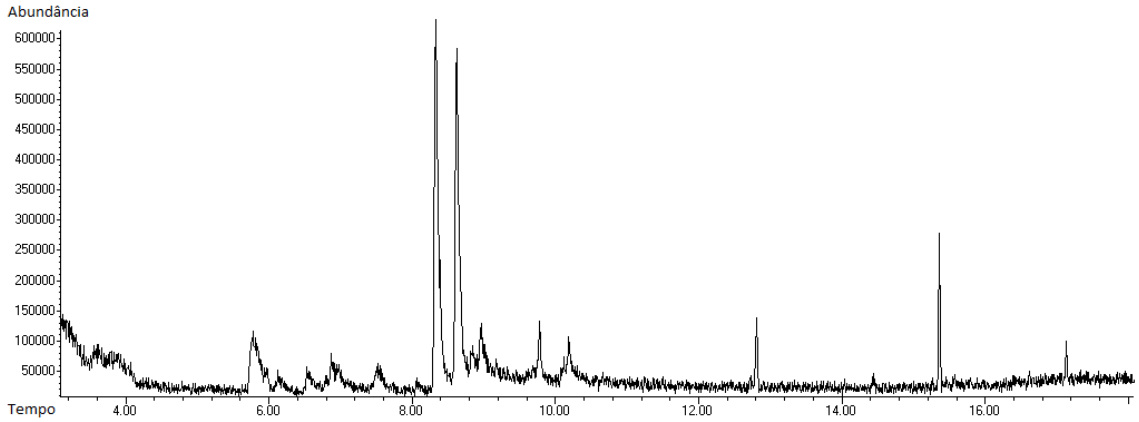
Amostra de mel da abelha Mandaçaia da cidade de Cambará-PR



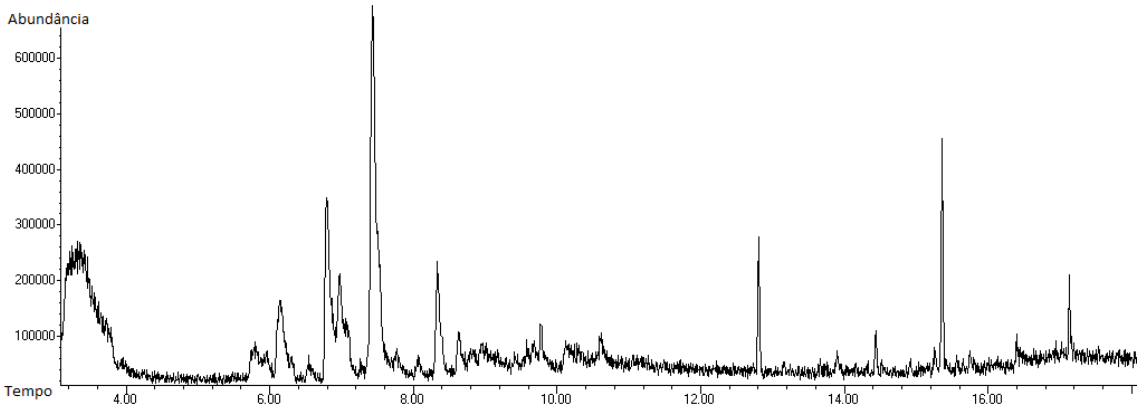
Amostra de mel da abelha Mandurí da cidade de Cambará-PR



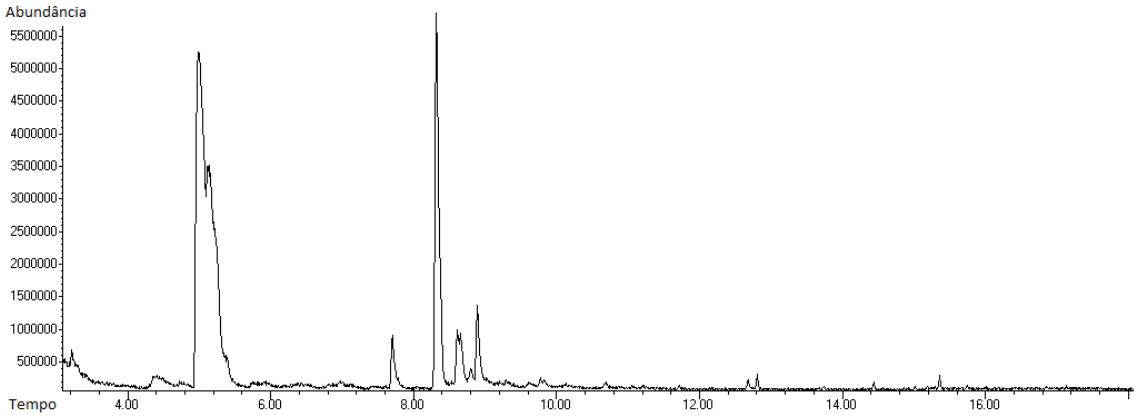
Amostra de mel da abelha Uruçu da cidade de Cambará-PR



Amostra de mel da abelha Jataí da cidade de Prudentópolis-PR



Amostra de mel da abelha Mandaçaia da cidade de Prudentópolis-PR



Amostra de mel da abelha Tubuna da cidade de Prudentópolis-PR

Anexo 3. Tabela com compostos identificados no mel de cada espécie de abelha sem ferrão

	Bo	**Go**	**Ja**	**Md**	**Mi**	**Tb**	**Tj**	**Ur**
2-heptanona						x		
2-heptanol						x		
Thuja-2,4(10)-dieno				x				
Benzaldeído		x		x	x	x	x	
Tetrahidro-2,2,6-trimetil-6-vinil-2H-pirano								x
β-Mirceno	X							
Hexanoato de etila	x			x				
α-Terpineno	x							
p-Cimeno		x		x	x	x		
Limoneno	x	x	x					
Acetato de heptila	x		x	x	x	x		
γ-Termineno	x	x						x
Trans-óxido de linalol (Furanóide)	x	x	x	x	x	x	x	x
Cis-óxido de linalol (Furanóide)	x	x	x	x	x	x	x	x
Linalol	x	x	x	x	x	x	x	x
Hotrienol	x	x	x	x	x	x	x	x
2,2,6-Trimetil-3-ceto-6-viniltetrahidro-pirano			x					
Fenchol	x							x
Isoporano		x	x			x		x
Octanoato de metila	x							
Ciclohexanoato de etila				x	x			
(E,E)-2,6-Dimetil-1,3,5,7-octatetraene						x		
Óxido de nerol	x	x	x	x	x	x	x	x
Epoxilinalol (Piranóide)		x	x	x	x			x
Benzoato de etila	x	x	x					x
Terpinen-4-ol	x	x		x	x			x
α-Terpinol		x						x
Octanoato de etila	x	x	x	x	x	x		x
Safranal		x		x	x	x		x
β-Ciclocitral	x	x		x	x		x	x
Benzenoacetato de etila	x		x	x	x			
Octanoato de propila	x							
Octanoato isobutílico	x							
1,1,5-Trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN)		x		x	x			
Decanoato de etila	x	x				x		
Cariofileno	x		x	x		x		

	Bo	Go	Ja	Md	Mi	Tb	Tj	Ur
Aloaromadendreno	x							
Germacreno D	x					x		
Octanoato de isoamila	x							
Hidroxitolueno butilado (BHT)		x		x	x			x
Cis-Muurola-4(14),5-dieno	x							
δ-Cadineno	x	x	x	x		x		x
Dodecanoato de etila	x							
Epi-biciclosesquifelandreno	x							

Anexo 4. Tabela com compostos identificados nas amostras de cada cidade

	Guaraqueçaba	Cambará	Prudentópolis
2-heptanona			x
2-heptanol			x
Thuja-2,4(10)-dieno			x
Benzaldeído	x	x	
Tetrahidro-2,2,6-trimetil-6-vinil-2H-pirano		x	
β-Mirceno	x		
Hexanoato de etila	x	x	x
α-Terpineno	x		
p-Cimeno	x	x	x
Limoneno	x	x	
Acetato de heptila	x	x	x
γ-Termineno	x	x	
Trans-óxido de linalol (Furanóide)	x	x	x
Cis-óxido de linalol (Furanóide)	x	x	x
Linalol	x	x	x
Hotrienol	x	x	x
2,2,6-Trimetil-3-ceto-6-viniltetrahidro-pirano			x
Fenchol	x		
Isoporano	x		
Octanoato de metila	x		
Ciclohexanoato de etila	x		
(E,E)-2,6-Dimetil-1,3,5,7-octatetraene	x		
Óxido de nerol	x	x	x
Epoxilinalol (Piranóide)	x	x	x
Benzoato de etila	x		
Terpinen-4-ol	x	x	

	Guaraqueçaba	Cambará	Prudentópolis
α-Terpinol	x		
Octanoato de etila	x	x	
Safranal	x		x
β-Ciclocitral	x	x	
Benzenoacetato de etila	x		
Octanoato de propila	x		
Octanoato isobutílico	x		
1,1,5-Trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN)	x	x	
Decanoato de etila	x	x	
Cariofileno	x	x	x
Aloaromadendreno	x	x	
Germacreno D	x	x	
Octanoato de isoamila	x		
Hidroxitolueno butilado (BHT)	x	x	
Cis-Muurola-4(14),5-dieno	x	x	
δ-Cadineno	x	x	
Dodecanoato de etila	x		
Epi-biciclosesquifelandreno	x	x	

Anexo 5. Primeira página do artigo submetido à revista Química Nova no dia 25 de Outubro de 2015.

Química Nova

química nova

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO VOLÁTIL DE MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO ATRAVÉS DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS E EXTRAÇÃO POR HEADSPACE ESTÁTICO

Journal:	*Química Nova*
Manuscript ID	QN-2015-0726
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	25-Oct-2015
Complete List of Authors:	da Silva, Patricia; UNICENTRO, PPGQ Torres, Yohandra; UNICENTRO, PPGQ Lima, Liliane; UNICENTRO, PPGQ
Keyword:	honey, stingless bee, headspace, volatile composition

For Review Only

SCHOLARONE™
Manuscripts