



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**Determinação do perfil de compostos orgânicos, obtido por ESI(-)MS,
para classificação da origem geográfica do mel do Estado do Paraná**

GUARAPUAVA

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**Determinação do perfil de compostos orgânicos, obtido por ESI(-)MS, para
classificação da origem geográfica do mel do Estado do Paraná**

Ivonete Hoss

Guarapuava - PR

2013

IVONETE HOSS

**Determinação do perfil de compostos orgânicos, obtido por ESI(-)MS, para
classificação da origem geográfica do mel do Estado do Paraná**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, área de concentração em Metodologias Analíticas e Aplicações, para a obtenção do título de Mestre.

Prof(a). Dr(a). Orientador(a)

Yohandra Reyes Torres

Guarapuava-PR

2013

IVONETE HOSS

**Contribuição do perfil de compostos orgânicos, obtido por ESI(-)MS, para
determinação da origem geográfica do mel do estado do Paraná**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, área de concentração em Metodologias Analíticas e Aplicações, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 26 de Fevereiro de 2013

Prof(a). Dr(a). Ieda Spacino Scarmínio- (UEL) – Titular Externo

Prof^a. Dr. Maria Lurdes Felsner- (UNICENTRO) - Suplente Interno

Prof(a). Dr(a).

Orientador(a)

Yohandra Reyes Torres

Guarapuava -PR

2013

“Nada se assemelha à alma como a abelha. Esta voa de flor para flor, aquela de estrela para estrela. A abelha traz o mel, como a alma traz a luz.”
Vitor Hugo

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que tenho conquistado, dando-me sempre força e saúde;

Aos meus familiares e amigos, por acreditarem e apoiarem nesta conquista;

Em especial, ao meu marido pelo amor, compreensão e companheirismo;

Ao meu irmão Jeferson pela força e carinho que significa muito para mim;

A minha irmã Márcia pela amizade, amor e Orações;

A meus tios Ivete e Ademar pelo apoio, carinho e ajuda na aquisição das amostras de mel;

Ao meu irmão Cleberson e sua esposa Franciele pela amizade e carinho;

À Prof^ª. Dra. Yohandra Reyes Torres pela oportunidade concedida,

orientação, ensinamentos e muita paciência;

Aos amigos, que tive o prazer de conhecer durante este percurso e

que ficarão para sempre em meu coração.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE ANEXOS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVOS	5
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	6
3.1. Aspectos geográficos do Estado do Paraná.....	6
3.1.1. Clima.....	7
3.1.2. Relevo, solo e vegetação.....	8
3.2. Abelhas melíferas.....	10
3.3. Apicultura no Brasil e no Estado do Paraná.....	12
3.4. Mel e suas propriedades medicinais.....	15
3.5. Flora Apícola.....	17
3.6. Composição química do mel.....	18
3.6.1. Compostos fenólicos.....	20
3.6.1.1. Flavonóides.....	22
3.7. Recuperação de compostos orgânicos do mel pelo método de extração em Fase Sólida (SPE).....	23
3.8. Métodos para o Controle de qualidade do mel.....	26
3.9. Métodos de determinação dos compostos fenólicos no mel.....	29
3.10. Espectrometria de massas (EM).....	38
3.10.1. Descrição da técnica.....	38
3.10.2. Instrumentação.....	38
3.10.3. Espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI).....	39
3.10.4. Tipos de íons formados na ionização por eletrospray.....	40
3.10.5. Analisador de massas triplo quadropolo.....	41
3.10.6. Detector.....	44

3.10.7. Cromatografia líquida de Ultra performance acoplado a Espectrometria de Massas UPLC-MS/MS.....	44
3.10.8. <i>Fingerprinting</i> de amostras omplexas.....	45
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	48
4.1. Obtenção das amostras de mel.....	48
4.2. Reagentes e Soluções.....	48
4.3. Extração das Amostras.....	48
4.4. Condições analíticas do espectrômetro de massas.....	50
4.5. Obtenção dos ESI-MS e ESI-MS/MS das amostras e padrões analíticos.....	50
4.6. Condições para análise por UPLC-MS/MS.....	50
4.7. Obtenção dos LC-MS/MS.....	51
4.8. Análise quimiométrica.....	51
5.RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
5.1. Extração dos compostos fenólicos do mel e desenvolvimento do método de análise por ESI(-)-MS e ESI(-)-MS/MS.....	53
5.2. Análise classificatória do mel produzido no Estado de Paraná baseada na impressão digital ESI(-)-MS e análise multivarida.....	55
5.3. Identificação por ESI(-)-MS/MS de compostos orgânicos no mel de <i>Apis mellifera</i> produzido no Paraná.....	73
5.3.1. ESI(-)-MS/MS para os ácidos carboxílicos identificados no mel de Paraná.....	76
5.3.2. ESI-MS/MS para os flavonoides.....	85
5.4. Confirmação por LC-MS/MS da atribuição dos íons identificados.....	93
5.5. Uso da impressão digital por ESI(-)-MS e PCA para comparar o mel de abelha Jataí (<i>Tetragonisca angustula angustula</i>) e de <i>Apis mellifera</i>	99
6. CONCLUSÕES.....	102
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	103
8. ANEXOS.....	119

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

UNICENTRO	Universidade Estadual do Centro-oeste
Anvisa	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria
ESI(-)MS	Espectrometria de massas com fonte de ionização eletrospray em modo negativo
ESI(-)MS/MS	Espectrometria de massas em tandem com fonte de ionização eletrospray em modo negativo
TIC	Cromatograma de íons totais
EM	Espectrometria de massas
LC	Cromatografia líquida
m/z	Razão massa/carga
Da	Dalton
[M-H] ⁻	Íon desprotonado
[M+H] ⁺	Íon protonado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
UPLC	Cromatografia líquida de ultra performance
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas em Tandem
UPLC-ESI/MS	Cromatografia líquida de ultra performance acoplado a espectrometria de massas com fonte de ionização eletrospray
UV-Vis	Ultravioleta-visível
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiencia
HPLC/PDA	Cromatografia líquida de alta eficiencia com detector UV com arranjo de diodos
PDA	Photo diodo array (Detector UV com Arranjo de diodos)
%	Porcentagem
°C	Graus Cescius
mm	Milimetro
m	Metro
kg	Quilograma
mg	Miligramas
g	Grams
L/hr	Litros por horas

V	Volts
kV	Quilo Volts
$\mu\text{L}/\text{min}$	Microlitros por minutos
CID	Dissociação induzida por colisão
RDA	Retro Diels-Alder
SPE	Extração em fase sólida
Hz	Hertz
p.	Página
MeOH	Metanol
mL	Mililitro
min	Minutos
μm	Micrômetros
tR	Tempo de retenção
a.C	Antes de Cristo
PC	Componentes Principais
PCA	Análise de componente principal
HCA	Análise de agrupamento hierárquico

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01. Mapa mostrando a divisão do Paraná em suas mesorregiões.....	6
Figura 02. Mapa representando o clima do Paraná.....	8
Figura 03. Mapa representando (A) Planaltos do Paraná (B) a vegetação do Paraná.....	10
Figura 04. Abelha <i>Apis Mellifera</i> coletando néctar de planta.....	11
Figura 05: Gráfico da Composição química do mel.....	18
Figura 06 - Estrutura base dos flavonóides.....	22
Figura 07. Estrutura genérica das principais classes dos flavonóides.....	23
Figura 08. Etapas básicas envolvidas na SPE.....	25
Figura 09. Representação esquemática de um espectrômetro de massas.....	39
Figura 10. Demonstração do spray, com a passagem dos íons formados em direção ao cone.....	40
Figura 11 . Processo de desprotonação (modo negativo de ionização) do Ibuprofeno.	41
Figura 12 . Processo de protonação (modo positivo de ionização) da Lidocaína.....	41
Figura 13. Representação esquemática de um analisador de massa com um hexapolo seguido de triplo quadrupolo preparado para <i>tandem</i> -MS (A) Triplo quadrupolo (B) Processo de seleção do íon precursor seguida de sua fragmentação.....	43
Figura 14. Separação cromatográfica e seu respectivo espectro de massas.....	45
Figura 15. Esquema geral de análise por impressão digital.....	46
Figura 16. Fluxograma do processo de extração do mel.....	49
Figura 17. Mapa do Estado do Paraná com destaque para as mesorregiões (A) e municípios (B) de onde amostras de mel foram analisadas neste estudo.....	55
Figura 18. Análise das componentes principais para as amostras de méis oriundas de diversas regiões paranaenses considerando os dados obtidos por ESI(-)-MS: (A) Projeções das amostras e (B) Projeções das variáveis no plano formado pela PC1 e PC2.....	59
Figura 19. Mapa representando as mesorregiões (A) Sul (B) Sudeste.....	60
Figura 20. Impressão digital obtida por ESI(-)-MS para amostra de mel de	61

Guarapuava classificada no grupo I.....	
Figura 21. Mapa representando as mesorregiões (A) Centro Oriental (B) Metropolitana.....	62
Figura 22. Análise das componentes principais para as amostras de méis oriundas de diversas regiões paranaenses considerando os dados obtidos por ESI(-)-MS: (A) Projeções das amostras e (B) Projeções das variáveis no plano formado pela PC2 e PC3.....	62
Figura 23. Impressão digital obtida por ESI(-)-MS para amostra de mel de Curitiba classificada no grupo II.....	63
Figura 24. Mapa representando a mesorregião Sudoeste.....	64
Figura 25. Análise das componentes principais para as amostras de méis oriundas de diversas regiões paranaenses considerando os dados obtidos por ESI(-)-MS: (A) Projeções das amostras e (B) Projeções das variáveis no plano formado pela PC5 e PC6.....	65
Figura 26. Impressão digital obtida por ESI(-)-MS para amostra de mel de Pérola do Oeste classificada no grupo III.....	66
Figura 27. Mapas das Messorregiões: (A) Noroeste (B) Centro Ocidental (C) Norte Central (D) Norte Pioneiro.....	67
Figura 28. Ampliação do Plano formado pela PC1 e PC2 evidenciando o Grupo IV....	67
Figura 29. Impressão digital obtida por ESI(-)-MS para amostra de mel de Paranavaí classificada no grupo IV.....	68
Figura 30. Mapa representando a mesorregião Oeste	69
Figura 31. Impressão digital obtida por ESI(-)-MS para amostra de mel de Cascavel classificada no grupo V.....	71
Figura 32. Estrutura química dos compostos identificados no mel de Paraná.....	74
Figura 33. Proposta de fragmentação do ácido p-cumárico, íon $[M-H]^-$ m/z 163.....	77
Figura 34. Espectro de massa do ácido p-cumárico, íon $[M-H]^-$ m/z 163.....	77
Figura 35. Proposta de fragmentação do ácido gálico, íon $[M-H]^-$ m/z 169.....	78
Figura 36. Espectro de massa do ácido gálico, íon $[M-H]^-$ m/z 169.....	79
Figura 37. Proposta de fragmentação do ácido Cafêico, íon $[M-H]^-$ m/z 179.....	79
Figura 38. Espectro de massa do ácido Cafêico, íon $[M-H]^-$ m/z 179.....	79
Figura 39. Proposta de Fragmentação do ácido 3-prenil-4-dihidrocina-moiloxicinâmico, íon $[M-H]^-$ m/z 363.....	80

Figura 40. Espectro de massa do ácido 3-prenil-4-dihidrocina-moiloxicinâmico, íon m/z 363.....	80
Figura 41. Proposta de Fragmentação do ácido agático íon [M-H]- m/z 333.....	81
Figura 42. Espectro de massa do ácido agático íon [M-H]- m/z 333.....	81
Figura 43. Proposta de Fragmentação do ácido cuprésico, íon [M-H]- m/z 319.....	82
Figura 44. Espectro de massa do ácido cuprésico, íon [M-H]- m/z 319.....	82
Figura 45. Espectro de massa do íon [M-H]- m/z 199 não identificado.....	83
Figura 46. Espectro de massa do íon [M-H]- m/z 201 não identificado.....	83
Figura 47. Proposta de Fragmentação do ácido 3,4-diacetilcafeico íon [M-H]- m/z 263.....	84
Figura 48. Espectro de massa do ácido 3,4-diacetilcafeico íon [M-H]- m/z 263.....	84
Figura 49. Espectro de massa do íon [M-H]- m/z 383.....	85
Figura 50. Proposta de fragmentação da Canferida, íon [M-H]- m/z 299.....	86
Figura 51. Espectro de massa da Canferida, íon m/z [M-H]- 299.....	87
Figura 52. Proposta de fragmentação da Pinocembrina, íon [M-H]- m/z 255.....	87
Figura 53. Espectro de fragmentação da Pinocembrina, íon [M-H]- m/z 255.....	88
Figura 54. Proposta do fragmentação do Canferol.....	88
Figura 55. Espectro de fragmentação do Canferol.....	89
Figura 56. Espectro de massa do íon [M-H]- m/z 339 não identificado.....	89
Figura 57. Espectro de massa do íon [M-H]- m/z 361 não identificado.....	90
Figura 58. Espectro de massa do íon [M-H]- m/z 399 não identificado.....	90
Figura 59. Espectro de massa do íon [M-H]- m/z 447 não identificado.....	91
Figura 60. Espectro de massa do íon [M-H]- m/z 443 não identificado.....	91
Figura 61. Espectro de massa do íon [M-H]- m/z 529 não identificado.....	92
Figura 62. Espectro de massa do íon [M-H]- m/z 595 não identificado.....	92
Figura 63. Cromatograma dos íons totais dos compostos do mel de Toledo (TIC) e seus respectivos tempos de retenção.....	94

Figura 64. LC/MS/MS dos compostos orgânicos em modo negativo.....	95
Figura 65. Ampliação do Plano formado pela PC1 e PC2 evidenciando o grupo de amostra de mel de Apis mellifera e de Jataí.....	99
Figura 66. Impressões digitais de mel de Jataí: (A) Nova Santa Rosa (B)Toledo e (C) Cascavel. Impressões digitais de mel de Apis mellifera de Toledo (D).....	101

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 01. Estados maiores produtores de mel do Brasil – 2010.....	14
Tabela 02. Condições cromatográficas para análise dos extratos de mel por UPLC-MS/MS.....	51
Tabela 03. Gradiente linear do software MassLynx . 4.1.....	51
Tabela 04. Relação de Municípios do Paraná de onde amostras de mel de <i>Apis mellifera</i> foram adquiridas.....	58
Tabela 05. Resumo das amostras de mel classificadas no Grupo I e seus íons característicos.....	60
Tabela 06. Resumo das amostras de mel classificadas no Grupo II e seus íons característicos.....	63
Tabela 07. Resumo das amostras de mel classificadas no Grupo III e íons característicos.....	65
Tabela 08. Resumo das amostras de mel classificadas no Grupo IV e íons característicos.....	68
Tabela 09. Resumo das amostras de mel classificadas no Grupo V amostras da mesorregião Oeste e íons observados por ESI(-)-MS.....	69
Tabela 10. Íons encontrados nos ESI(-)-MS de cada grupo e suas mesorregiões	71
Tabela 11. Comparando os ESI(-)-MS/MS dos íons principais do mel de <i>A. mellifera</i> com os ESI(-)-MS/MS obtidos dos padrões analíticos e reportados na literatura.....	75
Tabela 12. Íons Característicos das mesorregiões do Paraná.....	93
Tabela 13. Íons encontrados em mel de <i>A. mellifera</i> do Estado do Paraná por LC-MS/MS.....	97

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Tabela das Mesorregiões, Microrregião e Municípios do Estado do Paraná.....	120
Anexo 2. Tabela com os íons principais de cada grupo de amostras de mel formado segundo a PCA.....	122
Anexo 3. Espectros dos Padrões Analíticos.....	124

RESUMO

Ivonete Hoss. Contribuição do perfil de compostos orgânicos, obtido por ESI(-)MS, para determinação da origem geográfica do mel do Estado do Paraná.

Avanços na análise de produtos naturais derivados de abelha como o mel, mostram que os mesmos são ricos em compostos fenólicos que, por serem antioxidantes naturais, estão se tornando cada vez mais populares devido a sua contribuição para a saúde humana. Estes compostos podem também ser usados como indicadores em estudos sobre a origem floral e geográfica do mel. Mas o mel é uma mistura muito complexa, o que dificulta a caracterização da sua composição química e determinação de compostos marcadores. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia analítica rápida e confiável, de alta sensibilidade e seletividade, para determinação do perfil dos compostos orgânicos do mel de abelha *Apis mellifera* produzido no Paraná. Utilizou-se da técnica ESI(-)-MS para a obtenção da impressão digital dos méis. Foram analisadas 82 amostras de mel de diferentes regiões do Estado. Inicialmente as amostras de mel passaram por um processo de pré-preparação para remoção das partículas sólidas, diluição e homogeneização. Em seguida, os ácidos orgânicos do mel foram concentrados por extração em fase sólida (SPE). Os extratos obtidos foram introduzidos por infusão direta no espectrômetro de massas para obter suas impressões digitais por ESI(-)-MS na faixa de varredura de 50 a 650 m/z. Os íons principais que apresentaram intensidade superior a 25% foram selecionados como variáveis para a PCA. Verificou-se a formação de cinco grupos bem definidos de amostras de mel. As amostras de um mesmo grupo apresentaram um perfil de ácidos orgânicos semelhante, sendo possível a identificação, por ESI(-)-MS/MS, de nove compostos orgânicos presentes no mel de *Apis mellifera* do Paraná. Ainda, os agrupamentos observados mostraram-se em correspondência com as mesorregiões paranaenses de origem das amostras, podendo-se verificar íons, ou perfil de íons, característicos para os méis de cada mesorregião. Dessa maneira, sugere-se que o perfil de ácidos orgânicos do mel pode auxiliar na determinação de sua origem geográfica. As análises por LC-MS/MS permitiram comprovar os íons obtidos por ESI(-)-MS/MS, bem como, as identificações estruturais realizadas. Por fim, três méis de abelha Jataí foram comparados com mel de *Apis* da mesma região podendo-se observar perfil de íons diferentes por ESI(-)-MS, demonstrando a seletividade e especificidade do método.

Palavras-Chave: Mel, Compostos orgânicos, ESI(-)-MS, PCA.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se assistido um aumento em pesquisas sobre as propriedades antioxidantes de produtos naturais. Dentre eles, produtos apícolas como o mel tem sido objeto de atenção pelo seu alto valor nutricional e medicinal.

As propriedades químicas e farmacológicas do mel de abelha e outros produtos de colméia, como o pólen, a geléia real, a própolis e larvas de abelha, têm sido objeto de estudo por sua vasta utilização como produtos medicinais e alimentícios sendo considerados nutracêuticos.^{1,2,3,4}

O mel é um produto apícola de fácil exploração, muito conhecido e utilizado desde os primórdios da humanidade como alimento e também como medicamento. No entanto, até pouco tempo atrás não se conhecia cientificamente os benefícios farmacológicos do mel ou sua composição química para saber quais os compostos responsáveis pelas propriedades medicinais atribuídas ao mel. Atualmente, sabe-se através de estudos que o mel tem valor nutricional e medicinal e essas propriedades são atribuídas em grande parte a presença de compostos fenólicos que possuem atividades antioxidantes e antibactericidas.^{5,6,7}

Segundo a legislação brasileira entende-se por mel “um 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 colméia”.⁸

A composição química do mel é muito complexa, constituída por açúcares, proteínas, vitaminas, minerais, hidroximetilfurfural (HMF), enzimas, flavonóides, ácidos fenólicos e compostos voláteis^{5,9-10}. Contudo, fatores como a florada nativa, o solo local, a espécie da abelha, o estado fisiológico da colônia, insetos sugadores, o estado de maturação do mel, o clima e outros, podem alterar as características da composição do mel.^{11,12} Portanto, a composição exata de qualquer mel depende de vários fatores e por isso dois méis nunca são idênticos.¹⁰

As propriedades antioxidantes do mel são conhecidas e atribuídas aos compostos presentes em sua composição, tais como: flavonóides, ácidos fenólicos, proteínas, aminoácidos ácidos, ácido ascórbico, HMF e algumas enzimas. As classes mais importantes de antioxidante polifenóis são os flavonóides e ácidos fenólicos.⁵

A Apicultura tem se apresentado nos últimos anos como uma importante alternativa econômica em todos os estados brasileiros e a expansão dessa atividade do mercado global

tem exigido cada vez mais qualidade de seus produtos e desta forma, a autenticação e caracterização da origem botânica de mel tornou-se tarefa importante.

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar as possibilidades de caracterizar amostras de mel de diversas origens, usando marcadores químicos específicos. No entanto, é bastante difícil encontrar marcadores químicos de confiança para a discriminação de mel devido à variabilidade de fatores que o mesmo sofre, desde sua produção até seu armazenamento.¹³ Ao anterior soma-se as maiores exigências do mercado sendo necessárias técnicas específicas de controle de qualidade do mel comercializado, bem como, técnicas que determinem e verifiquem a autenticidade do mel através do conhecimento de sua composição química. Consumidores mais exigentes requerem ainda que a origem geográfica e o local de produção do mel estejam explicitados na embalagem.

A apicultura iniciou-se oficialmente no Brasil com a inserção da abelha *Apis mellifera* originária da Europa pelo padre Padre Antônio Carneiro em 1839, porém somente em 1956 é que a apicultura no país progrediu com a introdução da abelha africana (*Apis mellifera scutellata*), considerada espécie mais resistente a pragas e mais produtivas. Através do cruzamento dessas espécies com as abelhas europeia originou-se a abelha *Apis mellifera* Africanizada que exigiu modernização nas técnicas apícolas que passou a ser praticada pelos agricultores brasileiros.¹⁴

No Brasil, a apicultura é favorecida pela presença da abelha *Apis mellifera* Africanizada e também pela presença de melhores condições climáticas, vegetação natural e alta produção agrícola que fornece uma diversidade de fonte floral para as abelhas (desde que não se faça uso de defensivos agrícolas).¹⁴

A produção vem crescendo anualmente no Brasil. Entre 2009 e 2010 o crescimento foi de 30%; enquanto que entre 2010 e 2011 o crescimento foi de 24%. Atualmente ocupa a 11ª posição no *ranking* dos produtores mundiais, tornando-se o quinto maior exportador do produto, sendo a região Sul do país a principal produtora com 45% da produção nacional. O Paraná nesta região está em terceiro lugar com 14,4% da produção.¹⁵

A presente pesquisa visou estudar o mel de abelha *Apis mellifera* do Estado do Paraná através de espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI-MS). O objetivo foi verificar se o perfil de compostos orgânicos do mel, obtido por ESI-MS e, aliado a ferramentas de análise multivariada, poderia ser útil para classificar e atribuir à origem geográfica do mel produzido no Estado. Paralelamente, buscou-se também identificar íons característicos do mel desta região, bem como, identificar compostos orgânicos minoritários presentes no mel.

O estudo dos compostos orgânicos em mel exige um procedimento analítico específico e sensível, tanto na etapa de extração como na técnica instrumental utilizada para a análise.¹⁶ O procedimento envolve três etapas básicas: aquisição de amostras representativas da região em estudo, extração e análise instrumental.^{9,18}

A etapa de extração deve ser realizada, em especial para a remoção do alto teor de açúcares (aproximadamente frutose 38% e glicose 31%)^{9,17} e para a concentração dos analitos de interesse. Dependendo do processo extrativo utilizado, esta etapa pode demorar podendo ocorrer perda significativa dos analitos.

São vários os métodos disponíveis para a extração de substâncias químicas em matrizes complexas como o mel, sendo os mais usados: extração líquido-líquido (LLE), extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME),^{9,10,12} embora um dos métodos com eficiência comprovada e muito utilizado é a extração em fase sólida (SPE),^{5,9, 12, 16,18-20} desenvolvida principalmente para substituir os métodos tradicionais de extração líquido-líquido na determinação de analitos orgânicos em amostras aquosas.⁵

Muitas técnicas analíticas foram desenvolvidas e aplicadas com o objetivo de estudar a composição química do mel.^{9,12,18,20} No entanto, a técnica mais moderna e eficiente para esse tipo de análise é a espectrometria de massas com ionização eletrospray (ESI-MS/MS), pois o mel contém muitos compostos de baixa volatilidade e alta polaridade que são facilmente identificados por essa técnica. A ESI(-)-MS/MS pode ser usada por inserção direta, obtendo um perfil da amostra, chamado de impressão digital, ou acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (UPLC-ESI/MS) para separar os compostos. Os compostos são selecionados por massa e identificados a partir de seus padrões de fragmentação (MS/MS).

A técnica ESI-MS/MS também é muito utilizada para análise de vários produtos alimentícios²¹⁻²⁵ e é amplamente empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, uma vez que possibilita aumento na detectabilidade, seletividade e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz.²⁶

A ESI(-)-MS é eficiente para análise de componentes polares, porque a maioria das moléculas possui sítios ácidos ou básicos que serão detectados como um íon simples, quer na sua forma protonada $[M+H]^+$ (modo positivo) ou desprotonada $[M-H]^-$ (modo negativo). Esse estudo foi realizado em modo de ionização negativo, pois em modo positivo há a possibilidade de formação de adutos dos ácidos fenólicos com outros cátions presente nas amostras.¹² Essa técnica é também usada para estudos mais refinados como a elucidação estrutural.²⁷

A análise exploratória através do uso da ferramenta quimiométrica PCA

(Componentes Principais), tem como finalidade básica a análise dos dados visando sua redução, eliminação de sobreposições e a escolha das formas mais representativas de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais.²⁸ Com a redução de dimensionalidade dos dados proporcionada pela PCA, as amostras passam a ser localizadas em espaços reduzidos, por exemplo, bi ou tri dimensionais, formando grupos na PCA com características semelhantes, bem como evidenciando as diferenças encontradas nos resultados.^{28,29}

Este método tem diversas aplicações no meio acadêmico e vem sendo usado também da indústria, podendo ser utilizado na redução de informações, para reconhecimento de padrões, na seleção de amostras, na construção de modelos para calibração multivariada, na análise exploratória de dados, entre diversas outras aplicações.^{28,29}

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Verificar, através da técnica de ESI(-)-MS, o perfil qualitativo em compostos orgânicos minoritários do mel de *Apis mellifera* produzido no Estado do Paraná.

Objetivos específicos:

- Desenvolver uma metodologia analítica para extração e determinação qualitativa dos compostos orgânicos minoritários presentes no mel de *Apis mellifera* aplicando a técnica de ESI(-)-MS;
- Obter impressões digitais por ESI(-)-MS do mel de *Apis mellifera* que permitam sua comparação e rastreabilidade;
- Identificar compostos orgânicos minoritários presentes no mel *Apis mellifera* por meio da técnica ESI(-)-MS/MS;
- Aplicar ferramentas de quimiometria para comparar e classificar o mel de *Apis mellifera* produzido no Estado do Paraná.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

O presente estudo foi realizado com amostras de méis de *Apis mellifera* provenientes do Estado do Paraná. Como a composição química do mel depende de inúmeros fatores, dentre eles, origem geográfica, flora, clima, espécie de abelha coletora, época e forma de coleta, armazenamento, entre outros fatores de menores impactos, neste referencial serão abordadas informações sobre localização e organização do Estado, bem como, características importantes que influenciam a flora apícola do Paraná.

3.1. Aspectos geográficos do Estado do Paraná

O estado do Paraná com uma extensão territorial de 199 880 km² é uma das 27 unidades federativas do Brasil e está localizado na região Sul do país, com as seguintes coordenadas: **24°36'S51°23'O**, sendo delimitado a leste pelo Oceano Atlântico; a Oeste pela República do Paraguai; ao Noroeste pelo Mato Grosso do Sul; ao Sudoeste pela República Argentina; ao Sul e Sudeste por Santa Catarina e ao Norte e Nordeste com São Paulo.^{30,31}

O Paraná é composto por 399 municípios, organizados em 39 microrregiões e 10 mesorregiões. A capital do Estado é Curitiba, sendo também a cidade mais populosa do Paraná, seguida por Londrina, Maringá, Ponta Grossa, Cascavel, São José dos Pinhais, Foz do Iguaçu, Toledo, Apucarana, Araçongas e Umuarama.^{30,31} A figura 01 representa o mapa do Paraná dividido em suas mesorregiões e no anexo 01 foram sumarizados, na forma de tabela, os municípios de acordo com suas mesorregiões e microrregiões de origem.



Figura 01. Mapa mostrando a divisão do Paraná em suas mesorregiões (mapa adaptado de www.sites-do-brasil.com)³⁰

3.1.1. Clima

Dentre as várias classificações climáticas que existem a que se adota mais comumente como referência no Brasil é a de Wilhen Köppen, climatólogo alemão, cujo critério se baseia na vegetação nativa combinada à temperatura e quantidade de chuvas distribuídas ao longo do ano. Köppen utilizou-se de um código de letras para definir diferentes tipos climáticos³⁰⁻³³, que são:

1º letra (maiúscula): indica o clima;

2º letra (minúscula): indica a distribuição de chuvas;

3º letra (minúscula): indica as médias de temperaturas.

De acordo com essa classificação o clima do Paraná é dividido em três tipos principais, que são: *Cfa*, *Cfb*, *Af*, onde a letra **C** significa clima subtropical ou temperado, **f** significa sempre úmido (chuvas em todos os meses) e a terceira letra **a** significa que a média do mês mais quente é superior a 22 °C, **b** significa que a média do mês mais quente é inferior a 22 °C e a letra **A** significa clima quente e úmido, conforme o mapa da figura 02 e descrições a seguir:³⁰⁻³³

- **Clima *Cfa***: clima subtropical com chuvas bem distribuídas durante o ano, verões quentes e abafados, geadas pouco frequentes, concentração de chuvas nos meses de verão que alcançam 1.500 mm anuais, sem estação de seca definida e temperatura média de 18°C nos meses mais frios e nos meses mais quentes temperatura superior a 22°C. Ocorre em uma pequena parte na Baixada Litorânea e nas porções mais baixas do segundo e terceiro planalto na porção ocidental. Desta forma as seguintes mesorregiões apresentam em grande parte este clima: Sudoeste, Oeste, Noroeste, Centro Ocidental, Norte central e Norte Pioneiro;
- **Clima *Cfb***: é subtropical com chuvas bem distribuídas durante o ano e verões amenos. Ocorre na porção mais elevada do Estado, no primeiro planalto, no segundo planalto e uma pequena parte no terceiro planalto. A temperatura média no mês mais frio oscila em torno de 18°C (mesotérmico) e a temperatura média no mês mais quente ocorre abaixo de 22°C, sem estação seca definida e a pluviosidade alcança cerca de 1.200 mm anuais. As maiores quantidades de chuva ocorrem no litoral. As mesorregiões que apresentam este clima são: Metropolitana, Sudeste, Sul e Centro Oriental. O norte central apresenta o clima *Cfb* na região que faz divisa com a mesorregião Centro Oriental e na pequena parte do Oeste que faz divisa com o Sul;
- **Clima *Af***: é subtropical ou clima tropical de altitude, com verões quentes e chuvosos e invernos secos. Apresenta pluviosidade de 1.300 mm anuais, temperatura média

do mês mais quente superior a 18°C. Ocorre em grande parte na Baixada litorânea, compreendendo a mesorregião metropolitana (litoral do Paraná).



Figura 02. Mapa representando o clima do Paraná (mapa adaptado de www.iapar.br).³²

3.1.2. Relevo, solo e vegetação

O relevo do Paraná é diversificado e possui planícies, depressões e planaltos. As altitudes do Estado se distribuem de maneira geral em 52% do território acima de 600 m e 3% abaixo de 300m. Os rios mais importantes do Paraná, são: Iguaçu, Ivaí, Tibagi, Paranapanema, Itararé e Piquiri.³³

Aproximadamente 44% do solo do Paraná é utilizado para a Pecuária; segundo lugar vem a agricultura com aproximadamente 22%, cultivando principalmente cana-de-açúcar, milho, soja, trigo, café, tomate, mandioca e em terceiro lugar vem as florestas nativas com 20% do solo.³³

O Paraná é constituído por quatro planaltos principais, de acordo com o mapa da figura 03 representando o relevo e vegetação do Paraná e descrições a seguir³⁰⁻³³:

- **Baixada Litorânea ou Planície Litorânea:** compreende a região do litoral Paranaense, estendendo-se do Oceano Atlântico até a Serra do Mar. Este planalto possui as menores altitudes do Estado (inferiores a 200 m). A Serra do Mar compõe-se de rochas erodidas e a partir dela em direção a oeste inicia-se o Planalto de Curitiba. As cidades dessa região que mais se destacam são: Paranaguá, Antonina, Morretes, Guaratuba e Matinhos.
- **Primeiro Planalto ou Planalto de Curitiba:** este planalto possui as maiores altitudes do Estado (entre 850 m e 1300 m) e a menor área territorial. Estende-se da Serra do Mar até a

Serrinha, em São Luís do Purunã, próximo à cidade de Campo Largo. O relevo é ondulado e a vegetação predominante é a Mata das Araucárias;

- **Segundo Planalto ou Depressão Periférica ou Planalto dos Campos Gerais ou ainda planalto de Ponta Grossa:** as altitudes variam de 300 m a 1200 m, onde as maiores altitudes encontram-se na Escarpa Devoniana, declinado para sudoeste, oeste e noroeste (1.100 a 1.200 m). O relevo é ondulado e a vegetação é composta por Araucárias e campos;
- **Terceiro Planalto ou Planalto de Guarapuava ou Norte do Paraná, ou ainda Planalto Arenítico-Basáltico:** é o planalto de maior extensão territorial de todos e apresenta altitudes que variam de 300 m e 600 m. Nesta região, derrames basálticos levaram à formação de solo muito fértil, a terra roxa. Nessa área a vegetação original (Floresta Tropical e Mata das Araucárias) quase não existe mais. Em seu lugar são encontradas plantações e pastos. As principais cidades são Maringá, Foz do Iguaçu e Guarapuava. A figura 03 representa o relevo do Paraná.

Em geral a vegetação do Paraná é contituida por campos limpos, Mata Atlântica, Mata das Auracárias (Mata dos Pinhais), vegetação litorânea e Florestas Tropicais.

Os **campos limpos** recobrem uma porção oriental do primeiro planalto e uma pequena parte do segundo planalto e descrevem uma meia-lua no mapa de vegetação do Estado, incluindo principalmente os campos limpos de Curitiba e Castro, no primeiro planalto. Portanto, a mesorregião Metropolitana e a Centro Oriental são as que mais apresentam campos limpos, ocupando cerca de 9% do território paranaense.³¹

A **mata Atlântica** do Paraná está localizada grande parte na mesorregião Metropolitana (Baixada Litorânea). Esta mesorregião apresenta também a **vegetação litorânea** (localizada na parte litoral). Constituída basicamente de vegetação rasteira e pobre, são poucas as espécies presentes, tais como: salsa-da- praia, gramíneas e pinheirinhos-de-praia.³¹

A **Mata das Araucarias** ou também chamada de **Mata dos Pinhais**, tem como principal espécie o pinheiro-do-paraná (*Araucaria angustifolia*). Recobre a maior parte do primeiro planalto, a porção mais oriental do segundo planalto e pequena parte do terceiro planalto. Essa formação ocupa 44% do território paranaense, mas nas partes mais elevadas dos planaltos apresenta manchas de campos limpos, pois esta é a floresta do país mais explorada economicamente.³³⁻³¹ A Mata das Araucárias está presente principalmente nas mesorregiões Centro Sul e Sudeste e, em menor proporção no Centro Oriental, Sudoeste, Oeste e Centro Ocidental. Ao lado dos pinheiros encontram-se a Imbuia, a Erva-mate, Canela,

Bracatinga e o Cedro, que são plantas mais típicas da região Sudeste. Na região sul, a principal fonte de riqueza é a extração de madeira de pinus e eucaliptos e na agricultura se destaca o trigo, cevada e soja, além da extração da erva-mate.^{31,33}

A **floresta tropical** (parte da mata atlântica) ocupa uma área equivalente a 46% do Estado. As mesorregiões do Paraná que apresentam na maior parte da sua extensão territorial florestas tropicais são: Norte Pioneiro, Norte Central, Noroeste e uma pequena parte do Oeste e Sudoeste.^{31,33}



Figura 03. Mapa representando (A) Planaltos do Paraná (B) a vegetação do Paraná (mapa adaptado de www.iapar.br).³³

3.2. Abelhas melíferas

As abelhas foram importantes desde os primórdios da humanidade, ou melhor, antes do surgimento do homem na Terra, as abelhas já existiam. Elas exerceram importante papel entre os egípcios, gregos e romanos. No Egito, existe até hoje a dança típica chamada "Passo da Abelha". Na Grécia antiga como símbolo de riqueza, as moedas tinham em uma de suas faces a estampa de uma abelha. Em Roma, as abelhas eram veneradas como símbolo de admiração e de defesa de seu território.³⁴⁻³⁶

As abelhas sempre foram símbolo de defesa, riqueza e tema de escritores sábios como Aristóteles e Einstein, bem como foram citadas na Bíblia. Portanto, sempre despertaram a curiosidade do homem que através de estudos passou a compreendê-la melhor, respeitando as suas características e particularidades. Na atualidade elas continuam sendo produtoras de alimentos naturais, essenciais para a humanidade e deixaram de ser vistas como insetos perigosos e agressivos, como eram julgadas no início da história.

Existem milhares de espécies de abelhas, sendo conhecidas cerca de 20 mil espécies diferentes, dentre elas as do gênero *Apis*, que são classificadas em sete espécies: *Apis florea*, *A. andreniformes*, *A. dorsata*, *A. cerana*, *A. mellifera*, *A. laboriosa* e *A. koschevnikov*, essas são as mais utilizadas comercialmente. Entretanto, acredita-se que existam cerca de 40 mil espécies não descobertas e destas apenas 2% são sociais e produzem mel. ^{37,38,39}

As abelhas são insetos que pertencem à ordem *Hymenoptera*, da superfamília *Apoidea*, subgrupo *Anthophila*, medindo de 12 mm a 13 mm de comprimento bem como apresentam pelos do tórax mais escuros (Figura 04), possuem cinco olhos, sendo três pequenos no topo da cabeça, que são usados para enxergar melhor dentro da colméia, e dois maiores na frente que possuem função de percepção de luz, cores e movimentos. ^{35,38}



Figura 04. Abelha *Apis mellifera* coletando néctar de planta (fonte: www.unb.br).

As abelhas vivem em colônias organizadas, onde os indivíduos possuem diferentes funções que são realizadas visando sempre à sobrevivência e manutenção do enxame. O número de abelhas nos enxames depende das condições do ambiente e da existência de alimento, mas em geral em cada colméia existem cerca de 60 a 80 mil abelhas e cada colônia é organizada em três castas principais, sendo: ^{38,39}

- Rainha (Uma);
- Operárias (10.000-50.000);
- Zangões (0-400).

As funções que cada casta executam na colônia são:

- **Rainha:** é responsável por reproduzir, coloca cerca de 1000 ovos por dia durante aproximadamente um ano. Antes da postura, a rainha efetua o vôo de acasalamento, sendo fecundada por um número variável de zangões, podendo chegar a 17.^{35,38}
- **Operárias:** a maioria das abelhas de uma colmeia é constituída por abelhas operárias, campeiras ou caseiras. Elas desenvolvem inúmeras funções de acordo com seu desenvolvimento fisiológico, sendo responsáveis, por exemplo, pela coleta e transporte do néctar e água até a colmeia, transformação do néctar em mel, alimentação da cria, reparo e construção de favos, defesa da colmeia, etc.^{35,38,40}
- **Zangões:** são os machos da colônia e tem como função a fecundação da rainha, morrem logo após a cópula, pois seu órgão genital fica preso ao órgão genital da fêmea. Quando ocorre escassez de alimento os zangões deixam de ser alimentados pelas operárias e são expulsos do ninho.^{35,38,40}

As abelhas, além de produzirem alimentos, são as principais agentes polinizadoras das flores, aumentando a produção de frutos e sementes.³⁸ Sendo a abelhas *Apis* as melhores para a polinização, ajudando na agricultura, na produção de mel, geleia real, cera, própolis e pólen, e responsável por produzir a maior parte do mel do mundo. Ou seja, as abelhas e as plantas possuem uma relação de dependência um com o outro, as abelhas polinizam as plantas, em troca as plantas produzem o néctar que garante a sobrevivência das abelhas.^{35,37,38,39}

No entanto, a abelha *Apis mellifera* mais conhecida entre os brasileiros não é nativa do Brasil e sim uma abelha européia, que foi introduzida no Brasil no século XVIII pelos Jesuítas, no período colonial para fins de apicultura, espalhando-se por todo território nacional.³⁴

Atualmente no Brasil *A. mellifera* está presente nos ambientes, urbanos, agrícolas e naturais em qualquer estado de preservação ou degradação de Norte a Sul. O Brasil é um país considerado privilegiado devido a suas proporções continentais e riquezas de ecossistemas, pois abriga cerca de ¼ das espécies de abelhas existentes que corresponde a cerca de 5.000 espécies, sendo 2 mil espécies catalogadas no Brasil.^{34,39}

3.3. Apicultura no Brasil e no Estado do Paraná

A exploração dos produtos produzidos pelas abelhas existe desde o ano de 2400 a.C. e foram os egípcios e gregos que desenvolveram as primeiras técnicas de manejo que foram aperfeiçoadas por apicultores como Lorenzo Langstroth no final do século XVII, iniciando as bases da apicultura moderna.^{36,39}

Hoje, entende-se por apicultura a criação racional de abelhas. É uma atividade sustentável por natureza, proporcionando melhoria na qualidade de vida do homem do campo, gerando renda sem comprometer o meio ambiente e sem prejuízos maiores para as abelhas, normalmente ocupa mão-de-obra familiar e contribui para o aumento da biodiversidade do ecossistema.^{35,36,37,39}

Em meados de 1956, é que se iniciou a revolução da apicultura no país, mas somente em 2001 iniciou-se a exportação do mel brasileiro, favorecida pela suspensão das importações do mel da China por países da Comunidade Européia devido a presença de altos índices de resíduos de antibióticos.^{37,39}

Outro fator que contribuiu para o avanço da apicultura no Brasil foi o surgimento das abelhas africanizadas, assim chamadas devido ao cruzamento da abelha européia com a abelha africana (*A. mellifera scutellata*) que são mais resistentes a pragas, agressivas e mais produtivas, e de fácil adaptação a condições climáticas do país, o que contribuiu para sua rápida expansão. No entanto, esse novo híbrido de abelha exigiu avanços e melhorias nas técnicas apícolas.^{17,34,39}

A apicultura no Brasil passou por várias dificuldades e etapas até se tornar boa opção aos agricultores brasileiros. Atualmente, o Brasil é exportador de vários produtos apícolas como o mel, a cera e própolis.^{17,34,37,39}

O mel brasileiro é exportado principalmente para os Estados Unidos e Reino Unido. Durante janeiro a outubro de 2009, foram exportados 22,86 mil toneladas do produto, o que correspondeu a uma receita de US\$ 57,1 milhões. De acordo com dados da Rede de Apicultura Integrada Sustentável (Rede Apis) e da Secretaria de Comércio Exterior do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio (Mdic), o valor alcançado no período superou o total exportado em 2008, com US\$ 43,57 milhões, e bateu o recorde do ano de 2003, quando a receita das exportações do setor chegou a US\$ 45,57 milhões.^{15,41}

A produção vem crescendo anualmente, entre 2009 e 2010 o crescimento foi de 30%, já entre 2010 e 2011 o crescimento foi de 24%. Atualmente o Brasil ocupa a 11ª posição no *ranking* dos produtores mundiais, sendo China, Turquia, Argentina, Estados Unidos e Ucrânia, os cinco maiores produtores.^{15,41}

O Brasil tornou-se o quinto maior exportador do produto, sendo a região Sul do país a principal produtora com 45% da produção nacional. O Paraná nesta região está em terceiro lugar com 14,4% da produção. A cadeia produtiva envolve mais de 350 mil apicultores, gerando 450 mil ocupações no campo e 16 mil empregos diretos no setor industrial.¹⁵

De acordo com dados do IBGE, a produção de mel no ano de 2010 foi de 38 mil

toneladas, ocorrendo queda de 2,5% em relação a 2009. O principal Estado produtor foi o Rio Grande do Sul, com 18,7% de participação no total nacional. Os principais municípios produtores de mel foram Araripina (PE), com 655 toneladas, Ortigueira (PR), com 510 toneladas, o que representa maior produtor do Paraná, com cerca de 10% da produção do estado (9,33%) e 1,35% da produção total de mel do país e Santana do Livramento (RS), com 460 toneladas.¹⁵

A tabela a seguir demonstra os 5 maiores Estados produtores de mel do Brasil.

Tabela 01. Estados mais produtores de mel no Brasil – 2010

Estado	Quantidade de mel produzido no ano (toneladas)	Participação na Produção Nacional (%)
Rio Grande do Sul	7098	18,7
Paraná	5468	14,4
Santa Catarina	3966	10,4
Piauí	3262	8,6
Minas Gerais	3076	8,1

Fonte: IBGE 2010

O consumo de mel no Brasil como forma de alimento é baixo, comparado com outros países, cada cidadão consome aproximadamente 300 g/ano, sendo que na região Sul o consumo é um pouco maior, 400g/ano de mel. Os alemães, espanhóis, turcos, americanos e os mexicanos são os maiores consumidores mundiais do produto, com um consumo aproximado de 1 kg/ano.^{15,31}

Um dos motivos do baixo consumo no Brasil é a baixa produtividade por colméias (15kg/ano). Nos Estados Unidos a produção dobra, enquanto que no México chega a 25kg/ano, na Argentina a 35kg/ano e na China a até 50kg/ano.¹⁵

O Brasil apesar da extraordinária diversidade floral e seu clima favorável, aliado à presença da abelha africanizada, poderia ser uma grande potência na atividade apícola, mas está em quinto lugar no ranking mundial da produção de mel. Pensando nisso, para aumentar a produção e qualidade do mel e auxiliar na polinização, os apicultores utilizam-se de algumas técnicas inovadoras de manejo e gestão, pois não adianta ter todas as condições e não saber utilizá-las. Técnicas tais como: manejo de colméia, gestão de florada, outra estratégia é melhorar e aumentar a quantidade de colméia no apiário.^{14,37,39,40}

Outro fator importante para o sucesso da apicultura é identificação e qualidade da flora apícola, época e período do pico de floração e principalmente conhecer a vegetação em torno

do apiário. Conhecendo-se a área em torno do local de instalação do apiário, podem-se planejar melhor as atividades para a produção e os cuidados a serem tomados antes, durante e depois dos períodos de colheita do mel.^{14,37,39,40,43}

Conhecendo-se a flora apícola da região, facilita-se a exploração racional e programas de conservação de abelhas, bem como operações de manejo no apiário, como também, possibilitando a identificação, preservação e multiplicação das espécies vegetais mais importantes na área, visto que, ao variar espécies vegetais entre localidade, influencia-se diretamente o fluxo de pólen e néctar que entra na colméia e conseqüentemente na composição química do mel.^{39,40,43}

Entretanto, devido a técnicas de manejo de colméia para aumentar a produtividade de mel, tem-se mais dificuldade em identificar a origem geográfica do mel através da análise da composição química, pois se as abelhas são manejadas de uma região para outra, o mel produzido terá composição química conforme a flora apícola disponível em cada local.

3.4. Mel e suas propriedades medicinais

Para produzir o mel as abelhas colhem o néctar e/ou pólen das flores (principais recursos florais) com suas compridas línguas (glossas); o produto é armazenado em sua vesícula *mellífera* que também transporta água coletada. Quando retornam à colméia as campeiras transferem o néctar que colheram para outras abelhas chamadas de engenheiras, e estas, por sua vez, vão retirar o excesso de umidade, transformando o néctar em mel.^{8,11,35,38,39}

Desta forma entende-se por mel “um 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 colméia”. É um dos principais produtos apícolas, é uma substância viscosa e aromática. Seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais estão diretamente relacionados com a fonte floral que o originou e com a espécie que o produziu.⁸

Na atualidade o mel é muito utilizado como adoçante e principalmente por ser um alimento de alta qualidade, rico em açúcares e inúmeras outras substâncias benéficas ao equilíbrio dos processos biológicos do corpo humano. É reconhecido devido às suas

propriedades terapêuticas, sendo utilizado na medicina popular sob diversas formas e associações com fitoterápicos.^{1-5,7,17,39}

As propriedades medicinais do mel de abelha e outros produtos de colméia, por exemplo, pólen, geleia real, própolis e larvas de abelha, têm sido mencionadas por seus vários propósitos medicinais e nutricionais. As propriedades mais citadas do mel são antioxidantes, antibactericidas, antimicrobianas, antissépticas, antiinflamatórias.^{1-5,7,17}

Alguns países como a França e a Itália vêm objetivando a produção de mel com propostas terapêuticas específicas, como nos tratamentos de úlceras e problemas respiratórios.

44

A ação antimicrobiana do mel é atribuída a fatores químicos relacionados com a presença de substâncias inibidoras, como o peróxido de hidrogênio, e substâncias voláteis, como flavonóides e ácidos fenólicos.⁴⁵

Em um estudo realizado na Paraíba, Brasil (Várzea Comprida das Oliveiras, Pombal) foi analisado a utilização do mel de abelha associado com plantas medicinais. O estudo foi realizado com 40 pessoas (20 homens e 20 mulheres) de idade superior a 18 anos, através de um questionário com perguntas específicas sobre o assunto, sendo o preenchimento realizado a partir de entrevistas com moradores da comunidade de aproximadamente 80 famílias habitantes. Foram citadas 6 espécies usadas em associação com o mel de abelha para o tratamento de doenças que acometem humanos. O mel utilizado e mais citado foi o de abelha Africanizada (*Apis mellifera* L.). A forma de utilização do mel foi como lambedor (xarope caseiro). As plantas mais utilizadas em associação com o mel de abelha foram: Limão (*Citrus* spp.), Laranja (*Citrus sinensis* L.) e Hortelã (*Mentha* sp.), mais direcionada para a cura das afecções das vias respiratórias, destacando-se a gripe e o resfriado.⁴⁶

Foi descoberto que o mel apresenta um efeito inibitório sobre aproximadamente 60 espécies de bactérias incluindo aeróbicas e anaeróbicas, gram-positivas e gram-negativas. Uma ação antifúngica foi também observada em algumas leveduras e espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*.²

Pesquisas recentes têm confirmado a eficácia do mel no tratamento de doenças gastrointestinais, de candidíase, doenças orais (faringite e cáries) e doenças oculares como inflamação de pálpebras, catarata e inflamação das córneas. Junto à atividade antibacteriana, o mel mostra-se capaz de promover e reparar danos à mucosa intestinal, estimulando o crescimento de novos tecidos e funcionando como um agente antiinflamatório.^{47,48}

3.5. Flora Apícola

Fonte floral ou flora apícola é definida como o conjunto de espécies vegetais que as abelhas utilizam como fonte de néctar e/ou pólen, para sua sobrevivência e produção de mel e são muitas as espécies de plantas que exercem atração das abelhas.^{38,39}

O aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais do mel estão diretamente relacionadas com a fonte floral que o originou e com a espécie de abelha que o produziu.⁴⁶ Sendo que a distância que as abelhas percorrem para coletar néctar e/ou pólen depende da quantidade e diversidade presente próximo a colméia, ou seja, elas voam a distância necessária, mas em épocas de escassez de fonte floral as abelhas podem percorrer uma distância média de até 2 km a procura de alimento, se tiver uma fonte disponível a uma distância de 200 ou 500 metros da colméia, a maioria das abelhas trabalhará nela.^{17,38,39}

O número de flores visitadas pelas abelhas depende da quantidade de néctar que cada flor fornece, pois algumas espécies melíferas produzem mais e outras menos néctar dependendo da hora do dia coletado pelas abelhas. Geralmente as abelhas visitam aproximadamente 50 a 1000 flores por viagem e conseqüentemente quanto mais espécies elas visitar, maior será a influência na produção e composição do mel.^{17,38,39}

Há relatos de que as abelhas preferem as plantas que para o homem aparece como cor amarela ou azul. São capazes de perceber a região ultravioleta do espectro invisível para o homem, além disso, são muito sensíveis às flavonas e flavonóis, substâncias que absorvem no ultravioleta e estão presentes em quase todas as flores brancas. As abelhas são insensíveis ao vermelho, mas visitam flores vermelhas, guiadas pela presença de flavonas que absorvem luz ultravioleta.^{38,39}

A classificação do mel pode ser feita segundo a sua origem floral, como:^{8,37,38,39}

- **Unifloral ou monofloral:** quando o produto procede principalmente da origem de flores de uma mesma família, gênero ou espécie e possui características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias;
- **Multifloral ou polifloral ou silvestre:** é o mel obtido a partir de diferentes origens florais;
- **Melato:** É o mel obtido primordialmente a partir de secreções das partes vivas das plantas e das excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas.

Portanto, as plantas que as abelhas utilizam para produzir o mel, dependem principalmente da disponibilidade floral e da localização da colméia, ou seja, elas utilizar-se-ão de plantas disponíveis mais próximas da sua colméia e a composição química e qualidade

do mel dependerá das espécies visitadas por elas e considerando isso pode-se dizer que é difícil mel monofloral, o mais comum é a ocorrência de mel polifloral misturado com mel de melato.

17

3.6. Composição química do mel

O mel apresenta uma composição química muito complexa que sofre influência de vários fatores como: origem floral, espécie de abelhas que o fabricam, condições ambientais, tipo de solo, clima onde é produzido e do modo como é recolhido e posteriormente processado.³⁸ Desta forma pode-se dizer que dois méis nunca são idênticos, mas no geral o mel é constituído por aproximadamente 180 componentes diferentes, principalmente açúcares (frutose e glicose) seguido por água e carboidratos. Também apresenta outros componentes minoritários que incluem compostos fenólicos, minerais, enzimas, aminoácidos, proteínas, ácidos orgânicos, Hidroximetilfurfural e vitaminas (Figura 05).^{5,7,8,9,17,20,49} Alguns componentes são originados pelo processo de maturação do mel, outros são adicionados pela abelha e outros são derivados das plantas. Pequenas alterações na composição química do mel podem ser atribuídas aos efeitos de processamento e estocagem.

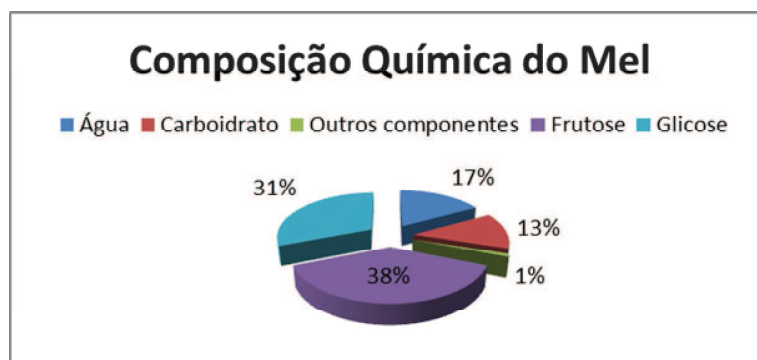


Figura 05: Gráfico da Composição química do mel.

Os principais componentes do mel são os açúcares, sendo os monossacarídeos frutose e glicose em proporções quase iguais, mas normalmente a frutose é predominante, juntos são responsáveis por 80% da quantidade total de açúcares, já os dissacarídeos incluindo sacarose e maltose, somam 10%.^{17,39}

A alta concentração de diferentes tipos de açúcares, principalmente a frutose, é responsável pelas diversas propriedades físicas do mel, tais como viscosidade, densidade,

higroscopicidade, capacidade de granulação (cristalização), pela doçura e valores calóricos.
6,17,39,50

O Hidroximetilfurfural (HMF) é um composto que resulta da quebra de açúcares hexoses, tais como glicose e frutose, em meio ácido, e tem assumido importância no controle de qualidade do mel. O HMF é um indicador de qualidade de deterioração, indicando que o produto pode estar velho. Em méis recém colhidos sua presença às vezes não é detectada, mas sua concentração aumenta com o passar do tempo.^{17,39}

O conteúdo de água no mel é uma das características mais importantes, influenciando diretamente na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade. É o segundo componente em quantidade variando de 15% a 21%, sendo normalmente encontrados níveis de 17%.^{7,17,51} Esta composição depende principalmente do clima, origem floral e colheita antes da completa desidratação.

Os minerais estão presentes numa concentração que varia de 0,02 % a valores próximos de 1%.¹⁷ Entre os elementos químicos inorgânicos encontrados no mel podemos citar: cálcio, cloro, cobre, ferro, manganês, magnésio, fósforo, boro, potássio, silício, sódio, enxofre, zinco, nitrogênio, iodo, rádio, estanho, ósmio, alumínio, titânio e chumbo. Méis mais escuros tendem a conter mais minerais do que méis mais claros.^{16,17,37,38}

As enzimas são adicionadas ao néctar pelas abelhas, e essas causam mudanças químicas, que aumentam a quantidade de açúcar, o que não seria possível sem essa ação enzimática. A enzima invertase adicionada pelas abelhas transforma 3/4 da sacarose inicial do néctar coletado nos açúcares invertidos glicose e frutose, ao mesmo tempo em que açúcares superiores são sintetizados, não sendo presentes no material vegetal original. Sua ação é contínua até que o mel esteja "pronto" ou maduro. Outras diversas enzimas, como a diastase, catalase, a-glicosidase, peroxidase, lipase, amilase, fosfatase ácida e inulase já foram detectadas no mel.^{17,37,38,50,51}

Os ácidos orgânicos representam menos que 0,5% da composição do mel, e influenciam no sabor e estabilidade (dificuldade de proliferação de alguns microorganismos) do mesmo. O ácido presente em maior quantidade é o ácido glucônico, sendo sua presença relacionada com as reações enzimáticas que ocorrem durante o processo de amadurecimento. Em menor quantidade podem-se encontrar outros ácidos como: acético, butírico, láctico, oxálico, fórmico, málico, succínico, pirúvico, glicólico, cítrico, butíricolático, tartárico, maléico, piroglutâmico, a-cetoglutárico, 2- ou 3-fosfoglicérico, a-ou b-glicerofosfato e vínico.
17, 37,38,51

As vitaminas estão presentes no mel em quantidades muito pequenas (traços), tais como: B1 (tiamina), complexo B2 (riboflavina, niacina), B6 (pyridoxina), ácido pantotênico e C (ácido ascórbico) e D são facilmente assimiláveis pela associação a outras substâncias como os açúcares, sais minerais, oligoelementos, ácidos orgânicos e outros.^{7, 17, 37,38,51}

Os antioxidantes presentes no mel incluem enzimas (catalase, glucose-oxidase, e peroxidase), ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas, compostos fenólicos, ácido ascórbico e carotenóides. No entanto, são os compostos fenólicos os que mais influenciam esta característica do mel.^{20, 37,38}

3.6.1. Compostos fenólicos

Há um crescente interesse nos alimentos funcionais, isto é, alimentos que não somente cumprem as necessidades nutricionais básicas e energéticas, como adicionam efeitos fisiológicos benéficos. O consumidor atual prefere ingredientes de origem natural que ofereçam a funcionalidade ao alimento ao invés de origem artificial. Dentre as substâncias funcionais o grupo mais amplamente estudado é o dos antioxidantes como os compostos fenólicos, presentes principalmente em frutas, vegetais, e derivados apícolas como o mel, pólen e própolis.^{58,59}

As estruturas químicas dos compostos fenólicos apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros. Quando presentes em vegetais podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas. Dentre eles, destacam-se os flavonóides e os ácidos fenólicos.^{58,59,60}

Os compostos fenólicos contidos no mel podem ter origem do néctar coletado pelas abelhas, do pólen ou, ainda, da própolis.^{5,52} Muitos desses compostos, principalmente os ácidos fenólicos e flavonóides, são conhecidos por apresentarem propriedades farmacológicas e tornaram-se alvos de estudo, devido a sua ação sobre numerosos processos fisiológicos no corpo, podendo beneficiar o coração, veias, fígado, sistema imunológico, rins, musculatura e sistema nervoso. Das várias propriedades terapêuticas atribuídas a essas substâncias, destacam-se os efeitos antioxidantes, antibacterianos, antialérgicos, antiinflamatórios, atividade antiviral, etc.^{53, 58,59}

Os compostos fenólicos têm propriedades captadoras de radicais livres, que confere a atividade antioxidante. Os radicais livres têm sido considerados como agentes causadores de isquemias cerebral e cardíaca, doenças de Parkinson, distúrbios gastrointestinais, envelhecimento, entre outros. As células vivas possuem capacidade limitada para anular a

atividade destes radicais livres, e a ingestão de antioxidantes pode melhorar a proteção das células e, portanto, a sua função fisiológica. Estes antioxidantes são geralmente obtidos a partir da alimentação e incluem vitaminas C e E, b-caroteno e uma variedade de compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos e flavonóides.^{54,58,59}

Alguns estudos têm demonstrado a existência da correlação entre a atividade antioxidante total dos méis e seus conteúdos fenólicos.^{55,56} Estevinho e colaboradores estudaram 2 méis malasianos de *Apis mellifera* de origens florais diferentes (*Cocos nucifera* e *Melaleuca* spp.), com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante e o conteúdo fenólico. O mel de *Melaleuca* apresentou atividade antioxidante significativamente maior que o mel de *Cocos nucifera*. O mel de *Melaleuca* mostrou conter alguns ácidos fenólicos, tais como ácidos gálico, ferúlico, caféico, benzóico e cinâmico, enquanto o mel de côco apresentou ácidos gálico, caféico e benzóico, bem como alguns outros compostos fenólicos desconhecidos. O valor terapêutico do mel é devido, em parte, à sua atividade antioxidante.⁵⁵

Linda avaliou a atividade antioxidante de 4 amostras de méis silvestres e 5 amostras de méis de laranjeira (monoflorais), e os resultados se mostraram satisfatórios tanto para os méis quanto para seus extratos. Os méis silvestres apresentaram teores de fenóis totais maiores em comparação com os monoflorais. Os teores de flavonóides totais destas amostras não foram tão significativos quanto de fenóis, sugerindo que nos méis brasileiros os ácidos fenólicos são bem mais abundantes que os flavonóides. Os estudos realizados com as diferentes amostras de méis demonstraram que o conteúdo de compostos fenólicos foi mais elevado nos méis silvestres, o que explicaria a maior ação antioxidante, demonstrada pela atividade sequestradora de radical livre (CE50) ter sido observado para essas amostras. Isto poderia fundamentar seu uso como alimento funcional.⁵⁷

Na Espanha, foi analisado o conteúdo de fenóis totais de 53 amostras de méis, sendo o número de amostras de cada tipo de mel e os respectivos conteúdos de fenóis: 39 monoflorais (0,66 mg/100g), 9 silvestres (0,87 mg/100g) e 5 méis de melato (1,03 mg/100g). No estudo também verificou-se a capacidade sequestradora de radicais (DPPH) para esses méis, que demonstraram que a capacidade de inibição do DPPH aumenta na mesma ordem descrita a cima.⁵⁶

Os compostos fenólicos de méis podem ser divididos em: ácidos benzóicos e seus ésteres; ácidos cinâmicos e seus ésteres e flavonóides. Mas a proporção desses grupos varia enormemente nos méis conforme as origens florais e geográficas.^{58,59}

3.6.1.1. Flavonóides

Os flavonóides são uma classe de compostos fenólicos que diferem entre si pela sua estrutura química e características particulares. São compostos largamente distribuídos na natureza. São exemplos de fontes destes compostos, os chás, vinhos, frutas, folhas, vegetais, grãos, flores.⁵⁸

O termo flavonóide consiste de um esqueleto de difenil propano, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C₆-C₃-C₆. O esqueleto base dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 06).^{58,59}

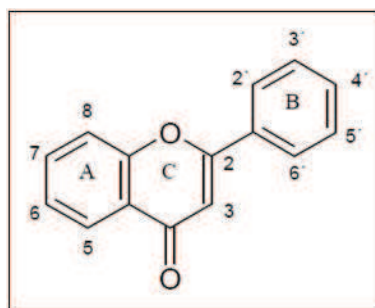


Figura 06 - Estrutura base dos flavonóides.⁵⁹

Os flavonóides podem ocorrer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonóides, como as flavolignanas, porém frequentemente ocorrem como glicosídeos. A disposição do anel C é responsável pela diversidade de compostos que integram o grupo flavonóide, resultando em importantes classes, sendo subdivididos principalmente de acordo com o grau de insaturação e oxidação do anel C.^{58,59}

Os flavonóides podem ser divididos em 14 classes, mas os flavonóides incluídos na dieta humana são divididos em 6 grupos: calconas, dihidrocalconas, auronas, flavonas (apegenina, luteolina, diosmetina), flavonóis (quercetina, miracetina, kaempferol), dihidroflavonol, flavanonas (naringina, hesperidina), flavanol, flavandioli, antocianidina, isoflavonóides (genisteína, daizdeína), bioflavonóides e proantocianinas (Figura 07).^{58,59, 60}

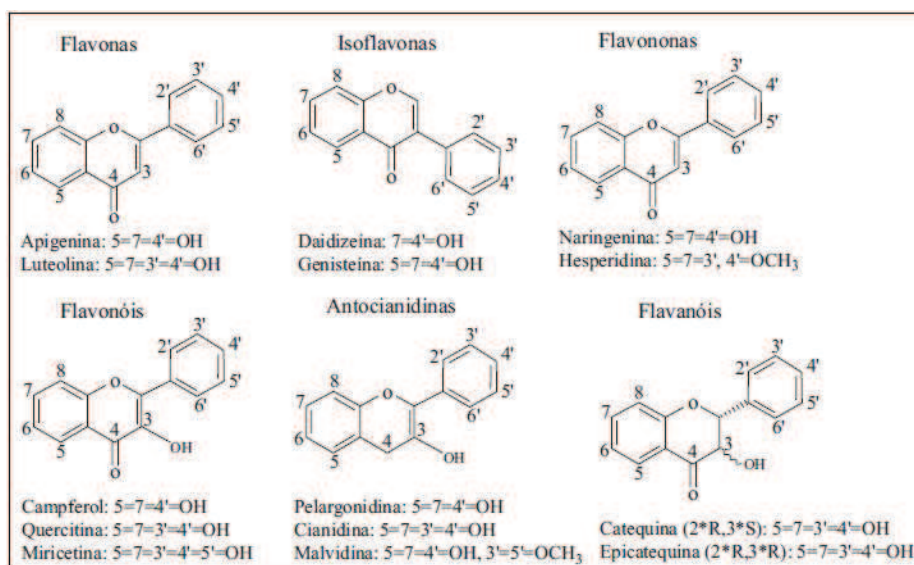


Figura 07. Estrutura genérica das principais classes dos flavonóides. ⁵⁹

3.7. Recuperação de compostos orgânicos do mel pelo método de extração em Fase Sólida (SPE)

Devido à complexidade da matriz do mel é difícil obter sensibilidade suficiente para a análise de compostos orgânicos minoritários, sendo necessária uma preparação prévia da amostra, como também, o uso de técnicas analíticas com alto poder de seletividade, sensibilidade e detectabilidade. Devido à alta concentração de açúcares no mel o objetivo primário do pré-tratamento é sua remoção da matriz, pois os mesmos podem interferir na análise. Ao mesmo tempo, os analitos de interesse são concentrados para melhor detecção.

A etapa de preparação da amostra é normalmente manual e decisiva para a precisão e a exatidão do método e demanda tempo e empenho do analista. Portanto, são preferíveis procedimentos mais rápidos, com poucas etapas, com boa recuperação e reprodutibilidade do analito, bem como, com possibilidade de automação. ⁵³

Para a determinação dos compostos orgânicos no mel, considerando que a matriz é formada principalmente por açúcares, o método de extração é determinante no sucesso da análise. Dentre os métodos mais utilizados para o pré-tratamento do mel estão a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida (SPE). ^{5,9,12,18,16,20,61}

Na extração líquido-líquido a quantidade total extraída do analito está relacionada com o coeficiente de partição entre duas fases imiscíveis (solvente e matriz) o que limita a recuperação, além de ser necessária a utilização de solventes puros, gerando muitos resíduos

orgânicos, formação de emulsões durante a extração, dificuldades de automação, necessidade de evaporação de volumes consideráveis de solventes gerando vapores orgânicos no ambiente e o principal problema são os baixos níveis de repetibilidade/reprodutibilidade das análises.⁶²

A SPE foi desenvolvida para substituir os métodos tradicionais de extração líquido-líquido; principalmente para a determinação de analitos orgânicos em amostras aquosas.⁵ É uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão e é usualmente empregada com o propósito de isolar analitos presentes em uma matriz. A extração ocorre pela adsorção seletiva do analito em materiais sólidos e posterior dessorção com solventes. A desvantagem da técnica é o alto custo dos cartuchos e discos extratores. Embora tenha a vantagem da grande disponibilidade de materiais adsorventes, possui altas recuperações e concentração do analito, bem como, baixo consumo de solventes que são qualidades desejáveis em um método de extração.⁶³

A SPE utiliza os mesmos materiais adsorventes empregados em cromatografia líquida e os mecanismos de retenção dependendo do adsorvente e do modo como é empregada, podendo ser em modo reverso, modo normal e modo troca iônica,⁶⁴ sendo que as fases sólidas como C₈, C₁₈, carbono grafitizado, resina trocadora iônica e materiais poliméricos, tal como estireno divinilbenzeno, comercializados em cartuchos e discos, são os sorventes mais usados em SPE.^{62,64}

Nos casos das fases reversas (C₈, C₁₈ e CN), a retenção do analito acontece devido às interações de van der Waals não polares, entre as ligações carbono-hidrogênio do analito com os grupos funcionais da superfície da sílica.^{53,64}

Os dispositivos mais usados na SPE são os cartuchos, devido a sua facilidade de manuseio, grande disponibilidade comercial. Em geral, os cartuchos disponíveis comercialmente possuem capacidade de 0,5 a 10 mL e quantidade de recheios que variam de 35 mg a 2 g.⁶³

O processo de extração da SPE é resumido nas seguintes etapas: condicionamento do cartucho para ativação do sorvente, percolação da amostra/sorção dos analitos no sorvente, lavagem para eliminação dos interferentes da matriz, eluição dos analitos através de solvente adequado e posterior concentração do composto de interesse, conforme figura 08. Os solventes de extração, lavagem e condicionamento do cartucho, bem como o tipo de cartucho (adsorvente) dependem do analito de interesse, da natureza da matriz e das impurezas a serem eliminadas. Os solventes e/ou amostra são forçados a passar pelo cartucho pela aplicação de pressão, vácuo ou por aceleração, tornando a análise mais rápida com extração simultânea de várias amostras ao mesmo tempo.^{62, 63}

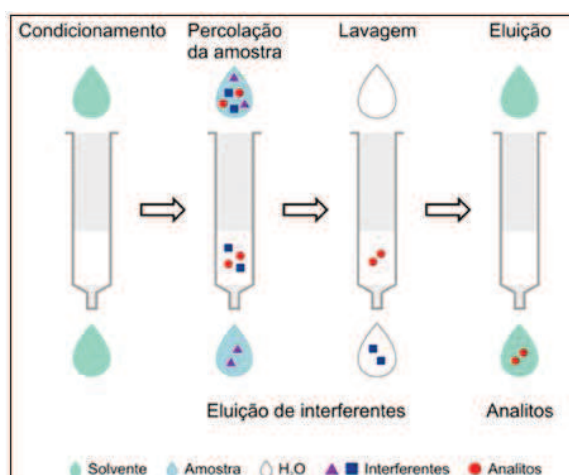


Figura 08. Etapas básicas envolvidas na SPE. ⁶³

Diversos solventes de lavagem podem ser usados, mas quando se trata da extração de compostos orgânicos em mel os solventes de lavagem ideal para remoção dos açúcares é a água ultra-pura ou uma solução levemente acidificada como solução de ácido clorídrico pH 2, e como solvente de eluição o metanol ^{519,12,18,16,65}. O intuito é usar um solvente de lavagem com força de eluição intermediária, capaz de eluir os interferentes, mas que não possua força suficiente para remover o analito de interesse. ⁶²

Michalkiewicz e colaboradores, bem como, Pyrzynska e colaboradores, testaram diferentes sorventes sólidos para extração de compostos fenólicos em mel. As análises foram realizadas por HPLC e os adsorvente testados foram: octadecil Bond Elut C18, Oasis HLB, Strata-X, Amberlite XAD-2. Os compostos fenólicos extraídos foram: ácido gálico, p-hidroxibenzóico, p-cumárico, ácidos vanílico, ácido caféico e ácido siríngico, rutina, quercetina e canferol. O sorvente que demonstrou melhor recuperações para os ácidos fenólicos foi o da Oasis HLB seguido da Amberlite XAD-2. Já para os flavonóides foi o da Bond Elut octadecil C18, Strata-X e Amberlite XAD-2 respectivamente. ^{12,19}

Em outro trabalho foi relatado que o ácido gálico e elágico não são possíveis de serem extraídos com a utilização do sorvente Amberlite XAD-2, já o ácido p-cumárico, o ácido caféico, o ácido ferúlico e clorogénico, foram extraídos com baixa recuperação (16% a 62%), embora tenham demonstrado melhores recuperações para os flavonóides (maior que 80%). ⁶⁶

Pulcini e colaboradores realizaram a extração de compostos fenólicos em mel através da SPE com a utilização dos cartuchos da Strata SDB L em substituição ao adsorvente amberlita XAD-2 e obtiveram uma ótima fração fonólica. Este procedimento, juntamente com o uso da espectrometria de massas (LC-MS/MS) forneceu resultados de alta recuperação e

reprodutibilidade para ácidos fenólicos e flavonóides.⁶⁷

3.8. Métodos para o Controle de qualidade do mel

Os méis brasileiros são aproximadamente 90% multifloral, originados principalmente de flores nativas, florestas secundárias e campos de cultivo. O interesse na caracterização de méis brasileiros é recente e os resultados até o momento são escassos.²⁶

A apicultura no Estado do Paraná tem se destacado no mercado nacional como uma atividade essencialmente familiar, que agrega benefícios sociais, econômicos e ambientais. No entanto, devido à diversidade do clima e da flora das regiões do país, muitas vezes, o processo de produção e obtenção do mel vem comprometendo a padronização e a qualidade do produto final.⁵¹

O controle de qualidade é uma etapa importante para que o produto seja comercializado com as suas propriedades naturais preservadas, que possuam características que facilitem sua utilização e que tenha uma adequada conservação e apresentação.⁶⁸

No Brasil, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel disposto na Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, apresenta critérios de qualidade para o mel definidos pelas características sensoriais (cor, sabor, aroma e consistência) e físico-químicas (teor de açúcares redutores, umidade, sacarose aparente, sólidos solúveis em água, minerais, pólen, acidez, atividade diastásica e hidroximetilfurfural).⁸

Segundo Anklam o conhecimento do perfil químico do mel, ou seja, a presença de ácidos orgânicos, aminoácidos, compostos fenólicos, compostos do aroma, aliado à análise estatística multivariada é útil na determinação da origem floral e geográfica do mel, o que não é possível através da determinação isolada de parâmetros físico-químicos.⁶⁹

A análise sensorial é uma técnica para avaliar a qualidade do mel, que pode ser empregada para monitorar o processamento de obtenção do mel, com o objetivo de preservar as características sensoriais do mesmo, classificá-lo de acordo com a origem botânica e identificar adulteração e contribuir para a melhoria do padrão de qualidade, bem como monitorar a qualidade nutricional do mel. Este tipo de análise mede e quantifica as características do produto pelos sentidos humanos, como: cor, sabor, aroma e consistência (viscosidade).^{8,70,71}

Anupama e colaboradores estudaram méis indianos, através das propriedades sensoriais cor, aroma e sabor e verificaram que estas propriedades variam de acordo com condições geográficas, climáticas e origem floral do mel.⁷⁰

Outra forma de determinar a qualidade do mel é através de suas características físico-químicas, tais como: pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais, diastase, teor de vitamina C, açúcares redutores e não redutores, cinzas, índice de formol, umidade, proteínas, Hidroximetilfurfural (HMF), análise microscópica de sujidades e cor.⁷²

Barth e colaboradores avaliaram a composição físico-química e origem botânica de 31 amostras de mel indicadas como sendo de origem monofloral, comercializadas e produzidas na região Sudeste do Brasil, a fim de verificar parâmetros de qualidade. Todas as amostras apresentaram-se dentro do limite previsto pela legislação brasileira para o teor de umidade. Dez amostras apresentaram teor de açúcares redutores inferior ao previsto na legislação, três tinham número de diastase (unidades Schade/Gothe) inferior a 8, uma apresentou pH abaixo do padrão e outra apresentou teor de cinzas superior ao previsto. A análise polínica mostrou que cerca de 57% das amostras poderiam ser classificadas como monoflorais, correspondendo nove amostras a mel de eucalipto (Myrtaceae), duas a mel de aroeira (Anacardiaceae), duas a mel de assa-peixe (Asteraceae), duas a mel de laranjeira (Rutaceae), uma a mel de cambará (Asteraceae) e uma a mel de capixingui (Euphorbiaceae). As demais amostras eram poliflorais.

A influência de uma determinada espécie botânica nas variáveis físico-químicas analisadas não foi significativa. Também foi concluído que, com alta frequência, os méis comercializados como monoflorais indicam incorretamente sua origem botânica. Ainda segundo Barth e colaboradores, méis monoflorais apresentam algumas propriedades físico-químicas constantes como: cor, odor, sabor e aromas. Já nos méis polifloral ou silvestres, as propriedades dependem da composição química que varia de acordo com as floradas.⁷³

De Arruda e colaboradores afirmam que as análises físico-químicas são de fundamental importância na caracterização de méis brasileiros, para criação de padrões, segundo fatores climáticos e florísticos de cada região.⁷⁴

Em um estudo realizado no Brasil, na Cidade Russa, no Estado do Ceará, foi avaliado a qualidade de 7 méis de *Apis mellifera* comercializados na cidade, o número de amostras analisadas se justifica pelo fato que considerou apenas amostras que continham lacre e rótulo e produzidas por apicultores locais.

As propriedades físico-químicas determinadas foram: hidroximetilfurfural, cinzas, acidez, umidade, açúcares redutores, sacarose aparente, umidade, pH, °Brix, coliformes totais e termotolerantes e bolores e leveduras e os resultados demonstraram que todas as amostras analisadas estavam em desacordo com a Instrução Normativa do Ministério da Agricultura e do Abastecimento brasileiro, sendo o ensaio que mais variou o de sólidos insolúveis, com

reprovação de todas as amostras, seguido do ensaio de cinzas, acidez, HMF e umidade. Do ponto de vista microbiológico, todas as amostras apresentaram ausência de coliformes, no entanto, foi observado contagem de bolores e leveduras em 33,33% das amostras analisadas.

45

Por outro lado, Díez e colaboradores que avaliaram amostras de mel e melato espanhóis, afirmam não ser possível diferenciar estes dois produtos usando parâmetros físico-químicos (pH, teor de minerais, condutividade elétrica, teor de açúcares e cor) e análises polínicas.⁷⁵

A análise polínica também é utilizada para determinar a qualidade do mel, fornecendo informação de suas propriedades e origem botânica. Esta análise consiste em reconhecer os tipos polínicos encontrados nas amostras de mel, e a partir deles, chegar às espécies vegetais, classificando o mel de acordo com o pólen presente no mesmo como monofloral ou polifloral. Portanto, se o mel contiver mais de 98% (em relação à soma polínica) de pólen de uma planta, é considerado monofloral.⁷³

Porém, através da análise polínica não é possível classificar o mel de melato, devido ao mesmo apresentar poucos grãos de pólen. Entre outras dificuldades como: diferentes espécies de plantas produzem diferentes proporções de pólen, a quantidade de pólen pode variar de estação para estação, o néctar colhido pode ser diferente em flores machos e fêmeas, abelhas podem forragear o pólen sem coletar néctar, bem como em alguns casos o pólen pode ser adicionado fraudulentamente ao mel.

No caso de mel *Citrus* e em algumas outras origens florais, a análise de pólen não é útil, devido à quantidade de pólen ser geralmente pequena e muito variável.⁷⁶ A origem botânica do mel, que influencia enormemente a preferência do consumidor permanece ainda difícil de ser determinada.

A qualidade do mel também depende de sua composição química, principalmente quanto aos diferentes tipos de compostos orgânicos, açúcares, sais minerais, proteínas e água.

A caracterização do mel pelas propriedades químicas e sensoriais recebeu maior atenção nos últimos anos.⁷⁷⁻⁷⁹ Métodos de controle qualidade, em conjunto com tratamento estatístico são capazes de classificar o mel de diferentes regiões geográficas, detectar adulteração e descrever características químicas.^{77,79} A combinação da PCA (componentes Principais) e análise polínica foi utilizada para autenticação de amostras de mel de acordo com tipo de flora, embora haja dificuldade em assegurar uma correta atribuição da sua origem.⁸⁰

De Maria e colaboradores analisaram 72 tipos de méis de *Apis mellifera* de quatro regiões do Brasil, sendo estudados os principais constituintes não-voláteis de amostras de mel de diferentes espécies de plantas encontradas em distintos estados brasileiros. Os níveis de água, acidez total, prolina livre, atividade de diastase, HMF, frutose e glicose foram determinados, porém, nenhum composto fenólico foi investigado e relacionado à origem botânica.⁸¹

Em um estudo a CLAE foi utilizada para validar um método para determinação do composto 5-Hidroxiacetilfurfural em mel e verificar a influência deste composto na qualidade do produto. Foram analisadas amostras de méis provenientes do Sudoeste da Bahia, visando uma melhor eficiência no controle de qualidade do produto comercializado. Das 15 amostras avaliadas, 6 apresentaram valores conforme recomendado pela legislação brasileira (60 mg kg⁻¹) das quais somente uma dessas amostras foi estocada por um tempo superior a 12 meses. A correlação entre aumento na concentração de HMF com o aumento no tempo de estocagem do mel sugere perda de qualidade com o envelhecimento e possível risco à saúde dos consumidores.⁸²

3.9. Métodos de determinação dos compostos fenólicos no mel

Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar as possibilidades de caracterizar amostras de mel de diversas origens, usando marcadores químicos específicos com base na análise da composição química do mesmo, mas devido à grande variabilidade de fatores é difícil encontrar marcadores químicos, sendo que o estudo da composição química do mel é uma importante ferramenta para determinar autenticidade, origem floral e geográfica de cada tipo de mel.^{18,9}

Pesquisas com méis europeus demonstraram a presença de flavonóides, tais como: hesperitina, canferol, quercetina e crisina, bem como de ácidos fenólicos: ácido abscísico, elágico, *p*-cumárico, gálico e ferulico que proporcionam ao mel excelente capacidade antioxidante.^{19,49,83-87} Outros compostos fenólicos como o flavonóides pinobanksina⁹⁰, galangina e crisina⁸⁸ e ácido benzóico e cinâmico⁸⁹, a flavanona pinocembrina tem sido relatados e estudados por suas atividades antibacterianas.⁹⁰

Estudos europeus relataram que a presença de determinados compostos fenólicos pode auxiliar na determinação da origem floral, geográfica e autenticidade do mel.^{42,91,49,52-61,92,84,93,86-88,94} Como por exemplo: através do estudo de mel de laranjeira verificou-se a presença do flavonóide hesperitina^{52,86,95}, o mel de urze apresenta o ácido elágico, ácido

abscísico ^{96,52,97,98}, o mel de alecrim apresenta canferol ^{83,87,96,97}, o mel de girassol apresenta o flavonóide quercetina ^{49,99}, o mel de castanha apresenta os ácidos caféico, p-cumárico e ferúlico, o mel de eucalipto apresenta tricetina, miricetina, quercetina, luteolina e kaempferol ⁵⁹ e a pinocembrina, pinobanksina e crisina são flavonóides encontrados em própolis. ^{9,18,49,83,90} A própolis também tem sido considerada como a principal fonte de compostos fenólicos presentes no mel, sugerindo que a origem geográfica do mel pode ser determinada a partir do seu perfil fenólico. ⁹⁷

Estes compostos são grandes indicadores da origem floral de cada um destes tipos de méis, ou seja, são usados como marcadores florais, sendo também que a certificação da origem floral através da identificação de compostos químicos característicos do mel de determinadas espécies florais pode apresentar vantagens significativas em relação à análise polínica atualmente utilizada. ^{9,18,49,83}

A origem botânica do mel é um dos seus principais parâmetros de qualidade e seu preço é frequentemente relacionado com esta origem floral. Ou seja, a qualidade do mel é julgada por sua origem botânica ou floral e composição química, sendo o seu preço baseado sobre a sua qualidade. ^{9,54}

Há muito interesse em desenvolver métodos analíticos que complementem a análise do pólen, auxiliando na determinação da origem floral do mel. Nesse sentido, a análise das substâncias fenólicas no mel é uma ferramenta para o estudo da origem botânica e geográfica. Em particular, a combinação de métodos físicos e químicos poderia ser uma abordagem promissora para demonstrar autenticidade dos diferentes méis.

Uma maneira de identificar compostos fenólicos em produtos naturais como o mel é através das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas. Porém, uma técnica mais rápida e eficiente é a espectrometria de massas através da obtenção de impressões digitais (ou fingerprinting) dos perfis dos compostos orgânicos presentes no mel.

A análise de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com o uso da extração em fase reversa é muito usada em alimentos, extratos de plantas e produtos apícolas. ^{84,92, 93,100-102}

Martos e colaboradores analisaram o conteúdo fenólico de diversos méis europeus de eucalipto por CLAE como o objetivo de correlacioná-los com a origem floral e/ou geográfica, identificando os seguintes flavonóides: miricetina, tricetina, quercetina, luteolina e canferol, sendo que a miricetina, tricetina e luteolina não haviam sido associadas, até então, com qualquer origem floral específica, podendo então ser marcadores do mel eucalipto. ¹⁰³

Segundo os dados da literatura, separação e identificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência foi muito utilizada para estudar a origem floral e geográfica de méis.^{88, 96, 97, 103} A CLAE também tem sido relatada como uma alternativa para análise dos componentes não-voláteis que constituem os méis europeus, e que auxiliam na caracterização da origem floral e geográfica.^{60, 88, 94, 96, 97} Esses estudos relatam a ocorrência de padrões de flavonóides (flavonas e flavonóis) e de derivados de ácidos benzóico e cinâmico como sendo importantes marcadores químicos de méis de diferentes regiões e origens geográficas.⁵⁵

Foi realizado um estudo com o objetivo de identificar o perfil cromatográfico, em ácidos fenólicos e flavonóides, e estudar a atividade antioxidante de méis de três diferentes espécies de abelhas: *A. mellifera* (africanizada), *Melipona flavolineata* (uruçu-amarela) e *M. fasciculata* (uruçu-cinzenta). Foram analisadas 36 amostras de mel, sendo 12 de cada espécie de abelha e provenientes do nordeste paraense, região que apresenta grande diversidade de solo e espécies botânica. Para comparar os méis das três espécies estudadas foi usado o tratamento estatístico *HCA* e *PCA*. Foi observada a presença de 13 compostos fenólicos: ácido gálico, ácido caféico, ácido vanílico, ácido *p*-cumárico, miricetina, ácido ferulico, ácido *m*-cumárico, quercetina, ácido trans-cinâmico, ácido *o*-metoxicinâmico, sendo 3 não identificados (Ph1, Ph2 e Ph3). Para a maioria dos méis analisados foram identificados como compostos majoritários o ácido gálico e a quercetina.

A análise dos ácidos fenólicos e flavonóides dos méis de *Apis mellifera* mostrou maior representatividade de ácido gálico (35% do total da quantidade de ácidos fenólicos). Os métodos *HCA* e *ACP* demonstraram que as porcentagens de ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido desconhecido, quercetina, ácido vanílico e ácido caféico são capazes de separar as amostras de mel das diferentes espécies de abelha de diferentes regiões do nordeste paraense. De modo geral, os méis analisados apresentaram uma significativa atividade antioxidante, principalmente os méis mais escuros que possuíram também teores mais elevados de polifenóis totais.¹⁰⁴

Petrus e colaboradores analisaram os flavonóides presentes em 19 méis uniflorais de diferentes variedades e origem por cromatografia de alta performance (HPLC) acoplado a detecção coulométrica eletrodo array (CEAD). Os compostos foram extraídos com resina Amberlite XAD-2 e separado em coluna de fase reversa e fase móvel em modo gradiente, identificando os seguintes flavonóides: Quercetina, naringenina, hesperetina, luteolina, kaempferol, isoramnetina, e galangina.

Para confirmação desses compostos realizou-se uma análise por HPLC acoplada com espectrometria de massas com ionização eletrospray em modo negativo. Os resultados mostraram diferenças entre as amostras de méis tanto em concentrações e perfis de flavonóides. Galangina, kaempferol, quercetina, isoramnetina, e luteolina foram detectados em todos os méis pesquisados, enquanto hesperetina ocorreu apenas em méis de limão e laranja, naringenina em mel de limão, laranja, rododendros (*Rhododendron* L.), alecrim e mel de flor de cereja.¹⁰⁵

Martos e colaboradores estudaram méis e própolis da Tunísia (norte da África), com o objetivo de comparar o perfil dessas amostras com o perfil europeu e determinar a origem geográfica e floral do mel. Os resultados mostraram perfis dos compostos fenólicos completamente diferentes daqueles encontrados nos méis europeus oriundos de diferentes origens florais.¹⁰⁶ Os méis europeus apresentaram um perfil de compostos fenólicos pouco variáveis. Já os méis da Tunísia mostraram variação, mesmo quando originários de mesma fonte floral. Ainda procurando relacionar as substâncias fenólicas dos méis da Tunísia com os marcadores químicos dos méis europeus, o mel rosmaninho da Tunísia também apresentou como principais constituintes o canferol e 8-metoxicanferol e o mel de *Citrus* da Tunísia, também apresentou hesperetina, em quantidades similares às encontradas nos méis de *Citrus* da Espanha. Também que 5 das 13 amostras demonstraram conter flavonóides derivados de álamo, que é a principal planta fornecedora de própolis na Europa, sendo eles: pinocembrina, crisina, galangina e pinobanksina, exatamente os méis que apresentaram maior conteúdo total de fenólicos.¹⁰⁶

Em um estudo foi comparado o conteúdo de flavonóides presentes em méis de eucalipto da Austrália com os da Europa, com o objetivo de verificar se os marcadores encontrados em méis de eucaliptos europeus estavam também presentes nas amostras australianas. Para tanto, foram analisados por CLAE 7 amostras de *Eucalyptus pilligaensis*, 2 amostras de *E. melliodora* e 6 amostras de *E. camaldulensis*. Os cromatogramas das 3 espécies australianas e da espécie europeia demonstraram perfis similares para a presença de miricetina, tricetina, quercetina, luteolina e canferol. Mas, os flavonóides pinocembrina, pinobanksina e crisina encontrados no mel europeu, não estiveram presentes no mel australiano, sendo também que o mel australiano, apresentou a 3-metilquercetina que não havia sido relatada no mel de eucalipto europeu.^{101, 94}

Em um trabalho foram investigados os ácidos fenólicos como marcadores químicos de méis de eucalipto australiano (*E. intermédia*, *E. ochrophloia*, *E. crebra*, *E. nubila*, *E. melliodora*, *E. moluccana*, *E. camaldulensis*, *E.globoidia*, *E. largiflorens*). O ácido gálico foi

o de maior concentração encontrado em todos os tipos de méis estudados, exceto para o mel de *E. globoidia*, que foi dominado pelo ácido elágico. Como o ácido gálico não havia sido até então relatado, ele foi indicado como marcador floral para méis de eucaliptos australianos.¹⁰⁷

Na Croácia em duas regiões de produção de mel de sálvia (*Salvia officinalis* L.) foram avaliadas 38 amostras por CLAE-DAD. Nesse trabalho foram identificados os flavonóides quercetina, luteolina, canferol, apigenina, crisina e galangina, bem como os ácidos *p*-cumárico e cafêico. O ácido abscísico foi identificado como majoritário, podendo talvez diferenciar esses méis de outros.⁸⁴

Méis brasileiros têm sido analisados por CLAE-DAD e UV-visível com o objetivo de identificar ácidos fenólicos e flavonóides em amostras de méis silvestres, de eucalipto e de laranjeira obtidas de diferentes regiões geográficas. Os resultados indicaram que existe uma grande variação no perfil dos compostos fenólicos nos diversos tipos de méis analisados. Para as amostras de méis silvestres foram identificados os ácidos protocatecuico, *para*-hidroxibenzóico, vanílico, *para*-cumárico, *para*-metoxi-benzóico e cinâmico; e os flavonóides morina, quercetina, canferol e isoquercetina. Para as amostras de méis de eucalipto foram identificados os ácidos protocatecuico, *para*-hidroxibenzóico e siríngico, além do flavonóide tricetina. Para as amostras de méis de laranjeira foram identificados os ácidos protocatecuico, *para*-hidroxibenzóico e *para*-cumárico como os mais representativos, e os flavonóides morina, quercetina, rutina e isoquercetina. Esta foi a primeira vez que os flavonóides isoquercetina e canferol foram relatados em méis brasileiros. Também foram realizadas análises polínicas dos méis monoflorais (eucaliptos e laranjeiras), a fim de se poder definir e certificar a sua origem botânica e as suas propriedades e os resultados demonstraram diagnóstico que pode se aproximar da verdadeira procedência do mel.⁵⁷

Em um estudo realizado no Chile comparou-se conteúdo fenólico de méis de diferentes origens florais, coletadas em diversos locais (Norte, Centro e Sul do Chile). As análises foram realizadas por HPLC com detector UV e a extração em fase sólida (Amberlite XAD-2) e a identificação dos compostos foi realizada por comparação com padrões analíticos. Os resultados demonstraram variações na concentração de flavonóides, bem como variação no potencial antioxidante, entre as amostras analisadas.

Verificou-se ainda maior quantidade de compostos fenólicos encontrada em mel de clima seco. Os principais flavonóides encontrados foram: pinocembrin, pinobanksin, quercetina, kaempferol, crisina, galangina e outras duas flavanonas não identificadas.¹⁰⁸ Esses compostos também foram encontrados na propólis.¹⁰⁶ Os flavonóides Pinobanskina e kaempferol são normalmente identificados em méis chilenos. O ácido elágico também

aparece com frequência tendo sua origem mais provável no néctar de eucalipto ou na própolis.

108

Lianda descreveu em 2004 pela primeira vez, a presença de flavonóides em méis brasileiros, sendo analisados dois méis de laranjeira de São Paulo. Uma das amostras apresentou ácidos fenólicos, os flavonóides morina e quercetina; e outro mel apresentou quercetina e rutina. Duas amostras de méis silvestres, uma de São Paulo apresentou morina e quercetina, enquanto outra do Rio de Janeiro apresentou apenas a morina.

Os perfis cromatográficos das substâncias fenólicas para os méis monoflorais (laranjeira), oriundos de diferentes regiões geográficas, não sofreram alterações qualitativas drásticas, quando comparados aos méis heteroflorais (silvestres), que apresentaram um perfil para os compostos fenólicos variados.

A ocorrência dos ácidos protocatecuico e *p*-cumárico em quatro amostras de méis de laranjeira indicou que estas substâncias poderiam ser usadas como marcadores químicos destas espécies. Para os méis polifloral (silvestre) não foi observada a presença constante de nenhum dos ácidos estudados, de forma que pudessem ser considerados possíveis marcadores.

109

Há vários trabalhos que estudaram a origem geográfica e composição química da própolis como em um estudo que analisou a própolis verde do sudeste do Brasil. Os resultados confirmaram a origem vegetal da própolis dessa região como sendo a *Baccharis dracunculifolia* (Alecrim), formando apenas um grupo. Essa própolis é rica em ácidos fenólicos, especialmente derivados prenilados do ácido *p*-cumárico.^{110,111}

Na própolis brasileira foram identificados diversos compostos como o flavonóide canferida, os compostos fenólicos artepelina C, benzofuranos¹¹² e ester de ácido cinamico prenilado como o ácido 3-prenil-cinamico^{113, 114}. Mono e sesquiterpenos foram encontrados na própolis verde como: o farnesol¹¹⁴, ester de ácidos graxos de cadeia longa, o ácido 3-hidroxiesteárico, e o triterpenoide pentacíclico lupeol.¹¹⁵

Outros compostos foram detectados em própolis verde e também em outros tipos de própolis brasileira, e de acordo com alguns pesquisadores a origem botânica é a principal responsável por essa diferença química, mas há outros fatores, pois verificaram que as diferenças são notáveis em amostras de lugares distantes, mas também de própolis de mesma localização.¹¹⁴ Esse fato é constatado para amostras de própolis européias, bem como para própolis verde.¹¹⁶⁻¹¹⁸

Os trabalhos mencionados nesta revisão usaram a técnica da CLAE com os mais variados tipos de detectores para estudar os compostos fenólicos presentes em méis ou

própolis. No entanto, há poucos trabalhos publicados que tenham estudado os ácidos orgânicos minoritários de méis do Brasil. Também não foi encontrado nenhum trabalho que utilizasse a impressão digital do mel por ESI-MS, bem como, que analisasse um número considerável de amostras de uma mesma região buscando a obtenção do perfil químico do mel.

A técnica de LC-MS/MS com ionização por electrospray e analisador de massa triplo quadrupolo, foi utilizada para determinar resíduo de cloronfenicol em amostras de leite e mel, como uma alternativa eficiente e adequada à determinação de resíduos de antibióticos em matrizes de alimentos. A técnica conferiu à metodologia baixos limites de detecção e quantificação, sendo que os resultados mostraram que a técnica de LC-MS/MS é uma ferramenta analítica de alta especificidade, detectabilidade e autoconfirmatória na determinação dos analitos em matrizes de alimentos.²⁵

Através da LC-MS/MS em modo negativo de ionização foram analisados os compostos fenólicos presentes em plantas como: o alecrim, orégano, sálvia, manjeriço e tomilho. Dentre os compostos identificados citam-se os derivados do ácido hidroxicinâmico: ácido caféico (m/z 179.03), ácido clorogênico (m/z 353.09), ácido p-coumarico (m/z 163.04), ácido rosmarinico (m/z 359.08), ácido ferulico (m/z 193.05), ácido caféico hexosido (m/z 341.10) e ácido dicafeoilquínico (m/z 515.10), derivados do ácido hidroxibenzóico: ácido gálico (m/z 169.01), ácido siríngico (m/z 197.04), ácido vanílico (m/z 167.04), ácido protocatecuico (m/z 153.02) e ácido 4 - hidroxibenzóico (m/z 137.02), flavonóides: apigenina (m/z 283.1), luteolina (m/z 285.03), apigenina-7-O-glucósido (m/z 431.09), luteolina-7-O-glicosídeo (m/z 447.09), galocatequina (m/z 305.06), phloridzina (m/z 435.12), quercetina (m/z 301.0349) e rutina (m/z 609.14) e terpenos fenólicos: timol (m/z 149.09) carnosol (m/z 345.20) e ácido carnósico (m/z 244.2). A identificação dos compostos fenólicos foi realizada por comparação dos tempos de retenção e espectros de massa com padrões analíticos.¹²⁰

Méis da Eslovênia foram analisados quanto ao perfil de flavonóides. Os mesmos foram extraídos por SPE e analisados por espectrometria de massa de ionização por electrospray acoplado a cromatografia líquida com detecção de díodos (LC-DAD-ESI/MS). Foram identificados miricetina, luteolina, quercetina, naringenina, apigenina, kaempferol, pinocembrin, crisina e galangina, pinobanksina em amostras semelhantes, mas quantitativamente diferentes.⁶⁵

Também foram identificados dois isômeros de ácido abscísico, o cis-trans-ácido abscísico e o trans-trans-ácido abscísico. A análise não mostrou nenhum composto específico para ser usado como marcador para a determinação das origens botânicas de diferentes tipos

de mel esloveno, mas classificou corretamente 85% das amostras de mel de acordo com suas origens botânicas. Neste estudo foi concluído que a LC-DAD-ESI/MS é uma poderosa ferramenta para a identificação e quantificação de flavonóides em mel e que para ser possível identificar algum marcador químico é necessário analisar um maior número de amostras de mel em estudos adicionais, bem como determinar os constituintes fitoquímicos como ácido fenólico, flavonóides glicosilados e uma abordagem estatística (análise multivariada) para verificar as semelhanças entre as amostras.⁶⁵

A literatura apresenta um trabalho que utilizou-se da micro-extração em fase sólida através do *headspace* e cromatografia gasosa (HS-SPME-CG) para a identificação da origem floral de méis brasileiros a partir da caracterização química de sua fração de voláteis. Foram avaliadas 90 amostras de méis brasileiros de vinte origens florais diferentes e várias procedências. Os resultados demonstraram que cada tipo de mel apresentou um perfil cromatográfico diferente. Foram identificados potenciais marcadores para os méis de eucalipto (*Eucalyptus sp*), laranja (*Citrus sp*), assa-peixe (*Vernonia polianthes*), cambará (*Lantana montevidensis*), morrão de candeia (*Croton sp*) e marmeleiro (*Cydonia vulgaris*). Os resultados obtidos mostraram que SPME-CG é útil na tipificação de méis e pode eventualmente ser utilizada na sua certificação.¹²¹

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa tandem com ionização eletrospray em modo negativo (ESI-MS/MS) foi utilizada para a separação de onze flavonóides agliconas de ocorrência natural, que pertence à classe das flavonas, flavonóis e flavanonas. A fim de resolver os espectros MS/MS obtidos, cada composto foi investigado novamente por infusão diretamente no espectrometro de massas de íons trap. Através dos espectros MSⁿ os pesquisadores proporam explicações para as fragmentação dos flavonóides, apoiado pelas análises complementares de cinco agliconas de flavonóides sintéticos. Os íons negativos ESI-MS/MS demonstraram comportamentos diferentes em comparação com estudos descritos utilizando a ionização de íons positivos por várias técnicas. A fragmentação via retro Diels-Alder (RDA) apresentou anions estruturalmente informativos e específicos no modo negativo de ionização. Foram observadas perdas neutras de CO, CO₂ e C₃O₂ que parecem ser característica do modo negativo de ionização. Desta forma, concluíram que os resultados e as incomuns perdas neutras, mostram que o modo negativo de ionização é uma poderosa ferramenta complementar do modo de íons positivo para a caracterização estrutural de flavonóides por ESI-MS/MS. Este foi o primeiro estudo realizado em modo negativo de ionização, demonstrando que para a análise fitoquímica de

plantas, o modo de íon negativo é mais seletivo e mais sensível do que o modo de íons positivos.¹²²

Os compostos fenólicos em mel de trigo, acácia e melato, também foram estudados utilizando a cromatografia líquida acoplado a espectrometria de massas, sem a separação dos açúcares ou uso de procedimento de limpeza. Foi possível identificar diferentes compostos fenólicos: rutina, miricetina, naringina, naringenina, quercetina e apigenina.¹⁸

Em outro estudo os compostos fenólicos do mel foram obtidos utilizando a extração líquido-líquido (acetato de etila) e como técnica analítica a espectrometria de massas com analisador quadrupolo e Tempo de voo acoplado a cromatografia líquida de ultra performance (UPLC-Q/TOF-MS), e desta forma foi possível verificar a presença de diferentes ácidos fenólicos e flavonóides, ou seja, os espectros de massas registraram 37 ácidos fenólicos e flavonóides descritos na literatura e ao empregar o software ChromaLynx para o tratamento dos dados 34 destes compostos fenólicos foram identificados rapidamente e claramente e ainda ao combinar o tempo de retenção com a massa molecular exata, identificaram vários compostos que não podem ser detectadas por detecção de díodos.¹²³

Como a composição química do mel depende da fonte floral, é razoável esperar que méis produzidos em regiões diferentes, onde a flora disponível para as abelhas é diferente, apresentarão composição fitoquímica diferente. Desta forma, o presente estudo pretendeu determinar e comparar o perfil químico do mel produzido nas diferentes regiões do Paraná e, realizar sua tipificação de acordo com esse perfil. Conhecendo-se o perfil dos compostos orgânicos do mel de cada região do Paraná, o mesmo poderá ser utilizado como uma informação auxiliar na rastreabilidade e controle de qualidade do mel.

3.10. Espectrometria de massas (EM)

3.10.1. Descrição da técnica

A espectrometria de massas (“Mass Spectrometry”) é uma poderosa ferramenta que foi usada, no princípio, na determinação de massas atômicas e, vem sendo empregada, na atualidade, na busca de informações sobre a estrutura de compostos orgânicos, na análise de misturas orgânicas complexas, na quantificação de materiais conhecidos, na análise elementar e na determinação da composição isotópica dos elementos. É uma técnica largamente utilizada pelos químicos na análise de moléculas de diversas massas molares, sendo uma técnica destrutiva da amostra.¹²⁴

A grande sensibilidade do método faz com que seja rotineiramente usada na análise de substâncias em baixa concentração, como no caso do doping, controle de alimentos e medicamentos, contaminação ambiental, entre muitas outras aplicações.

A detecção de compostos pode ser conseguida para quantidades tão pequenas como 10^{-15} g para um composto de massa de 1000 Dalton. Isto significa que os compostos podem ser identificados em concentrações muito baixas (uma parte em 10^{12}) em misturas quimicamente complexas.^{124,125}

Os princípios científicos em que a técnica se baseia são simples. A essência da técnica envolve a geração de íons que são depois detectados. A sofisticação surge nos métodos que são usados para a geração desses mesmos íons e no modo de analisá-los.

A EM realiza a análise em fase gasosa nem sempre, de átomos ou moléculas de uma amostra que são ionizados e separados de acordo com a razão massa/carga (m/z) quando submetidos a condições específicas de um campo elétrico e/ou magnético.^{124,125}

3.10.2. Instrumentação

Um espectrômetro de massas é composto pelos módulos principais: fonte de íons, analisadores de massas (m/z) e os detectores (Figura 09), sob altovácuo.

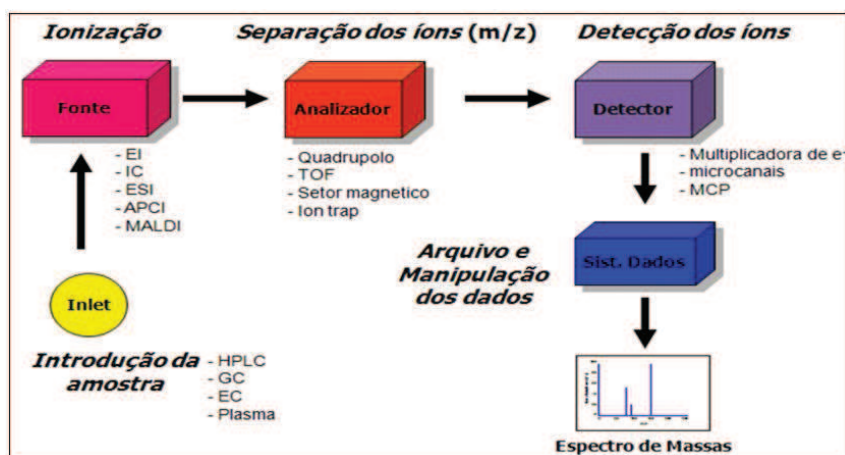


Figura 09. Representação esquemática de um espectrômetro de massas.¹²⁴

As análises em um espectrômetro de massas podem ser realizadas por infusão direta da amostra na fonte de ionização ou por introdução em coluna cromatográfica, através do acoplamento da cromatografia líquida ou gasosa ao espectrômetro de massas. Há vários tipos de fontes de ionização e de analisadores de massas possíveis de serem usados na espectrometria de massas, mas neste trabalho serão apresentados a fonte de ionização

eletrospray e o analisador triplo quadrupolo, utilizados para a realização deste projeto.

3.10.3. Espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI)

O “eletrospray” é conhecido como um modo de "ionização branda" que significa que os íons formados possuem baixa energia interna, o que permite a observação de espécies iônicas moleculares com pouca ou nenhuma fragmentação, permitindo com isso a produção de íons com base em compostos de alta massa molecular e não-voláteis, incluindo proteínas, nucleotídeos e polímeros sintéticos, sendo por isso uma técnica muito usada em investigação biológica, bioquímica, farmacêutica e médica.^{124,126,127,128}

A ionização por eletrospray possui características que fazem com que seja considerada uma técnica distinta das outras técnicas de ionização, tais como:

- Produz íons multiplamente carregados, com número de cargas elevadas, reduzindo, assim a razão m/z , de tal modo que seja possível analisar compostos de elevada massa molecular até centenas de kDa, em praticamente todo o tipo de analisadores;
- A amostra deve ser introduzida em solução, o que faz com que seja possível o acoplamento com muitas técnicas de separação;
- A fonte de ionização por eletrospray encontra-se à pressão atmosférica e a evaporação do solvente é muitas vezes completada por intermédio de um fluxo contra corrente de um gás, em geral, nitrogênio. Os íons gerados são depois transferidos desta zona de alta pressão para a zona de alto vácuo do analisador de massa. Portanto, a ionização por “eletrospray” envolve a formação de um “spray” eletrostático, a partir do qual são geradas pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons.^{124,125} A figura a seguir demonstra a saída dos íons pelo capilar do eletrospray indo em direção ao cone de amostragem.

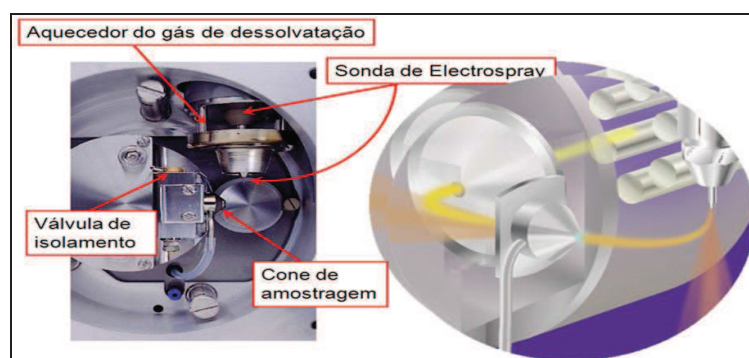


Figura 10. Demonstração do spray, com a passagem dos íons formados em direção ao cone (fonte: Manual de operações da Waters).

3.10.4. Tipos de íons formados na ionização por eletrospray

Diversos processos ocorrem na fonte de electrospray capazes de gerar íons sendo eles: reações ácido-base, complexação com cátions ou ânions e/ou reações redox.^{127,128} Dessa maneira é possível gerar três tipos de íons: íons moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas (íons *quasi*-moleculares) e moléculas cationizadas ou anionizadas. Para moléculas orgânicas com sítios ácidos ou básicos, a ionização em ESI geralmente ocorre através de reações ácido-base gerando íons moleculares protonados $[M+H]^+$ ou desprotonados $[M-H]^-$.^{126,128}

Embora a protonação e a desprotonação de uma substância sejam processos que ocorrem simultaneamente dentro do capilar, a extensão dos mesmos depende, dentre outros parâmetros, da estrutura da substância e do solvente. Substâncias que apresentam grupamentos básicos, principalmente aminas, amidas e ésteres, normalmente são analisadas no modo positivo, devido à facilidade com que as mesmas são protonadas. Por outro lado, substâncias contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, são mais facilmente desprotonadas e, conseqüentemente, são analisadas no modo negativo.¹²⁸

Por exemplo, o fármaco Ibuprofeno, de massa molar 206 g/mol, ao ser analisado no modo de ionização negativo apresenta seu íon molecular com a relação massa/carga (m/z) 205 devido ao processo de desprotonação (Figura 11).¹²⁴

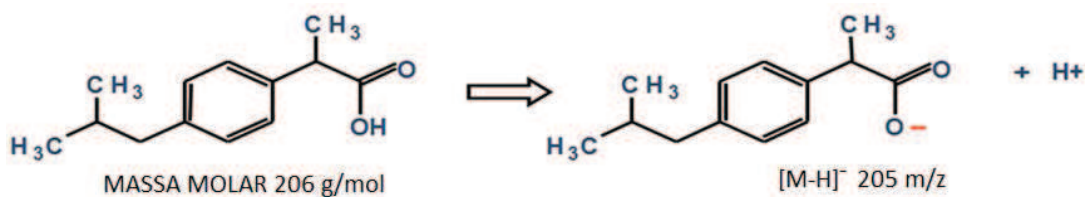


Figura 11 . Processo de desprotonação (modo negativo de ionização) do Ibuprofeno.

No modo positivo de ionização é adicionado um íon com carga positiva (H^+) na molécula, formando o íon molecular $[M+H]^+$. Exemplo: o fármaco Lidocaína de massa molar 234 g/mol, apresentará o íon m/z 235 (Figura 12).¹²⁴

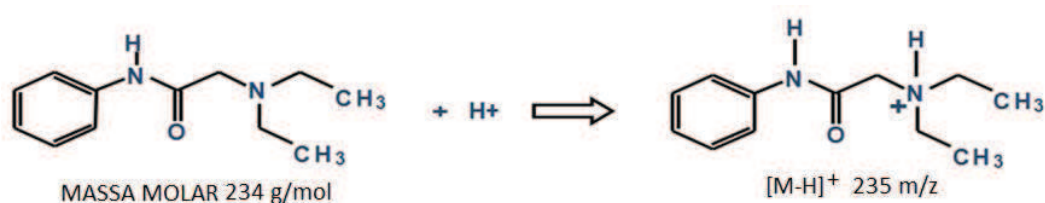


Figura 12 . Processo de protonação (modo positivo de ionização) da Lidocaína.

Nestas fontes de ionização, também pode ocorrer à formação de adutos entre os íons moleculares e Na⁺, K⁺, NH₄⁺, HCOO⁻ e CH₃COO⁻, que são espécies iônicas presentes na fase móvel provenientes dos modificadores adicionados a elas.^{26,125, 124, 127,128,126}

3.10.5. Analisador de massas triplo quadropolo

Os íons, após serem gerados na fonte de ionização, são separados pelo analisador de massas. Os analisadores dependem em geral da aceleração dos íons, por isso, a separação dos mesmos ocorre de acordo com a relação massa-carga (m/z), e não apenas em função de suas massas. As três principais características de um analisador são:

- Limite de massa: é o valor mais alto de massa que pode ser medido, é geralmente expresso em Daltons (Da) para um íon de carga unitária (z = 1);
- Transmissão: é a razão entre o número de íons que chegam ao detector e os íons produzidos na fonte;
- Resolução em massa: é a capacidade de produzir dois sinais distintos para dois íons com uma diferença de massa pequena ($R = m/\Delta m$).

O analisador de massas triplo quadropolo é uma inovação da técnica de espectrometria de massas, depois dos métodos brandos de ionização, chamado de Espectrometria de massas em “tandem” ou MS/MS, utilizada para identificar compostos desconhecidos, quantificar compostos conhecidos e auxiliar na elucidação estrutural de moléculas.^{124,26,53}

Para ser possível a análise em tandem, são necessários equipamentos apropriados que permitam o acoplamento de analisadores de massas, sendo as configurações mais comuns os triplos quadropolos (Q-Q-Q), que são equipamentos que apresentam três analisadores em sequência.

O primeiro analisador (MS1) seleciona o íon precursor que em seguida passa pelo segundo quadropolo chamado de cela de colisão, que é uma câmara adaptada para realizar a fragmentação do íon precursor. O modo mais comum de se obter fragmentos é através da

dissociação induzida por colisão (CID – *collision induced dissociation*). A cela de colisão é preenchida com um gás inerte, como argônio, onde os íons são acelerados pela aplicação de altos campos elétricos para uma região de alto vácuo no interior do segundo quadrupolo, que sofre repetidas colisões com o gás argônio, até ocasionar sua fragmentação, conduzindo à formação dos íons produto. Os fragmentos formados serão analisados pelo terceiro quadrupolo (segundo analisador - MS2) antes de chegar ao detector.^{9,26, 53,124,125, 126,127,128} A energia de colisão pode ser controlada através do ajuste de voltagem entre a fonte de íons e o segundo quadrupolo.¹²⁴

Para melhorar a eficiência no transporte de íons, alguns instrumentos foram construídos com um hexapolo adicionado antes do primeiro quadrupolo, logo após o cone de extração. Ou seja, os íons primeiro passam pelo hexapolo, em seguida passam por um pré-filtro e são direcionados ao primeiro quadrupolo¹²⁴, seguindo o processo normal descrito acima e demonstrado na figura a seguir.

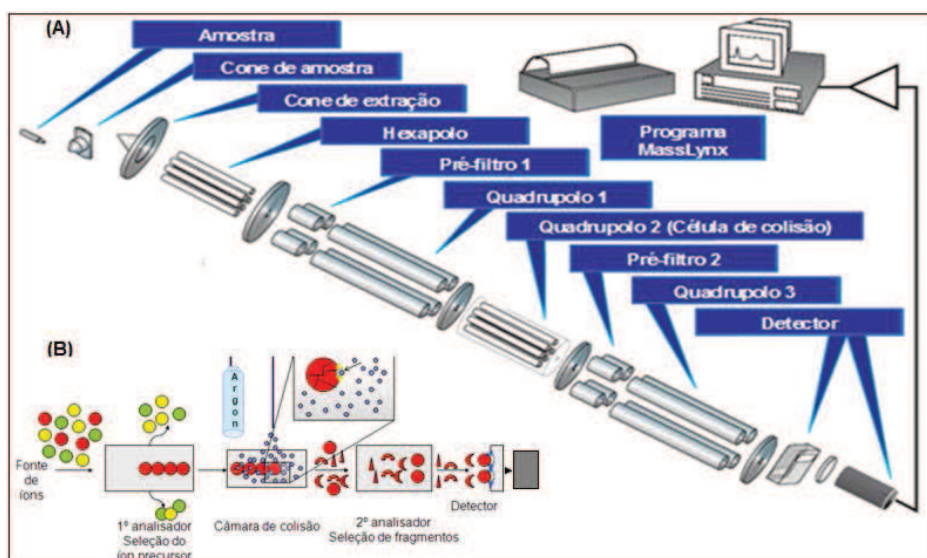


Figura 13. Representação esquemática de um analisador de massa com um hexapolo seguido de triplo quadrupolo preparado para *tandem-MS* (A) Triplo quadrupolo (B) Processo de seleção do íon precursor seguida de sua fragmentação (fonte: Manual de operações da Waters).

Os analisadores descritos anteriormente possuem as vantagens de possuir alta especificidade, precisão e exatidão, que torna possível a análise de misturas complexas, alta sensibilidade, principalmente no modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), tornando possível a quantificação de espécies em nível de traços.

A desvantagem do analisador de massas quadrupolo é a baixa resolução ($R= 3000-5000$) e o fato de ser limitado a dois estágios de análise de massas (MS^2), trabalhando com uma razão massa/carga menor que 4000.

Na EM é possível a aquisição de dados no modo SCAN (Varredura) utilizado para análise qualitativa e modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), utilizado para análises quantitativas. Para trabalhar neste último modo há necessidade do acoplamento do espectrômetro de massas com a cromatografia líquida (LC-MS/MS). O modo SCAN é ideal para obter informação estrutural dos compostos, mapa de fragmentação, diferenciação de isômeros e identificação de peptídeos, além disso, é utilizado para obter impressões digitais de amostras.

3.10.6. Detector

O detector mede a abundância de elétrons gerados pelos íons, para cada relação m/z . A maioria dos sistemas de MS usa algum tipo de multiplicador de elétrons como detector, combinado a um amplificador de sinal. O registro de todas as m/z detectadas durante a varredura constitui o espectro de massas. Ou seja, os detectores funcionam pela conversão dos feixes de íons em sinais elétricos, que podem ser armazenados e traduzidos em imagens.

O detector depende do tipo de analisador e no triplo quadrupolo são utilizados normalmente os detectores fotomultiplicador e o multiplicador de elétrons, sendo que o último, utilizado neste trabalho, possui o multiplicador de elétrons. O mesmo funciona pela emissão de elétrons secundários produzidos por dinodos quando os íons provenientes dos analisadores chocam-se a eles. Potenciais mais altos nos dinodos de conversão são utilizados para acelerar íons de massas altas e assim melhorar a sensibilidade.^{124,126}

3.10.7. Cromatografia líquida de Ultra performance acoplado a Espectrometria de Massas UPLC-MS/MS

O espectrômetro de massas com fonte de ionização eletrospray é extremamente compatível com a técnica de cromatografia líquida, pois combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade). O acoplamento dessas duas técnicas gera o sistema conhecido como LC-MS/MS.²⁶

Atualmente existe o sistema cromatográfico conhecido como UPLC (*ultra performance liquid chromatography*), que é a sofisticação do sistema CLAE (“high performance liquid chromatography”). Este sistema diminui o tempo e custo da análise, além de melhorar a qualidade dos resultados, permite que os cromatógrafos trabalhem com eficiências mais altas em uma variação mais ampla de velocidades lineares, taxas de fluxo e contrapressões.^{124,125,126,127}

O sistema LC-MS/MS não é ideal para identificação e sim separação dos compostos e quantificação. No entanto, a identificação de compostos é conseguida pelo uso de padrões analíticos, através da comparação dos tempos de retenção e obtenção de espectros de massas.¹²⁶ A coincidência de tempos de retenção entre o analito e o padrão não confirma a estrutura do analito.^{125,126,127} A confirmação estrutural pode ser obtida comparando os padrões de fragmentação e intensidade relativa dos íons com padrões analíticos ou com dados de banco de espectros.^{124, 126,127} A figura a seguir representa uma separação cromatográfica de uma amostra complexa, evidenciando a separação dos diferentes compostos presentes na amostra e seus respectivos espectro de massas, ou seja, os íons que geraram cada banda cromatográfica.

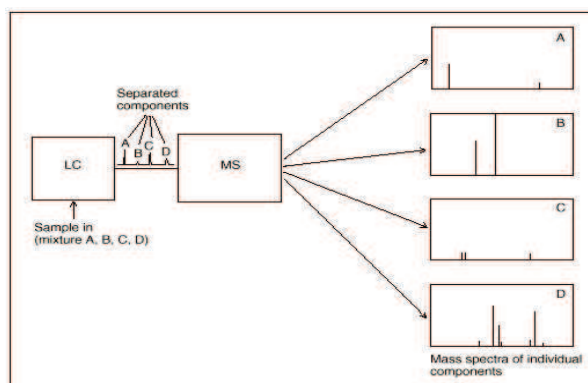


Figura 14. Separação cromatográfica e seu respectivo espectro de massas (<http://www.waters.com>).

A maioria dos estudos publicados com o uso da técnica de LC-MS/MS para análise de compostos orgânicos em mel ou própolis utiliza a fase móvel em modo gradiente de eluição, devido à complexidade da amostra estudada. Diversas fases móveis têm sido utilizadas, mas a mais comum é composta por sistemas binários contendo um componente aquoso e um solvente orgânico menos polar. Por exemplo, um método disponível para a análise de compostos fenólicos em mel é um gradiente de fase reversa usando como fase móvel uma solução aquosa de ácido fórmico e metanol.¹²

3.10.8. *Fingerprinting* de amostras complexas

O fingerprinting ou "impressão digital" é um gráfico da abundância relativa de íons em um feixe, em função de seus valores de m/z . Para um composto, seu espectro de massas é chamado de impressão digital da substância, pela inexistência de duas substâncias com o mesmo espectro de massa. Essa propriedade faz com que a identificação da substância presente na amostra seja considerada inequívoca e incontestável e é obtido no espectrômetro de massas no modo de análise conhecido como varredura (MS Scan).

Quando a amostra analisada é composta por uma mistura complexa de substâncias químicas, a impressão digital da amostra fornece íons moleculares dos compostos presentes na amostra e, portanto, dá informação qualitativa sobre sua composição química. Dessa forma, é possível a análise de um conjunto de amostras de forma rápida, possibilitando a avaliação de um grande e diferente número de compostos (íons m/z).

Na análise por impressões digitais não há necessariamente a intenção de identificar cada composto detectado, mas sim de comparar e classificar perfis que podem identificar substâncias discriminantes ou marcadoras de um determinado grupo de amostras. Neste trabalho analisaram-se diferentes amostras de mel de abelha *Apis mellifera* obtendo-se as respectivas impressões digitais, verificando os perfis dos compostos orgânicos presentes no mel, em busca de íons ou aspectos característicos do mel do Estado do Paraná que possam ser vinculados ao local de produção do mel.

Com o uso da ESI-MS e analisador triplo quadrupolo é possível obter as impressões digitais por infusão direta das amostras no espectrômetro de massas, sem nenhum método de separação. A impressão digital é obtida em questão de segundos para cada amostra em ampla faixa de relação m/z , onde cada impressão digital possui características próprias, proporcionando que esta técnica seja utilizada para análise qualitativa e exploratória de amostras. No geral, um estudo por impressão digital segue o esquema representado a seguir, sendo este o utilizado neste trabalho.

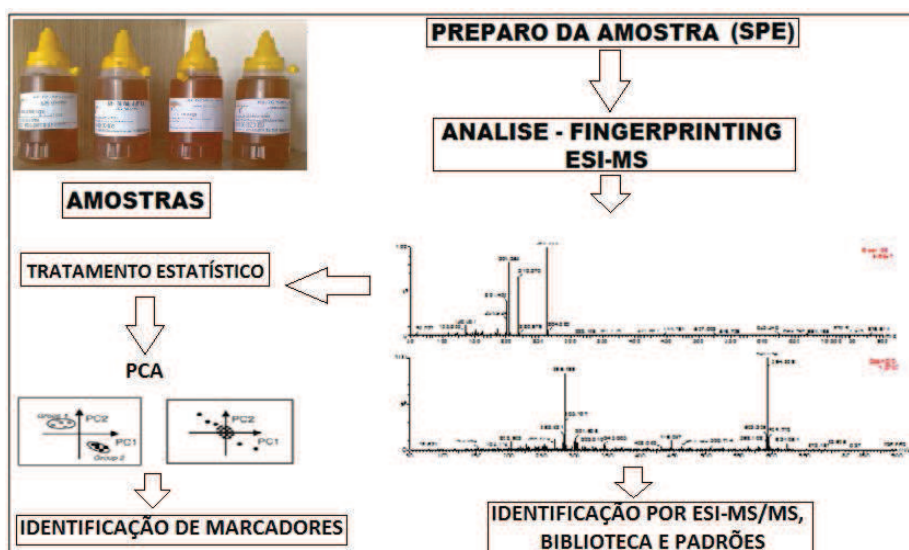


Figura 15. Esquema geral de análise por impressão digital.

Há muitos trabalhos na literatura com o uso da espectrometria de massas com fonte de ionização eletrospray para caracterização por impressões digitais dos mais variados produtos, como na análise de extrato de produtos naturais²³, vinho²⁴, própolis^{129,130}, uísque²¹, cerveja²², perfume.¹³¹

A ESI-MS por impressão digital foi utilizada para determinar os componentes principais de extratos de plantas, sendo possível através desta técnica detectá-los rapidamente, utilizando pequenas quantidades de amostra em baixas concentração das seguintes plantas investigadas: antocianinas (*Vaccinium myrtillus*), isoflavonas (Glicina, soja), flavonolglicosídeos e terpenos (*Ginkgo biloba*), triterpenos (*Centella asiatica*), cafeoil-quinóico ácidos (*Cinara scolimus*, alcachofra), ginsenosídeos (*Panax ginseng*), catequinas (*Camellia sinensis*, o chá verde) e flavonas e flavanonas (Própolis).²³

Um grupo de pesquisadores utilizou a espectrometria de massas com ionização por eletrospray em modo negativo para comparar amostras de própolis de abelhas *Apis mellifera* de diferentes regiões do Brasil com amostras de própolis das abelhas nativas, *Tetragonisca angustula* (jataí), com o objetivo de estabelecer a provável fonte vegetal para a própolis produzida pelas abelhas nativas. Foram analisados diversos extratos de plantas visitadas por essas abelhas.²⁷ Os resultados demonstraram que a composição química da própolis da *Apis mellifera* é dependente da região, enquanto que, a própolis de abelhas nativas mostra composição química constante, independente da região, e diferente de todas as amostras de própolis de *Apis mellifera*. Tal resultado sugere que as abelhas nativas da espécie *T. angustula*

retiram a resina para a produção da própolis de uma única fonte vegetal, sugerindo ser a *Schinus terebenthifolius*, conhecida como aroeira e comum em todo o território nacional.²⁷

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Obtenção das amostras de mel

Foram analisadas 82 amostras de mel de abelha *Apis mellifera* provenientes das regiões norte, nordeste, sul, centro-oeste, sudeste e do litoral do Paraná. Também foram analisadas três amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula angustula*) provenientes da mesorregião Oeste (Toledo, Cascavel e Nova Santa Rosa). As amostras foram adquiridas dos apicultores e comércios locais. A aquisição das amostras foi contínua desde Janeiro de 2011 a Março de 2012. Os méis foram devidamente armazenados em refrigerador a aproximadamente 8°C em embalagens de polietileno. Todas as amostras foram identificadas, transportadas e armazenadas sob o abrigo de luz e calor, até o momento das análises.

4.2. Reagentes e Soluções

Os seguintes padrões analíticos foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha): ácido caféico, ácido gálico, ácido vanílico, canferol, quercetina, ácido p-cumárico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido sinapínico, hesperitina, hesperidina, salangina. As soluções estoques dos padrões dos ácidos orgânicos foram preparadas na concentração de 100 µg/mL pela dissolução em água ultra-pura e metanol. As soluções foram conservadas sob refrigeração, a aproximadamente 2 °C e protegidas da luz. Todas as soluções foram filtradas através de membranas de 0,45 µm (Millipore) e degaseificadas antes da sua utilização.

Os demais reagentes utilizados foram: metanol - grau LC (Carlo Erba, Milão, Itália), ácido clorídrico 37%- PA, ACS (Merck, Darmstadt, Alemanha), hidróxido de amônio - ACS para análise (Carlo Erba, Milão, Itália), água ultra pura (Gehaka, Kansas City, KS, EUA). Para extração em fase sólida utilizaram-se cartuchos Strata-X (500mg/3mL) obtidos da Phenomenex.

4.3. Extração das Amostras

ETAPA 1 - Pré-tratamento das amostras de mel

Foram pesados 5 g de cada amostra de mel e dissolvidos em 20 mL de uma solução aquosa de ácido clorídrico de pH 2,0. Para completa dissolução, as soluções foram agitadas durante 5 minutos em agitador de tubos (Phoenix AP56) e em seguida filtradas com auxílio de funil de filtração e algodão para remoção de partículas sólidas.

ETAPA 2 - Extração dos compostos orgânicos em fase sólida

Para a remoção dos açúcares do mel e concentração dos compostos orgânicos utilizou-se a extração em fase sólida (SPE) em cartuchos Strata-X (500 mg/3mL) Phenomenex C₁₈. Os cartuchos foram acondicionados por lavagem com 6 ml de metanol grau LC, seguido de 6 mL de água ultrapura e 6 mL de uma solução aquosa de HCl pH 2,0. O processo de eluição foi auxiliado por centrifugação a 1000 rpm durante 1 min (Eppendorf 5810 R). A capacidade em volume dos cartuchos utilizados é de 3 mL. Portanto, para cada solução a eluição foi realizada por 3 vezes com volumes de 2 mL, totalizando 6 mL para cada eluente.

Os filtrados obtidos para as amostras de mel através do processo de clean-up (Etapa 1) foram aplicados nos cartuchos já equilibrados com a solução de HCl pH 2,0 e eluídos com 6 mL dessa mesma solução ácida. Em seguida, realizou-se a lavagem com 6 mL de água ultrapura, para remover todos os açúcares e outros constituintes polares presentes na amostra.

Os ácidos orgânicos absorvidos no cartucho foram eluídos com 6 mL de metanol grau LC. A solução resultante foi concentrada no concentrador líquido-líquido sob fluxo de nitrogênio com aquecimento em banho-maria a temperatura de 45 °C (Tecnal TE-0195), obtendo-se dessa maneira o extrato dos compostos orgânicos presentes no mel. As amostras foram todas extraídas em duplicatas e as impressões digitais por ESI(-)-MS foram obtidas para cada amostra de mel.

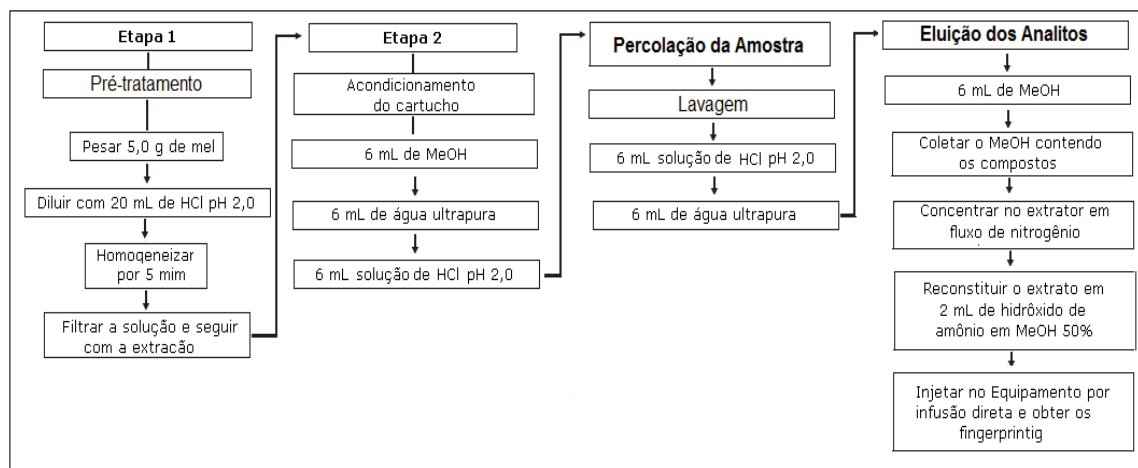


Figura 16. Fluxograma do processo de extração dos compostos orgânicos do mel.

4.4. Condições analíticas do espectrômetro de massas

As análises foram realizadas no laboratório do Centro de estudos Biofarmacêuticos – Biocinese, localizado em Toledo – PR, usando um espectrômetro de massas em tandem (ESI(-)-MS/MS) de Marca Waters - Quattro Premier XE (Waters, Milford, MA, USA), equipado com fonte de ionização ESI, analisador de massas triplo quadropolo, software MassLynx 4.1 e ionização electrospray em modo de ionização negativo (ESI-) com as seguintes condições de análise: gás do cone 100 L/hr, gás de dessolvatação (nitrogênio) 700 L/hr, voltagem do capilar -4,00 kV, voltagem do extrator 4 V, temperatura da Fonte 110 °C, temperatura de dessolvatação 400 °C, voltagem do cone variou entre -10 a -40 V e a energia do gás de colisão (argônio) variou de entre 10 a 40 V.

4.5. Obtenção dos ESI-MS e ESI-MS/MS das amostras e padrões analíticos

Para obtenção das impressões digitais ESI(-)-MS) os extratos foram reconstituídos em 2 mL de uma solução de hidróxido de amônio 0,5% v/v em metanol 50% v/v e injetados por infusão direta no espectrômetro de Massas com auxílio de seringa de volume de 250 µL (Harvard Apparatus, Natick, MA) em fluxo de 20 µL/min. Em seguida, os íons de maior intensidade (maior que 25%) foram selecionados e submetidos a colisão por argônio (CID) para obtenção dos ESI(-)-MS/MS.

Para a obtenção dos espectros dos padrões analíticos, preparou-se uma solução de 100 ng/mL em metanol 50% v/v de cada padrão que foram injetados por infusão direta no

equipamento, obtendo-se primeiramente os ESI(-)MS seguido dos ESI(-)MS/MS.

4.6. Condições para análise por UPLC-MS/MS

Para separar os compostos orgânicos foi usado um cromatógrafo líquido de ultra performance acoplado ao espectrômetro de massas em Tandem. As condições do espectrômetro de massa utilizada para as análises foram às mesmas citadas acima. Utilizou-se cromatógrafo líquido da marca Waters, sistema UPLC, modelo Acquity (Waters UPLC Acquity™ - Milford, MA, USA).

A coluna utilizada foi de marca Waters, Modelo Acquity UPLC® BEH, C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 mm). A eluição foi realizada em modo gradiente linear com fluxo de 0,25 µL/min, iniciando com uma proporção de 78% de uma solução aquosa de ácido fórmico 0,2 % v/v e 22% de metanol, mantendo-se essa condição por 3 minutos, iniciando um gradiente linear até 100% de metanol por 10 minutos. A condição final de 100% de metanol foi mantida por mais dois minutos e aos 16 minutos de corrida retornou-se a proporção inicial, mantendo até o fim da corrida que teve um tempo total de 26 min. As condições cromatográficas estão sumarizadas na tabela 02 e o gradiente utilizado na tabela 03.

Tabela 02. Condições cromatográficas para análise dos extratos de mel por UPLC-MS/MS

Condições Cromatográficas	
Sistema – Modelo - Fabricante	UPLC - Acquity – Waters
Deteção	Espectrometria de Massas
Fase móvel	Metanol: Ácido Fórmico 0,2%
Bomba A	Ácido Fórmico 0,2%
Bomba B	Metanol grau LC
Fase móvel: proporção	Gradiente Linear
Fluxo (mL/min)	0,25 mL/min
Temperatura do Auto Injetor	6 °C
Temperatura da Coluna	40 °C
Volume de Injeção	5 µL
Tempo total de corrida	26 minutos

Tabela 03. Gradiente linear do software MassLynx . 4.1

Gradiente					
Linearidade	Time (min)	Fluxo	%A	%B	Curva
1	Inicial	0,25	78.0	22.0	Inicial
2	3.0	0,25	78.0	22.0	6
3	10.0	0,25	00.0	100.0	6
4	12.0	0,25	00.0	100.0	6
5	16.0	0,25	78.0	22.0	6
6	26.0	0,25	78.0	22.0	11

4.7. Obtenção dos LC-MS/MS

Para confirmar os íons visualizados na ESI(-)-MS analisou-se por LC-MS/MS uma amostra de mel de Toledo (TO). A amostra foi extraída, transferida para o insert vial e posicionada no autoinjeter do equipamento para obter o cromatograma dos íons totais (TIC).

4.8. Análise quimiométrica

Para a comparação do perfil em compostos fenólicos das diferentes amostras de mel utilizou-se a Análise das Componentes Principais (PCA), utilizando o software Matlab&Simulink-R2006a.

Para tal, os objetos foram às amostras de mel e as variáveis os íons $[M-H]^-$ observados nas impressões digitais de cada amostra e que apresentaram intensidade superior a 25%. A PCA realizou-se com os dados brutos e baseada na matriz de covariância.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Extração dos compostos fenólicos do mel e desenvolvimento do método de análise por ESI(-)-MS e ESI(-)-MS/MS

O desenvolvimento de um método eficiente, seletivo e específico para análise de compostos fenólicos presentes no mel utilizando a técnica de ESI(-)-MS/MS depende muito da otimização do método de extração e das condições experimentais do espectrômetro de massa, pois ambos influenciam significativamente na obtenção do resultado final.

Para as análises das amostras de mel usou-se um espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo e fonte de ionização eletrospray em modo varredura. Para a ionização dos compostos foram testados dois modos de ionização: o modo positivo através do qual são gerados íons protonados que podem ser representados como $[M+H]^+$ e o modo negativo que provoca a desprotonação da molécula gerando íons representados como $[M-H]^-$.

A intensidade do sinal e a resolução dos picos na faixa de massa de 100 a 1000 m/z foram os critérios utilizados para a escolha entre os modos de ionização. Como não se observaram íons intensos acima de 650 m/z a faixa de trabalho utilizada foi de 100 a 650 m/z. A ionização em modo negativo demonstrou melhores resultados, pois apresentou maior sensibilidade, sem qualquer evidência de formação de adutos, o que facilita a interpretação do espectro de fragmentação e a determinação estrutural.^{42,57}

A melhor ionização em modo negativo também pode ser explicada pelo fato de a maioria dos compostos conterem grupos ácidos fenólicos em sua estrutura química, que se ionizam mais facilmente em modo negativo, ou seja, são mais facilmente desprotonados.^{42,57} O modo negativo também é reportado como o modo de ionização que fornece maior sensibilidade para a detecção de flavonóides e ácidos fenólicos.²⁵

Além do modo de ionização, otimizaram-se outros parâmetros, como temperatura da fonte, fluxo dos gases nitrogênio e argônio, energias do cone, do capilar e energia de colisão. Estes parâmetros são determinantes na sensibilidade; intensidade sinal/ruído dos íons e número de íons fragmentos observados.

A otimização dos parâmetros instrumentais para a detecção foi efetuada pela infusão direta de uma solução de 100 ng/mL em metanol 50% v/v de cada padrão analítico, com vazão de 20 μ L/min. O objetivo foi obter as impressões digitais com a melhor relação sinal/ruído e resolução tanto para os íons principais como para os íons fragmentos, sendo que

a energia de cone e colisão aplicada para fragmentação dos íons foi conforme necessidade, pois alguns necessitam energias maiores ou menores para sofrerem fragmentação.

O principal problema na análise de compostos fenólicos em mel é o elevado teor de açúcares, dificultando a extração e recuperação dos analitos da matriz. Como a técnica de ESI(-)-MS é muito sensível, exige um clean-up muito eficiente e específico da amostra, pois a presença de qualquer interferente será detectada, podendo ocorrer contaminação e saturação do equipamento com os açúcares e demais impurezas presente no mel.

Desta forma, baseando-se nos diferentes tipos de pré-tratamentos de amostras de mel relatados na literatura para análise de compostos fenólicos, testou-se a extração líquido-líquido com os solventes éter etílico e acetato de etila e a extração em fase sólida com três diferentes cartuchos, o Spe-ed TM C18/18 (500 mg/3mL), OASIS HLB cartridge (Waters 500 mg/3mL- C₁₈) e Strata-X (Phenomenex 500 mg/3mL- C₁₈).

A avaliação dos resultados do pré-tratamento foi qualitativa e monitorada por ESI(-)-MS tendo em conta a melhor eliminação dos açúcares do mel e ainda a detecção dos compostos fenólicos. A extração líquido-líquido foi demorada, pois foi utilizada uma grande quantidade de amostra e principalmente, de solvente orgânico. A principal desvantagem da extração líquido-líquido foi falta de seletividade, pois as impressões digitais apresentaram muitas interferências que possivelmente são dos açúcares e outros constituintes do mel que não são de interesse neste trabalho. Desta forma o método de pré-tratamento mais seletivo e que foi empregado neste trabalho foi a SPE utilizando os cartuchos da Strata-X.

A natureza do solvente utilizado e o pH são igualmente importantes na geração de íons positivos e negativos.⁵⁷ Portanto, para uma boa ionização das moléculas também é necessário utilizar um modificador iônico. O modificador adicionado à solução de diluição da amostra após a extração e/ou à fase móvel tem a função de auxiliar na ionização das moléculas. Como o modo de ionização utilizado foi o negativo, testaram-se várias bases: acetato de amônio, hidróxido de amônio e formiato de amônio. A base que melhor promoveu a desprotonação dos compostos ácidos do mel, resultando em bom sinal analítico para os íons, foi o hidróxido de amônio 0,5% v/v em metanol 50% v/v.

Após a extração dos ácidos orgânicos do mel e otimização das condições analíticas do espectrômetro de massas, analisaram-se todas as amostras obtendo as impressões digitais para cada amostra por ESI(-)-MS. Os íons [M-H]⁻ com intensidade superior a 25% foram selecionados e submetidos à colisão em CID por argônio para obtenção de seus fragmentos principais por ESI(-)-MS/MS.

A partir da comparação dos espectros obtidos com dados da literatura ou pela análise

de padrões foi possível a identificação de nove íons $[M-H]^+$, e com o objetivo de confirmar a identidade desses íons obtidos desenvolveu-se um método por LC-MS/MS. O método detectou os íons principais, fornecendo os padrões de fragmentação e separação cromatográfica em um intervalo de 26 min com alta intensidade e seletividade.

5.2. Análise classificatória do mel produzido no Estado de Paraná baseada na impressão digital ESI(-)-MS e análise multivariada

As amostras de mel adquiridas e analisadas neste trabalho são representativas do mel produzido no Estado do Paraná, tendo sido incluídas na amostragem todas as mesorregiões paranaenses. Na figura 17 estão destacados em amarelo os municípios de origem do mel que foram considerados neste estudo. Na tabela 04 estão descritos os municípios de acordo com suas mesorregiões de origem e siglas utilizadas para a identificação das amostras.

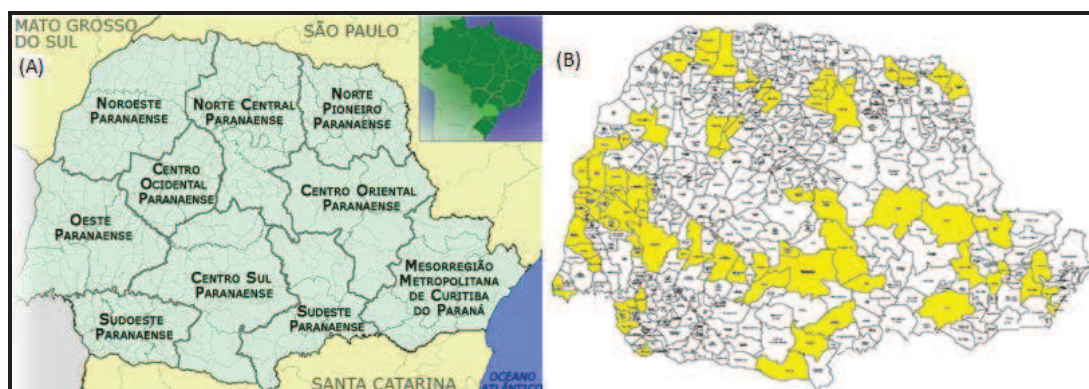


Figura 17. Mapa do Estado do Paraná com destaque para as mesorregiões (A) e municípios (B) de onde amostras de mel foram analisadas neste estudo (mapa adaptado de www.sites-do-brasil.com).⁴³

O processo de aquisição das amostras teve duração de um ano e dois meses, devido a o grande número de amostras analisadas e por ser necessária a aquisição de amostras produzidas em diversas regiões do Estado. Por esse motivo, as amostras são das várias estações do ano, apresentando colorações que variaram de clara, dourado e escuro, mas a predominância era de amostras de cor clara, consideradas como sendo de melhor qualidade.⁵⁴

Sabe-se que a cor do mel está relacionada com sua origem floral, processamento, armazenamento, fatores climáticos durante o fluxo de néctar, temperatura na qual o mel amadurece na colméia, entre outros fatores.^{23,25,54-56} Como algumas amostras neste trabalho foram adquiridas nos comércios locais, há informações impossíveis de serem levantadas.

Algumas embalagens traziam a classificação do mel como polifloral ou silvestre. Também a declaração dos apicultores em relação à origem floral das amostras é intuitiva, devido à diversidade da flora nativa, tornando-se difícil afirmar com certeza a florada predominante do mel sem uma análise polínica.

Tabela 04. Relação de Municípios do Paraná de onde amostras de mel de *Apis mellifera* foram adquiridas

Município	Sigla	Microrregião
Mesorregião - Oeste		
Assis chateubrinde	AC	Toledo
Entre Rios do Oeste	ERO	Toledo
Foz do Iguaçu	FI	Foz do Iguaçu
Guaira	GA	Toledo
Marechal Cândido Rondon	MCR	Toledo
Máripa	MP	Toledo
Ouro Verde do Oeste	OO	Toledo
Palotina	PA	Toledo
Pato Bragado	PB	Toledo
Terra Roxa	TR	Toledo
Cascavel	CA	Cascavel
Jesuítas	JS	Toledo
Missal	ML	Foz do Iguaçu
Nova Santa Rosa	NSR	Toledo
Medianeira	MD	Foz do Iguaçu
Quatro pontes	QP	Toledo
Santa Helena	SH	Toledo
Toledo	TO	Toledo
Mercedes	ME	Toledo
Guaraniaçu	GU	Cascavel
Ibema	IA	Cascavel
Santa Tereza do oeste	STO	Cascavel
Brasiliana	LB	Toledo
Tupãssi	TS	Toledo
Mesorregião - Norte Central		
Arapongas	AS	Apucarana
Manoel Ribas	MR	Ivaiporã
Maringá	MA	Maringá
Cândido de Abreu	CU	Ivaiporã
Mandaguaiçu	UM	Astorga
Cambé	CE	Londrina
Londrina	LD	Londrina
Ibiporã	IP	Londrina
Rôlandia	RD	Londrina

Continuação da Tabela 04. Relação de Municípios do Paraná de onde amostras de mel de *Apis mellifera* foram adquiridas

Município	Sigla	Microrregião
Mesorregião - Noroeste		
Altônia	AA	Umuarama
Guairaçá	GR	Paranavaí
Paranavaí	PI	Paranavaí
Pérola	PE	Umuarama
Terra Rica	TA	Paranavaí
Cianorte	CN	Cianorte
Jussara	JA	Cianorte
Loanda	LO	Paranavaí
Umuarama	UA	Umuarama
Nova Esperança	NA	Astorga
Município Sigla Microrregião		
Mesorregião - Centro Sul		
Campina do Simão	CS	Guarapuava
Guarapuava	GÇ	Guarapuava
Palmas	PS	Palmas
Candói	CI	Guarapuava
Cantagalo	CG	Guarapuava
Laranjeira do sul	LS	Guarapuava
Santa Maria do Oeste	SMP	Pitanga
Nova Laranjeira	NL	Guarapuava
Mesorregião - Sudoeste		
Barracão	BO	Francisco Beltrão
Pérola do Oeste	PO	Capanema
Planalto	PT	Capanema
Pranchita	PR	Capanema
Barra Grande	MG	Capanema
Realeza	RA	Capanema
Mesorregião - Centro Ocidental		
Araruna	AR	Campo Mourão
Terra Boa	TB	Campo Mourão
Mesorregião - Metropolitana de Curitiba		
Antonina	AI	Paranaguá
Curitiba	CB	Curitiba
Paranaguá	PG	Paranaguá
Campo Largo	CL	Curitiba
Cerro Azul	CZ	Cerro Azul
Lapa	LA	Lapa
Colombo	CO	Curitiba
Matinhos	MO	Paranaguá
Marcondes	MS	Curitiba
Morretes	MT	Paranaguá
Mesorregião - Sudeste		
Bituruna	BA	União da vitória
Cruz Machado	CM	União da vitória
Irati	II	Irati
Prudentópolis	PD	Prudentópolis
Prudentópolis Lixeira	PL	Prudentópolis
Barra Mansa	BM	Prudentópolis
Prudentópolis Relógio	PU	Prudentópolis

Continuação da Tabela 04. Relação de Municípios do Paraná de onde amostras de mel de *Apis mellifera* foram adquiridas.

Município	Sigla	Microrregião
Mesorregião - Centro Oriental		
Castro	CT	Ponta Grossa
Tibagi	TI	Telêmaco Borba
Mesorregião - Norte Pioneiro		
Bandeirantes	BS	Cornélio Procópio
Jacarezinho	JO	Jacarezinho
Ribeirão Claro	RC	Jacarezinho
Santa Mariana	SM	Cornélio Procópio

Para verificar a possível relação entre o perfil de compostos fenólicos dos méis oriundos do Estado do Paraná e a região geográfica de produção do mel, informação que poderia auxiliar na rastreabilidade do mesmo, foi utilizada a análise multivariada. Os espectros de impressões digitais obtidos para as 82 amostras de mel foram examinados quanto aos íons presentes e suas intensidades relativas. Foram selecionados 20 íons que tiveram suas intensidades relativas registradas para cada amostra de mel: m/z 163, 169, 179, 199, 201, 255, 263, 285, 299, 319, 333, 339, 361, 363, 383, 399, 443, 447, 529 e 595. Esses dados formaram a matriz para a análise das componentes principais constituída por 20 variáveis (colunas) e 82 amostras (Linhas).

A análise por PCA foi aplicada neste trabalho com a finalidade de reduzir a dimensionalidade dos dados e fornecer uma melhor visualização dos agrupamentos das amostras e desta forma verificar a relação das mesmas com suas respectivas mesorregiões. Isso principalmente devido ao número elevado de amostras de mel consideradas no estudo e sua complexidade química evidenciada pelo grande número de íons presentes nas impressões digitais, os quais são muito difíceis de serem avaliados individualmente pela simples inspeção visual.

Os dados gráficos foram gerados empregando a matriz de covariância (Figura 18). Os resultados da PCA demonstraram que as seis primeiras componentes principais explicaram mais de 70% da variância dos dados. A PC1 e a PC2 juntas capturaram mais de 40% da variância total. Através da análise dos scores para as duas primeiras PCs, as amostras foram classificadas em cinco grupos. Os agrupamentos observados mostraram-se, com algumas exceções, intimamente relacionados com as mesorregiões de origem dos méis.

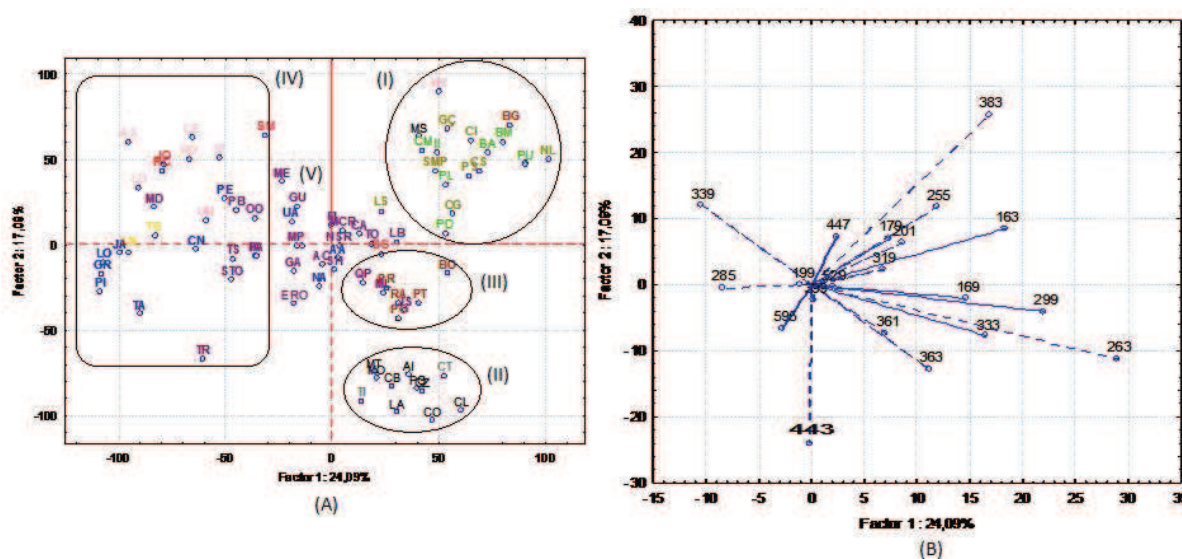


Figura 18. Análise das componentes principais para as amostras de méis oriundas de diversas regiões paranaenses considerando os dados obtidos por ESI(-)-MS: (A) Projeções das amostras e (B) Projeções das variáveis no plano formado pela PC1 e PC2.

Grupo I: Mesorregiões do Centro Sul e Sudeste do Paraná

O gráfico de escores mostra uma separação nítida entre os grupos I, II, III e IV enquanto que, as amostras do grupo V localizadas próximas da origem, apresentam características intermediárias.

O grupo I é formado principalmente por méis produzidos nas mesorregiões Centro Sul e Sudeste (figura 19) que possuem clima subtropical, chuvoso e as temperaturas mais frias do estado. Também é importante destacar a predominância de Araucárias em ambas as mesorregiões. Neste estudo foram analisadas 8 amostras do Centro Sul e 7 do Sudeste e todas as amostras classificaram-se neste grupo de acordo com a semelhança de seus íons $[M-H]^-$ mais intensos o que demonstra perfis semelhantes em ácidos orgânicos.

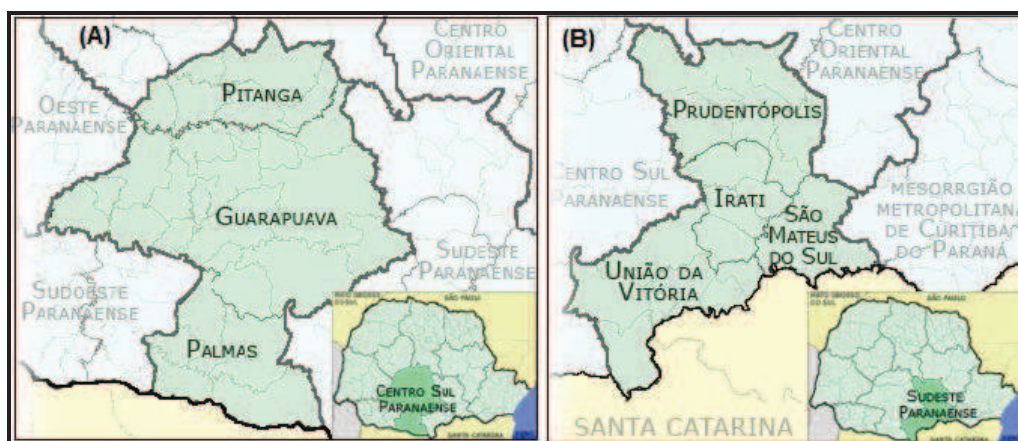


Figura 19. Mapa representando as mesorregiões (A) Sul (B) Sudeste (mapa adaptado de www.sites-do-brasil.com).³⁰

A particularidade mais notável do ESI(-)-MS do Grupo I é a presença do íon m/z 255, observado em todas as amostras do grupo com alta intensidade. Os íons m/z 163 e 383 também são importantes neste grupo, pois os mesmos estão presentes em todas as amostras com alta intensidade (a partir de 60 a 100%), sendo este o grupo em que o íon m/z 383 mais se destacou. Outra característica importante é a ausência do íon m/z 285 para todas as amostras do grupo.

O grupo I é constituído por 19 amostras (Tabela 05), sendo 4 amostras consideradas como exceções por pertencerem a outras mesorregiões, sendo elas os municípios de: Marcondes (MS) de origem da mesorregião Metropolitana, Cândido de Abreu (CU) e Manoel Ribas (MR) do Norte Central e Barra Grande (BG) do Sudoeste do estado paranaense. Essas amostras pontuais classificaram-se no Grupo I por apresentarem espectros ESI(-)-MS semelhantes aos mostrados na figura 20, principalmente quanto à intensidade do íon com m/z 255.

Tabela 05. Resumo das amostras de mel classificadas no Grupo I e seus íons característicos.

Mesorregião Sul	Sigla	Mesorregião Sudeste	Sigla	Exceção	Sigla	Íons Principais (m/z)
Campina do Simão	CS	Prudentópolis	PD	Mesorregião Norte central		163, 169, 179, 199, 201, 255 , 263, 299, 333, 361, 363, 383 e 447
Guarapuava	GÇ	Prudentópolis Relógio	PU	Candido de Abreu	CU	
Palmas	PS	Prudentópolis Lixeira	PL	Manoel Ribas	MR	
Candoí	CI	Bituruna	BA	Mesorregião Metropolitana		
Cantagalo	CG	Cruz Machado	CM	Marcondes	MS	
Laranjeira do sul	LS	Irati	II	Mesorregião Sudoeste		
Nova Laranjeira	NL	Barra Mansa	BM	Barra Grande	BG	
Santa Maria	SMP					

A mesorregião Sudoeste e Norte central fazem divisa com a mesorregião Sul, já a mesorregião Metropolitana faz divisa com a mesorregião Sudeste, desta forma estas mesorregiões apresentam fonte floral, clima e relevo semelhantes, em grande parte, principalmente nas áreas de divisa, classificando-as no mesmo grupo de acordo com a composição de compostos orgânicos.

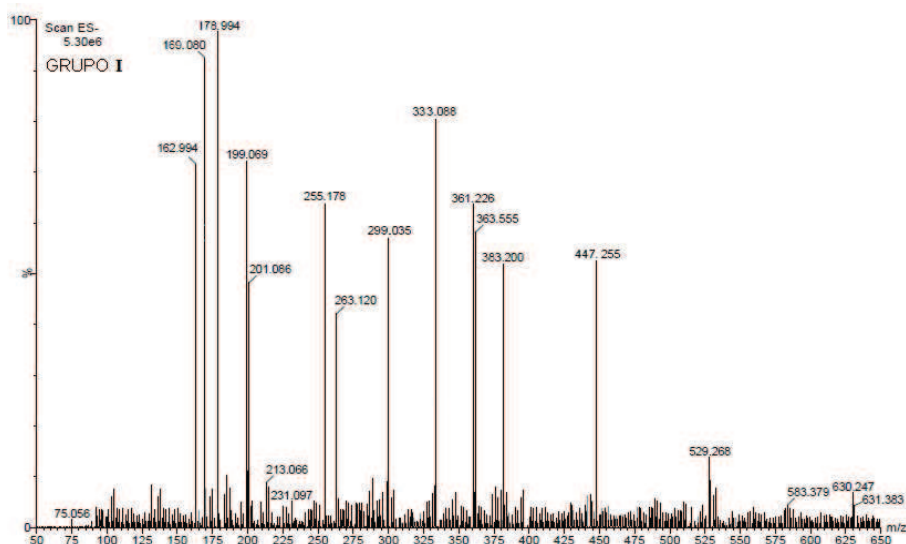


Figura 20. Impressão digital obtida por ESI(-)-MS para amostra de mel de Guarapuava classificada no grupo I.

Grupo II: Mesorregiões Metropolitana de Curitiba e Centro Oriental do Paraná

O grupo II é formado pelas amostras de origem nas mesorregiões Metropolitana e Centro Oriental (Figura 21) e pode ser visualizado tanto no plano formado pela PC1 e PC2 (Figura 22) como pela PC2 e PC3 (Figura 23). Foram analisadas 10 amostras da mesorregião Metropolitana de Curitiba e 2 do Centro Oriental e somente a amostra de Marcondes de origem Metropolitana não classificou-se neste grupo, devido a apresentar o íon m/z 255 com boa intensidade característico do grupo I. As localizações geográficas dessas duas mesorregiões estão demonstradas nos mapas da figura a seguir.



Figura 21. Mapa representando as mesorregiões (A) Centro Oriental (B) Metropolitana (mapa adaptado de www.sites-do-brasil.com)³⁰

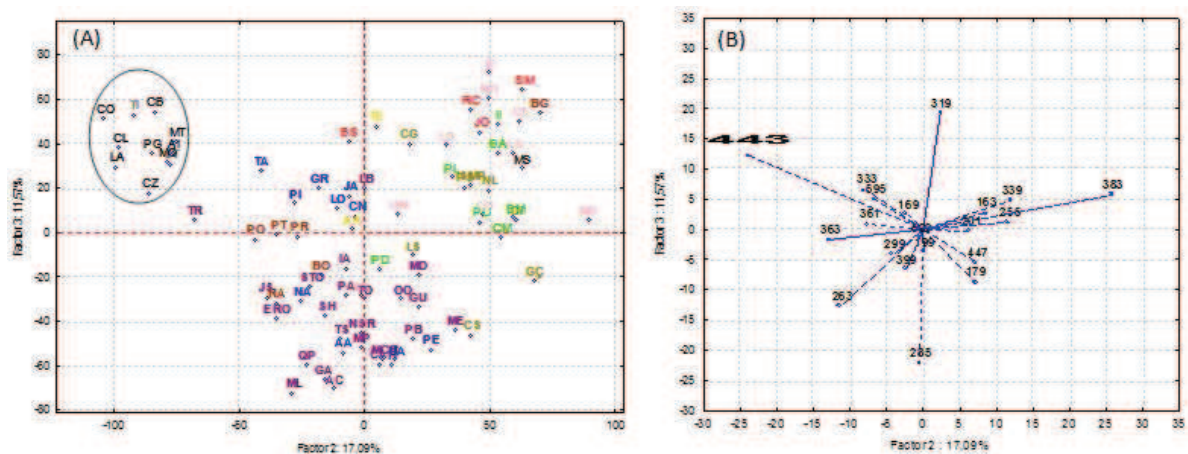


Figura 22. Análise das componentes principais para as amostras de méis oriundas de diversas regiões paranaenses considerando os dados obtidos por ESI(-)-MS: (A) Projeções das

amostras e (B) Projeções das variáveis no plano formado pela PC2 e PC3.

O Grupo II tem como particularidade a presença do íon m/z 443 com alta intensidade (acima de 70%) para todas as amostras do grupo. A presença, com intensidade média, do íon m/z 319 em todas as amostras também é uma característica deste grupo (Figura 05), visto que a observação do íon m/z 319 nas amostras de méis dos outros grupos não é constante. Ainda o grupo II tem como diferencial a ausência dos íons m/z 255, 285, 339, 383, 399 e 529 para todas as amostras do grupo, ou seja, estão ausentes 6 íons que ocorrem nos demais grupos, conforme a Tabela 06 com destaque em negrito para os dois íons mais importantes do grupo.

Apenas os méis do grupo III, apresentado a seguir, também não mostraram os íons m/z 255 e 339.

Tabela 06. Resumo das amostras de mel classificadas no Grupo II e seus íons característicos.

Mesorregião Metropolitana Curitiba	Sigla	Mesorregião Centro Oriental	Sigla	Íons Principais (m/z)
Antonina	AI	Castro	CT	163, 169, 179, 199, 201, 263, 299, 319 , 333, 361, 363, 443 , 447
Cerro Azul	CZ			
Campo Largo	CL			
Lapa	LA	Tibagi	TI	
Colombo	CO			
Curitiba	CB			
Matinhos	MO			
Morretes	MT			
Paranaguá	PG			

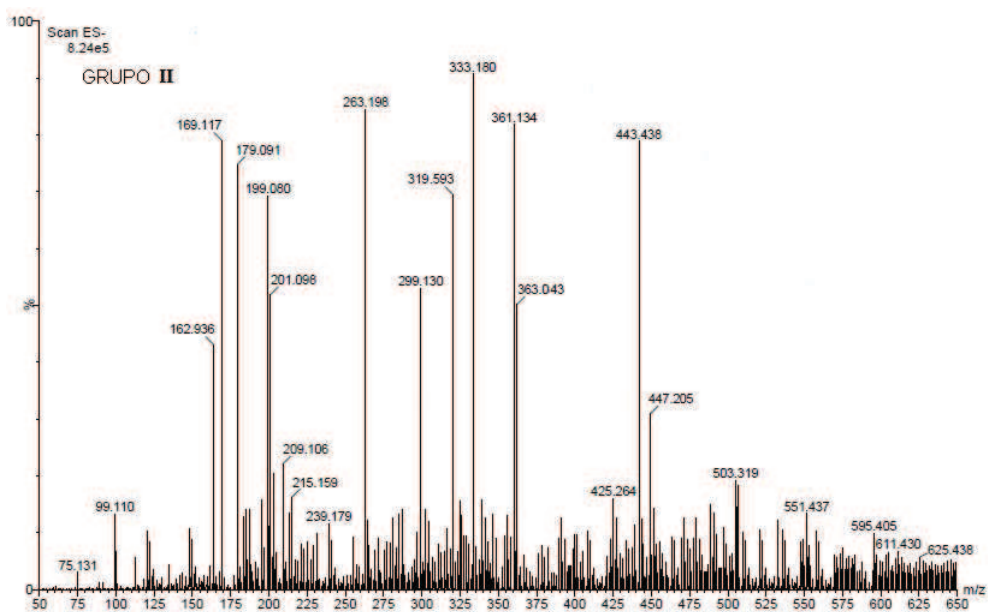


Figura 23. Impressão digital obtida por ESI(-)-MS para amostra de mel de Curitiba

classificada no grupo II.

Grupo III: Mesorregião Sudoeste do Paraná

O grupo III contém apenas 8 amostras de mel sendo 5 méis oriundos da mesorregião Sudoeste (Figura 24). Foram analisadas 6 amostras desta mesorregião e 5 foram classificadas pela PCA neste grupo de acordo com a semelhança de seus espectros de ESI(-)-MS. O clima nesta mesorregião é subtropical, chuvoso tendo verões mais quentes. A vegetação é caracterizada pela floresta e as Araucárias, porém essas em menor extensão que a observada nas mesorregiões centro sul, sudeste e metropolitana.



Figura 24. Mapa representando a mesorregião Sudoeste (mapa adaptado de www.sites-do-brasil.com)³⁰

Todas as amostras do grupo III apresentaram íons em m/z 163, 169, 179, 199, 201, 263, 299, 333, 361, 363 e 447. Dentre esses íons, os de m/z 201 e m/z 199 ocorrem em todas as amostras de méis paranaenses analisadas neste estudo e também os íons m/z 163, 169 e 179 têm distribuição ampla, ausentes apenas em amostras pontuais de mel.

Por outro lado, o íon m/z 255, característico do grupo I, e o íon 339 estão ausentes para todas as amostras deste grupo, conforme pode ser verificado na Tabela 07.

A semelhança entre os méis da região sudoeste foi bem capturada pela PC5 e PC6 (Figura 25). No gráfico de pesos da Figura 25B se destaca o íon m/z 399 que está presente em 6 méis do grupo, exceto na amostra de Jesuítas e Quatro Pontes do Oeste do Estado. O íon m/z 399 não ocorre constantemente em méis de outras mesorregiões o que poderia indicar esse íon como característico da região sudoeste, porém para confirmar essa observação, um

número maior de amostras dessa mesorregião deve ser incluído no estudo. A figura 26 representa o espectro de massa para o grupo III.

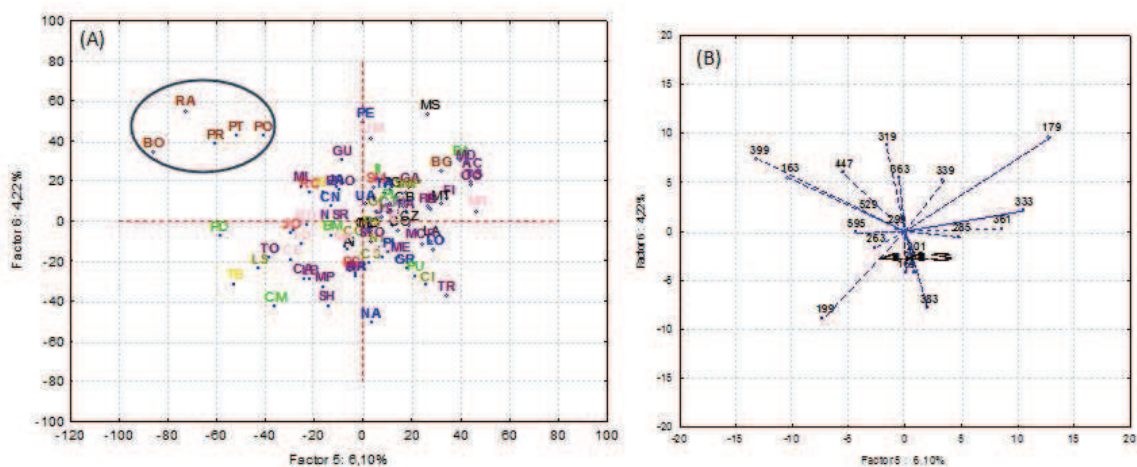


Figura 25. Análise das componentes principais para as amostras de méis oriundas de diversas regiões paranaenses considerando os dados obtidos por ESI(-)-MS: (A) Projeções das amostras e (B) Projeções das variáveis no plano formado pela PC5 e PC6.

Tabela 07. Resumo das amostras de mel classificadas no Grupo III e íons característicos.

Mesorregião Sudoeste	Sigla	Exceção Mesorregião Oeste	Sigla	Íons Principais (m/z)
Planalto	PT	Quatro Pontes	QP	163, 169, 179, 199, 201, 263, 299, 333, 361, 363, 399 , 443 e 447
Pranchita	PR	Missal	ML	
Realeza	RA			
Barracão	BO	Jesuíta	JS	
Pérola do Oeste	PO			

A mesorregião Oeste faz divisa com a mesorregião Sudoeste e ambas apresentam o Clima *Cfa*, com vegetação em maior parte de floresta tropical e ficam localizadas no segundo planalto. Portanto, essa semelhança de clima, vegetação e relevo entre essas duas mesorregiões provavelmente é responsável pela composição química desses méis.

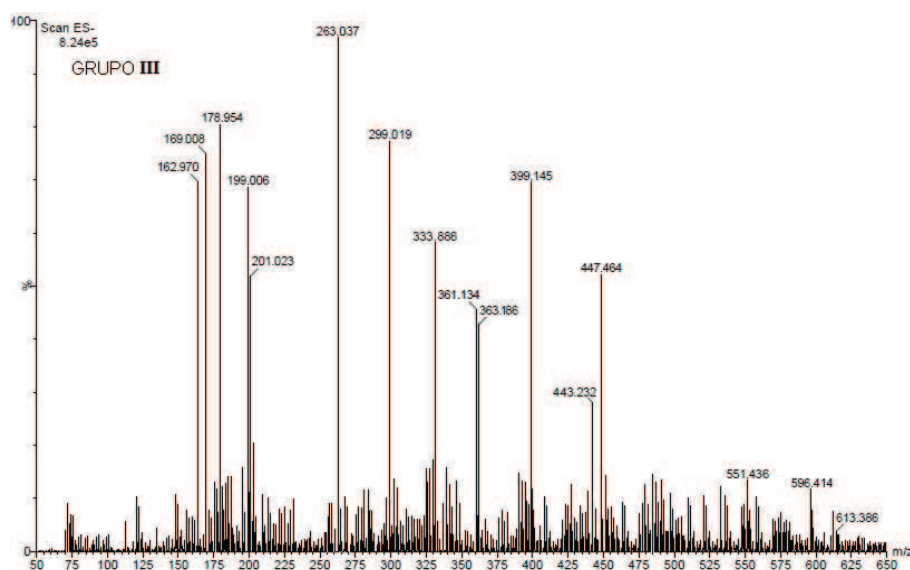


Figura 26. Impressão digital obtida por ESI(-)-MS para amostra de mel de Pérola do Oeste classificada no grupo III.

Grupo IV: Mesorregiões Norte Central, Noroeste, Norte Pioneiro, Oeste e Centro Ocidental do Paraná

O grupo IV é formado por 5 mesorregiões, e estas têm em comum as temperaturas médias mais altas do Estado do Paraná e altitudes mais baixas, pois as temperaturas têm relação com a latitude, devido as massas de ar quente normalmente avançarem de Norte/Noroeste, e com a altitude, visto que, quanto maior a altitude, mais frio, e vice-versa. Sendo este provavelmente o motivo pelo qual essas mesorregiões se agruparam, considerando que possivelmente apresentam as mesmas fontes florais fornecendo uma composição fitoquímica semelhante. As localizações geográficas dessas mesorregiões estão representadas nos mapas da figura 27, exceto a mesorregião Oeste que está representada na figura 30. A vegetação nessas mesorregiões também apresenta como característica comum a predominância da floresta tropical.

O grupo IV, no eixo negativo da PC1, é o maior grupo formado pela PCA (Figura 28) contendo 26 amostras de méis das mesorregiões Norte Central (7), Noroeste (7), Norte Pioneiro (3), Oeste (7) e Centro Ocidental (2) (Tabela 08), sendo que o número de amostras analisadas por mesorregiões foram: 9 amostras do Norte Central; 10 do Noroeste; 4 do Norte Pioneiro; 24 do Oeste e 2 do Centro Ocidental.

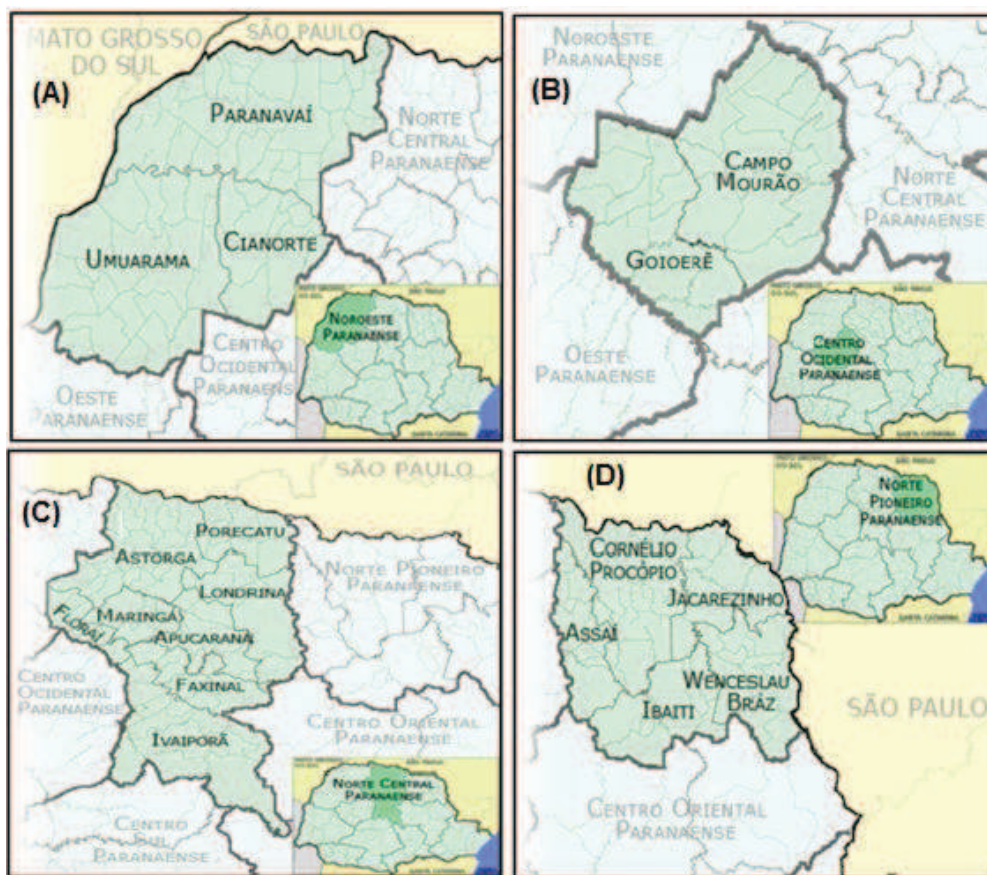


Figura 27. Mapas das Messorregiões: (A) Noroeste (B) Centro Ocidental (C) Norte Central (D) Norte Pioneiro (mapa adaptado de www.sites-do-brasil.com)³⁰

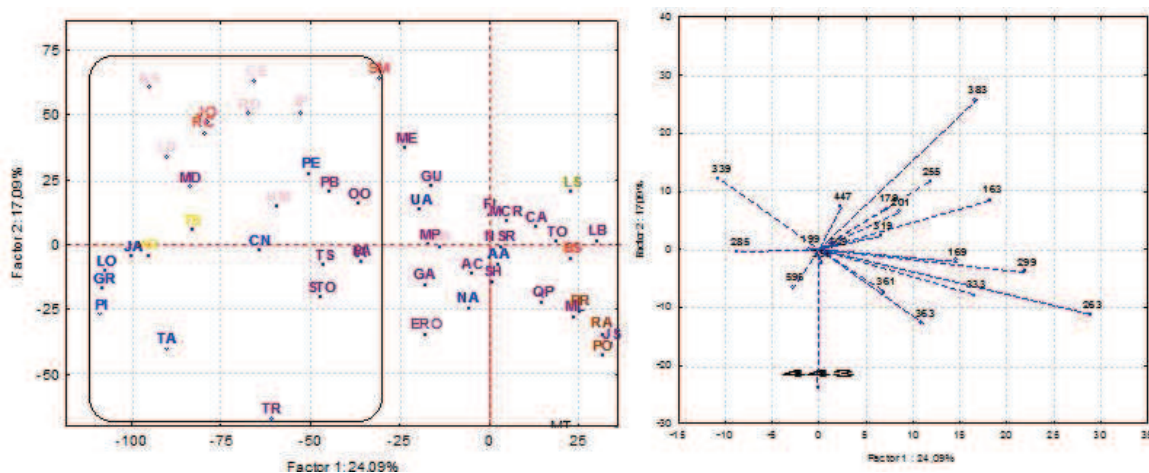


Figura 28. Ampliação do Plano formado pela PC1 e PC2 evidenciando o Grupo IV.

Os méis do grupo IV apresentaram o íon m/z 339 com boa intensidade, sendo este

característico deste grupo. Apresenta ainda o íon m/z 285 em 70% das amostras, também com boa intensidade. Já o íon m/z 595 está presente em algumas amostras, mas é o grupo que mais apresenta este íon. O íon m/z 163 está presente nestas amostras com baixa intensidade, sendo que o mesmo apresentou-se nos demais grupos com alta intensidade. No entanto, neste grupo ocorreu muita variação dos íons, ou seja, somente os íons m/z 169,199, 201 e 447 estão presentes para todas as amostras (Figura 29). A mesorregião do Oeste paranaense é a que teve um maior número de amostras analisadas, sendo que 7 méis do total de 24 pertencentes à mesorregião oeste, encontram-se no Grupo IV.

Tabela 08. Resumo das amostras de mel classificadas no Grupo IV e íons característicos.

Município Mesorregião Oeste	Sigla	Município Mesorregião Norte Central	Sigla	Município Mesorregião Noroeste	Sigla	Município Mesorregião Norte Pioneiro	Sigla	Município Mesorregião Centro Ocidental	Sigla	Íons Principais (m/z)
Sta Tereza do Oeste	STO	Arapongas	AS	Terra Rica	TA	Sta Mariana	SM	Araruna	AR	163, 169, 179, 199, 201, 285 , 333, 339 , 361, 363, 447, 595
Tupãssi	TS	Londrina	LD	Jussara	JA					
Pato Bragado	PB	Ibiporã	IP	Pérola	PE	Jacarezinho	JO			
Medianeira	MD	Rôlandia	RD	Loanda	LO	Ribeirão Claro	RC	Terra Boa	TB	
Ouro Verde do Oeste	OO	Cambé	CE	Paranavaí	PI					
Terra Roxa	TR	Mandaguaçu	UM	Guairacá	GR					
Ibema	IA	Maringá	MA	Cianorte	CN					

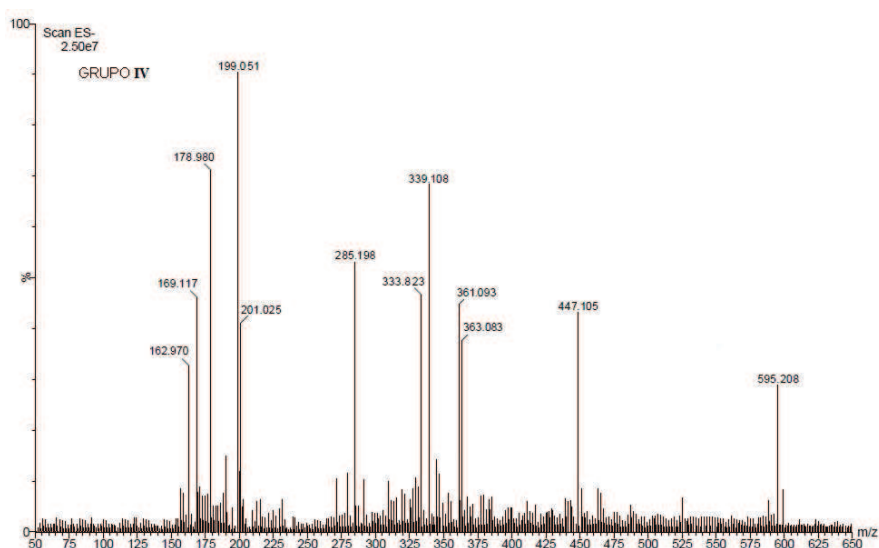


Figura 29. Impressão digital obtida por ESI(-)-MS para amostra de mel de Paranavaí classificada no grupo IV.

Grupo V: Mesorregião Oeste do Paraná

Em sua maioria, o grupo V é formado pelos méis com origem na mesorregião Oeste (Figura 30). Esta mesorregião teve um maior número de amostras analisadas, no total 24 amostras que ficaram divididas em: 14 amostras no grupo V, 7 amostras no grupo IV e 3 amostras do grupo III.



Figura 30. Mapa representando a mesorregião Oeste (mapa adaptado de www.sites-do-brasil.com)³⁰

Este grupo é composto por 18 amostras, sendo 4 consideradas exceções, pois através da classificação dos íons principais pertencem a esse grupo, porém foram produzidas noutras mesorregiões (Tabela 09).

Tabela 09. Resumo das amostras de mel classificadas no Grupo V da mesorregião Oeste e íons observados por ESI(-)-MS.

Município Mesorregião Oeste	Sigla	Exceções	Sigla	Íons Principais (m/z)
Brasília	LB	Mesorregião Norte Pioneiro		163, 169, 179, 199, 201, 263, 285, 299, 333, 361, 363 e 447
Toledo	TO	Bandeirantes	BS	
Cascavel	CA			
Marechal Cândido Rondon	MCR			
Nova Santa Rosa	NSR			
Santa Helena	SH	Mesorregião Noroeste		
Foz do Iguaçu	FI	Altônia	AA	
Guaraniaçu	GU			
Palotina	PA			
Assis chateubrand	AC	Umuarama	UA	
Mercedes	ME			
Máripa	MP	N. Esperança	NA	
Guaira	GA			
Entre Rios do Oeste	ERO			

Esse grupo não apresentou nenhum íon específico, ou seja, não apresentou nenhum íon com intensidade superior a 25% que não esteja presente nos demais grupos, portanto apresenta características similares a todas as amostras de mel analisadas. Ou seja, todos os íons observados estão presentes em outro grupo. O diferencial é que o grupo V não apresenta regularmente os íons que são específicos dos outros grupos como os íons m/z 255, 443, 319 e 399. A presença os íons m/z 263 e 299, em todas as amostras do grupo V com boa intensidade, presentes em somente algumas amostras do grupo IV, foi o motivo pelo qual as amostras de Bandeirantes (BS) de origem da mesorregião Norte Pioneiro, Antônio (AA), Umuarama (UA) e Nova Esperança (NA) da mesorregião Noroeste, classificaram-se neste grupo (Figura 31).

As seguintes amostras ficaram localizadas na PCA entre o grupo IV e V: Assis Chateaubrind (AC), Guaraniaçu (GU) Mercedes (ME), Maripá (MP), Guaíra (GA), Entre Rios do Oeste (ERO) todas da região Oeste e Nova Esperança (NA) do Noroeste, ou seja, essas amostras poderiam pertencer ao grupo IV ou V, mas devido à semelhança maior entre os íons foram classificadas no grupo V, sendo os íons m/z 263 e 299 os determinantes nesta classificação, pois todas essas amostras citadas apresentam esses dois íons muito intensos que é a característica principal para a formação do grupo V.

A mesorregião Noroeste faz divisa com a mesorregião Oeste, apresentando clima tipo *Cfa*, e estão localizadas no segundo planalto, podendo possivelmente ser o motivo que três méis da mesorregião Noroeste apresentaram semelhanças em sua composição de compostos orgânicos com a região Oeste, pois provavelmente possuem fonte floral semelhante.

Já a mesorregião Norte Pioneiro não está localizada próxima a região Oeste uma justificativa para o mel de Bandeirantes pertencer ao grupo da mesorregião Oeste é que provavelmente esta amostra não seja da região de onde foi adquirida. Outra explicação seria o manejo de colméia de uma região para outra em períodos de escassez de fonte floral disponíveis para as abelhas.

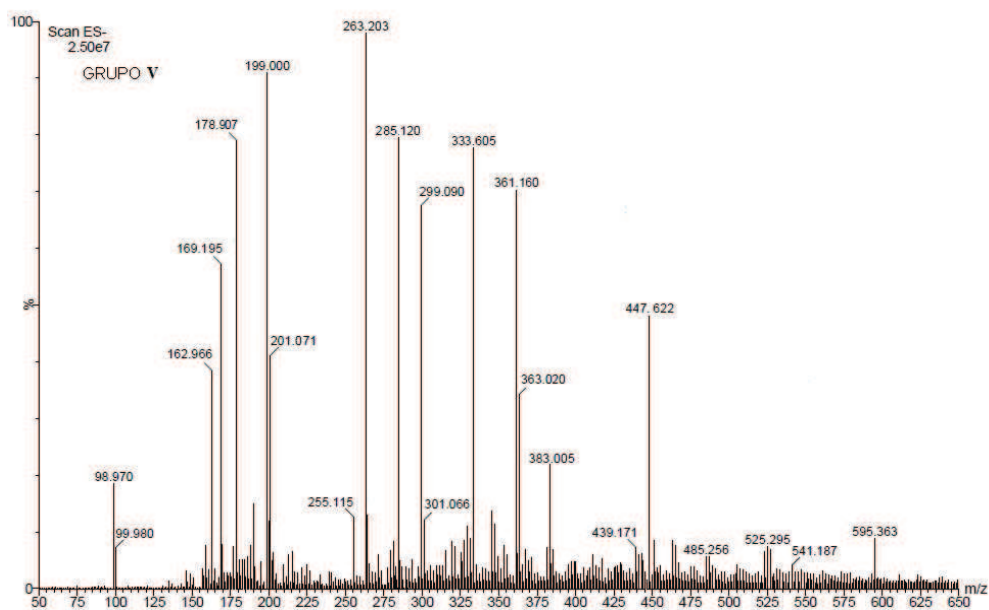


Figura 31. Impressão digital obtida por ESI(-)-MS para amostra de mel de Cascavel classificada no grupo V.

Agruparam-se todas as informações importantes em relação aos grupos formados na Tabela a seguir.

Tabela 10. Íons encontrados nos ESI(-)-MS de cada grupo e suas mesorregiões.

Grupo	Mesorregiões	Amostras (siglas)	Íons principais [M-H] ⁻ (m/z)	Característica Específica
Grupo I	Centro Sul e Sudeste	GC, PU, II, BG, BA, CU, BM, NL, MR, MS, PS, CS, CG, PL, CI, SMP, CM, PD, LS	163, 169, 179, 199, 201, 255, 263, 299, 333, 361, 363, 383, 447	m/z 255
Grupo II	Metropolitana de Curitiba e Centro Oriental	AI, CZ, CL, CO, CB, LA, MO, MT, CT, TI, PG	163, 169, 179, 199, 201, 263, 299, 319, 333, 361, 363, 443, 447	m/z 443 m/z 319
Grupo III	Sudoeste	QP, PR, ML, RA, BO, PO, JS, PT	163, 169, 179, 199, 201, 263, 299, 333, 361, 363, 399, 443, 447	m/z 399
Grupo IV	Norte Central, Noroeste, Norte Pioneiro, Oeste e Centro Ocidental	PI, AS, GR, JA, AR, LD, JO, LO, RC, IP, RD, CE, MD, TR, UM, PE, STO, TS, PB, SM, CN, MA, OO, IA, TA, TB	163, 169, 179, 199, 201, 285, 333, 339, 361, 363, 447	m/z 339
Grupo V	Oeste	LB, TO, CA, MCR, NSR, SH, FI, AC, ME, GA, ERO, GU, MP, BS, AA, UA, NA, PA	163, 169, 179, 199, 201, 263, 285, 299, 333, 361, 363, 383, 447	Não apresenta nenhum íon específico

A partir dos dados da tabela acima, podemos concluir que:

1) Os íons m/z 163, 169, 179, 199, 201, 333, 361, 363 e 447 estão presentes em todos os grupos e devem corresponder a produtos naturais amplamente distribuídos na flora disponível para as abelhas;

2) Particularmente os íons m/z 201 e 199 estão distribuídos, sem exceção, em todas as amostras de mel, o que pode indicar que esses íons sejam marcadores dos méis do Paraná ou, mais provavelmente, que correspondem a compostos comuns no reino vegetal. A afirmação de que algum íon seja marcador do mel paranaense deve ser confirmada pela análise, qualitativa e quantitativa, de méis de outros Estados do Brasil, mas através da literatura verificou-se que esses íons não estão presentes em méis de outros Estados do Brasil.

3) Os íons m/z 263 e 299 não estão frequentemente presentes nos méis do grupo IV. Portanto, a ausência simultânea desses íons em amostra de mel é um indicativo de que a mesma é oriunda das mesorregiões do Norte Central, Noroeste, Norte Pioneiro ou Centro Ocidental. Ao mesmo tempo é um indicativo forte de que o mel não foi produzido nas mesorregiões Centro Sul, Sudeste, Metropolitana de Curitiba, Centro Oriental ou Sudoeste, que sempre apresentaram esse íon;

4) O íon m/z 255 é marcador dos méis produzidos nas mesorregiões Centro Sul e Sudeste;

5) A presença de um íon m/z 443 intenso e, em menor extensão um íon m/z 319, é indicativo de méis oriundos das mesorregiões Metropolitana de Curitiba e Centro Oriental;

6) O íon m/z 399 é um possível marcador do mel da mesorregião Sudoeste e;

7) O íon m/z 339 ocorre frequentemente nos méis das mesorregiões Norte Central, Noroeste, Norte Pioneiro, Oeste e Centro Ocidental e está ausente nos méis das mesorregiões Metropolitana de Curitiba e sudoeste;

Das 82 amostras analisadas, somente 11 amostras (13%) não foram classificadas no grupo principal de suas mesorregiões de origem. Através desses resultados pode se concluir que as amostras de mel de uma mesma mesorregião são semelhantes em sua composição de ácidos orgânicos e compostos fenólicos e são de origens florais semelhantes. Essa conclusão nos leva a sugerir que o perfil de compostos orgânicos obtido por ESI-MS e, aliado a ferramentas quimiométricas, possa ser utilizado como um dado complementar para atribuição da origem geográfica do mel.

O agrupamento de algumas mesorregiões em um mesmo grupo se justifica pelo fato das proximidades das localizações geográficas, pela semelhança do clima e vegetação, pois os

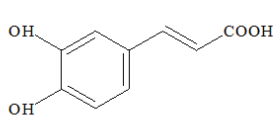
méis não se diferenciaram significativamente quanto a suas impressões digitais. O que contribuiu para formação de cinco grupos foi a presença de algum íon específico, que está ausente nos demais grupos e, portanto, podem ser considerados como característico do grupo e são essenciais para atribuir a origem geográfica do mel produzido no Estado.

Sugere-se que um estudo mais detalhado da contribuição do perfil de compostos fenólicos no mel seja realizado incluindo amostras de localidades distantes, por exemplo, um número considerável de méis de outros Estados brasileiros. No anexo 2 estão demonstrados os íons principais e suas respectivas intensidades de acordo com os grupos descritos acima.

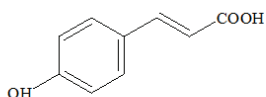
5.3. Identificação por ESI(-)-MS/MS de compostos orgânicos no mel de *Apis mellifera* produzido no Paraná

Os íons principais de cada amostra foram selecionados e submetidos à análise por ESI(-)-MS/MS. O padrão de fragmentação observado para esses íons foi comparado com os MS/MS dos padrões analíticos disponíveis e com dados da literatura sendo possível a identificação de nove ácidos orgânicos que estão demonstrados na tabela 11. Também foi verificado que os íons nas amostras de mel que apresentaram a mesma m/z, apresentaram o mesmo espectro de fragmentação, indicando que se tratava do mesmo composto.

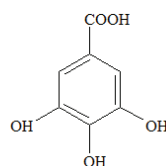
A figura 32 apresenta as estruturas químicas dos compostos identificados nas amostras de mel do Estado do Paraná. Verificou-se a presença de diversas classes de compostos fenólicos como derivados do ácido benzóico (ácido gálico), flavonóides de diversas classes, compostos fenólicos prenilados (fenilpropanóides). Ainda foram identificados diterpenos funcionalizados com unidades carboxila como os ácidos cuprêssico e agático (diterpenos labdânicos). No anexo 03 estão demonstrados os espectros obtidos dos padrões analíticos.



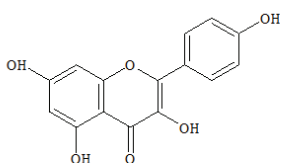
Ácido Caféico - 179 m/z



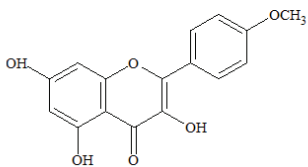
Ácido p-Cumárico - 163 m/z



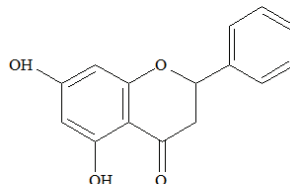
Ácido Gálico - 169 m/z



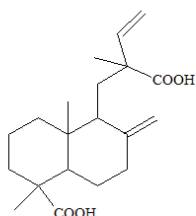
Canferol - 285 m/z



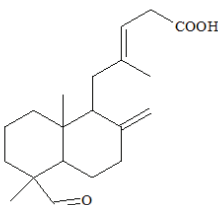
Canferida - 299 m/z



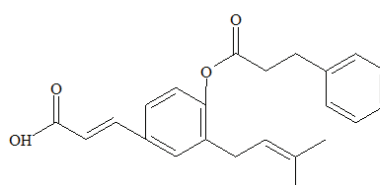
Pinocembrina - 255 m/z



Ácido Agático - 333 m/z



Ácido Cuprético - 319 m/z



Ácido 3-prenil-4-dihidrocinaoiloxicinâmico - 363 m/z

Figura 32. Estrutura química dos compostos identificados no mel de Paraná.

Tabela 11. Comparação dos ESI(-)-MS/MS dos íons principais do mel de *A. mellifera* com os ESI(-)-MS/MS obtidos para os padrões analíticos e dados reportados na literatura.

Identificação			Condições Equipamento		ESI(-)-MS/MS dos íons [M-H] ⁻ - m/z (Abundancia relativa %)		
[M-H] ⁻	Composto	Grupo	CE (V)	Cone (V)	Encontrado nas Amostras	Padrão analítico	Literatura
163	Ácido p-Cumárico	I, II, III, IV e V	15	-10	163 (10), 119 (80)	163(15), 119(100)	119 (100), 93 (5) ¹²
							163 (15), 119 (100), 93 (10) ¹¹³
169	Ácido gálico	I, II, III, IV e V	25	-15	169 (5), 125 (95), 79 (20), 81 (10)	169(10), 125(100), 79(30)	125 (100), 79 (8), 81 (6) ¹²
							169 (5), 125 (100), 79 (20), 81 (20) ¹³⁰
179	Ácido caféico	I, II, III, IV e V	30	-20	179 (25), 135 (60), 97 (10), 107(30)	179(20), 135(45), 107 (40), 97(10)	135 (100) ¹²
							179 (3), 135 (100), 107 (10) ¹¹³
							179 (5), 135 (95), 97 (10), 107 (5) ¹³⁰
255	Pinocembrina	I	30	-20	255 (70), 227 (15), 213 (20), 185 (40), 171 (70), 151 (50), 145 (30)	255(50), 227(15), 213(20), 185(50), 171(40), 151(30), 145(40), 107 (15)	255 (20), 227 (10), 213 (35), 185 (30), 171(100), 151 (60), 145 (70), 107 (70) ¹¹³
285	Canferol	IV e V	30	-25	285 (40), 256 (70), 239 (30), 210 (60), 185 (40), 169 (30), 151 (80), 145 (90), 117 (100), 107 (50), 93(55)	285 (45), 256 (55), 239 (60), 210 (50), 185 (50), 169 (40), 151 (60), 145 (50), 117 (50), 107 (25)	285 (100), 151 (100), 93 (45), 117 (30), 145 (25), 256 (10), 239 (10), 229 (10), 187 (10), 185 (10), 169 (10), 107 (10) ¹¹³
							151 (100), 93 (45), 117 (30), 145 (25) ¹²
299	Canferida	I, II, III e V	25	-20	299 (10), 284 (40), 200 (30), 164 (25), 151 (20), 107 (20)	N/A	299 (10), 284 (100), 200 (10), 164 (10), 151 (20), 107 (10) ¹¹³
319	Ácido cuprêssico	II	30	-30	319 (100), 99 (15)	319(80), 99(20)	319(100), 99(10), 97(10) ¹¹³
333	Ácido agático	I, II, III, IV e V	35	-40	333 (90), 289 (25)	N/A	333 (100), 289 (10), 119 (10) ¹¹³
363	Ácido 3-prenil-4-dihidrocina-moioxicinâmico	I, II, III, IV e V	20	-25	363 (20), 187 (30), 149 (20)	N/A	363 (30), 187 (100), 149 (45) ¹¹³

Os compostos identificados são amplamente distribuídos na natureza e já foram identificados em outros derivados apícolas como a própolis e mel. Acrescenta-se que numerosos íons ainda não foram identificados e pelos padrões de fragmentação observados devem pertencer às classes acima mencionadas, bem como, também é provável a presença de ácidos carboxílicos alifáticos.

Os seguintes compostos identificados no mel do Paraná já foram identificados em mel, própolis ou plantas: ácido p-cumárico (m/z 163), ácido caféico (179 m/z), pinocembrina (m/z 255), canferol (m/z 285), canferida (m/z 299), ácido cuprêssico (m/z 319), ácido agático (m/z 333), ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico (m/z 363).^{9,12,113}

Já para o íon m/z 169 identificado como ácido gálico e, encontrado em todos os grupos, não há relatos na literatura de ter sido anteriormente encontrado em mel ou própolis do Paraná.

Porem, é necessário um estudo mais aprofundado em relação aos íons: m/z 199, 201, 263, 339, 361, 383, 399, 443, 447, 529 e 595 com o objetivo de sua identificação. A seguir será apresentada uma breve discussão dos padrões de fragmentação dos compostos identificados.

5.3.1. ESI(-)-MS/MS para os ácidos carboxílicos identificados no mel de Paraná

Neste trabalho foram identificados ácidos carboxílicos de natureza fenólica e diterpenos ácidos. Os compostos fenólicos são importantes compostos presentes em mel e possuem algumas fragmentações características.

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por possuírem um anel benzênico, um grupo carboxílico e um ou mais grupos hidroxila ligados ao anel aromático o que lhes confere propriedades antioxidantes.⁵⁹ Suas reações de fragmentação tem como característica a perda de fragmentos neutros (H₂O, MeOH, CO, CO₂ etc.) que fornece informações acerca de grupos funcionais presentes na molécula, auxiliando na determinação estrutural.

O padrão de fragmentação de uma molécula depende também do modo de ionização, sendo a ionização por eletrospray em modo negativo, o modo ideal para compostos fenólicos, pois devido a seu caráter ácido formam maior quantidade de íons.⁴²

O espectro MS/MS de ácidos fenólicos tem como principal característica a presença de um íon fragmento intenso devido à perda de 44 Da a partir do íon molecular. A mesma é atribuída à saída do CO₂ devido à presença do grupo carboxila, proporcionando um anion fragmento que pode ser representado como [M-H-COO]⁻.

O íon m/z 163 está presente em todos os grupos de amostras, sendo que das 82 amostras, somente 5 não apresentam esse íon: Guairacá (GA), Loanda (LO), Paranavaí (PI), Terra Roxa (TA) do grupo IV e Nova Esperança (NA) do grupo V. Este íon foi identificado como ácido p-cumárico através de seu padrão de fragmentação que apresentou um único fragmento m/z 119 muito intenso atribuído à perda de CO_2 (44Da) a partir do íon molecular (Figura 33 e 34).

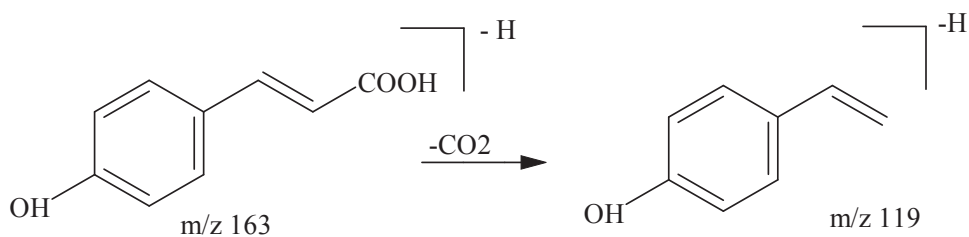


Figura 33. Proposta de fragmentação do ácido p-cumárico íon $[\text{M-H}]^-$ m/z 163.

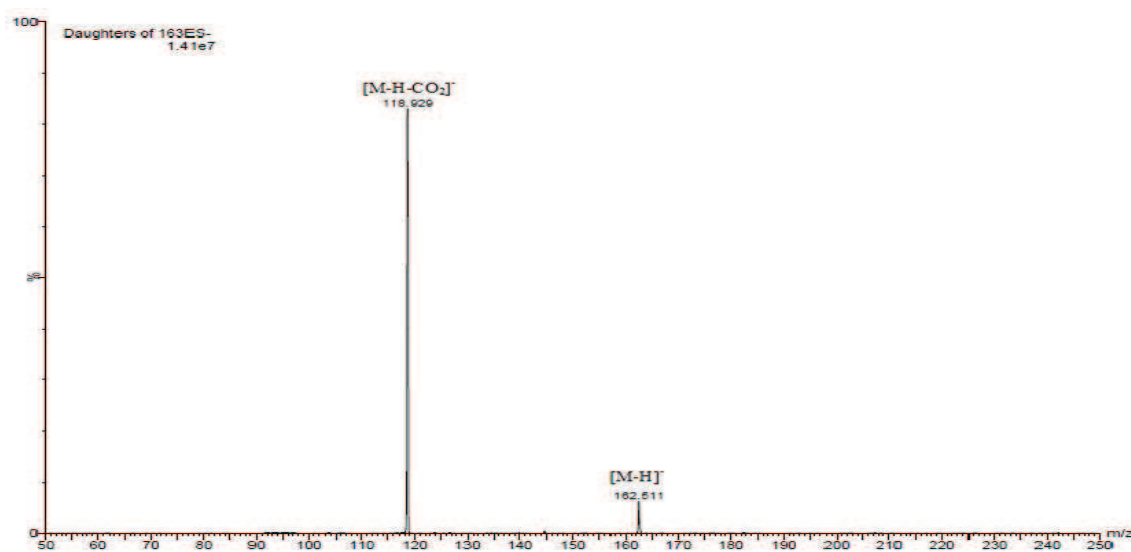


Figura 34. Espectro de massa do ácido p-cumárico íon $[\text{M-H}]^-$ m/z 163.

O íon m/z 169 identificado como ácido gálico (Figura 35), apresenta o fragmento principal m/z 125 (figura 36) atribuído também à perda de CO_2 (44 Da). O mesmo está ausente em apenas uma amostra, a de Umuarama (UA) do grupo V.

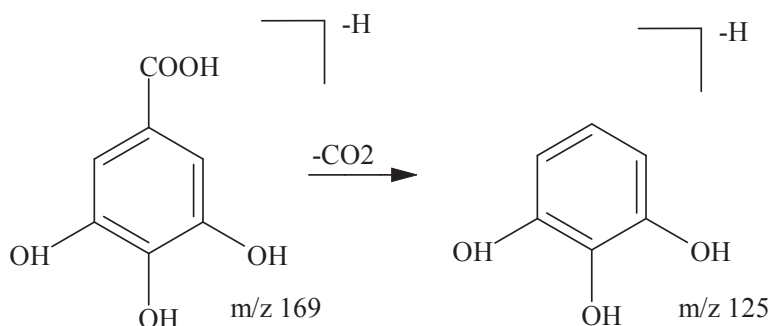


Figura 35. Proposta de fragmentação do ácido gálico íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 169.

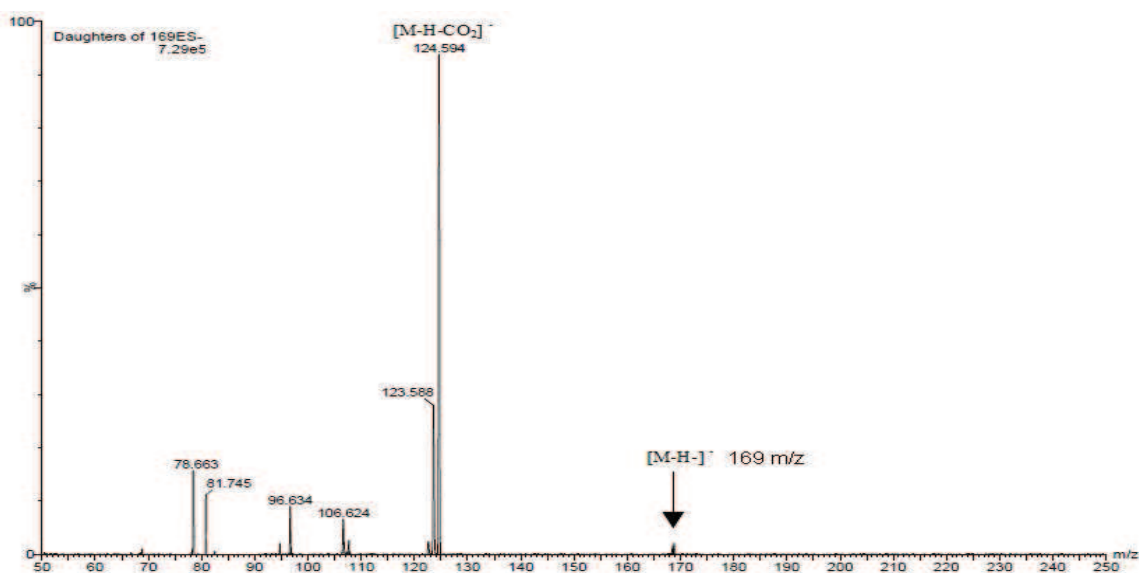


Figura 36. Espectro de massa do ácido gálico íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 169.

O íon m/z 179 identificado com o ácido cafeico, produz um fragmento intenso em m/z 135, atribuído à perda de CO_2 (44 Da) e outro fragmento em m/z 107, atribuído a perda sucessiva de CO e CO_2 (Figuras 37 e 38). Este composto está presente em todas as amostras dos grupos I, II e III, e somente está ausente para algumas amostras dos grupos IV e V. Desta forma, esses três ácidos fenólicos citados estão presentes em todos os grupos com alta intensidade, sugerindo ser característica dos méis do Paraná apresentar esses compostos.

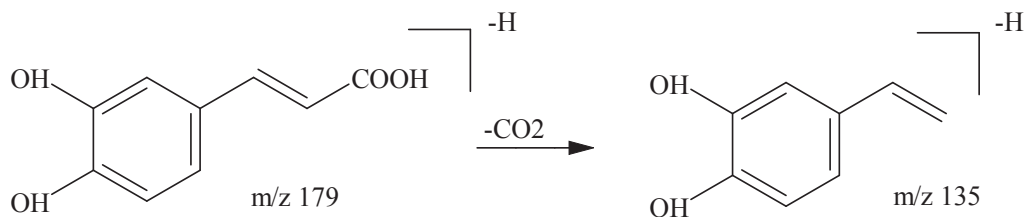


Figura 37. Proposta de fragmentação do ácido cafeico íon $[\text{M-H}]^-$ m/z 179.

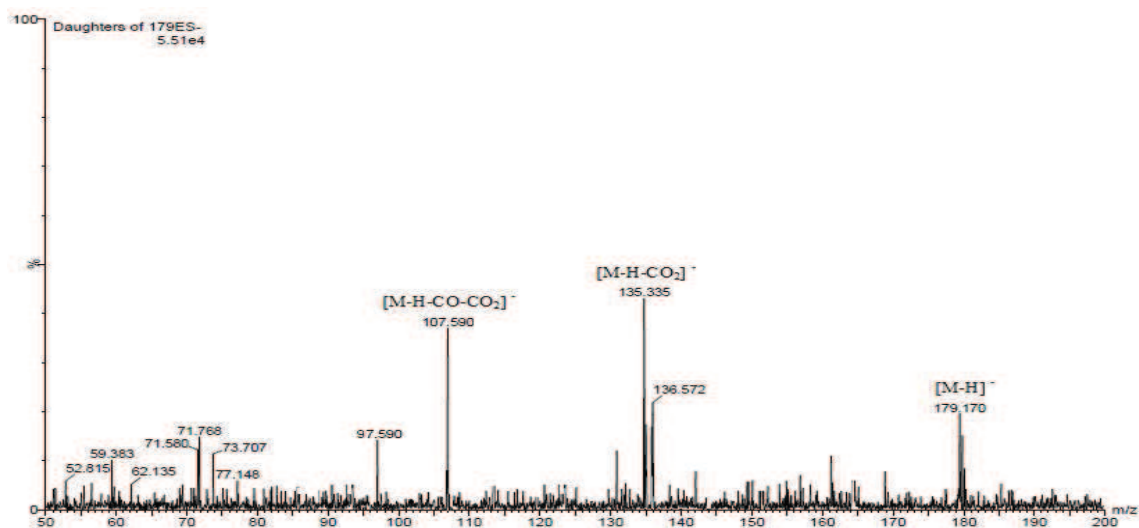


Figura 38. Espectro de massa do ácido cafeico íon $[\text{M-H}]^-$ m/z 179.

O íon m/z 363 identificado com ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico apresenta dois fragmentos: íon m/z 187 originado pela perda de 176 Da e o íon em m/z 149 correspondente à perda de 214 Da que pode ser atribuída à unidade dihidrocinamoiloxi (Figuras 39 e 40). Este composto está ausente somente para algumas amostras do grupo IV. Nos demais grupos aparece com boa intensidade, sendo que nos grupos II e III este íon apresenta maior intensidade.

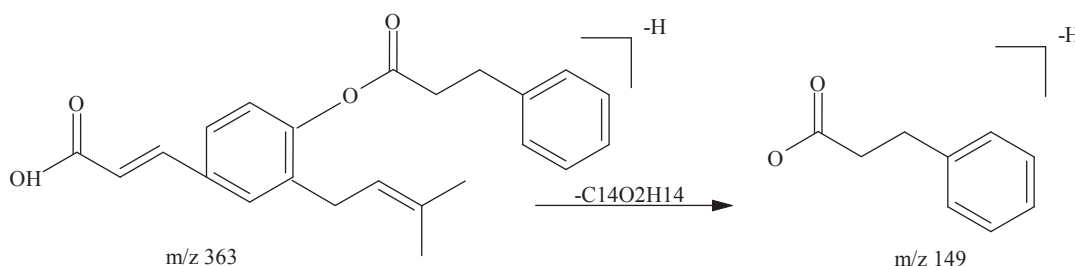


Figura 39. Proposta de fragmentação do ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico íon $[M-H]^-$ m/z 363.

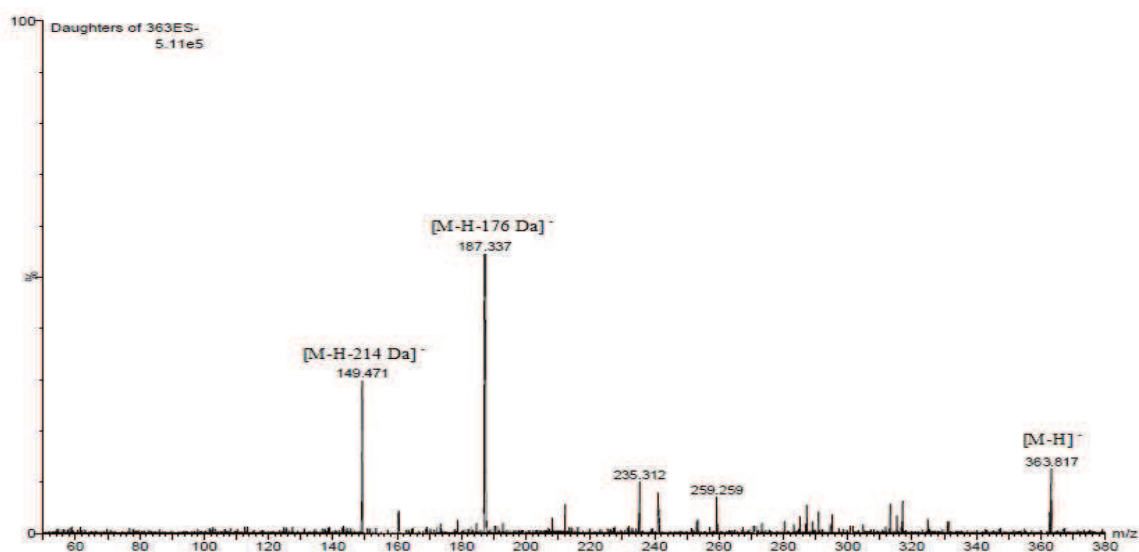


Figura 40. Espectro de massa do ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico dihidrocinamoiloxicinâmico íon $[M-H]^-$ m/z 363.

O ácido agático íon m/z 333 é um terpeno, apresentando uma fragmentação branda com somente um único padrão de fragmentação, o íon m/z 289 gerado da perda de CO_2 (44 Da). (Figuras 41 e 42). Este composto está ausente somente para algumas amostras do grupo IV, nos demais grupos está presente com alta intensidade.

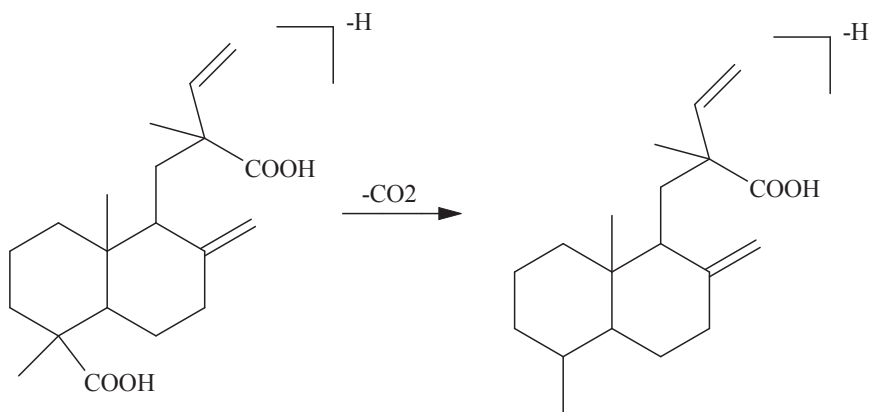


Figura 41. Proposta de fragmentação do ácido agático íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 333.

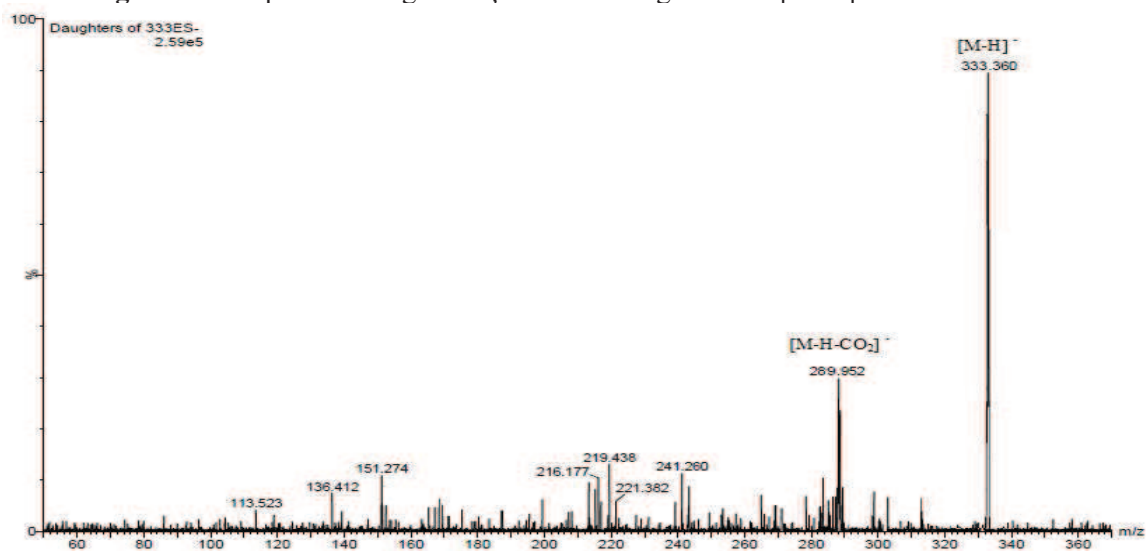


Figura 42. Espectro de massa do ácido agático íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 333.

O íon m/z 319 foi identificado como sendo ácido cuprêssico, um diterpeno lábdano, que apresenta um único fragmento, o íon m/z 99, originado pela perda de 220 Da, atribuída a perda dos anéis condensados (Figuras 43 e 44). Este composto é evidenciado no grupo II, sendo que este grupo também tem como diferencial a presença constante do íon m/z 443. Ou seja, é uma característica dos méis das mesorregiões Metropolitana de Curitiba e Centro Oriental a presença desses íons, porém eles não são exclusivos ao grupo II.

O terpeno ácido cuprêssico já foi identificado na resina de *Araucária angustifolia*, então essa é uma possível fonte vegetal visitada pelas abelhas nessas mesorregiões paranaenses, provavelmente para coleta da própolis.¹³³

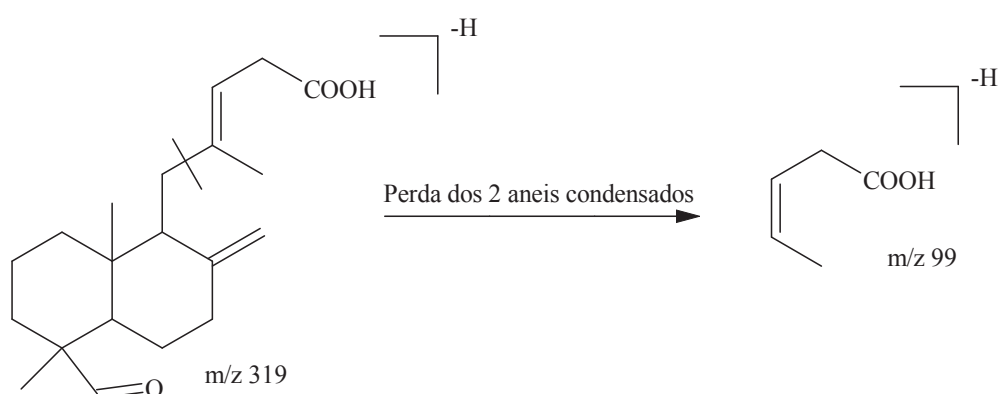


Figura 43. Proposta de fragmentação do ácido cuprêssico íon $[M-H]^-$ m/z 319.

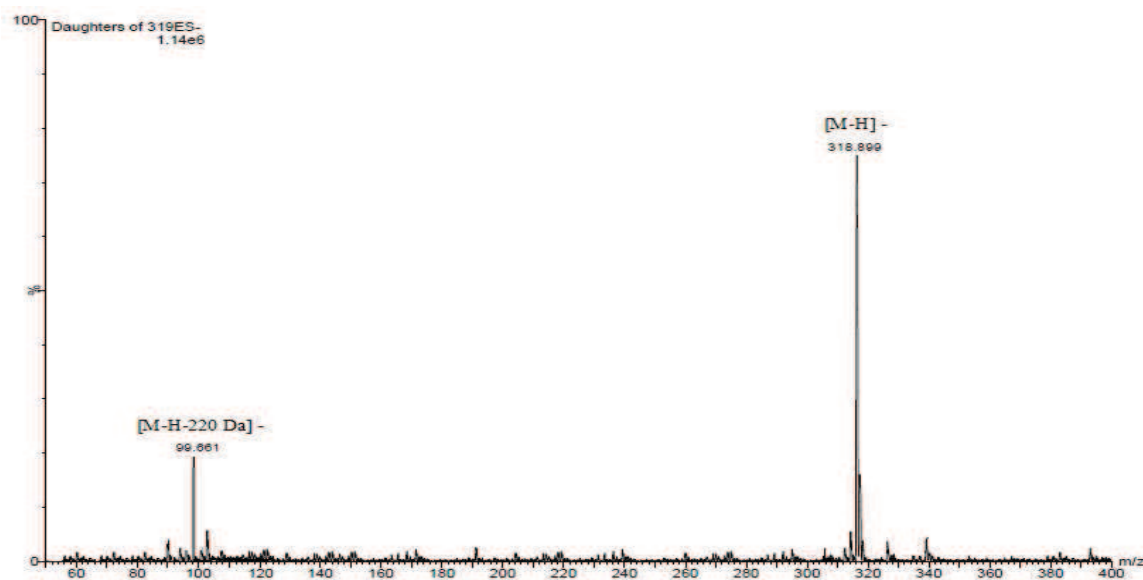


Figura 44. Espectro de massa do ácido cuprêssico íon $[M-H]^-$ m/z 319.

Considerando as informações acima, tudo indica que os íons desprotonados $[M-H]^-$ m/z 199 e m/z 201 sejam ácidos carboxílicos. O íon m/z 199 apresenta o fragmento intenso em m/z 155 que pode ser representado como $[M-H-CO_2]^-$ e outros fragmentos de menores intensidades em m/z 181 $[M-H-H_2O]^-$ e m/z 137 $[M-H-H_2O-CO_2]^-$ (Figura 45). Essa última sequência de fragmentação observa-se também para o composto com íon $[M-H]^-$ em m/z 201 que apresentou fragmentos em m/z 139 devido às perdas sucessivas de CO_2 e H_2O totalizando 62 Da, em m/z 183 devido à perda de H_2O (18 Da) e em m/z 157 pela perda de CO_2 (44 Da) (Figura 46). E estes dois íons estão presentes em todas as amostras analisadas.

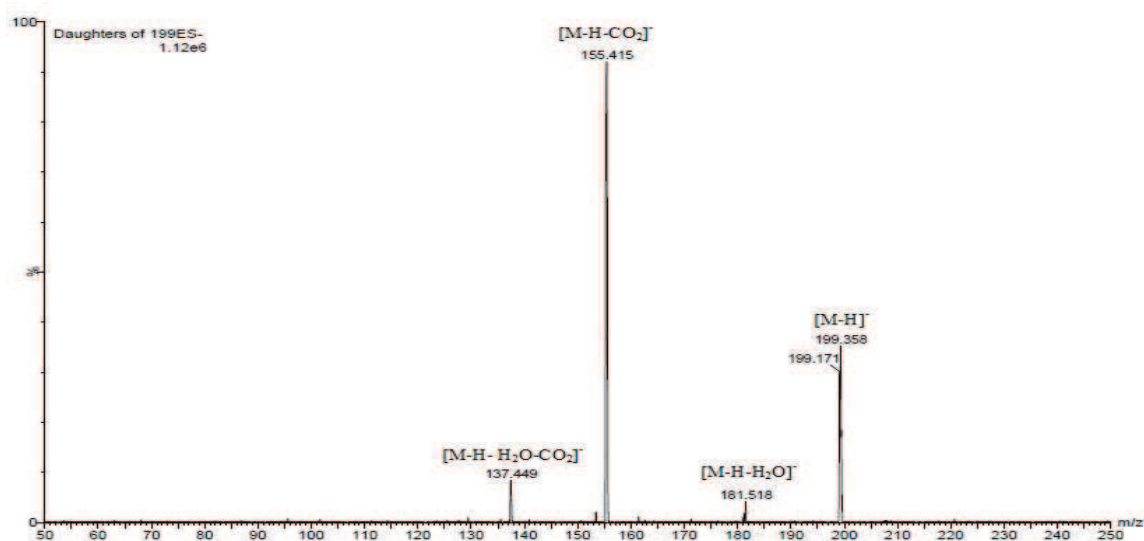


Figura 45. Espectro de massa do íon $[M-H]^-$ m/z 199 não identificado.

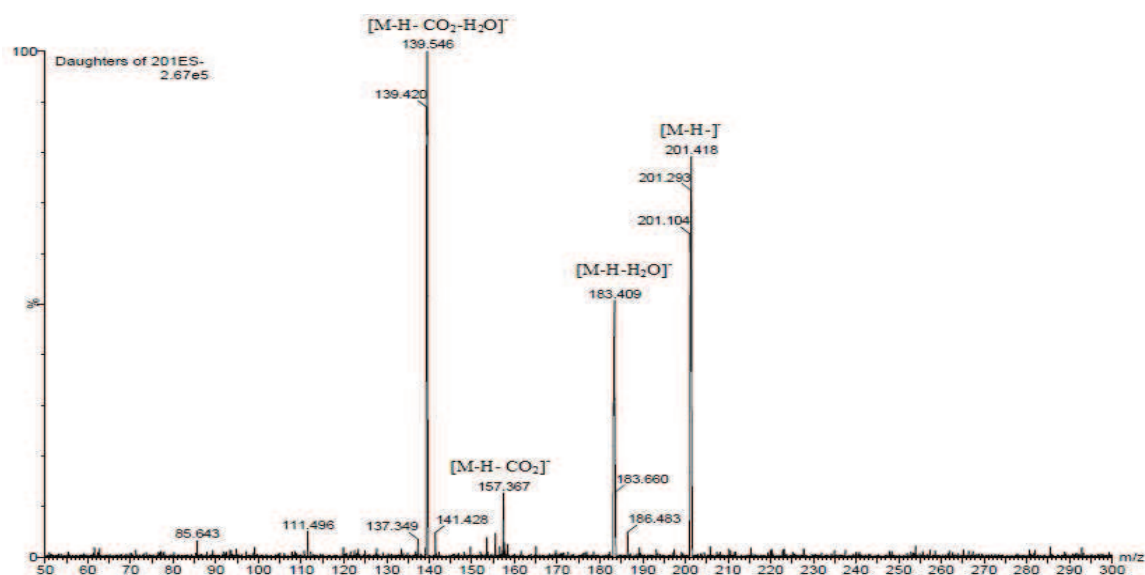


Figura 46. Espectro de massa do íon $[M-H]^-$ m/z 201 não identificado.

O íon **m/z 263** apresentou três fragmentos intensos: o m/z 153 originado pela perda de 110 Da a partir do íon molecular; o íon m/z 219 originado pela perda de CO₂ (44 Da) e; o fragmento de m/z 204, originado pela perda de 59 Da a partir do íon desprotonado (Figuras 43 e 44). Essa última perda de massa indicou a presença de ao menos uma unidade acetila o que leva a sugerir a presença do ácido 3,4-diacetilcafeico. Este íon é muito importante para o grupo V, ou seja, este grupo não apresenta nenhum íon específico, sendo esse o diferencial para formação deste grupo, mas tem como característica apresentar com muita intensidade os íons: m/z 263 não identificado e o m/z 299 identificado como canferida, sendo este considerado íon marcador das amostras de própolis do Paraná.¹¹³

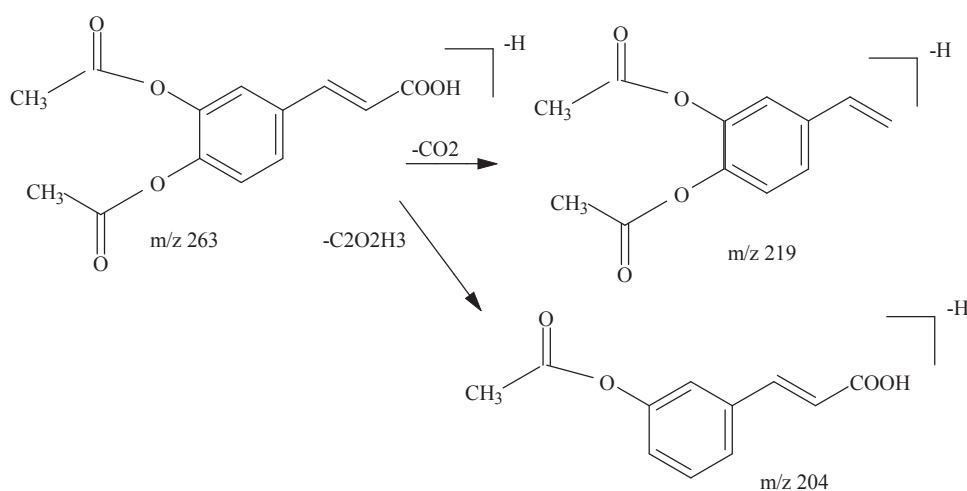


Figura 47. Proposta de fragmentação do ácido 3,4-diacetilcafeico íon $[M-H]^-$ m/z 263.

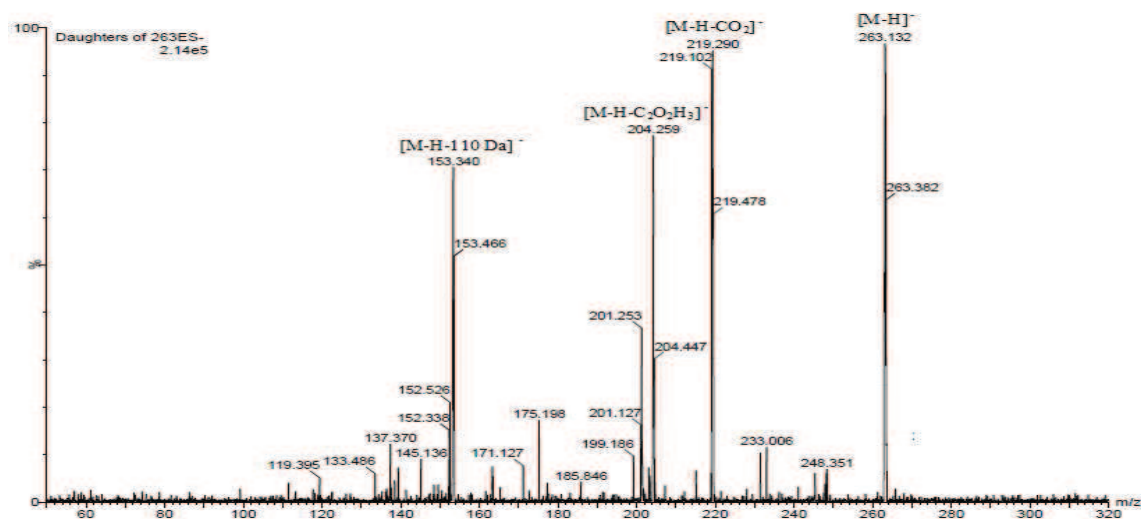


Figura 48. Espectro de massa do ácido 3,4-diacetilcafeico íon $[M-H]^-$ m/z 263.

Através das informações obtidas para o ácido ágatico e ácido cuprêssico sugere-se que o íon **m/z 383** seja um terpeno dicarboxílico. Os fragmentos **m/z 321**, **339** e **295**, observados na Figura 49, podem ser explicados como decorrentes da perda de **62 Da** [$[M-H-CO_2-H_2O]^-$], **44 Da** [$[M-H-CO_2]^-$] e **88 Da** [$[M-H-CO_2-CO_2]^-$], respectivamente.

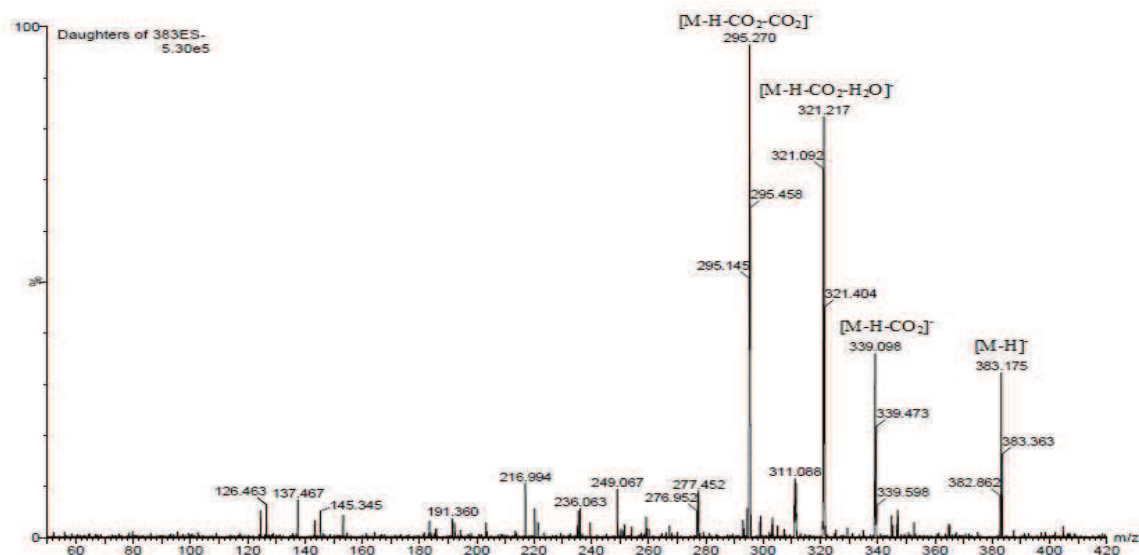


Figura 49. Espectro de massa do íon $[M-H]^-$ **m/z 383**.

5.3.2. ESI-MS/MS para os flavonóides

Assim como nos ácidos fenólicos, nos espectros de massas dos flavonóides se observam fragmentos originados pela perda de pequenas moléculas neutras como: H_2O , CO , CO_2 , C_2H_2O e CH_3OH . Sendo também comum observar perdas de **15 Da** (CH_3), **31 Da** (CH_3O), **29 Da** (CHO), etc.⁴²

De maneira geral, os íons observados no MS/MS dos flavonoides apresentam os anéis A e B intactos devido à quebra de ligações no anel C, gerando os íons $^{i,j}A^-$ e $^{i,j}B^-$ (modo negativo), que fornece informações do tipo e do número de substituintes nos anéis A e B, onde os sobrescritos *i* e *j* indicam qual ligação do anel C foi quebrada. Por exemplo: a clivagem das ligações 1 e 3 do anel C é produzida por um mecanismo denominado como retro Diels-Alder (RDA), que origina o íon $^{1,3}A^-$ e/ou $^{1,3}B^-$.^{120,122,129}

O espectro de ESI(-)-MS/MS da canferida (Figuras 50 e 51) de **m/z 299** um flavonol metoxilado apresentou os seguintes fragmentos: **284**, **200**, **164**, **151**, **107**. A perda de uma metila $[M-H-CH_3]^-$ - gera o fragmento de **m/z 284**, já o íon **m/z 151** é decorrente da clivagem de retro Diels-Alder, que corresponde ao fragmento $^{1,3}A^-$.⁵¹ O íon **m/z 164** é produzido pela

fragmentação do anel C nas posições 0 e 3 formando um íon com o anel B intato representado como $^{0,3}[B]$. O íon m/z 107 provavelmente é produzido pela fragmentação das ligações 0 e 4 com formação do íon $^{0,4}[A-H]$.

Este composto foi encontrado em todas as amostras de mel dos grupos I, II, III e V, o que nos permite sugerir que o mesmo pode ser considerado característico dos méis das mesorregiões Centro Sul e Sudeste, Metropolitana de Curitiba e Centro Oriental, Sudoeste e, em menor extensão, do Oeste do Paraná. Como já descrito anteriormente, esse íon é muito importante para caracterização do grupo V, pois juntamente com o íon m/z 263 diferenciaram as amostras do grupo IV e V.

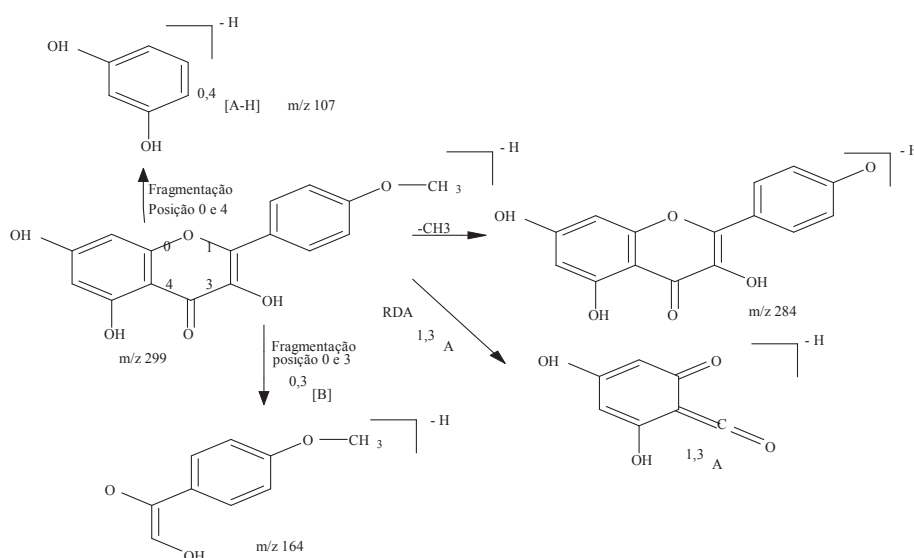


Figura 50. Proposta de fragmentação da Canferida íon $[M-H]^-$ m/z 299.

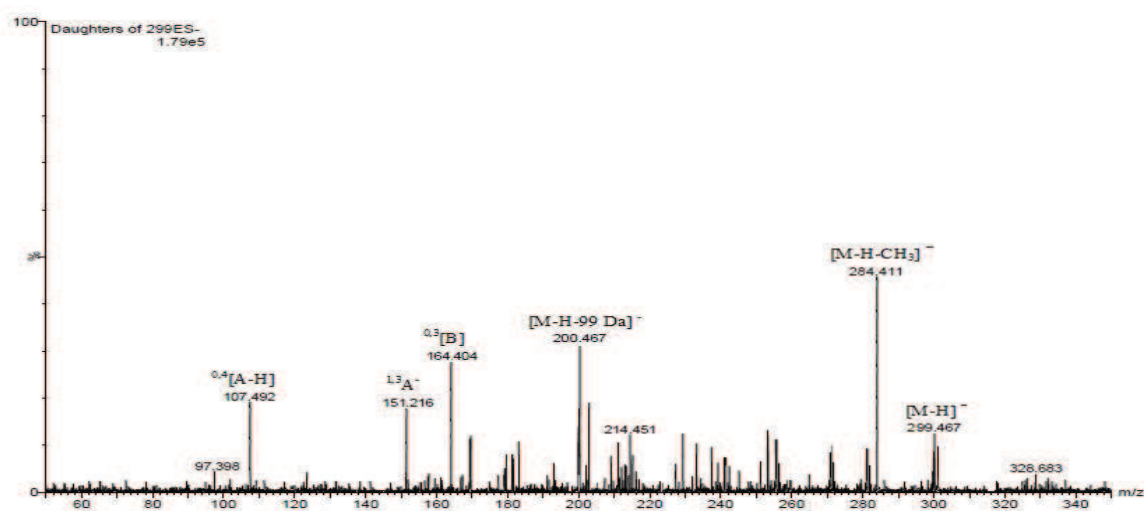


Figura 51. Espectro de massa da Canferida íon $[M-H]^-$ m/z 299.

O íon **255** identificado como Pinocembrina (Figuras 52 e 53) também apresenta o fragmento m/z 151, bem como outros fragmentos de menores intensidades como o íon em m/z 227 devido à perda de 28 Da que pode ser da clivagem simultânea das ligações 3 e 4 com perda de CO, o fragmento m/z 213 perda de 42 Da, atribuída a perda do íon $[M-H-C_2H_2O]^-$.¹²² Este composto está presente para todas as amostras do grupo I, podendo ser considerado característica dos méis deste grupo, pertencentes na sua maioria às mesorregiões Centro Sul e Sudeste.

Na literatura já foi mostrada claramente a presença desse flavonóide em mel e própolis.^{9,27,110-112,129,130,53}

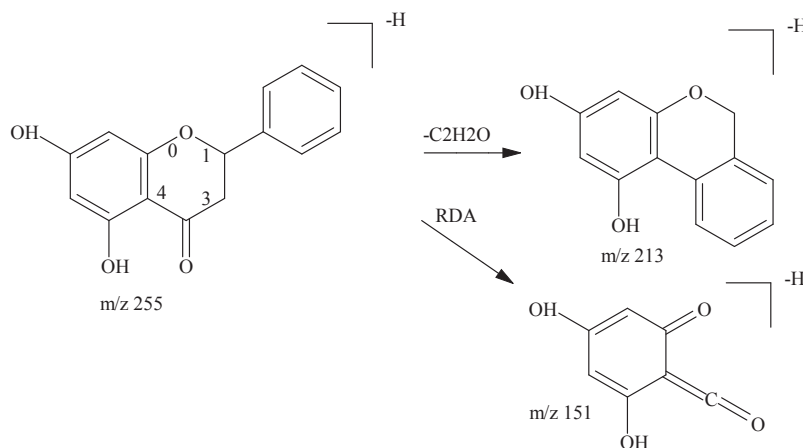


Figura 52. Proposta de fragmentação da Pinocembrina íon $[M-H]^-$ m/z 255.

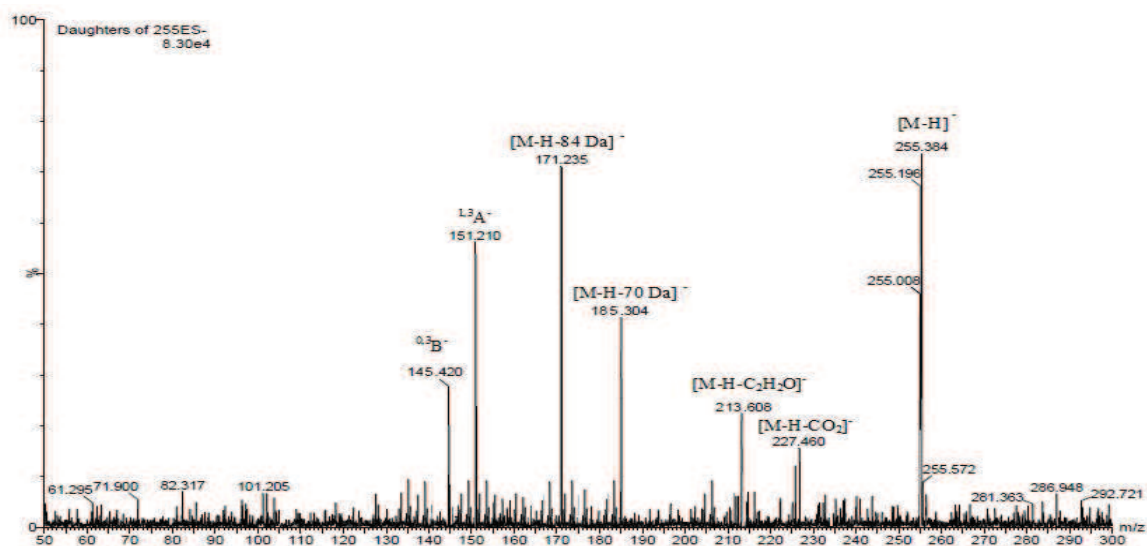


Figura 53. Espectro de fragmentação da Pinocembrina íon $[M-H]^-$ m/z 255.

O canferol de m/z 285 (Figuras 54 e 55) apresenta várias fragmentações de sua estrutura, sendo muito dependente da energia de colisão utilizada, pois mesmo na literatura há divergência nos fragmentos.^{25,47,48}

Os fragmentos obtidos para o canferol são quando utilizou-se a energia de colisão 25V foram: m/z 257, 239, 211, 187, 169,151, 145,130,117,107,92. O fragmento em m/z 151 é típico de flavonóides com hidroxilas nas posições 5 e 7, devido a substituição no anel A. O fragmento m/z 239 foi originado pela perda de 46 Da, possivelmente atribuída à perda sucessiva de CO e H₂O. As mesorregiões Norte Central, Noroeste, Norte Pioneiro, Centro Ocidental e Oeste (Grupos IV e V) possuem como característica a presença deste íon, o mesmo tem sido utilizado na literatura como marcador do mel de alecrim (*Rosmarinus officinalis*).¹¹³

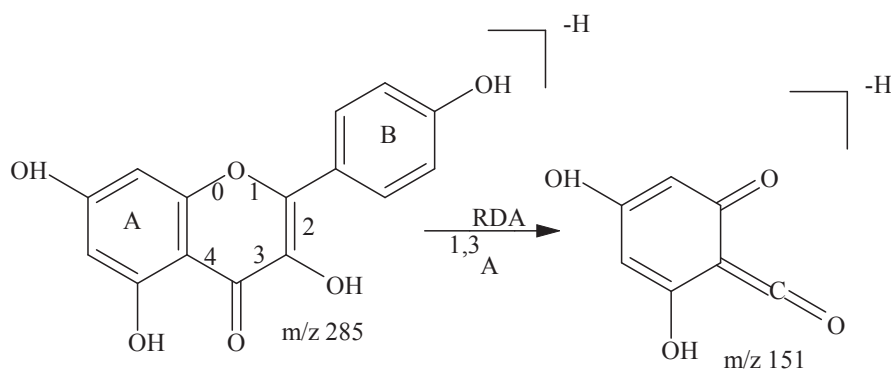


Figura 54. Proposta de fragmentação do Canferol íon $[M-H]^-$ m/z 285.

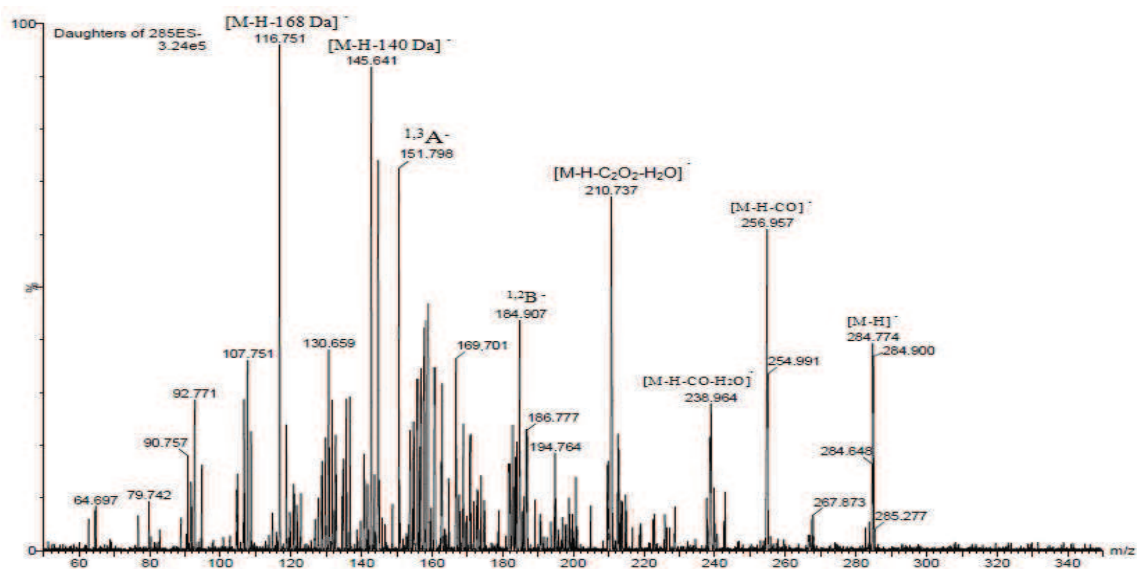


Figura 55. Espectro de fragmentação do Canferol íon $[M-H]^-$ m/z 285.

O íon m/z 339 apresentou apenas o fragmento de m/z 169 (Figura 56), dificultando sua identificação pela escassa informação no espectro de massa e na literatura. Baseado na análise por LC-MS/MS suspeita-se que se trata de um flavonóide. Este íon é característico das amostras pertencentes às mesorregiões Norte Central, Noroeste, Norte Pioneiro, Oeste e Centro Ocidental (grupo IV).

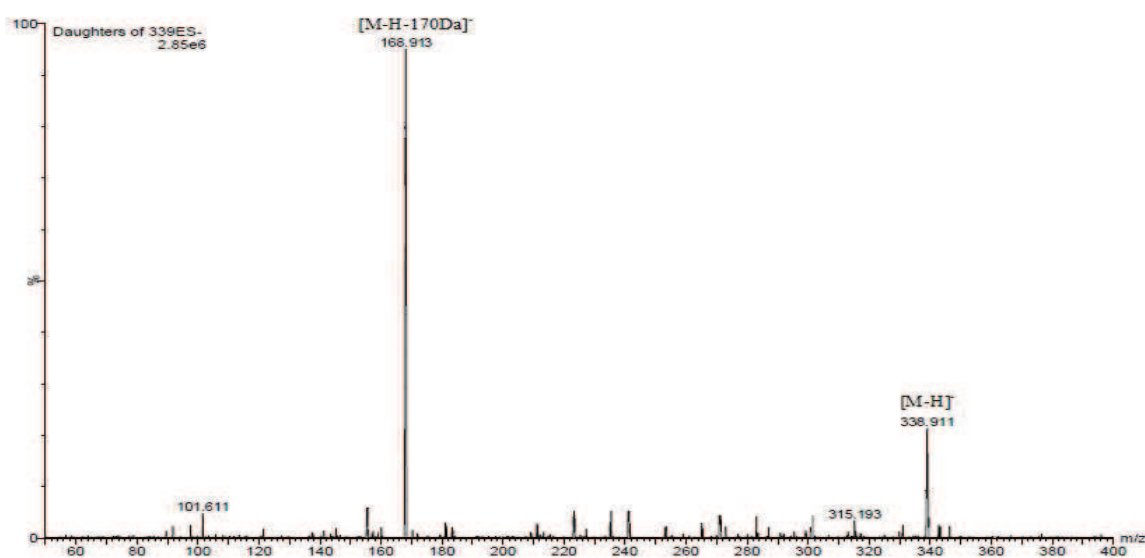


Figura 56. Espectro de massa do íon $[M-H]^-$ m/z 339 não identificado.

O íon m/z 361 também se suspeita que seja um flavonóide, apresentando os seguintes fragmentos: m/z 161, 199, 241, 271, 301 (Figura 57). Este composto não identificado está presente em todas as amostras, dos grupos I, II, III e V, sendo que somente o grupo IV possui amostras que não apresenta esse íon.

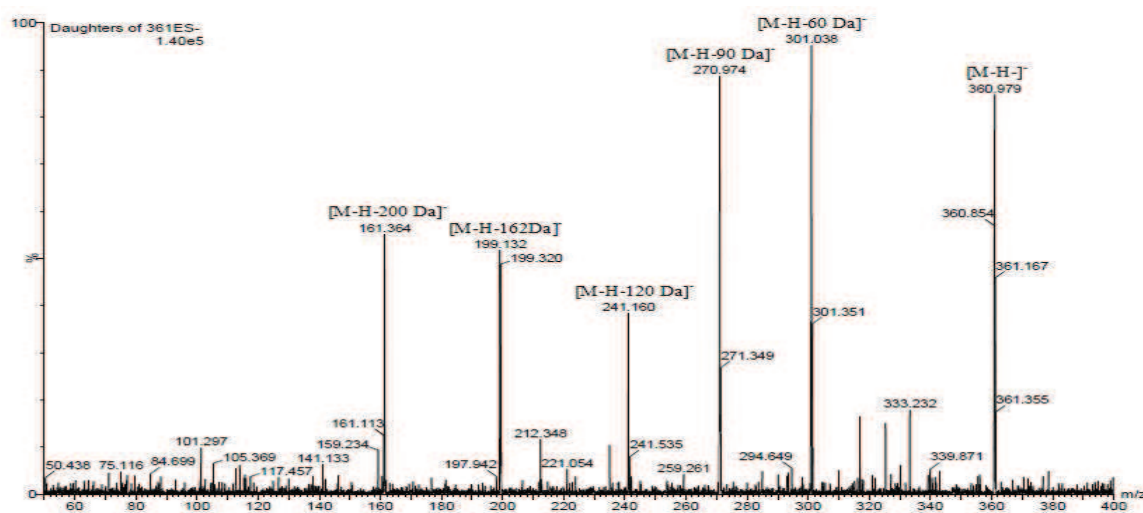


Figura 57. Espectro de massa do íon $[M-H]^-$ m/z 361 não identificado.

O íon m/z 399 apresenta as seguintes fragmentações: m/z 311 atribuída à perda sucessiva de duas moléculas de CO_2 (88 Da), 337 perda sucessiva de CO_2 e H_2O (62 Da), 355 perda de CO_2 (44 Da) (Figura 58). O grupo III, que contém os méis da mesoregião sudoeste, tem como característica a presença deste íon, até o momento não identificado, mas se suspeita que o mesmo possa ser um flavonóide, devido ao seu perfil de fragmentação ser semelhante aos observados para os flavonóides.

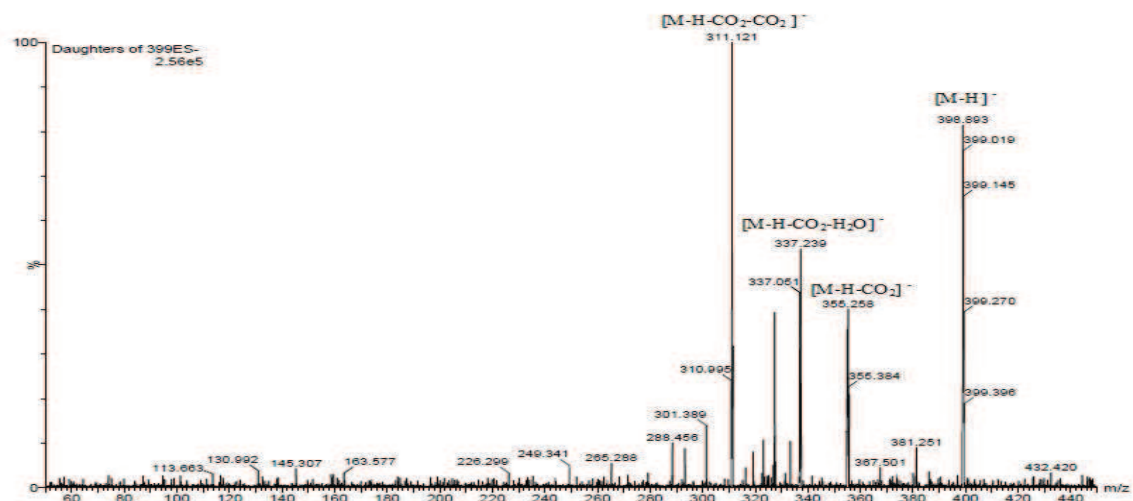


Figura 58. Espectro de massa do íon $[\text{M-H}]^-$ m/z 399 não identificado.

O íon m/z 447 apresenta os seguintes fragmentos: m/z 101, 199, 271, 297, 323 (Figura 59). Este íon está presente em todas as amostras do grupo I, III e IV, sendo as amostras do grupo III que apresentaram maior intensidade para o mesmo.

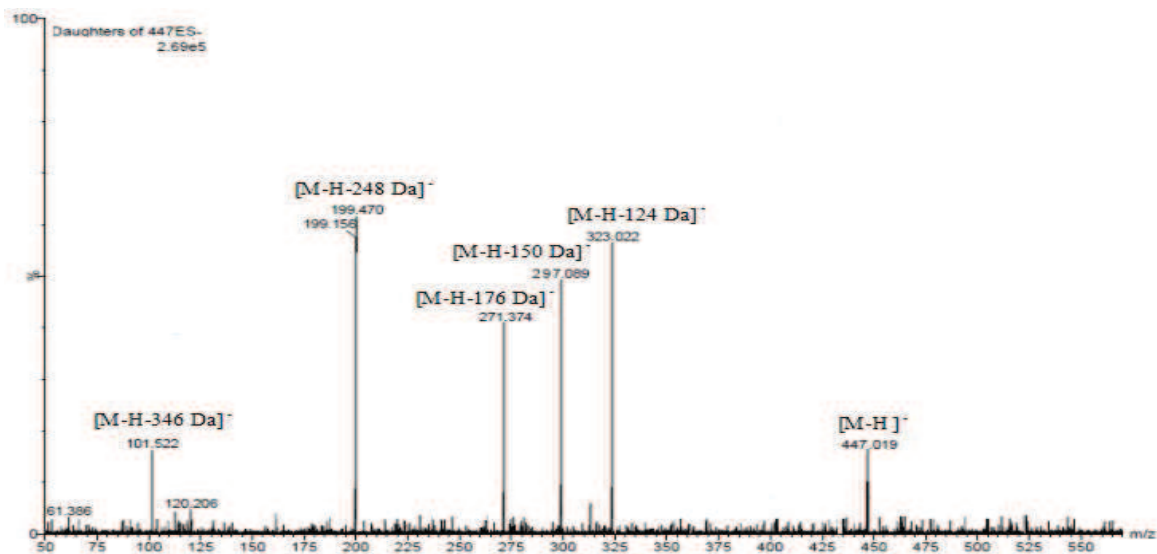


Figura 59. Espectro de massa do íon $[\text{M-H}]^-$ m/z 447 não identificado.

O íon m/z 443 apresenta os fragmentos em m/z 179 e 263 (Figura 60). Ambos os fragmentos podem ser indicativo da presença na estrutura de uma unidade cafeoila. Este íon está presente em todas as amostras do grupo II.

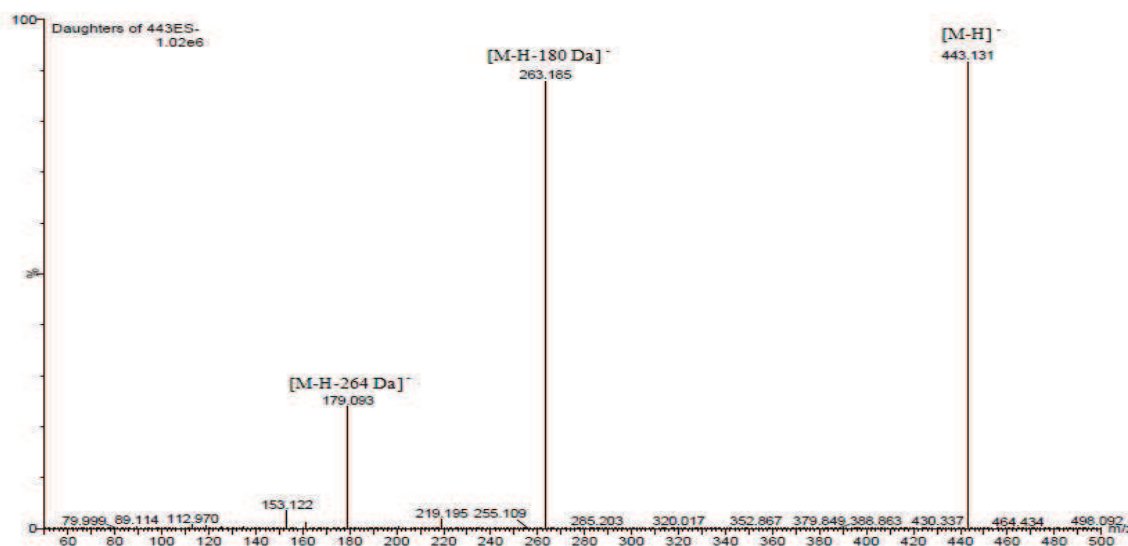


Figura 60. Espectro de massa do íon $[M-H]^-$ m/z 443 não identificado.

O íon m/z 529 está ausente somente no grupo III, nos demais grupos se observa em algumas amostras. Este íon, também não identificado, apresentou vários fragmentos no seu espectro de massas (Figura 61): m/z 463, 433, 361, 343, 271, 199. Já o íon 595, presente em todos os grupos para algumas amostras, porém mais evidente para o grupo IV, apresentou apenas 3 fragmentos principais em m/z 564, 330, 263 (Figura 62). O fragmento m/z 564 é decorrente da perda de CH_3O (31 Da) a partir do íon molecular. A seguir representa-se o espectro de massa do íon m/z 529 e 595 com suas respectivas perdas neutras em Da.

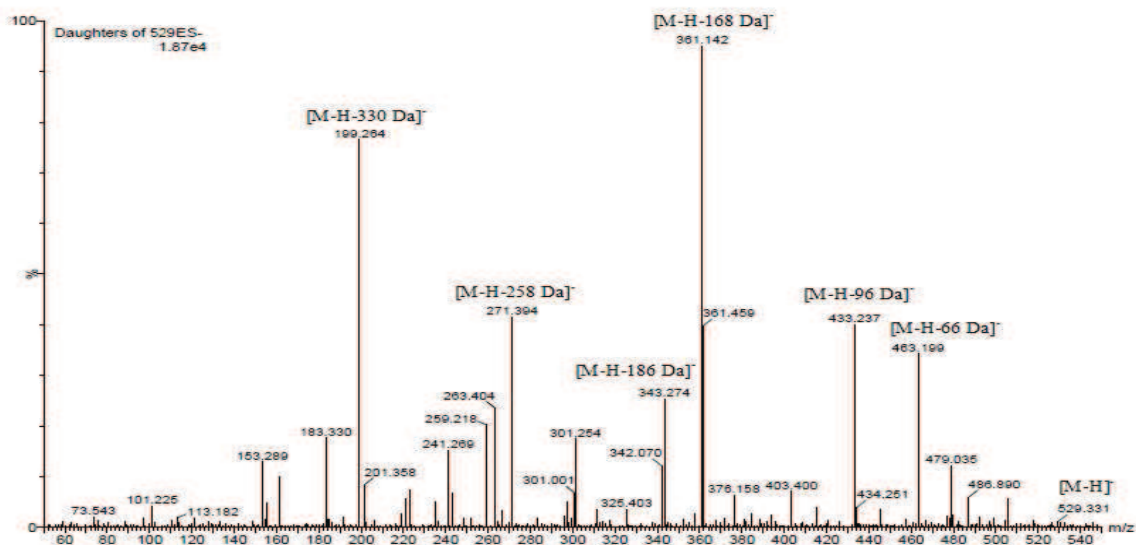


Figura 61. Espectro de massa do íon $[M-H]^-$ m/z 529 não identificado.

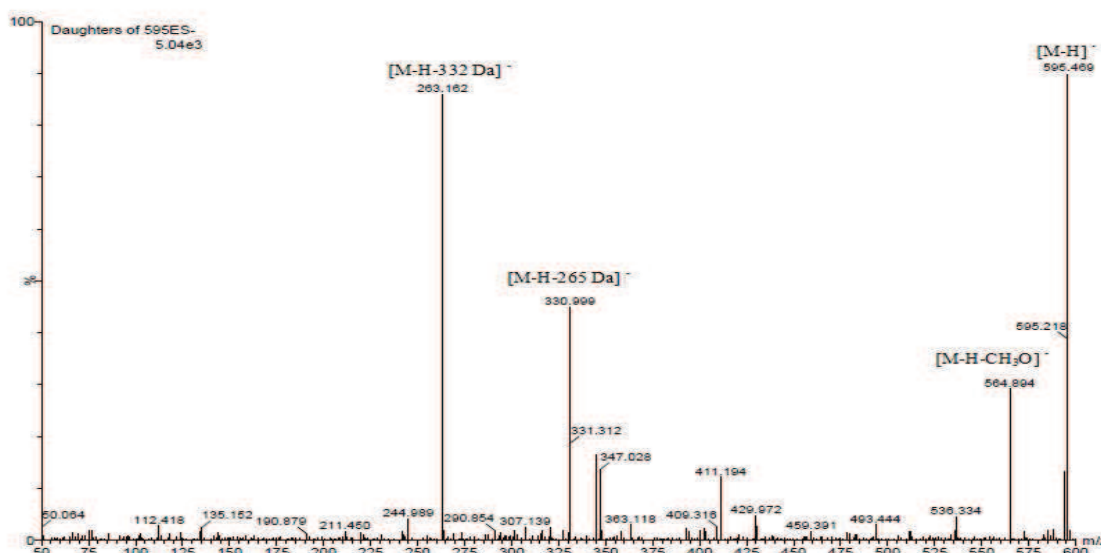


Figura 62. Espectro de massa do íon $[M-H]^-$ m/z 595 não identificado.

Através dos ESI(-)-MS/MS desses íons não identificados, tem-se algumas informações estruturais, mas devido à falta de padrões analíticos e informações em literatura, não foi possível a comprovação de sua identificação.

Para tanto, seria necessário um estudo mais aprofundado em relação aos mesmos e a obtenção de dados de massa exata. Para auxiliar na identificação e comprovação dos íons obtidos por ESI(-)-MS/MS, realizou-se um estudo por LC-MS/MS.

Na tabela 12, estão resumidas as conclusões sobre os íons que são característicos das

mesorregiões do Paraná.

Tabela 12. Íons Característicos das mesorregiões do Paraná.

[M-H] ⁻	Composto	Grupo	Características
163	Ácido p-cumárico	Todos	Característica do mel do Paraná em apresentar esses íons com alta intensidade.
169	Ácido gálico		
179	Ácido caféico		
199	Ácidos carboxílicos*		
201	Ácidos carboxílicos*		
361	Flavonóide*		
363	Ácido 3-prenil-4- dihidrocinamoiloxicinâmico		
333	Ácido agático		
447	CNI**		
255	Pinocembrina		
383	Terpeno dicarboxílico*	Importante no grupo I	Centro Sul e Sudeste
319	Ácido cuprésico	II	Metropolitana e Centro Oriental
443	CNI**		
399	Flavonóide *	III	Sudoeste
339	Flavonóide *	IV	Norte Central, Noroeste, Norte Pioneiro, Oeste e Centro Ocidental
285	Canferol		
595	CNI**		
263	Ácido 3,4-diacetilcafeico *	V	Esse íon está presente em algumas amostras dos outros grupos, mas é mais destacado no grupo V, mesorregião Oeste
299	Canferida		

* Sugerido

**Composto não identificado

5.4. Confirmação por LC-MS/MS da atribuição dos íons identificados

Quando se faz o acoplamento da cromatografia com a EM obtém-se o chamado cromatograma, e quando este é constituído de todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas é denominado TIC pelas siglas em inglês para o cromatograma de íons totais.²⁵

Com o objetivo de confirmar os íons visualizados na ESI(-)-MS analisou-se por LC-MS/MS a amostra de mel de Toledo (TO) pertencente ao grupo V, pois apresentou a maioria dos íons principais, sendo possível uma separação razoável dos compostos do mel. A amostra foi extraída (conforme método de extração), transferida para o insert vial e injetada no sistema LC-MS/MS obtendo-se o TIC (Figura 63). Numeraram-se as bandas cromatográficas de 1 a 17 relacionando-as com seu respectivo espectro de massa que estão representados na figura 63. Na tabela 13 estão relacionados os dados de LC-MS/MS obtidos

para todos os íons principais e seus respectivos tempos de retenção da amostra e alguns padrões analíticos.

A retenção relativa observada no cromatograma da Figura 63 mostra-se similar ao perfil já observado para os componentes da própolis onde o composto mais polar ácido gálico possui menor tempo de retenção. Em seguida eluem os fenilpropanóides de acordo com o número de grupos hidroxilas no anel aromático. Os compostos de polaridade intermediária são os flavonóides.

Os diterpenos ácido cuprésico e ácido agático encontram-se nessa região do cromatograma devido aos grupos carboxila na sua estrutura. Por último eluem os compostos fenólicos prenilados devido à presença dos grupos isoprenila que lhe conferem maior caráter lipofílico.

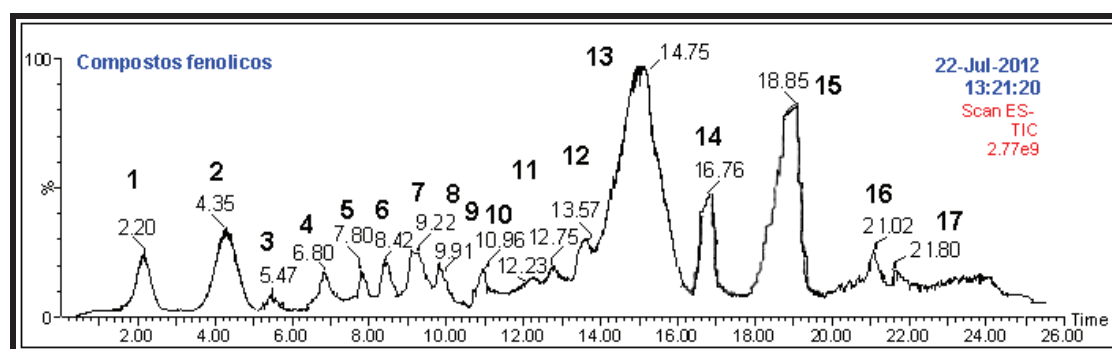


Figura 63. Cromatograma dos íons totais dos compostos do mel de Toledo (TIC) e seus respectivos tempos de retenção (1) íon m/z -169 ácido gálico, (2) íon m/z 179 - ácido caféico, (3) íon m/z 163 - ácido p-cumárico, (4) íon m/z 285 - canferol, (5) íon m/z 263 - desconhecido, (6) íon m/z 199 - desconhecido, (7) íon m/z 201 - desconhecido, (8) íon m/z 255 - pinocembrina, (9) íon m/z 299 canferida, (10) íon m/z 319 - ácido cuprésico, (11) íon m/z 339 - desconhecido, (12) íon m/z 447 - desconhecido, (13) íon m/z 361 - desconhecido, (14) íon m/z 333 - ácido agático, (15) íon m/z 363 - ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico, (16) íon m/z 383 - desconhecido, (17) íon m/z 443 - desconhecido.

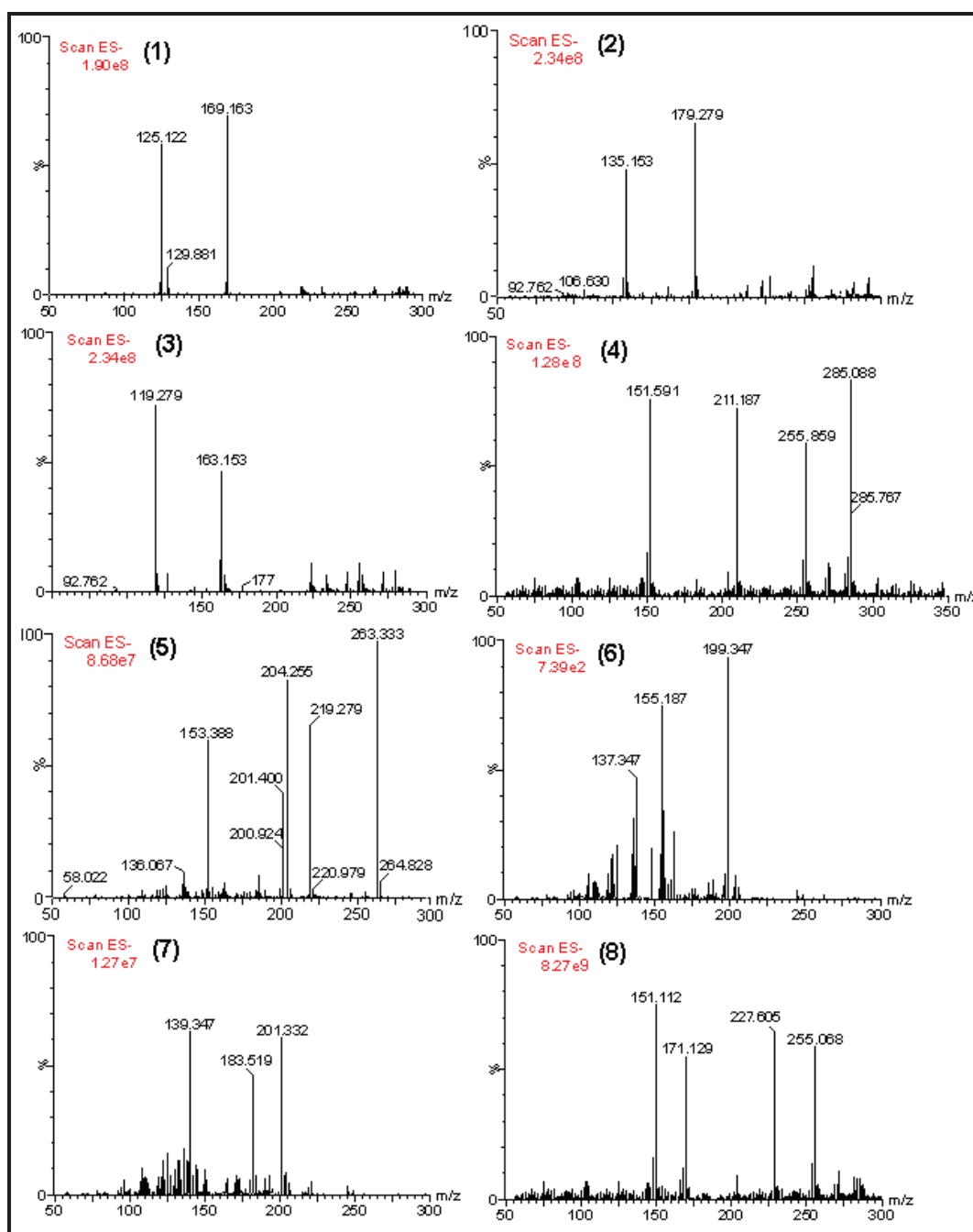
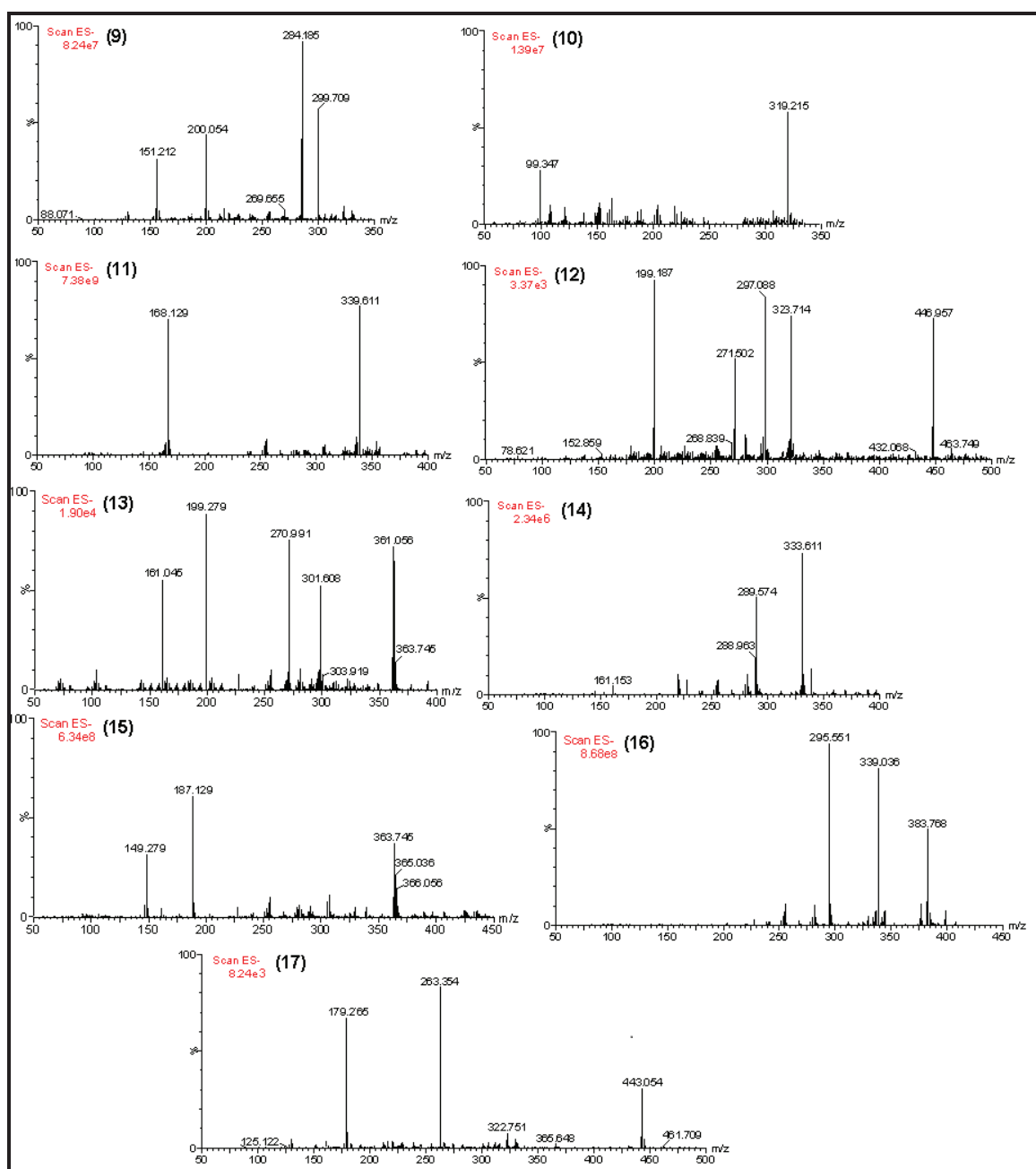


Figura 64. LC/MS/MS dos compostos orgânicos em modo negativo. (1) íon m/z -169 ácido gálico, (2) íon m/z 179 - ácido caféico, (3) íon m/z 163 - ácido p-cumárico, (4) íon m/z 285 - canferol, (5) íon m/z 263 - desconhecido, (6) íon m/z 199 - desconhecido, (7) íon m/z 201 - desconhecido, (8) íon m/z 255 - pinocembrina.



Continuação figura 64. LC/MS/MS dos compostos fenólicos em modo negativo. (9) íon m/z 299 canferida, (10) íon m/z 319 - ácido cuprêssico, (11) íon m/z 339 - desconhecido, (12) íon m/z 447 - desconhecido, (13) íon m/z 361 - desconhecido, (14) íon m/z 333 - ácido agático, (15) íon m/z 363 - ácido 3-prenil-4- dihidrocinamoiloxicinâmico, (16) íon m/z 383 - desconhecido, (17) íon m/z 443 - desconhecido.

Tabela 13. Íons encontrados em mel de *A. mellifera* do estado do Paraná por LC-MS/MS

[M-H]-	Composto	Grupo	T _R (mim.) do padrão analítico	T _R (mim.) da amostra	Fragmentos principais (LC-MS/MS) m/z
163	Ácido p-cumárico	I, II, III, IV	5,50	5,47	119 (60)
169	Ácido gálico	I, II, III,	2,00	2,20	125 (50)
179	Ácido caféico	I, II, III,	4,40	4,35	135 (70)
199	CNI*	I, II, III, IV	**N/A	8,42	137 (50), 155 (70)
201	CNI*	I, II, III, IV	**N/A	9,22	139 (60), 183 (50)
255	Pinocebrina	I	9,80	9,91	151 (75), 171 (50), 227 (70)
263	CNI*	I, II, IV e V	**N/A	7,80	153 (60), 204 (90), 219 (70)
285	Canferol	IV e V	7,00	6,80	255(60), 211(70), 151(80),
299	Canferida	I, II, III e V	**N/A	10,96	151 (30), 200 (40), 284 (100)
319	Ácido cuprêssico	II	12,00	12,23	99 (30)
333	Ácido agático	I, II, III, IV	**N/A	16,76	289 (50)
339	CNI*	IV	**N/A	12,75	168 (70)
361	CNI*	I, II, III, IV e V	**N/A	14,75	161 (50), 199 (100), 270 (80), 301 (50)
363	Ácido 3-prenil-4-dihidrocinamoiloxicinâmico	I, II, III, IV e V	**N/A	18,85	149(30), 187(60)
383	CNI*	II e V	**N/A	21,02	295 (100), 339 (80)
443	CNI*	II e III	**N/A	21,80	179 (70), 263 (80)
447	CNI*	I, II, III, IV e V	**N/A	13,57	199 (100), 271 (50), 297 (90), 323 (80)

*CNI- Composto não identificado.

**N/A- Padrão não disponível.

Os íons m/z 399, 529 e 595 não foram observados nestas condições. Os íons m/z 529 e 595 são pouco significativos com baixa intensidade, podendo até mesmo ser excluídos da PCA, mas o íon m/z 399 é importante, pois define a formação do grupo III. Uma possibilidade para estudar melhor esses três íons seria analisar uma amostra que pertença ao grupo IV, pois este grupo apresenta o íon m/z 595 com boa intensidade e uma do grupo III, pois este grupo tem amostras que apresentam os íons m/z 399 e 529.

A fragmentação dos íons principais obtidas através da LC-MS/MS gera menos fragmentos para alguns íons do que a ESI(-)-MS/MS, pois a LC-MS/MS considera os íons de maior intensidade para formação dos picos cromatográficos, embora seja possível confirmar a presença dos fragmentos mais importantes (intensos) dos íons principais.

O íon m/z 361 foi identificado na literatura através ESI(-)-MS/MS como sendo o

composto ácido 15-acetoxi-cupressico com as seguintes fragmentações: m/z 361, 301.¹¹³ Este íon está presente nas amostras de mel dos cinco grupos, mas seu ESI(-)-MS/MS apresenta maior número de íons fragmentos: m/z 361, 301, 271 e 199, o que não permite sua identificação inequívoca na ausência de padrão analítico. Para tal, seria necessário combinar o espectro ESI(-)-MS/MS com medidas de massa exata.

O mesmo ocorre com o íon 447 identificado na literatura como sendo o composto ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-dihidrocinamoiloxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenil-fenil}-2-propenóico, com os seguintes fragmentos: 447, 297, 149.¹¹³ Mas no presente trabalho os fragmentos obtidos para esse íon foram: m/z 447, 323, 297, 271 e 199. Inicialmente suspeitou-se tratar-se dos mesmos compostos, por apresentarem algumas fragmentações semelhantes, mas através da LC-MS/MS foi possível confirmar os fragmentos obtidos por ESI(-)-MS/MS e verificar que se tratava de outro composto, até o momento não identificado.

Através da comparação dos resultados obtidos por LC-MS/MS e ESI(-)-MS/MS pode-se comprovar a eficiência do modo ESI(-)-MS/MS na caracterização do perfil dos compostos fenólicos do mel. ESI(-)-MS/MS permitiu a obtenção dos mesmos íons [M-H]⁻ e fragmentos, ainda gerou um número de fragmentos maior, que facilita a identificação estrutural.

Outro ponto positivo do método de infusão direta é sua rapidez e simplicidade, pois é necessário apenas ajustar as condições analíticas do espectrômetro de massas. Para amostras muito complexas a análise por LC-MS/MS demora entorno de minutos enquanto que a análise por infusão direta por ESI(-)-MS/MS leva segundos (30 seg. por espectro). O tempo de análise curto é uma característica desejável para qualquer método de controle de qualidade.

Para a elucidação estrutural dos íons não identificados é necessário um estudo mais detalhado inclusive a obtenção de medidas de massas exatas dos íons em questão e comparação com padrões analíticos. Não sendo possível a aquisição dos padrões, seria necessário o isolamento dos compostos do mel para obtenção de dados espectroscópicos por RMN e outras técnicas de determinação estrutural.

5.5. Uso da impressão digital por ESI(-)-MS e PCA para comparar o mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula angustula*) e de *Apis mellifera*

Para confirmar a especificidade do método e sua eficiência em mostrar as diferenças em composição química entre as amostras comparadas, foram analisadas três amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula angustula*) de origem da mesorregião Oeste: Toledo, Cascavel e Nova Santa Rosa.

As três amostras de mel de Jataí foram extraídas e analisadas de acordo com o processo realizado para as amostras de mel de *Apis mellifera*. Foram selecionados 21 íons com intensidades superiores a 25%: m/z 75, 89, 113, 165, 179, 203, 217, 225, 255, 277, 279, 281, 309, 311, 315, 325, 341, 357, 413, 459 e 630. Esses íons foram incorporados à matriz de PCA juntamente com os íons principais da *Apis mellifera* (Figura 65). As impressões digitais das amostras de mel de *A. mellifera* foram novamente examinadas na procura pelos íons anteriores e quando presentes também tiveram suas intensidades registradas para realizar a PCA.

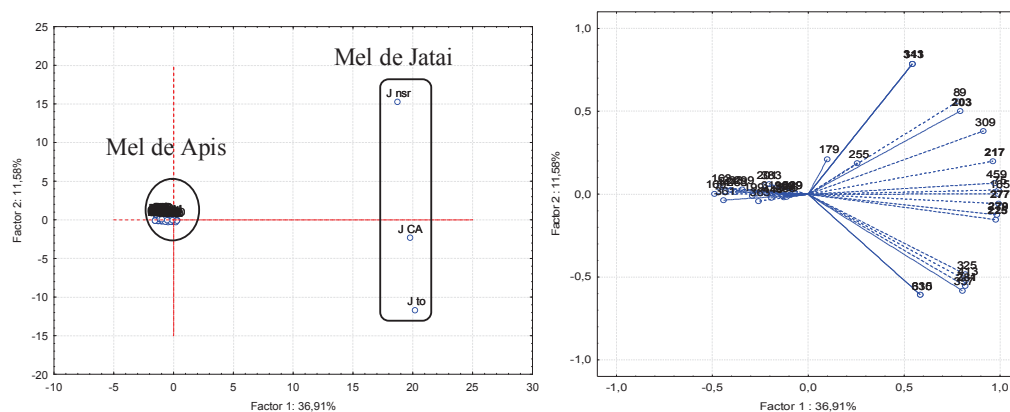


Figura 65. Ampliação do Plano formado pela PC1 e PC2 evidenciando o grupo de amostra de mel de *Apis mellifera* e de Jataí.

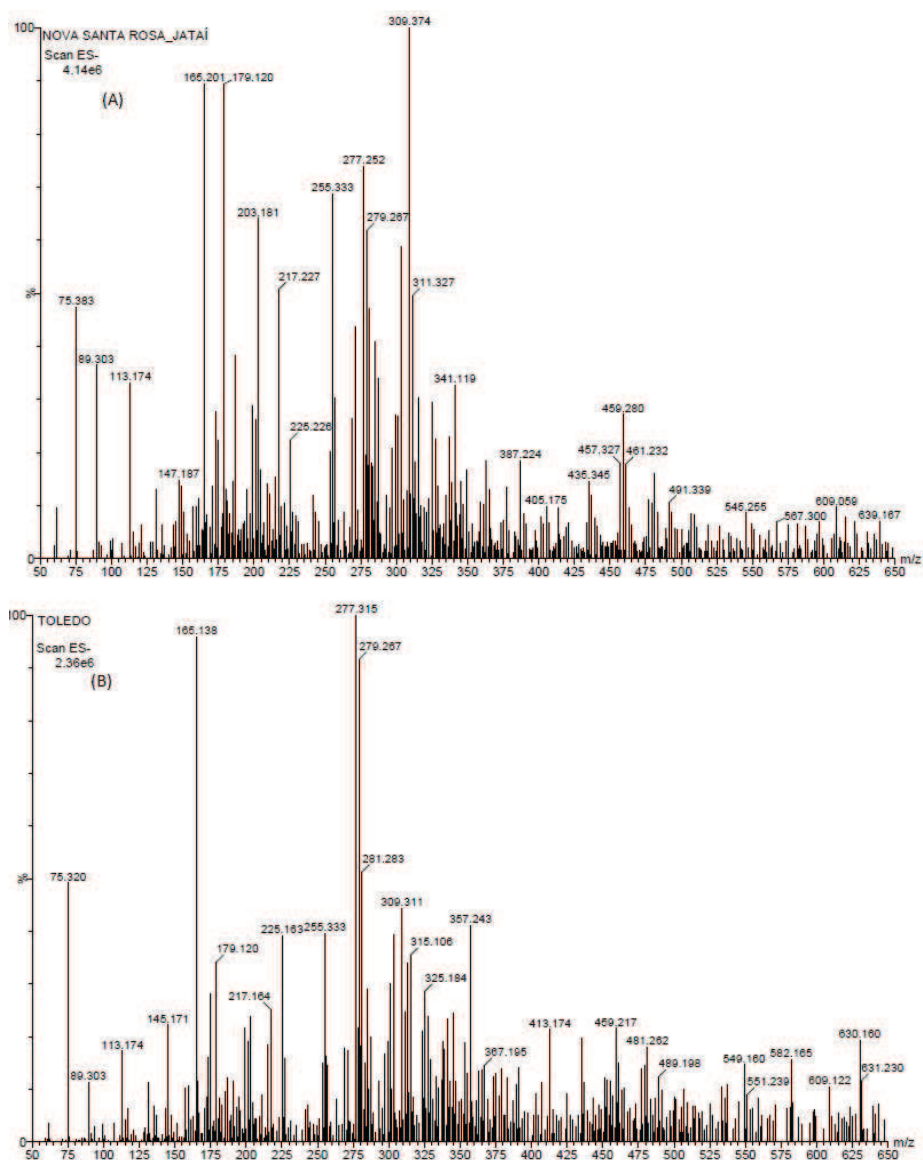
Observa-se na PCA a formação de dois grupos bem separados: o grupo formado pelos méis de *Apis mellifera* e o grupo de três amostras formado pelo mel de Jataí, uma vez que a composição em produtos naturais do mel de Jataí é muito diferente do mel de *Apis mellifera*. Nesse caso, os méis de Jataí apresentam-se como extremos na PCA e dominam o modelo, não permitindo enxergar as pequenas diferenças entre os méis de *Apis mellifera*.

O mel de Jataí apenas tem em comum com o mel de Apis os íons em m/z 179 e 255. No entanto, esses íons não são os de maior intensidade no mel de Jataí, conforme pode ser

observado nas impressões digitais a seguir (Figuras 66).

Os íons que determinaram a separação do mel de Jataí são: m/z 277, 279, 225, 165, 309, 217, 281, 315, 357, 309. Esses íons não ocorrem no mel de Apis, mostrando que o tipo de abelha influencia significativamente a composição fitoquímica do mel. Essa conclusão é ainda mais significativa quando comparamos méis de Apis e de Jataí produzidos na mesma região onde a diversidade floral disponível para as abelhas é muito similar.

Para verificar a influência do gênero e espécie de abelha na composição fitoquímica do mel novas pesquisas serão realizadas onde méis de Apis e de abelhas nativas, da mesma região geográfica e incluindo um maior número de amostras, serão comparadas quanto a seus perfis em produtos naturais.



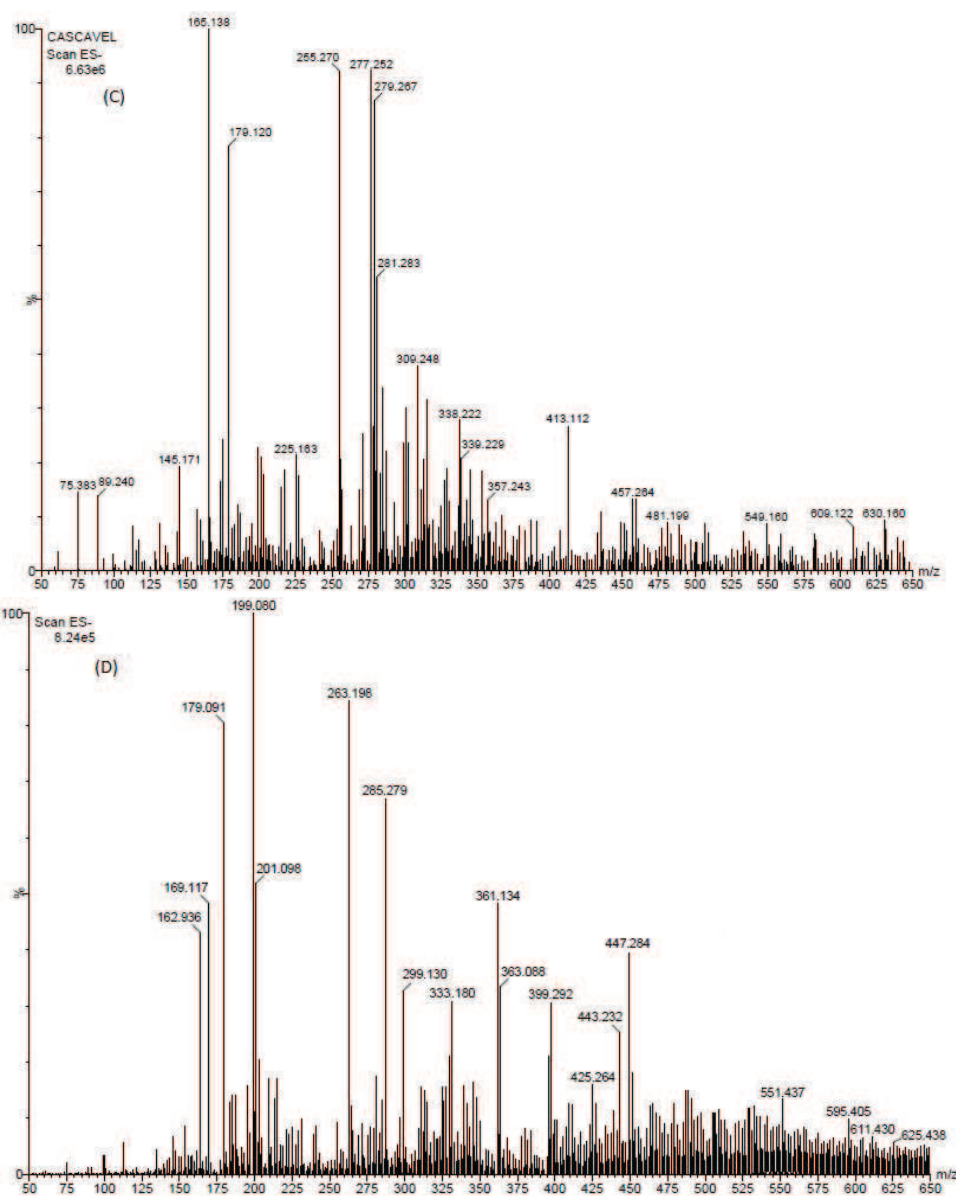


Figura 66. Impressões digitais obtidas por ESI(-)-MS de mel de Jataí: (A) Nova Santa Rosa; (B) Toledo e (C) Cascavel. Impressões digitais de mel de *Apis mellifera* de Toledo (D).

6. CONCLUSÕES

Através da espectrometria de massas por infusão direta foi possível desenvolver um método simples e rápido para comparar méis de *Apis mellifera* de diversas regiões do Estado do Paraná.

Este trabalho ressalta a importância da utilização da quimiometria para o tratamento de dados espectrais obtidos para um grande número de amostras. O emprego da análise por componentes principais (PCA) evidenciou os íons comuns e discrepantes entre as diferentes amostras que dificilmente seriam visualizados diretamente na matriz de dados.

Dessa maneira, a combinação dos dados obtidos por ESI(-)-MS e a análise multivariada permitiu classificar o mel do Estado do Paraná quanto a sua origem geográfica em 5 grupos. Também, foram observadas correlações entre o perfil de ácidos orgânicos no mel e as mesorregiões de produção, o que pode auxiliar no controle e rastreabilidade do mel produzido no Paraná.

Através da espectrometria de massas sequencial ESI(-)-MS/MS, combinado à análise de padrões autênticos, foi possível caracterizar ácidos orgânicos minoritários contidos nos méis analisados. No entanto, para fins classificatórios dos tipos de mel apenas se faz necessária a comparação das impressões digitais das amostras, não sendo imprescindível a identificação de seus componentes.

Os resultados obtidos nas análises por LC-MS/MS confirmaram os íons obtidos nas impressões digitais, e desta forma demonstraram que a técnica ESI(-)-MS/MS determina claramente o tipo de mel podendo ser usado para a tipificação das amostras e a comparação de sua composição.

Através da comparação dos resultados obtidos nas análises de mel de *Apis* com o mel de Jataí, comprovou-se que o método de estabelecer a impressão digital do mel por ESI(-)-MS é específico e seletivo, evidenciando claramente que o mel de *Apis* é rico em compostos fenólicos e sua composição química é semelhante entre as mesorregiões, sendo totalmente diferente do mel de Jataí.

Dessa forma, o estudo da composição fenólica dos méis brasileiros poderá fornecer informação da origem geográfica e identificação de méis autênticos, auxiliando no controle de qualidade do produto.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 - COOPER, R.A.; MOLAN, P.C.; HARDING, K.G.; Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. J. R. Soc. Med., Vol. 92, p. 283-285, 1999.
- 2 - MOLAN, P.C. Why honey is effective as a medicine. 2. The scientific explanation of its effects. Bee World, Vol. 82, N° 1, p. 22-40, 2001.
- 3 - NAGAI, T. et al.; Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. Food Chem., Vol. 75, N° 2, p. 237-240, 2001.
- 4 - SUBRAHMANYAM, M.; HEMMADY, A.; PAWAR, S.G.; Antibacterial activity of honey on bacteria isolated from wounds. Ann. Burns Fire Disasters, Vol. 16, N° 1, Disponível: http://www.medbc.com/annals/review/vol_14/num_1/text/vol14n1p22.htm. Acesso em: 30 Outubro. 2012.
- 5 - MAKAWI, A.Z.S., GADKARIEM, A.E., AYOUB, H.M.S.; Determination of Antioxidant Flavonoids in Sudanese Honey Samples by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography. E-Journal of Chemistry, Vol 6, N° 1, p. 429-437, 2009.
- 6 - MOREIRA, R.F.A.; MARIA, C.A.B.; Glicídios no mel. Quim. Nova, Vol. 24, N° 4, p. 516-525, 2001.
- 7 - SUAREZ, J.M.A.; TULIPANI, S.; ROMANDINI, S.; BERTOLI, E.; BATTINO, M.; Contribution of honey in nutrition and human health: a review. Mediterr J Nutr Metab, Vol.3, p.15–23, 2010.
- 8 - BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Diário Oficial da União, Brasília, N° 204, Seção 1, p.16, 2000.
- 9 - GUTIÉRREZ, A.F.; CARRETERO, A.S.; CARAVACA, A.M.G.; ROMERO, M.G.;

ROMÁN, D. A.; Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 41, p.1220–1234, 2006.

10 - GHELDOF, N.; WANG, X.; ENGESETH, N.J.; Identification and quantification of antioxidants components of honeys from various floral sources. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 50, N° 10, p. 5870-5877, 2002.

11 - CAMPOS, G.; DELLA-MODESTA, R.C.; SILVA, T.J.P.; BAPTISTA, K.E.; GOMIDES, M.F.; GODOY, R L; Classificação do mel em floral ou mel de melato. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Vol. 23, N° 1, p. 1-5, 2003.

12 - PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M.; Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey. *Journal of Chromatography A*, Vol 1216, N° 38, p. 6620–6626, 2009.

13 - KASKONIENE, V.; VENSKUTONIS, P.R.; Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* , Vol. 9, p. 620-624, 2010.

14 - SOUZA, D.C. (org.); *Apicultura: manual do agente de desenvolvimento rural*. Brasília: SEBRAE, p. 100, 2004.

15 - IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro, 2004. Pecuária Municipal. In: Sistema IBGE de recuperação de dados: mel de abelhas. <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?e=I&c=74>. Consultado em 09/11/2012.

16 - ROMÁN, D.A.; CARAVACA, A.M. G.; ROMERO, M.G.; CARRETERO, A.S.; Carretero A.S., GUTIERREZ, A.F.; Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis–electrospray ionization–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 41, p.1648–1656, 2006.

17 - EMBRAPA; *Mel: Características e propriedades*. Documentos ISSN 0104-866X, N°

150, 2010.

18 - PYRZYNSKA, K. and BIESAGA, M.; Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Analytical Chemistry*, Vol. 28, N° 7, 893-902, 2009.

19 - MICHALKIEICZ, A.; BIESAGA, M.; PYRZYNSKA, K.; Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal of Chromatography A*, Vol 1187, p.18–24, 2008.

20 - KASKONIENÉ, V.; MARUSKA, A.; KORNYSOVA, O.; Quantitative and qualitative determination of phenolic compounds in honey. *Cheminé Technologija*, Vol.52, N° 3, 2009.

21 - EBELIN, M.N.; MOLLER, J.K.S.; CATHARINO, R.R.; Electrospray ionization mass spectrometry impressão digitaling of whisky: immediate proof of origin and authenticity. *Analyst*, Vol.130, p.890–897, 2005.

22 - EBELIN, M.N.; ARAÚJO, A.S.; ROCHA, L.L.; TOMAZELA, D.M.; SAWAYA, A.C.H.F.; ALMEIDA, R.R.; CATHARINO, R.R.; Electrospray ionization mass spectrometry impressão digitaling of beer. *Analyst*, Vol. 130, p.884–889, 2005.

23 - MAURI, P.; PIETTA, P.; Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol. 23, p. 61–68, 2000.

24 - MARSHALL, H. and COOPER, H.J.; Electrospray Ionization Fourier Transform Mass Spectrometric Analysis of Wine. *J. Agric. Food Chem.*, Vol.49, p.5710-5718, 2001.

25 - JÚNIOR, H.A.M.; BUSTILLOS, O.V.; PIRES, M.A.F.; Determinação de resíduos de cloranfenicol em amostras de leite e mel industrializados utilizando a técnica de espectrometria de massas em “Tandem” (CLAE-EM/EM). *Quim. Nova*, Vol. 29, N° 3, p.586-592, 2006.

26 - CHIARADIA, M.C.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada á espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quim. Nova*, Vol. 31, N° 3, p.623-636, 2008.

- 27 - SAWAYA, A.C.H.F., CUNHA, I.B.S., MARCUCCI, M.C., RODRIGUES, R.F.O., EBERLIN, M.N., Brazilian Propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. *Apidologie*. Vol.37, p. 398–407, 2006.
- 28 - MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C.; Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados, *Química Nova*, Vol. 21, Nº 4, p. 467-469, 1998.
- 29 - ABDI. H.; WILLIAMS, L.J. "Principal component analysis.". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, Vol.2: p.433-459, 2010.
- 30 - Disponível em http://www.sites-do-brasil.com/diretorio/index.php?cat_id=911. Acesso em Abril 2012.
- 31 - <http://profjopa.no.comunidades.net/index.php?pagina=1748517990> (Geografia do Paraná)
- 32 - Disponível em <http://www.iapar.br>
- 33 - Disponível em <http://www.ipardes.gov.br/webasis.docs.pdf>.
- 34 - OLIVEIRA, M. L.; CUNHA, J. A.; Abelhas africanizadas *Apis mellifera scutellata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Apinae) exploram recursos na floresta amazônica? *Acta Amazonica*, Manaus, Vol. 35, Nº 3, p. 389-394, 2005.
- 35 - SOUZA, D.L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; PINTO, M. S. C.; As abelhas como insetos polinizadores. *Revista Eletrônica de Veterinária*, Vol. 8, Nº.3, p.1-7, 2007.
- 36 - BACAXIXI, P.; BUENO, C.E.M.S.; RICARDO, H.A.; EPIPHANIO, P.D.; SILVA, D.P.; BARROS, B.M.C.; SILVA, T.F.; BOSQUÊ, G.G.; LIMA, F.C.C.A.; Importância da Apicultura no Brasil. *Revista Científica Eletrônica de Agronomia*– ISSN: 1677-0293. Periódico semestral, Nº20, 2011.
- 37 - SEBRAE. Informações de mercado sobre mel e derivados da colméia. Relatório

Completo, Série Mercado. 2006.

38 - CRANE, E. O livro de mel. São Paulo: Nobel, p. 13-76,1983.

39 - SEBRAE. Informações de Mercado sobre Mel e derivados de colmeia. Relatório completo. Série Mercado. 2006.

40 - SEGEREN, P.; Apicultura nas regiões tropicais. Agrodok 32. Fundação Agromisa, ISBN: 90-77073-77-9. 2004 USAID/Brasil. Análise da indústria do mel. Inserção de micro e pequenas empresas no mercado internacional. Vol 2, 2006.

41 - Disponível em

http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2002&id_pagina=1.

42 - GÓMEZ-ROMERO, M.; ZUREK, G. ; SCHNEIDER, B.; BAESSMANN, C.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; Automated identification of phenolics in plant-derived foods by using library search approach. Food Chemistry, N° 124, p.379–386, 2011.

43 - AGUIAR, C. M. L.; Utilização de recursos florais por abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em uma área de Caatinga (Itatim, Bahia, Brasil). Revista Brasileira de Zoologia, Curitiba, Vol. 20, N° 3, p.457-467, 2003.

44 - YANIV. Z. & RUDICH, M. Bee Products. Plenum Press, New York. p.232, 1996.

45 - DYEGO, C.S.; OLIVEIRA, E. N.A.; MARTINS, J.N.; ALBUQUERQUE, B.; E.M.B.; Qualidade físico-química e microbiológica do mel de *Apis mellifera* comercializado na cidade de Russas, CE. Tecnol. & Ciên. Agropec., João Pessoa, Vol.5, N° 1, p.41-45, 2011.

46 - ANDRADE, S.E. O.; MARACAÇA, P.B.; SILVA, R. A.; FREIRES, G.F.; PEREIRA, A. M. P.; FERNANDES, A.A.; Estudo sobre o uso do mel de abelha associado com plantas medicinais na comunidade Várzea Comprida dos Oliveiras, Pombal, Paraíba, Brasil. ACSA – Agropecuária Científica no Semi-Árido, Vol.8, N° 3, p. 45- 50, 2012.

- 47 - ALJADI, A. M.; KAMARUDDIN, M. Y.; Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chem.*, Vol. 85, p. 513-518, 2004.
- 48 - MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; MILLOGO, J.; ROMITO, M.; NACOUUMA, O.G.; Therapeutic uses of honey and honeybee larvae in central Burkina Faso. *J. Ethnopharmacol.*, Vol. 95, N° 1, p. 103-107, 2004.
- 49 - TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; MARTOS, I.; FERRERES, F.; RADOVIC, B. S.; ANKLAM, E.; HPLC flavonoid profiles as markers for the botanic origin of European unifloral honeys, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol.81, p.485-496, 2001.
- 50 - HUIDOBRO, J. F.; SANTANA, F. J.; SANCHES, M. P.; SANCHO, M. T.; MUNIATEGUI, S.; SIMAL-LOZANO, J.; Diastase, invertase and β -glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain. *Journal of Apicultural Research*, London, Vol. 34, N° 1, p. 39-44, 1995.
- 51 - MENDES, B. A.; COELHO, E. M.; Considerações sobre características de mel de abelhas - análises e critérios de inspeção. *Informe Agropecuario*, Belo Horizonte, Vol. 9, N° 106, p. 56-67, 1983.
- 52 - TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; BLÁZQUEZ, A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F.; High-performance liquid chromatography of honey flavonoids. *Journal of Chromatography*, Vol.634, p. 41-46, 1993.
- 53 - QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. *Quím. Nova*, Vol. 24, p. 68-76, 2001.
- 54 - DATTA, N.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A; MARTOS, I.; FERRERES, F.; YAO, L.; SINGANUSONG, R.; Flavonoids, Phenolic acids and Abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. *Food Chemistry*, Vol.81, p.159-168, 2003.

55 - ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A.N.; MOREIRA, L.; DIAS, L.G.; PEREIRA, E.; Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, Vol.46, p.3774-3779, 2008.

56 - PÉREZ, R. A.; IGLESIAS, M. T.; PUEYO, E.; GONZÁLEZ, M.; DE LORENZO, C.; Amino Acid Composition and Antioxidant Capacity of Spanish Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 55, p.360-365, 2007.

57 - LIANDA, R.L.P.; Tese de Doutorado. Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante. PPGQO-UFRRJ, 2009.

58 - SHAHIDI, F.; NACZK, M.; Phenolics in Food and Nutraceuticals. Boca Raton: CRC Press, p. 576, 2004.

59 - SOARES, S.E.; Phenolic acids as antioxidants. *Rev. Nutr.*, Campinas, Vol.15, Nº 1, p.71-81, 2002.

60 - NACZK, M.; SHAHIDI, F.; Review: Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1054, p. 95–111, 2004.

61 - TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F.; Flavonoids in honey of different geographical origin. *Zeitschrift-fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, Vol.196, p.38-44, 1993.

62 - CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F.; PRIMEL, E. G.; Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. *Quím. Nova* [online]. Vol.34, Nº.9, p.1604-1617, 2011. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000900021>.

63 - ROSSI, D. T.; ZHANG, N.; Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, Vol. 885, p. 97-113, 2000.

64 - POOLE, C. F.; GUNATILEKA, A. D.; SETHURAMAN, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A.*, Amsterdam, Vol. 885, p.17-39, 2000.

65 - BERTONCELJ, J.; POLAK, T.; KROPF, U.; KOROSEC, M., GOLOB, T.; LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. *Food Chemistry*, Vol.127, p.296–302, 2011.

66 - D'ARCY, B.R.; Antioxidants in Australian floral honeys – Identification of health-enhancing nutrient components. Australia: Rural Industries Research and Development Corporation, Publication, N° 05/040, 1. 2005<<http://www.rirdc.gov.au/reports/HBE/05-040.pdf>>.

67 - PULCINI, P.; ALLEGRINI, F.; FESTUCCIA.; Fast SPE extraction and LC-ESI-MS-MS analysis of flavonoids and phenolic acids in honey. *Apiata*, Vol.4, p.21–27, 2006.

68 - LACERDA, J. J. J.; SANTOS, J. S.; SANTOS, S. A.; RODRIGUES, G. B.; SANTOS, M. L. P.; Influência das características físico-químicas e composição elementar nas cores de méis produzidos pro *Apis mellifera* no sudoeste da Bahia utilizando análise multivariada. *Química Nova*, Vol. 33, N° 5, p. 1022-1026, 2010.

69 - ANKLAM E.; A Review of the Analytical Methods to Determine the Geographical and Botanical Origin of Honey. *Food Chem.*, Vol.63, p. 549-562. 1998.

70 - ANUPAMA, D.; BHAT, K. K.; SAPNA, V. K.; Sensory and physico-chemical properties of commercial samples of honey. *Food Research International*, Vol. 36, p.183–191, 2003.

71 - 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*, Vol. 15, N°. 3, p. 251-258, 2009.

72 - DISCHE, E.; Color reactions of carbohydrates. In:WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). *Methods in carbohydrates chemistry*. New York: Academic Press, 2008. Vol. 1, p. 477-512.

73 - BARTH, O. M.; MAIORINO, C.; BENATTI, A. P. T.; BASTOS, D. H. M.; Determinação de parâmetros físico-químicos e da origem botânica de méis indicados monoflorais do sudeste do Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, Vol.2, N° 25, p.229-233, 2005.

74 - DE ARRUDA C. M. F.; MARCHINI L. C.; MORETI A. C. C. C.; OTSUK I. P.; SODRÉ G. S.; Características Físico-Químicas de Méis da Chapada do Araripe/Santana do Cariri-Ceará. *Act. Scient. Anim. Sci.* Vol.27, 171-176, 2005.

75 - DÍEZ M.J.; ANDRÉS C.; TERRAB A.; Physicochemical Parameters and Pollen Analysis of Moroccan Honeydew Honeys. *Int. J. Food Sci. Technol.* Vol.39, 167-176, 2004.

76 - ANKLAM, E.; A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* Vol.63, p. 549-562, 1998.

77 - CORDELLA, C.B.; MILITÃO, J.S.; CLÉMENT, M.C.; CABROL-BASS, D.; Honey characterization and adulteration detection by pattern recognition on HPAEC-PAD profiles. 1. Honey floral species characterization. *J. Agric. Food Chem.* Vol.51, p.3234-3242, 2003.

78 - TERRAB, A.; ESCUDERO, M.L.; GONZALEZ-MIRET, M.L.; HEREDIA, F.J.; Colour characteristics of honey as influenced by pollen grain content: a multivariate study. *J. Sci. Food Agric.* Vol.84, p.380-386, 2004.

79 - DEVILLERS, J.; MORLOT, M.; PHAM-DELEGUE, M.H.; DORE, J.C.; Classification of monofloral honeys based on their quality control data. *Food Chem.* Vol. 86, p.305-312, 2004.

80 - SERRANO, S., M.; VILLAREJO, R.; ESPEJO; JODRAL, M.; Chemical and physical parameters of Andalusian honey: classification of Citrus and Eucalyptus honeys by discriminant analysis. *Food Chem.* Vol. 87, p.619-625, 2004.

81 - DE MARIA, C.A.B.; TRUGO, L.C.; COSTA, L.S.M.; ALBUQUERQUE, M.L.S.; QUINTEIRO, L.M.C.; BARTH, O.M.; Determination of non-volatile compounds of

different botanical origin Brazilian honeys. *Food Chemistry*, Vol. 65, p.347-352, 1999.

82 - LEMOS, G.S.; SANTOS, J. S.; SANTOS, M. L. P.S.; Validação de método para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto. *Quím. Nova* [online]. Vol.33, Nº.8, p. 1682-1685, 2010. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000800012>.

83 - FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; GIL, M.I.; TOMÁS-LORENTE, F.; An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. *Journal Science Food Agric.*, Vol. 56, p.49-56, 1991.

84 - KENJERIC, D.; MANDIC, M.L.; PRIMORAC, L.; CACIC, F.; Flavonoid pattern of sage (*Salvia officinalis* L.) unifloral honey. *Food Chemistry*, Vol.110, p.187–192, 2008.

85 - 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*, Vol. 114, p.1438–1443, 2009.

86 -FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; SOLER, C.; GARCÍA-VIGUERA; A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. *Apidologie*, Vol.25, p.21-30, 1994.

87 - FERRERES, F.; JUAN, T.; PEREZ-ARQUILLUE, C.; HERRERA-MARTEACHE, A.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; Evaluation of pollen as a source of kaempferol in rosemary honey. *Journal Science Food Agric.*, Vol.77, p.506-510, 1998.

88 - SABATIER, S.; AMIOT, M.J.; TACCHINI, M.; AUBERT, S.; Identification of flavonoids in sunflower honey. *Journal of Food Science*. Vol. 57, Nº3, p.773-777, 1992.

89 - WESTON, R.J.; MITCHELL, K.R.; ALLEN, K.L.; Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *Food Chemistry*, Vol.64, Nº3, p.295-301, 1999.

90 - RIBEIRO-CAMPOS, M.G.; SABATIER, S.; AMIOT, M.J.; AUBERT, S.; Characterization of flavonoids in three hiveproducts: bee pollen, própolis and honey. *Planta Médica*, Vol.56, p. 580-581, 1990.

- 91 - AMIOT, M.J.; AUBERT, S.; GONNET, M.; TACCHINI, M.; Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles. *Apidologie*, Vol.20, p.115-125, 1989.
- 92 - DIMITROVA, B.; GEVRENOVA, R.; ANKLAM, E.; Analysis of Phenolic Acids in Honeys of Different Floral Origin by Solid-phase Extraction and High-performance Liquid Chromatography. *Phytochemical Analysis*, Vol.18, N° 24–32, 2007.
- 93 - KAHOUN, D.; REZKOVÁ, S.; VESKRNOVÁ, K.; KRÁLOVSKÝ, J.; HOLCAPEK, M.; Determination of phenolic compounds and hydroxymethylfurfural in meads using high performance liquid chromatography with coulometric-array and UV detection. *Journal of Chromatography A*, Vol 1202, p.19–33, 2008.
- 94 - MARTOS, I.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; Identification of flavonoids markers for the botanical origin of Eucaliptus honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 48, p.1498-1502, 2000.
- 95- FERRES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMAS-LORENTE, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; Hesperetin: A marker of the floral origin of citrus honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol.61, N° 1, p.121–123, 1993.
- 96 - ANDRADE, P.; FERRERES, F.; AMARAL, M.T.; Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, Vol.20, p. 2281-2288, 2004.
- 97 - GIL, M. I.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; Plant phenolic metabolites and floral origin of rosemary honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.43, N° 11, p.2833–2838, 1995.
- 98 - FERRERES, F.; ANDRADE, P.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol 44, N° 8, p.2053–2056, 1996.

99 - TOMAS-BARBERAN, 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*, Vol.81, N° 5, p.485–496, 2001.

100 - MERKEN, H.M.; GARY, R.B.; Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography : a Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.48, N° 3, p.577- 599, 2000.

101 - YAOA, L.; JIANG, Y.; SINGANUSONG, R.; DATTA, N.; RAYMONT, K.; Phenolic acids in Australian *Melaleuca*, *Guioa*, *Lophostemon*, *Banksia* and *Helianthus* honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*, Vol. 38, p.651–658, 2005.

102 - FIORANI, M.; ACCORSI, A.; BLASA, M.; PIATTI, E. Flavonoids from Italian Multifloral Honeys Reduce the Extracellular Ferricyanide in Human Red Blood Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol.54, p.8328-8334, 2006.

103 - MARTOS, I.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; Identification of flavonoid marks for botanical origin of Eucalyptus honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 48, p. 1498 - 1502, 2000.

104 - OLIVEIRA, P.S.; MULLER, R.C.S.; DANTAS, K.G.F.; ALVES, C.N.; VASCONCELOS, M.A.M.; VENTURIERI, G.C.; Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. *Quím. Nova* [online], Vol.35, N°.9, p. 1728-1732, 2012. ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000900005>.

105 - PETRUS, K.; SCHWARTZ H.; SONTAG G.; Analysis of flavonoids in honey by HPLC coupled with coulometric electrode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.*, Vol.400, N° 8, p.2555-63, 2011.

106 - MARTOS, I.; COSENTINI, M.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry, Vol 45, N° 8, p.2824-2829, 1997.

107 - YAO, L.; JIANG, Y.; D'ARCY, B.; SINGANUSONG, R.; DATTA, N.; CAFFIN, N.; RAYMONT, K.; Quantitative high-performance liquid chromatography analyses of flavonoids in Australian *Eucalyptus* honeys. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol.52, p. 210-214, 2004.

108 - MUÑOZ, O.; COPAJA, S.; SPEISKY, H.; PENÃ, R. C.; MONTENEGRO, G.; Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. Quim. Nova, Vol. 30, N° 4, p.848-851, 2007.

109 - LIANDA, R.L.P. Dissertação de Mestrado. Caracterização de mel de *Apis mellifera* pelo seu perfil em substâncias fenólicas por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação da atividade biológica. PPGQO-UFRRJ, p.142, 2004.

110 - BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; SFORCIN, J.M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; MAIMONI-RODELLA, R.; POPOV, S.; Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. Z. Naturforsch, Vol.54, p.401-405, 1999.

111 - MARÓSTICA JUNIOR, M.R.; DAUGSCH, A.;MORAES, C.S.; QUEIROGA, C.L.; PASTORE, G.M.; PARK, Y.K.; Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. Ciência e tecnologia de alimentos, Vol.28, N°1, p. 178-181, 2008.

112 - BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.; MARCUCCI, M.A.; Propolis: recente advances in chemistry and plant origin. Apidologie. Vol 31, N°3-15, 2000.

113 - SAWAYA, A.C.H.F.; Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas. Tese de doutorado (Área de concentração: química analítica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. p.34-35, 2006.

114 - SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D.; Origin and chemical variation of Brazilian própolis.e CAM2:33-38.

115 - FURUKAWA,S.; TAKAGI, N.; IKEDA, T.; ONO, M.; NAFADY, M.; NOHARA, T.; SUGIMOTO, H.; DOI, S.; YAMADA, H.; Two novel long-chain alkanolic acid esters of lupeol from alecrim-propolis. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. Vol. 50, N°3, p.439-440, 2002.

116 - BANKOVA,V.; POPOVA, M.; BOGDANOV, S.; SABATINI, A.G.; Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences, Vol 57, N°5-6, p.530-533, 2002.

117 - SORKUN, K.; SUER, B.; SALIH, B.; Determination of chemical composition of Turkish propolis. Zeitschrift fur Naturforschung C-A Journal of Biosciences. Vol 56, N° 7-8, p. 666-668, 2001.

118 - NEGRI, G.; SALATINO, M.L.F.; SALATINO, A.; Unusual chemical composition of a sampli of Brazillian própolis, as assessed by analisis of a chloroform extract. Journal of Apicultural Reserarch. Vol 42, p.53-56, 2003.

119 - SERRANO, S.; VILLAREJO, M.; ESPEJO, R.; JODRAL, M.; Chemical and physical parameters of Andalusian honey: classification of Citrus and Eucalyptus honeys by discriminant analysis. Food Chem. Vol.87, N°619-625, 2004.

120 - HOSSAIN, M.B.; Dilip K. R.; BRUNTON, N.P.; MARTIN-DAIANA, A.B.; BARRY-RYAN, C.; Characterization of Phenolics Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. J Agric Food Chem. Vol 13, 58, N° 19, 2010.

121 - SILVA, A.C.L.; Tipificação de méis brasileiros por micro-extração em fase sólida combinada com cromatografia gasosa (SPME-CG). Tese de doutorado (Departamento de Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas Instituto de Química, Campinas, 2006.

122 - FABRE, N.; RUSTAN, I.; HOFFMANN, E.; QUETIN-LECLERCQ, J.; Determination of Flavone, Flavonol, and Flavanone Aglycones by Negative Ion Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom,

Vol.12, p.707–715, 2001.

123 - TRAUTVETTER,S.; KOELLING-SPEER, I.; SPEER, K.; Confirmation of phenolic acids and flavonoids in honeys by UPLC-MS. *Apidologie*, Vol.40, Nº 2, p. 140–150, 2009.

124 - WATERS. Operator's Guide. Waters Micromass, Quatro Premier XE, Mass Spectrometer.2008.

125 - MORAES, M.C.; LAGO, C.L.; Espectrometria de massas com ionização por “eletrospray” aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. *Quim. Nova*, Vol. 26, Nº. 4, p.556-563, 2003.

126 - ARDREY, R. E.; *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2003.

127 - SOARES, V. L.M.; Como obter resultados confiáveis em cromatografia. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, São Paulo, Vol.60, Nº1, p.79-84, 2001.

128 - CROTTI, A. E. .M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J.L. C.; LOPES, N. P.; Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Quím. Nova* [online]. Vol.29, Nº.2, p. 287-292. 2006, ISSN 0100-4042. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422006000200020>.

129 - SAWAYAA, A.C.H.F.; ABDELNURB, P.V.; EBERLINB, M.N.; KUMAZAWAC S.; AHND, M.R.; BANGD, Z.S.; NAGARAJAE, N.; BANKOVAF, V.S.; AFROUZANG, H.; Fingerprinting of propolis by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry. *Talanta*. Vol 81, p. 100–108. 2010.

130 - SAWAYA, A.C.; ABDELNUR, P.V.; EBERLIN, M.N.; KUMAZAWA,S.; AHN, M.R.; BANG, K.S.; NAGARAJA, N.; BANKOVA, V.S.; AFROUSAN, H.; Electro spray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. Vol. 15, Nº 81(1-2), p.100-8, 2010.

131 - MARQUES, L. A.; CATHARINO, R.R.; BRUNS, R.E.; EBERLIN, M.N.; Electro spray ionization mass spectrometry fingerprinting of perfumes: Rapid classification

and counterfeit detection. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*; Vol 20, N° 24, p.3654-8, 2006.

132 - Disponível em <http://www.massbank.jp>. Acessado 20/08/12.

133 - RODRIGUES-FILHO, E.; MAGNANI, R.F; Xi,W.; MIROCHAB, C.J.; PATHRE, S.V.; Hydroxylation of the Labdane Diterpene Cupressic Acid by *Fusarium graminearum*. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 13, N° 2, p.266-269, 2002.

8. ANEXOS

Anexo 1. Tabela das Mesorregiões, Microrregião e Municípios do Estado do Paraná.

MESORREGIÃO SUL - 19 Municípios	
Microrregião	Municípios
Guarapuava	Campina do Simão, Candói, Cantagalo, Espigão Alto do Iguaçu, Foz do Jordão, Goioxim, Guarapuava, Inácio Martins, Laranjeiras do Sul, Marquinho, Nova Laranjeiras, Pinhão, Porto Barreiro, Quedas do Iguaçu, Reserva do Iguaçu, Rio Bonito do Iguaçu, Turvo, Virmond.
Palmas	Clevelândia, Coronel Domingos Soares, Honório Serpa, Mangueirinha, Palmas
Pitanga	Boa Ventura de São Roque, Laranjal, Mato Rico, Palmital, Pitanga, Santa Maria do Oeste.
MESORREGIÃO SUDESTE - 21 Municípios	
Prudentópolis	Fernandes Pinheiro, Guamiranga, Imbituva, Ipiranga, Ivaí, Prudentópolis, Teixeira Soares
São Mateus do Sul	Antônio Olinto, São João do Triunfo, São Mateus do Sul
União da Vitória	Bituruna, Cruz Machado, General Carneiro, Paula Freitas, Paulo Frontin, Porto Vitória, União da Vitória
MESORREGIÃO METROPOLITANA - 37 Municípios	
Microrregião	Municípios
Cerro Azul	Adrianópolis, Cerro Azul, Doutor Ulysses
Curitiba	Almirante Tamandaré, Araucária, Balsa Nova, Bocaiúva do Sul, Campina Grande do Sul, Campo Largo, Campo Magro, Colombo, Contenda, Curitiba, Fazenda Rio Grande, Itaperuçu, Mandirituba, Pinhais, Piraquara, Quatro Barras, Rio Branco do Sul, São José dos Pinhais, Tunas do Paraná
Lapa	Lapa, Porto Amazonas
Metropolitana	Agudos do Sul, Campo do Tenente, Piên, Quitandinha, Rio Negro, Tijucas do Sul
Paranaguá	Antonina, Guaraqueçaba, Guaratuba, Matinhos, Morretes, Paranaguá, Pontal do Paraná
MESORREGIÃO CENTRO ORIENTAL -14 Municípios	
Jaguariaíva	Arapoti, Jaguariaíva, Piraí do Sul, Sengés
Ponta Grossa	Carambeí, Castro, Palmeira, Ponta Grossa
Telêmaco Borba	Ortigueira, Reserva, Telêmaco Borba, Tibagi, Ventania
MESORREGIÃO NORTE CENTRAL -79 Municípios	
Astorga	Ângulo, Astorga, Atalaia, Cafeara, Centenário do Sul, Colorado, Flórida, Guaraci, Iguaçu, Itaguajé, Jaguapitã, Lobato, Lupionópolis, Mandaguaçu, Munhoz de Melo, Nossa Senhora das Graças, Nova Esperança, Presidente Castelo Branco, Santa Fé, Santa Inês, Santo Inácio, Uniflor
Apucarana	Apucarana, Araongas, Califórnia, Cambira, Jandaia do Sul, Marilândia do Sul, Mauá da Serra, Novo Itacolomi, Sabáudia
Faxinal	Bom Sucesso, Borrazópolis, Cruzmaltina, Faxinal, Kaloré, Marumbi, Rio Bom
Floraí	Doutor Camargo, Floraí, Floresta, Itambé, Ivatuba, Ourizona, São Jorge do Ivaí
Ivaiporã	Arapuã, Ariranha do Ivaí, Cândido de Abreu, Godoy Moreira, Grandes Rios, Ivaiporã, Jardim Alegre, Lidianópolis, Lunardelli, Manoel Ribas, Nova Tebas, Ribeirão Bonito, Rio Branco do Ivaí, Rosário do Ivaí, São João do Ivaí, São Pedro do Ivaí.
Londrina	Cambé, Ibitiporã, Londrina, Pitangueiras, Rolândia, Tamarana
Maringá	Mandaguari, Marialva, Maringá, Paiçandu, Sarandi
Porecatu	Alvorada do Sul, Bela Vista do Paraíso, Florestópolis, Miraselva, Porecatu, Prado Ferreira, Primeiro de Maio, Sertãozinho

Continuação Tabela das Mesorregiões, Microrregião e Municípios do Estado do Paraná.

MESORREGIÃO NOROESTE - 61 Municípios	
Microrregião	Municípios
Cianorte	Cianorte, Cidade Gaúcha, Guaporema, Indianópolis, Japurá, Jussara, Rondon, São Manoel do Paraná, São Tomé, Tapejara, Tuneiras do Oeste
Paranavaí	Alto Paraná, Amaporã, Cruzeiro do Sul, Diamante do Norte, Guairaçá, Inajá, Itaúna do Sul, Jardim Olinda, Loanda, Marilena, Mirador, Nova Aliança do Ivaí, Nova Londrina, Paraíso do Norte, Parancity, Paranapoema, Paranavaí, Planaltina do Paraná, Porto Rico, Querência do Norte, Santa Cruz de Monte Castelo, Santa Isabel do Ivaí, Santa Mônica, Santo Antônio do Caiuá, São Carlos do Ivaí, São João do Caiuá, São Pedro do Paraná, Tamboara, Terra Rica
Umuaram	Alto Paraíso, Alto Piquiri, Altônia, Brasilândia do Sul, Cafezal do Sul, Cruzeiro do Oeste, Douradina, Esperança Nova, Francisco Alves, Icaraíma, Iporã, Ivaté, Maria Helena, Mariluz, Nova Olímpia, Perobal, Pérola, São Jorge do Patrocínio, Tapira, Umuarama, Vila Alta, Xambrê
MESORREGIÃO NORTE PIONEIRO - 46 Municípios	
Assaí	Assaí, Jataizinho, Nova Santa Bárbara, Rancho Alegre, Santa Cecília do Pavão, São Jerônimo da Serra, São Sebastião da Amoreira, Uraí
Cornélio Procópio	Abatiá, Andirá, Bandeirantes, Congonhinhas, Cornélio Procópio, Itambaracá, Leopólis, Nova América da Colina, Nova Fátima, Ribeirão do Pinhal, Santa Amélia, Santa Mariana, Santo Antônio do Paraíso, Sertaneja
Jacarezinho	Barra do Jacaré, Cambará, Jacarezinho, Jundiá do Sul, Ribeirão Claro, Santo Antônio da Platina
Ibaiti	Conselheiro Mairinck, Curiúva, Figueira, Ibaiti, Jaboti, Japira, Pinhalão, Sapopema
Wenceslau Bráz	Carlópolis, Guapirama, Joaquim Távora, Quatiguá, Salto do Itararé, Santana do Itararé, São José da Boa Vista, Siqueira Campos, Tomazina, Wenceslau Braz
MESORREGIÃO OESTE - 50 Municípios	
Cascavel	Cascavel, Rio do Salto, Juvínópolis, São João do Oeste, Sede Alvorada, São Salvador, Distrito Sete, Espigão Azul
Foz do Iguaçu	Céu Azul, Foz do Iguaçu, Itaipulândia, Matelândia, Medianeira, Missal, Ramilândia, Santa Terezinha de Itaipu, São Miguel do Iguaçu, Serranópolis do Iguaçu, Vera Cruz do Oeste
Toledo	Assis Chateaubriand, Diamante d'Oeste, Entre Rios do Oeste, Formosa do Oeste, Guaíra, Iracema do Oeste, Jesuítas, Marechal Cândido Rondon, Maripá, Mercedes, Nova Santa Rosa, Ouro Verde do Oeste, Palotina, Pato Bragado, Quatro Pontes, Santa Helena, São José das Palmeiras, São Pedro do Iguaçu, Terra Roxa, Toledo, Tupãssi
MESORREGIÃO SUDOESTE - 37 Municípios	
Microrregião	Municípios
Capanema	Ampére, Bela Vista da Caroba, Capanema, Pérola d'Oeste, Planalto, Pranchita, Realeza, Santa Izabel do Oeste
Francisco Beltrão	Barracão, Boa Esperança do Iguaçu, Bom Jesus do Sul, Cruzeiro do Iguaçu, Dois Vizinhos, Enéas Marques, Flor da Serra do Sul, Francisco Beltrão, Manfrinópolis, Marmeleiro, Nova Esperança do Sudoeste, Nova Prata do Iguaçu, Pinhal de São Bento, Renascença, Salgado Filho, Salto do Lontra, Santo Antônio do Sudoeste, São Jorge d'Oeste, Verê
Pato Branco	Bom Sucesso do Sul, Chopinzinho, Coronel Vivida, Itapejara d'Oeste, Mariópolis, Pato Branco, São João, Saudade do Iguaçu, Sulina, Vitorino
MESORREGIÃO CENTRO OCIDENTAL - 25 Municípios	
Campo Mourão	Araruna, Barbosa Ferraz, Campo Mourão, Corumbataí do Sul, Engenheiro Beltrão, Farol, Fênix, Iretama, Luiziana, Mamborê, Peabiru, Quinta do Sol, Roncador, Terra Boa. Goioerê: Altamira do Paraná, Boa Esperança, Campina da Lagoa, Goioerê, Janiópolis, Juranda, Moreira Sales, Nova Cantu, Quarto Centenário, Rancho Alegre d'Oeste, Ubitatã
Goioerê	Altamira do Paraná, Boa Esperança, Campina da Lagoa, Goioerê, Janiópolis, Juranda, Moreira Sales, Nova Cantu, Quarto Centenário, Rancho Alegre d'Oeste, Ubitatã

Anexo 2. Tabela com as intensidades relativas dos íons principais de cada grupo de amostras de mel formado segundo a PCA.

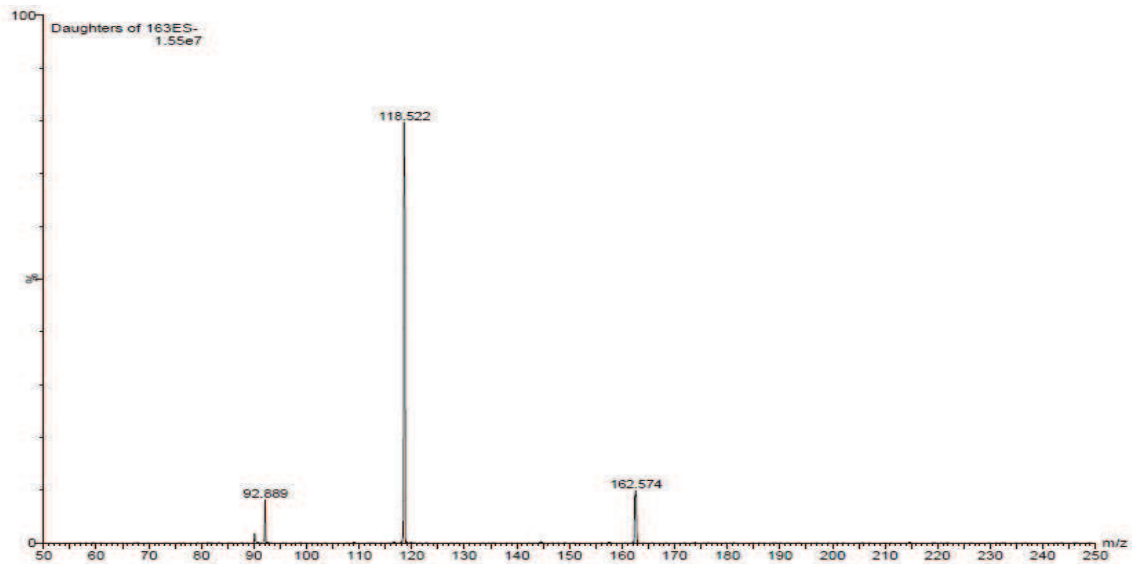
Intensidades relativas dos íons principais das amostras pertencentes ao GRUPO I																					
Município	Sigla	163	169	179	199	201	255	263	285	299	319	333	339	361	363	383	399	443	447	529	595
Barra Grande	BG	100	100	80	50	50	50	60	0	70	70	100	70	50	40	100	0	25	50	0	0
Barra Mansa	BM	100	100	70	60	45	45	80	0	85	45	40	0	35	30	85	0	0	45	0	0
Bituruna	BA	95	45	100	30	75	35	40	0	75	50	100	0	60	30	95	0	35	55	40	0
Campina do Simão	CS	80	100	60	55	80	50	90	0	60	0	65	0	50	35	75	30	0	45	0	0
Candido de Abreu	CU	90	100	70	50	75	30	100	0	55	25	80	0	35	25	100	0	25	60	0	0
Candói	CI	70	100	55	70	45	60	85	0	40	0	85	50	60	45	100	0	0	35	0	0
Canta Galo	CG	85	100	40	100	50	25	40	0	60	55	100	0	75	35	60	0	30	70	40	0
Cruz Machado	CM	100	100	35	100	40	35	55	0	45	0	40	0	35	50	85	0	0	55	0	0
Guarapuava	GÇ	85	90	95	75	45	65	45	0	60	0	80	0	65	50	55	0	0	55	0	0
Irati	II	95	40	75	70	55	45	45	0	45	85	65	0	70	30	85	0	40	80	0	0
Laranjeira do sul	LS	100	60	40	100	60	50	70	0	30	0	40	0	60	25	35	40	25	35	0	0
Manoel Ribas	MR	75	100	100	40	75	60	45	0	55	0	70	65	55	30	90	0	0	55	0	0
Marcondes	MS	95	60	95	50	60	60	65	0	60	55	65	100	60	25	45	0	30	75	0	0
Nova Laranjeira	NL	100	75	55	75	50	65	90	0	60	40	100	0	80	30	100	0	25	90	0	0
Palmas	PS	80	100	85	80	35	55	85	0	35	60	55	0	55	25	75	0	35	70	0	0
Prudentópolis	PD	100	50	40	80	45	55	100	0	55	0	40	0	65	30	50	45	50	85	30	30
Prudentópolis Lixeira	PL	100	45	45	40	75	80	55	0	50	30	100	0	70	30	40	0	0	45	0	35
Prudentópolis Relógio	PU	90	55	85	60	100	65	85	0	70	0	90	0	55	25	100	0	40	55	0	40
Rio Pivovial (Sta Maria)	SMP	60	100	45	40	45	25	100	0	45	55	60	70	75	30	65	0	0	60	0	0

Intensidades relativas dos íons principais das amostras pertencentes ao GRUPO II																					
Município	Sigla	163	169	179	199	201	255	263	285	299	319	333	339	361	363	383	399	443	447	529	595
Antonina	AI	75	100	45	85	65	0	85	0	40	35	70	0	80	55	0	0	90	30	0	60
Campo Largo	CL	70	100	25	70	30	0	100	0	75	45	90	0	100	70	0	0	80	25	0	60
Castro	CT	45	100	40	70	35	0	100	0	70	65	85	0	70	65	0	0	75	40	0	0
Cerro Azul	CZ	50	80	30	65	25	0	95	0	60	30	85	0	100	80	0	0	70	30	0	0
Colombo	CO	60	90	25	70	30	0	80	0	65	50	100	0	95	90	0	0	85	0	0	45
Curitiba	CB	50	80	75	70	50	0	85	0	50	70	90	0	80	50	0	0	80	25	0	0
Lapa	LA	45	70	25	45	25	0	100	0	45	25	90	0	100	70	0	0	80	0	0	25
Matinhos	MO	60	70	35	70	30	0	80	0	55	35	65	0	100	45	0	0	90	45	0	40
Morretes	MT	45	70	50	60	25	0	55	0	65	45	100	0	55	75	0	0	75	0	0	0
Paranaguá	PG	70	50	30	70	30	0	80	0	60	45	100	0	95	80	0	0	90	50	0	0
Tibagi	TI	60	60	25	50	30	0	75	0	25	55	70	0	85	90	0	0	100	0	0	0

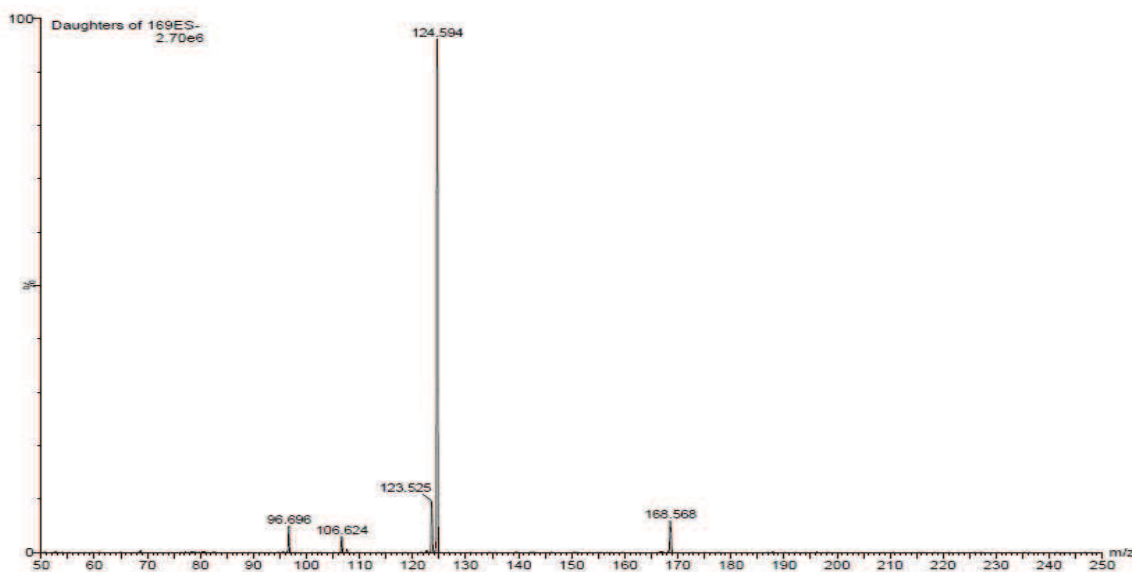
Intensidades relativas dos íons principais das amostras pertencentes ao GRUPO III																					
Município	Sigla	163	169	179	199	201	255	263	285	299	319	333	339	361	363	383	399	443	447	529	595
Barracão	BO	100	90	25	60	30	0	100	0	65	25	40	0	25	95	30	70	0	60	0	45
Jesuítas	JS	30	80	30	60	25	0	95	0	85	0	80	0	75	55	0	0	0	75	0	0
Missal	ML	100	80	60	80	35	0	100	75	40	0	55	0	70	30	0	40	35	65	40	0
Pérola do Oeste	PO	75	80	85	70	50	0	100	0	80	0	60	0	50	45	0	70	25	50	0	0
Planalto	PT	90	65	40	55	25	0	85	0	55	30	60	0	45	85	25	55	45	80	0	25
Pranchita	PR	70	75	35	85	40	0	70	0	70	55	55	0	30	65	0	60	25	75	0	0
Quatro pontes	QP	80	100	50	100	30	0	75	85	55	0	35	0	80	30	0	0	50	65	0	0
Realeza	RA	100	70	35	45	40	0	100	25	40	25	45	0	40	70	0	65	35	90	50	25

Anexo 03. Espectros ESI(-)-MS/MS dos Padrões Analíticos

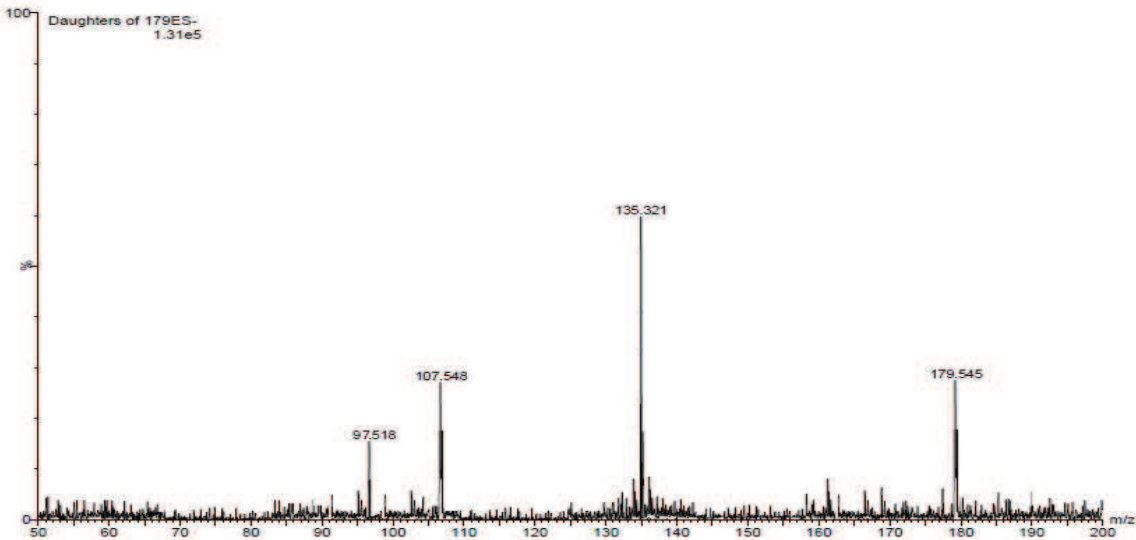
ESI(-)-MS/MS - ÍONS 163 m/z: Ácido p-cumárico



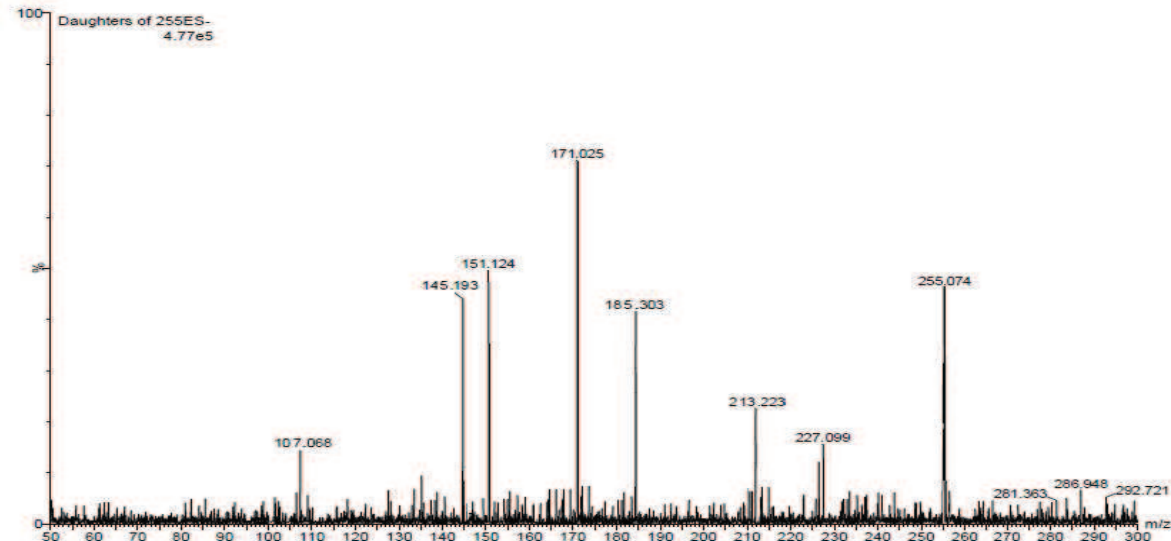
ESI(-)-MS/MS - ÍONS 169 m/z: Ácido Gálico



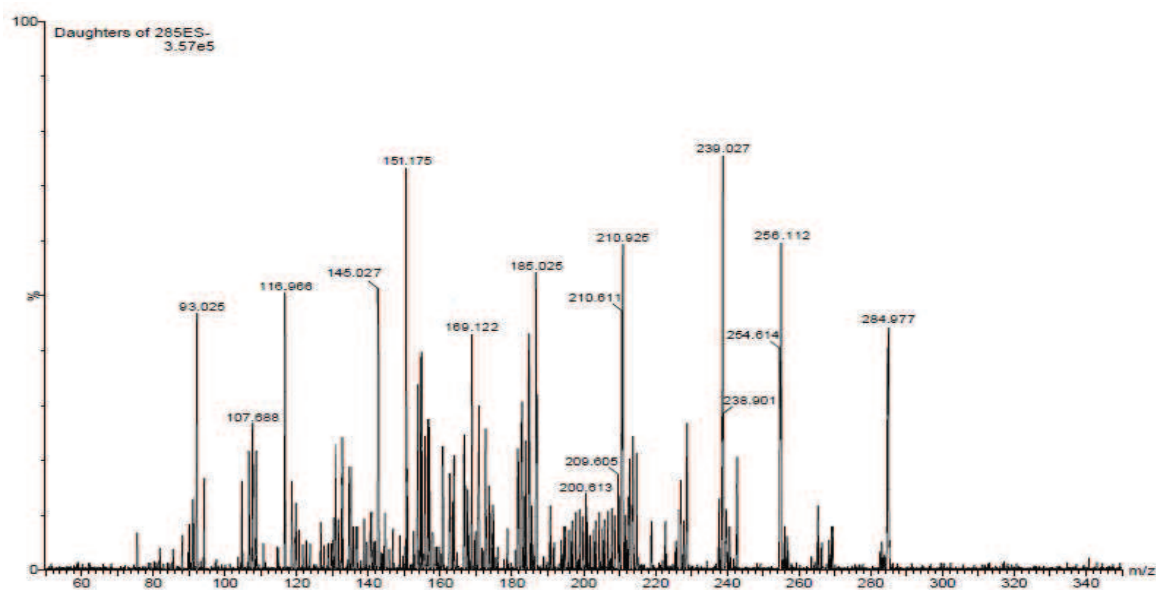
ESI(-)-MS/MS - IONS 179 m/z: Ácido Caféico



ESI(-)-MS/MS - IONS 255 m/z: Pinocembrina



ESI(-)-MS/MS - ÍONS 285 m/z: Canferol



ESI(-)-MS/MS - ÍONS 319 m/z: Ácido Cuprésico

