



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

SANDRA REGINA RIVELLINO MARQUES

**MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRÁFIA
GASOSA CONVENCIONAL E BIDIMENSIONAL PARA
CLASSIFICAÇÃO DE MÉIS.**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

ORIENTADOR: PROF. DR. FABIO AUGUSTO

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
POR SANDRA REGINA RIVELLINO MARQUES, E ORIENTADA PELO PROF.DR. FABIO AUGUSTO.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR SIMONE LUCAS - CRB8/8144 -
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

Marques, Sandra Regina Rivellino (1975-).
M348m Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa
convencional e bidimensional para classificação de
méis / Sandra Regina Rivellino Marques. – Campinas,
SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Fabio Augusto.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto
de Química.

1. Cromatografia gasosa. 2. Mel. 3. Microextração em fase
sólida. 4. Cromatografia compreensiva. I. Augusto,
Fabio. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Solid phase microextraction and conventional and comprehensive gas
chromatography for the classification of honeys

Palavras-chave em inglês:

Gas chromatography

Honey

Solid phase microextraction

Comprehensive chromatography

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Fabio Augusto [Orientador]

Eduardo Carasek da Rocha

Rogério Cesar de Lara da Silva

Carla Beatriz Grespan Bottoli

Ronei Jesus Poppi

Data de defesa: 17/11/2011

Programa de pós-graduação: Química

Como prometido, dedico este trabalho ao meu grande amigo e pai, Antonio Rivellino (*in memoriam*), pelo exemplo de caráter, amor, carinho e dedicação. Por nunca ter medido esforços em proporcionar-me condições para estudar. Apesar de não ter completado o ensino fundamental I, sempre dizia: "...o estudo é a maior herança que um pai pode deixar para um filho ..". Muito obrigada por tudo! Sem você está conquista não teria sido possível. Mesmo distante, você estará sempre presente!

"O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã".

Leonardo da Vinci

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fábio Augusto pelo apoio, oportunidade, aprendizado e paciência.

In memoriam ao meu pai, Antonio Rivellino, por tudo que fez em vida para que eu alcançasse mais esta realização.

À minha mãe, Deolinda, sempre presente em todos os momentos, obrigada por ter tornado a minha caminhada mais leve, iluminando o meu dia-a-dia com sua força e seu amor sincero e único.

Ao meu marido Alexandre, companheiro desde muito tempo, que muitas vezes, mesmo privado de minha companhia, com amor, estímulo e apoio permitiu que eu vencesse mais esta etapa.

A Livia, minha princesinha, seu nascimento trouxe sentido à minha vida, sua existência é razão da minha fé no futuro.

A todos os outros familiares que acreditaram e incentivaram todas as minhas decisões. Em especial, minha tia Cida, que contribuiu com suas orações e conselhos e minha tia Inez, com sua experiência de vida. Obrigada pela força e doação nos momentos em que precisei de vocês.

A uma pessoa muito especial em minha vida, minha avó Ana (*in memoriam*). “*A escola da experiência é a mais educativa.*” *Moliere*

A todos os meus amigos da Unicamp, e em especial aos companheiros de trabalho do laboratório de Cromatografia Gasosa (todos), que tive a oportunidade de conviver ao longo desses anos, contando com a amizade, o apoio e o incentivo de todos. Muito obrigada Raquel Gomes, Carlos Fidélis e Soraia Neves pelo auxílio nas correções finais do texto. Obrigada Leandro

Hantao pela colaboração na parte experimental empregando GC bidimensional. Agradeço também ao Paulo Henrique e ao Luís A. F de Godoy pela parceria em quimiometria.

À técnica de laboratório Lucília, por seu profissionalismo e dedicação.

À EMBRAPA (Empresa Brasileira de Agropecuária) por ter cedido as amostras de mel.

À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de estudos e pelo suporte financeiro.

Enfim agradeço a todos os amigos, professores e funcionários do Instituto de Química da Unicamp, e todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a minha formação científica. Muito obrigada!

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestrado em Química Analítica – Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas – SP, 2004. Desenvolvimento de uma sistemática para Micro-Extração por fase sólida acoplada a Cromatografia Gasosa (SPME/CG) com injetores de controle eletrônico.

Licenciatura em Química - Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas – SP, 2000.

Bacharelado em Química Tecnológica – Unicamp, Campinas, 2000.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

- Augusto, Fabio., Rivellino S. R., Hantao L. W., Risticovic Sanja., Camargo R. C., Carasek E., Pawliszyn J. “ Detection of Extraction Artifacts on Analysis of Honey Volatiles using Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Corresponding.” Submetido a Journal of Food Chemistry.

- Augusto, F., Carasek, E., Silva, R. G. C., Rivellino, S. R; Batista, A. D.; Martendal, E. “ New sorbents for extraction and microextraction techniques. ” Journal of Chromatography A, v. 1217, p. 2533-2542, 2010.

ATIVIDADE DOCENTE

- Programa de Estágio Docente (PED B) na disciplina de Química Analítica Instrumental Experimental, oferecida 3º semestre do curso de Graduação em Química da UNICAMP, 2010.

- Programa de Estágio Docente (PED B) na disciplina de Química Analítica Instrumental Experimental, oferecida 4^o semestre do curso de Graduação em Química da UNICAMP, 2008.
- Programa de Estágio Docente (PED B) na disciplina de Química Analítica Instrumental Experimental, oferecida 3^o semestre do curso de Graduação em Química da UNICAMP, 2008.
- Professora de aula prática do curso de extensão na área de Química Analítica (Separações Cromatográficas) no Instituto de Química da Unicamp, 2007.

CURSOS E PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

- Apresentação de pôster: "Estratégias para classificação de amostras de mel de mesma florada coletados em diferentes localidades analisados por GCxGC." 34^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Florianópolis (SC), 2011
- Palestrante convidada no Simpósio Satélite de Análises de Compostos Voláteis do IV Simpósio Brasileiro de Cromatografia e técnicas afins realizado em Campos do Jordão (SP), 2010.
- Trabalho Oral Apresentado no *International Symposium on Advances in Extraction Technologies (Extech)* 2010, realizado na Polônia, com o tema: "Assessment of aroma related volatiles of foodstuff by HS-SPME and GCxGC" representada pelo prof. Dr. Fabio Augusto, 2010.
- Participação no IV Simpósio Brasileiro de Cromatografia e técnicas afins realizado em Campos do Jordão (SP) com apresentação de pôster intitulado HS-SPME e Cromatografia Gasosa Convencional e Bidimensional na Classificação de méis, 2010.

- Participação como monitora da I escola de Inverno de Separações – Instituto de Química (Unicamp), 2010
- Apresentação de pôster: Utilização de uma matriz *Doehlert* na otimização HS-SPME-GC(xGC)-FID para caracterização de méis da região nordeste brasileira, na 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ) em Poços de Caldas-SP, 2010.
- Apresentação de pôster: “*Extraction artifacts and GC × GC profiling of honey*”, no *International Symposium on Hyphenated Techniques for Sample Preparation (HTSP)* em Bruges (Bélgica), 2010.
- Scientific Instruments Co. (Sinc do Brasil) – Operação no Cromatógrafo Gasoso com detector de massas, modelo QP 2010 e Software GCMS Solution – marca Shimadzu, 2009.
- Apresentação de pôster no Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas. Florianópolis (SC), Brasil, 2009.
- I Simpósio Brasileiro de Entomologia Forense, realizado no Centro de Convenções da Unicamp, 2007.

RESUMO

A técnica de microextração em fase sólida através do *headspace* (HS-SPME) combinada com a cromatografia gasosa bidimensional abrangente e detecção por ionização em chama (GC×GC-FID) foi empregada para detectar artefatos formados durante o preparo da amostra de méis, que poderiam ser prejudiciais ao processo de identificação de sua origem floral. O método foi otimizado utilizando-se planejamento multivariado. Para isso, uma mistura de diferentes tipos de méis brasileiros foi usada como modelo. Os artefatos de extração identificados foram classificados como resultantes da manipulação através do HS. A influência da temperatura e do tempo de exposição ao tratamento térmico também foi avaliada. A identificação da fração volátil da mistura de mel foi realizada por GC×GC-FID e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas com analisador quadrupolar (GC-QMS), comparando-se o índice de retenção linear com programação de temperatura obtido na primeira dimensão (¹D-LTPRI), calculado a partir dos cromatogramas obtidos por GC×GC-FID, e os índices obtidos por GC-QMS para as mesmas amostras. Esta identificação foi confirmada por cromatografia gasosa bidimensional abrangente combinada a um espectrômetro de massas por tempo de voo (GC×GC-TOFMS). Portanto, a identificação e detecção de artefatos de extração previamente desconhecidos é atribuída às vantagens da GC×GC. A GC×GC-FID combinada com ferramentas quimiométricas foi empregada para classificar algumas amostras de méis de diferentes origens do Piauí-Brasil. A GC×GC-QMS foi empregada para identificação dos voláteis de algumas destas amostras. A combinação de HS-SPME - (GC×GC ou GC) com o poder de identificação do detector MS, juntamente com índices de retenção e de métodos quimiométricos forneceram informações valiosas sobre a classificação química dos méis.

ABSTRACT

Solid phase microextraction through *headspace* (HS-SPME) was optimized by a multivariate design. This technique combined with comprehensive two-dimensional gas chromatography with flame ionization detection (GC×GC-FID) was employed to detect potential artifacts formed during preparation of honey samples, that could possibly be relevant to the identification of its floral origin. A mixture of different types of Brazilian honeys was used as the model sample. The extraction artifacts identified were classified as resulting from HS manipulation. The influence of temperature and time exposure of the thermal treatment was also evaluated. The identification of the volatile fraction of the honey blend was performed through combination of GC×GC-FID and GC coupled to quadrupole mass spectrometry (GC-QMS) by comparing the one dimensional linear temperature programmed retention index (¹D-LTPRI) calculated from GC×GC-FID chromatograms to that of chromatograms of the same samples obtained on GC-QMS. This identification was confirmed by GC×GC combined with a time-of-flight mass analyzer (GC×GC-TOFMS). Therefore, the identification and detection of previously unknown extraction artifacts is attributed to advantages of GC×GC. GC×GC-FID in combination with chemometric tools was employed to classify some honey samples from different origins from Piauí-Brazil. GC×GC-QMS was employed for the identification of the volatiles from some one of these samples. The combination of HS-SPME – (GC×GC or GC) and the qualitative information of MS, retention index and chemometric methods may be able to provide valuable information on the chemical classification of honeys.

SUMÁRIO

	Página
Capítulo 1. Introdução.....	1
1. Mel.....	3
1.1 Definição	3
1.2 Exportação e Importação.....	3
1.3 Classificação do mel	5
1.4 Adulteração do mel	6
1.5 Certificação do mel	9
1.6. Métodos analíticos empregados para identificação da origem botânica e/ou geográfica do mel	11
1.6.1 Métodos tradicionais convencionalmente tradicionalmente empregados	11
1.6.2 Análise polínica	12
1.6.3 Análise sensorial.....	16
1.6.4 Análise físico-química.....	18
1.7 Métodos alternativos e/ou complementares aos métodos tradicionalmente empregados na identificação da origem geográfica e/ou botânica do mel	20
1.7.1 Microextração em fase sólida.....	22
1.7.2 Cromatografia gasosa unidimensional.....	26
1.7.3 Cromatografia gasosa multidimensional.....	27
Capítulo 2. Revisão Bibliográfica.....	39
2.1 Métodos convencionais tradicionalmente empregados na identificação da origem geográfica e/ou botânica do mel	41
2.2 Métodos alternativos e/ou complementares empregados na identificação da origem geografia e/ou botânica do mel.....	42

2.2.1 Técnicas analíticas empregadas para análise de misturas complexas de voláteis.....	45
2.2.2 Aplicação da cromatografia gasosa bidimensional no estudo do mel.....	57
2. 3 Mel Brasileiro.....	60
Capítulo 3. Justificativas e Objetivos.....	65
3. Justificativa e Objetivos.....	67
Capítulo 4. Materiais e métodos.....	69
4.1.1 Materiais.....	71
4.1.2 Outros Materiais.....	71
4.1.3 Amostras	71
4.1.4 Equipamentos	73
4.1.4.1 GC-FID.....	73
4.1.4.2 GC×GC-FID.....	73
4.1.4.3 GC-QMS.....	75
4.1.4.4 GC×GC-TOFMS.....	75
4.1.4.5 GC×GC-QMS.....	76
4.2 Métodos.....	76
4.2.1 Preparo da amostra.....	76
4.2.2 HS-SPME.....	77
4.2.3 Monitoramento da formação de artefatos.....	81
4.2.4 Classificação das amostras.....	81
Capítulo 5. Resultados e Discussão.....	83
5.1 Manipulação da amostra.....	85
5.2 Otimização SPME.....	87
5.3 Adequabilidade das técnicas cromatográficas avaliadas.....	93
5.4 GC×GC-FID + GC-QMS e GC×GC-TOFMS.....	96

5.5 Análise Exploratória.....	109
5.5.1 Comparação GC convencional e GC bidimensional.....	115
Capítulo 6. Conclusão.....	133
6. Conclusão.....	135
Capítulo 7. Referências Bibliográficas.....	139
7. Referências Bibliográficas.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS

- ◆ AOS: espectroscopia de emissão atômica (*atomic emission spectrometry*)
- ◆ ANN: rede neural artificial (*artificial neural network*)
- ◆ CAR/PDMS: carboxen/polidimetilsiloxano (*carboxen/ polydimethylsiloxane*)
- ◆ CBA: Confederação Brasileira de Apicultura
- ◆ CNNPA: Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
- ◆ CW/DVB: carbowax/divinilbenzeno (*carbowax/divinylbenzene*)
- ◆ 1D: primeira dimensão
- ◆ ²D: segunda dimensão
- ◆ ³D: terceira dimensão
- ◆ ¹D-GC: cromatografia gasosa monodimensional (*monodimensional gas chromatography*)
- ◆ DI: imersão direta (*direct imersion*)
- ◆ DPLS: mínimos quadrados parciais (*partial least squares*)
- ◆ ECD: detector por captura de elétrons (*electron capture detector*)
- ◆ FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (*Food and Organization Agriculture*)
- ◆ FS, do inglês *fused sílica*
- ◆ GC: cromatografia gasosa (*gas chromatography*)
- ◆ GC-FID: cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (*inglês flame ionisation detection*)
- ◆ GC–GC: cromatografia gasosa de frações parciais (*heart cut two-dimensional gas chromatography*)
- ◆ GC×GC: cromatografia gasosa bidimensional abrangente (*comprehensive two-dimensional gas chromatography*)

- ◆ GC×GC-TOFMS: cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas por tempo de voo (*comprehensive two-dimensional gas chromatography - time of flight mass spectrometry*)
- ◆ GC-QMS: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas quadrupolar (*quadrupole gas chromatography-mass spectrometry*)
- ◆ HD: hidrodestilação
- ◆ HMF: hidroximetilfurfural
- ◆ HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*)
- ◆ HS: espaço confinante (*headspace*)
- ◆ ICP-OES: espectroscopia de emissão ótica acoplada ao plasma (*inductively coupled plasma optical emission spectroscopy*)
- ◆ IN: Instrução Normativa
- ◆ IR: espectrometria no infravermelho (*infrared spectrometry*)
- ◆ LDA: análise linear discriminante (*linear discriminant analysis*)
- ◆ LTPRI: índice de retenção linear com programação de temperatura obtido na primeira dimensão
- ◆ mPCA: solução aproximada de matriz de análise de componentes principais (*approximate solution of matrix principal component analysis*)
- ◆ MDGC: cromatografia gasosa multidimensional (*multidimensional gas chromatography*)
- ◆ MS: espectrometria de massas (*mass spectrometry*)
- ◆ NMR: ressonância magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance*)
- ◆ PNCRC: Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
- ◆ PA: poliacrilato (*poliacrilate*)
- ◆ PCA: análise de componentes principais (*principal components analysis*)

◆ PDMS/DB:

polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (*polydimethylsiloxane/divinylbenzene*)

◆ P&T: purga e trapeamento (*purge and trap*)

◆ SDE: extração por destilação simultânea (*simultaneous distillation-extraction*)

◆ SE: extração por soxhlet (*soxhlet extraction*)

◆ SE-SDE: extração por solvente – extração por destilação simultânea (*solvent extraction - simultaneous distillation extraction*)

◆ SIMCA: modelagem de classes por componentes principais (*soft independent modeling of class analogy*)

◆ SPME: microextração em fase sólida (*solid phase microextraction*)

◆ 1t_R : tempo de retenção na primeira dimensão

◆ 2t_R : tempo de retenção na segunda dimensão

◆ USE: extração assistida por ultrassom (*ultrasonically assisted extraction*)

◆ USE-SPME: extração assistida por ultrassom e microextração em fase sólida

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Reação de formação do hidroximetilfurfural (HMF) a partir da quebra da molécula de frutose.....	8
Figura 2. A. Etapas de identificação dos grãos de pólen presentes no mel B. Reconhecimento dos diferentes materiais presentes no mel.....	13
Figura 3. Fotomicrografias de pólen.....	15
Figura 4. Dispositivo da fibra de SPME.....	24
Figura 5. Procedimento básico para HS-SPME.....	25
Figura 6. Diagrama do sistema de cromatografia gasosa bidimensional abrangente.....	30
Figura 7. Construção de diagramas tridimensionais em GC×GC.....	33
Figura 8. Comparação de perfis GC-QMS de um mel de mesma procedência.	50
Figura 9. Cromatograma representativo dos voláteis de mel da espécie <i>Paliurus</i> , obtidos por HS-SPME (fibra PDMS/DVB).....	53
Figura 10. Cromatograma representativo dos compostos do mel da espécie <i>Paliurus</i> extraídos com éter por USE.....	54
Figura 11. Cromatograma obtido por GC-FID para a mistura de méis.....	86
Figura 12. Valores de área e estimativa de desvio padrão (5 a 10 %) obtidos para procedimentos diferentes de manipulação da amostra.....	87
Figura 13. A. Gráfico dos valores de área medidos contra os valores de área estimados pelo modelo obtido do planejamento <i>Doehlert</i> , para o nível de significância de 0,05. B. Gráfico de resíduos.....	90
Figura 14. Superfícies de resposta.	93

Figura 15. Cromatogramas modulados da mistura de méis adquirido por A. GC-QMS B. GC × GC-FID e C. GC×GC-TOFMS.....	94
Figura 16. Cromatograma modulado da mistura (GC × GC-FID). T _{coluna} : 60 °C à 3 °C min ⁻¹ à 250 °C; T _{inj} : T _{detector} : 250 °C.....	99
Figura 17. A. Cromatograma GC×GC-FID do mel com pré-tratamento aquoso a 45 °C por 1h. B. cromatograma GC×GC-FID do mel armazenado em frasco selado a 45 °C por 48 h.....	103
Figura 18. A. Porção ampliada do cromatograma GC×GC-FID do mel bruto em frasco selado a 45 °C por 48 h. B. Porção ampliada do cromatograma GC×GC-FID do mel com pré-tratamento aquoso a 45 °C por 1 h. O artefato HMF é indicado pela seta. A escala de cor é a mesma da figura 17.....	105
Figura 19. Cromatogramas GC×GC-FID da mistura de méis submetida a tratamento térmico a diferentes temperaturas e tempos de extração. A. 45 °C por 0 min (extração realizada imediatamente após a amostra atingir a temperatura de 45°C). B. 45 °C por 90 min. C. 45 °C por 240 min. D. 60 °C por 0 min. E. 60 °C por 90 min. F. 60 °C 240 min.....	108
Figura 20. Cromatograma unidimensional típico para o mel de marmeleiro do nordeste do Brasil (amostra 60), obtido por GC-QMS.....	113
Figura 21. Porção estendida do cromatograma unidimensional típico para o mel de marmeleiro do nordeste do Brasil (amostra 60), obtido por GC-QMS.....	114
Figura 22. Cromatograma unidimensional típico para mel de silvestre do sul do Brasil, obtido por GC-QMS.....	114
Figura 23. Gráfico de escores normalizado a partir dos cromatogramas obtidos por GC-QMS.....	115

Figura 24. Amostra 58 A. GC-QMS e B. GC×GC-QMS.....	117
Figura 25. Amostra 87 A. GC-QMS e B. GC×GC-QMS.....	118
Figura 26. Gráfico de escores normalizado a partir dos cromatogramas obtidos por GC×GC-QMS.....	131

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Compostos voláteis de impacto detectados em méis brasileiros....	63
Tabela 2. Amostras de mel de marmeleiro empregadas na análise exploratória.....	72
Tabela 3. Matriz <i>Doehlert</i> para as variáveis estudadas.....	80
Tabela 4. Avaliação da regressão e da falta de ajuste, ao nível de significância de 0,05 para a somatória das áreas de todos os picos cromatográficos (modelo A).....	89
Tabela 5. Avaliação da regressão e da falta de ajuste, ao nível de significância de 0,05 para a somatória das áreas a partir de 3,8 min os picos cromatográficos (modelo B).....	89
Tabela 6. Otimização multivariada (<i>Doehlert</i>) – parâmetros significativos.....	92
Tabela 7. Identificação dos principais constituintes da mistura de méis brasileiros por GC-QMS, GC×GC - FID e GC×GC-TOFMS.....	100
Tabela 8. Compostos detectados nas amostras de marmeleiro (<i>Croton sonderianus</i>) (similaridade ≥ 85) por GC-QMS.....	109
Tabela 9. Identificação dos compostos em duas amostras de mel (GC×GC-QMS).....	119
Tabela 10. Compostos identificados em duas amostras de mel (Comparação GC×GC-QMS e GC-QMS).....	124
Tabela 11. Amostras de mel empregadas na análise exploratória.....	130

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1. Mel

1.1 Definição

Pela resolução de 12 de 1978 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA (BRASIL, 1978) [1], o mel é definido como um produto natural elaborado por abelhas a partir do néctar de flores e/ou exsudatos sacarínicos de plantas. Trata-se de uma matriz complexa constituída na sua maioria por frutose, glicose e água. Em menor concentração, é constituída de proteínas na forma de enzimas, sais minerais, vitaminas e compostos voláteis responsáveis pelo aroma. [2] O mel é uma solução supersaturada de açúcar. Mais de 95% de sua massa é constituída de açúcares e água, com variabilidades de sabor e aroma. Os compostos voláteis contribuem significativamente para a distinção do sabor e aroma do mel, dependendo de sua origem floral. [3]

1.2 Exportação e Importação

Segundo dados da Confederação Brasileira de Apicultura, a produção mundial de mel é da ordem de 1,2 milhões de toneladas, o Mercosul representa 11 % do total mundial. O maior produtor de mel é a China, seguido dos Estados Unidos da América e da Argentina, sendo que o Brasil ocupa a sétima posição na produção mundial de mel. Segundo levantamentos estatísticos, o Brasil produz 50 mil toneladas de mel por ano, destinadas ao mercado externo e interno. [4] A implantação do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) possibilitou o fim do embargo

européu ao mel brasileiro em 2007, causado pela falta de métodos científicos para a determinação de antibióticos em méis. Juntamente com a Instrução Normativa nº 11 de 2000[5] , a Portaria nº 685 de 1998 [6], o Decreto nº 55871 de 1965 [7] e a IN nº 10 de 2008 [8] – parte integrante da PNCRC – foram estabelecidos os padrões de qualidade para o mel produzido em território nacional. [9] Atualmente, os principais importadores do mel brasileiro são a Alemanha, os Estados Unidos da América, o Japão, a França e o Reino Unido. Os países árabes estão entre os novos mercados que os exportadores brasileiros do mel querem conquistar nos próximos anos. [4, 10]

Em agosto de 2010 o Brasil exportou 1689 toneladas de mel que movimentaram cerca de US\$ 4.9 milhões. O Nordeste foi responsável por mais da metade (51,9%) das exportações brasileiras, com 877 toneladas e uma receita de US\$ 2,5 milhões. Os principais estados brasileiros exportadores de mel foram Piauí (US\$ 1.426.660), São Paulo (US\$ 1.134.131), Ceará (US\$ 740.938), Rio Grande do Sul (US\$ 662.029), Santa Catarina (US\$445.214), Rio Grande do Norte (US\$ 250.090), Minas Gerais (US\$ 121.356), Bahia (US\$ 101.249) e Paraná (US\$ 2.922) [11] Os três maiores exportadores de mel são a Argentina, a China e o México. O Brasil ocupa a quinta colocação no *ranking* das exportações. [4]

Hoje no Brasil são consumidos anualmente 128 g de mel por pessoa por ano, sendo uma quantidade inferior que os Estados Unidos, onde a média é de 1,5 Kg por pessoa ao ano. [4] A população de maneira geral, consome mel mais como remédio caseiro do que como alimento diário, passando a comprá-lo apenas nas épocas mais frias do ano, que é quando ocorre um aumento de doenças relacionadas aos problemas respiratórios. [12]

1.3 Classificação do mel

O mel pode ser classificado por sua origem floral (unifloral ou multifloral) pelo procedimento de obtenção do favo (escorrido, prensado ou centrifugado) e/ou pela sua apresentação e/ou processamento (mel, mel em favos, mel com pedaços de favos, mel cristalizado ou granulado, mel cremoso e mel filtrado). Pela origem pode ser classificado em dois grandes grupos: mel de origem floral e mel de melato. [12]

O mel de origem floral é obtido a partir do néctar das flores, e o mel de melato é obtido a partir da excreção de artrópodes (insetos) da ordem *Homoptera* conhecidos como afídeos (por ex. pulgões), que sugam o fluído do floema (vaso condutor de material orgânico nas plantas). Esses insetos excretam um líquido adocicado na forma de gotas através do canal alimentar. Esse líquido se deposita na parte externa das folhas e em outras partes da planta. A abelha coleta esse líquido e o utiliza como matéria-prima para produção de mel. Geralmente, as abelhas preferem coletar o néctar como matéria-prima, utilizando outras fontes no período de baixa disponibilidade de néctar. Os méis de melato só apresentam valor de mercado na Europa Central; em outras regiões são considerados inferiores, do ponto de vista estético, aos méis florais. [14] O mel de origem floral pode ser **unifloral** ou **monofloral** (para produtos que procedem primordialmente de flores de uma família, gênero ou espécie e possuem características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias) e **multifloral** [12] ou **polifloral**, onde mais de uma espécie vegetal contribui, de forma expressiva, com o néctar. [15]

1.4 Adulteração do mel

O mel pode sofrer várias alterações de causas diversas. Algumas acontecem devido à falta de informação do próprio agricultor, quanto à tecnologia de extração, a forma de manejo adequado, equipamentos a serem utilizados e principalmente à forma de armazenamento e conservação. [18]

A CNNPA define que no mel não é permitida a presença de substâncias estranhas, e também a adição de corantes, aromatizantes, espessantes, agentes conservadores e edulcorantes naturais ou sintéticos estranhos à sua composição normal. [1] Contudo, Rossi *et al.* [16] relatam que o mel é um produto escasso e o preço relativamente alto incentiva a sua adulteração. Essa adulteração pode ser natural ou provocada, sendo que as alterações provocadas podem ser por desconhecimento dos produtores ou por adulteração propositada, principalmente nos entrepostos de venda. [17]

As adulterações naturais podem ser aquelas decorrentes do excesso de umidade, calor ou envelhecimento. Em decorrência do excesso de umidade o mel pode ser fermentado por vários microorganismos, especialmente os da espécie *Zigosaccharomyces* e outros (*Sacchamycetes rouxii*; *Sacchamycetes mellis*; *Leucomostoc dextranicum*; *Aerobacter aerogines*), que existem nas flores e no solo e que conseguem desenvolver em altos teores de açúcar. A alteração sofrida pelo mel é avaliada pelo excesso de ácido láctico produzido. Méis colonizados por esses microorganismos tendem a fermentar mais rapidamente após a cristalização da glicose em função do desequilíbrio água/açúcar provocado.

Para facilitar o escoamento do mel no processo de embalagem ou evitar cristalização, o produtor geralmente recorre ao aquecimento. Este processo,

entretanto, deve ser feito com muita cautela, pois, o calor pode decompor as enzimas de maneira irreversível e acelerar a transformação dos açúcares, frutose e glicose (encontrados naturalmente no mel) em hidroximetilfurfural (HMF). [17, 18, 39]. A Reação de formação do hidroximetilfurfural (HMF) a partir da quebra da molécula de frutose está representada na figura 1. [39].

Quando a temperatura é superior a 40 °C, há uma aceleração na formação de HMF a níveis superiores ao estabelecido pela Legislação vigente. Entretanto, deve-se ressaltar que esse aumento ocorre, naturalmente, não afetando a sua qualidade dentro de um período de 180 dias. O mel deve ser armazenado em recipientes e ao abrigo da luz, para evitar a produção do hidroximetilfurfural. O mel, quando aquecido, ou exposto a altas temperaturas e/ou luminosidade, seguramente se deteriora, transformando a frutose (primeiramente) e a glicose (em seguida) em HMF.

Além da temperatura e do tempo de armazenamento, o pH é também importante para a velocidade de formação do HMF. [18]

Pela resolução de 12 de 1978 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos - CNNPA (BRASIL, 1978) [1], é permitido o aquecimento do mel até no máximo de 70°C, desde que seja mantida a sua atividade enzimática¹

A detecção e determinação quantitativa do HMF são as provas mais significativas para o teste de qualidade do mel, não só em função do

¹ O mel no seu processo de formação contém enzimas próprias das plantas e dos insetos: invertase, amilase (diastase), glicose, oxidase, catalase e fosfatase. A invertase incorporada ao néctar pela saliva das abelhas transforma os açúcares, em particular a sacarose, que resulta numa mistura de glicose e frutose. As ações diastásicas conduzem a transformação de ¾ da sacarose. Por isso, quanto mais velho for o mel, menos sacarose conterá.[18]

aquecimento e envelhecimento, mas também para verificação de possíveis adulterações. [17, 39]

O HMF ocorre naturalmente no mel (normalmente na faixa de 1mg/kg) e não é uma substância tóxica. Apenas indica que, quando detectado em quantidade superior a 80 mg/kg demonstra a presença de adulteração ou aquecimento indevido. O mel, quando estocado à 20°C, aumenta em cerca de 1 mg/kg/mês a quantidade de HMF. [39]

Os níveis de HMF aceitos pela comunidade Européia, bem como pela Legislação Brasileira, são de no máximo 60 mg/kg . [18]

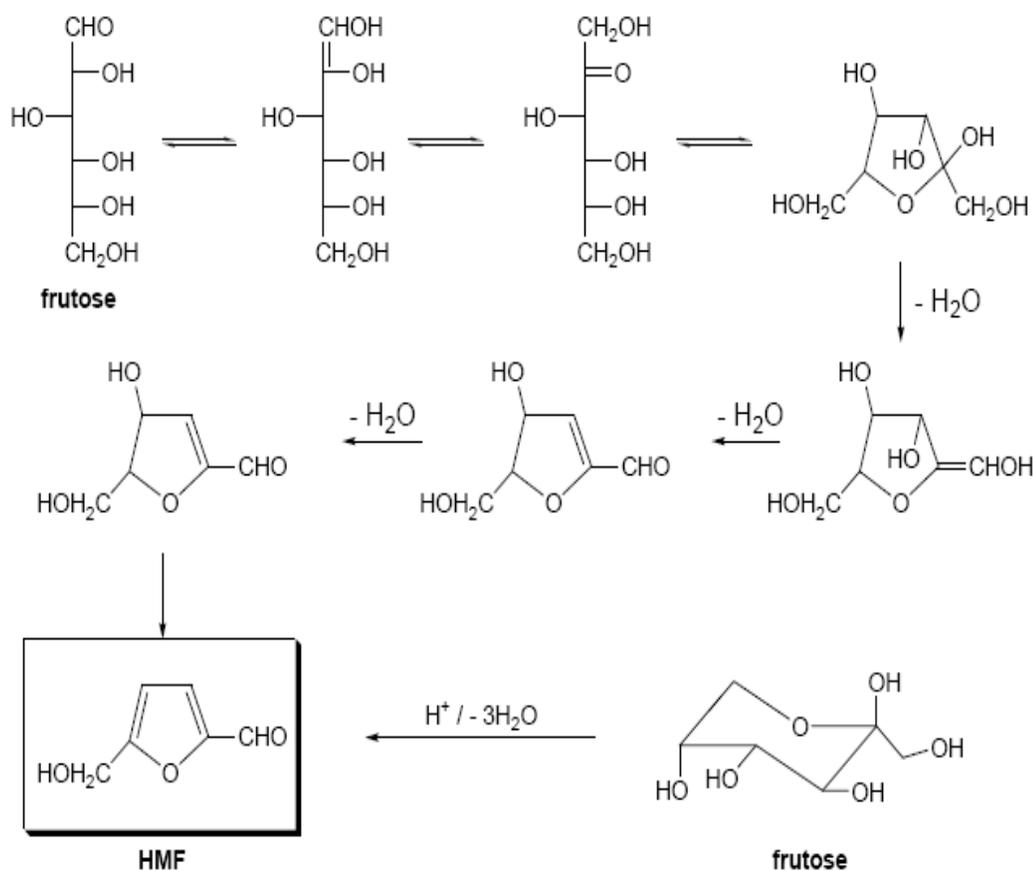


Figura 1. Reação de formação do hidroximetilfurfural (HMF) a partir da quebra da molécula de frutose. [39]

Geralmente o processo de adulteração propositada do mel é feito pela adição de outros carboidratos, principalmente açúcares comerciais (dissacarídeos) como glicose comercial, solução ou xarope de sacarose, melado e solução de sacarose invertida. A forma mais utilizada de adulteração é obtida a partir do caldo de cana-de-açúcar "apurado" ao fogo para engrossar. A aparência dessa mistura é melhorada pela adição de iodo (cor) e pela adição de aditivos químicos que aumentam a viscosidade. [16]

1.5 Certificação do mel

É importante conhecer a caracterização do mel, para garantir um produto de qualidade no mercado, cada vez mais exigente. Os méis são muito pouco estudados tendo em vista as suas qualidades nutricionais indiscutíveis. Essa caracterização se faz necessária à qualidade do mel, pois é um alimento bastante usado no dia-a-dia de muitas famílias, principalmente, na alimentação de crianças e idosos, devido à riqueza de vitaminas e sais minerais, além de possuir propriedades antibacterianas e anticéptica, usado também na área terapêutica em tratamentos profiláticos. [18]

A certificação do mel garante ao consumidor que ele está comprando um produto livre de adulteração e/ou contaminação, assegurando a sua autenticidade. [19, 20] Portanto, são necessários critérios analíticos que garantam ao consumidor a veracidade da origem botânica definida no rótulo. [21]

O conhecimento da origem botânica do mel e de sua relação com a procedência do mesmo pode gerar um diferencial no mercado e contribuir para

a sua valorização, já que existe um aumento da demanda de produtos agroalimentares detentores de características químicas e organolépticas particulares relacionadas à denominação da origem botânica. [22] Os méis de maior valor de mercado são aqueles de origem monofloral e os de localização geográfica específica [23] em função do aroma e sabor característico, que são utilizados pelos consumidores como um critério de seleção do produto no momento da compra. [21]

O aroma pode ser descrito como extremamente suave e agradável, ou ainda, como no mel de tabaco, descrito como muito desagradável. [24]

Atualmente, além do mel unifloral e multifloral, algumas misturas de méis de duas origens florais têm aparecido para atender a diversidade do mercado. A caracterização da composição da fração volátil dessas misturas também representa um novo desafio para o analista. [25]

O principal interesse da certificação do mel brasileiro surge do conhecimento de que a flora apícola do país ainda é pouco estudada. A região nordeste, em específico, é reconhecida como uma das áreas de maior potencial para a apicultura do país. Entretanto, a maioria dos estudos de classificação iniciados na década de 60, concentra-se na região sudeste. [26]

Como a flora apícola brasileira é muito diversificada e varia de lugar para lugar, é imperioso conhecer a composição e a qualidade dos produtos oriundos de cada região para caracterizá-los e estabelecer padrões, fundamentais para a comercialização internacional.

O mel brasileiro tem boa aceitação no mercado exterior porque não contém em sua composição antibióticos, já que as abelhas melíferas brasileiras, acidentalmente cruzadas com abelhas africanas, tornaram-se resistentes e estão menos sujeitas a infecções comuns em outros países, como

exemplo pode-se citar o ácaro *varroase* que suga o “sangue” da abelha desde a fase de larva até a fase adulta e prejudica a capacidade produtiva da colônia. [27]

Além disso, o Brasil apresenta condições climáticas diversificadas, o que resulta na produção de mel durante o ano todo, diferenciando dos demais países que, normalmente, colhem mel somente uma vez por ano. [28] Além disso, o Brasil possui uma ampla flora apícola, que origina uma variedade de sabores e aromas exóticos, apreciados principalmente pelos europeus. Como exemplo, pode-se citar os méis de aroeira e de marmeleiro que agregam valor muito grande ao produto. Entretanto, essa circunstância não tem sido aproveitada por falta de certificação de florada, o que leva os importadores europeus e americanos a utilizá-lo quase exclusivamente em misturas para correção de méis de qualidade inferior [29] deixando de ser apreciado por seus tipos diferentes de floradas de origem. [12]

Vale ressaltar ainda que faltam leis adequadas que regulem a produção do mel brasileiro, pois os parâmetros e especificações estabelecidos pela legislação em vigor são baseados nas referências e normas dos Estados Unidos, cuja realidade de flora, clima e solo é bem distinta da imensa diversidade existente no Brasil. [30]

1.6 Métodos analíticos empregados para identificação da origem botânica e/ou geográfica do mel

1.6.1 Métodos convencionais tradicionalmente empregados

A abordagem clássica para verificar a origem botânica/geográfica do mel é a aplicação de métodos analíticos complementares, através da avaliação de parâmetros físico-químicos diversos, a análise polínica (melissopalínologia) e características sensoriais. [31-33]

1.6.2 Análise polínica

A análise polínica se baseia no fato que grãos de pólen sempre são detectáveis nos méis. Quando as abelhas coletam o néctar, o pólen é engolido ocasionalmente por elas e carregado até a colméia. Posteriormente, ele é armazenado nos favos juntamente com o néctar e está presente no produto final. Além disso, com frequência, grãos de pólen isolados entram no néctar via pêlos do corpo de uma abelha. [24, 34]

Cada espécie vegetal produz grãos de pólen com formatos e tamanhos característicos que podem servir de base para sua identificação. Por este fato, a origem polínica é um importante critério na classificação de méis. [24, 34]

O levantamento palinológico quantitativo e qualitativo de uma amostra de mel constitui o seu espectro polínico (obtido pela análise polínica da amostra), evidenciando as plantas produtoras de néctar, as não produtoras, os tipos de contaminações, as falsificações e as misturas, fornecendo ainda dados sobre a origem geográfica, botânica e época de colheita do mel. [36] Já a caracterização polínica do pólen coletado pelas abelhas implica no conhecimento de quais tipos polínicos as formam. [37]

A Figura 2 A ilustra as etapas de identificação dos grãos de pólen presentes no mel. Em (1) o mel é colocado sobre uma lâmina para ser observado em microscópio (2). Em (3) uma idéia da variedade de formas e tipos de grãos de pólen que podem ser encontrados, além da presença de grãos

de amido, resíduos de órgãos de abelha, elementos vegetais, cera e cristais de açúcar (Figura 2B). Em (4) e (5) verifica-se a qual espécie vegetal pertence o grão encontrado, através de comparação com o polinário de referência. Dependendo da frequência com que os grãos apareceram na lâmina pode-se afirmar que a espécie vegetal em questão é uma importante fonte de néctar (6) para a abelha estudada.

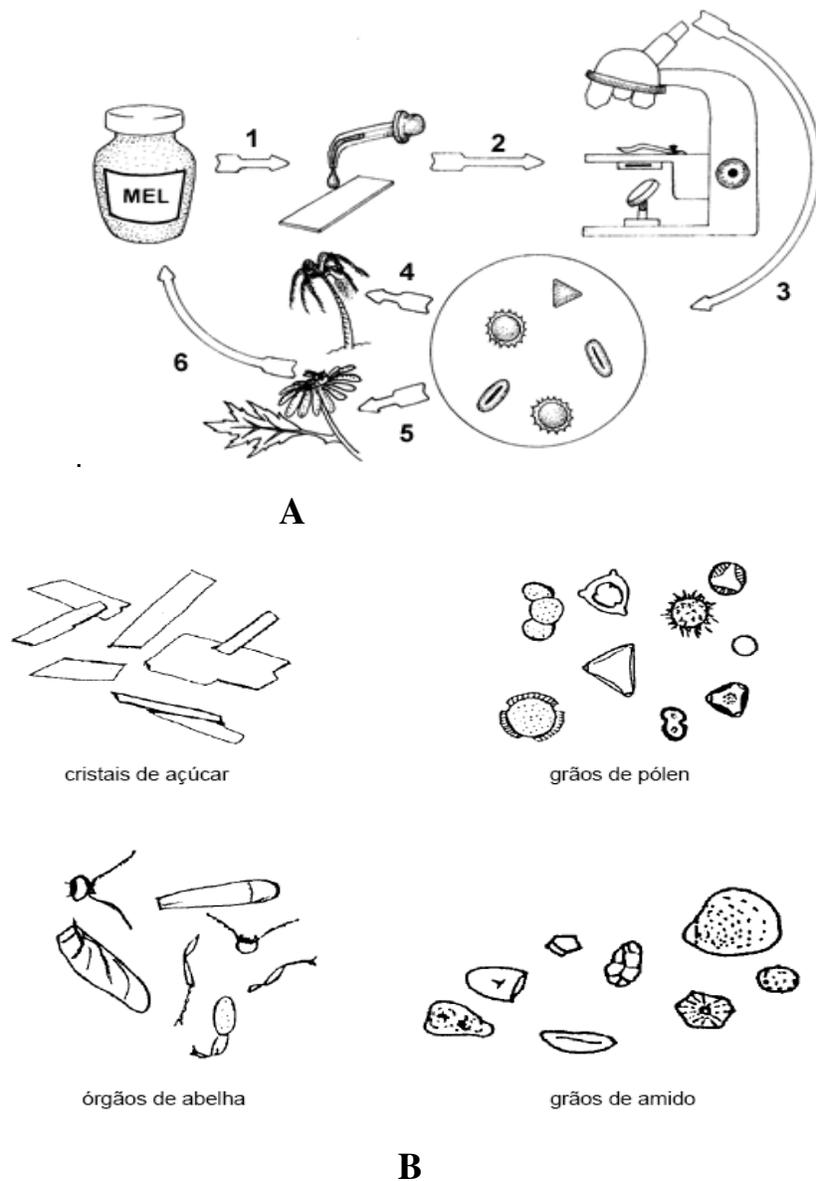


Figura 2. A. Etapas de identificação dos grãos de pólen presentes no mel [38] B. Reconhecimento dos diferentes materiais presentes no mel. [39]

Na prática, não é possível obter um mel 100 % monofloral, ou seja, isento de grãos de pólen de outras espécies. [15] O mel pode ser considerado unifloral quando apresenta especificamente um tipo de pólen dominante (acima de 45 %). [40] Uma pequena quantidade de néctar de outras plantas melíferas não influi marcadamente no sabor e cor de um mel onde predomine o néctar de uma única espécie de flores.

A Figura 2 mostra uma aplicação da análise polínica de méis. Foram analisadas onze amostras de mel (provenientes do distrito de Morro Azul do Tinguá da cidade do Rio de Janeiro), proveniente de plantas nativas, ruderais, palmeiras, plantas introduzidas no sítio como obra de paisagismo e da plantação de espécies de *Eucalyptus*. Foram identificados 33 tipos polínicos, reconhecendo-se quatro espécies, 23 gêneros e 19 famílias. Os resultados obtidos permitiram estabelecer a contribuição mensal das diferentes espécies botânicas no mel e em bolotas de grãos de pólen, bem como a confecção de um calendário de floradas para a região de Morro Azul. [41]

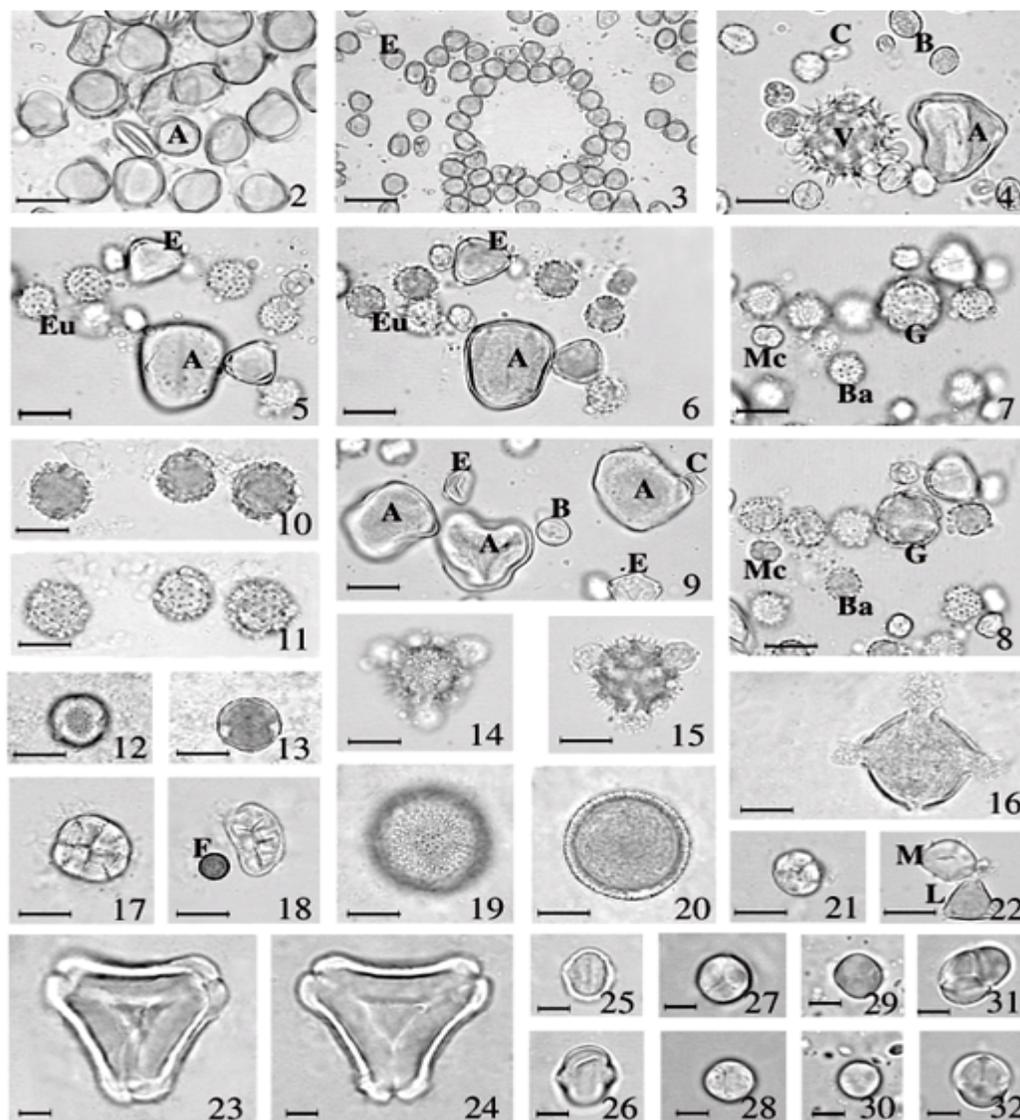


Figura 3. Figuras 2-32. Fotomicrografias de grãos de pólen em amostras de mel e bolotas de pólen. 2. Amostra de bolota de pólen de *Arecaceae* (A). 3. Amostra de bolota de pólen de *Eucalyptus* (E). 4-9. Amostras de mel com grãos de pólen de *Arecaceae* (A), *Baccharis* (Ba), *Castanea* (B), *Cecrapia* (C), *Eucalyptus* (E), *Eupatorium* (Eu), *Gochnatia* (G), *Mimosa caesalpiniiifolia* (Mc) e *Vernonia* (V). 10 – 11. *Eupatorium*. 12 – 13. *Caesalpinia peltophoroides*. 14 – 15. *Vernonia* com intina proeminente nas aberturas. 16. *Portulacca*. 17 – 18. *Anadenanthera colubrina* e esporo de fungo (F). 19 – 20. *Croton*. 21. *Piptadenia communis*. 22. *Allophylus* (L) e grão de amido (M). 23- 24. *Eucalyptus*. 25-26. *Cecrapia*. 27-30. *Mimosa scabrella*. 31-32. *Mimosa verrucosa*. Barras = 20 µm (2-22), 5 µm (23-32) .

[41]

Embora a tipificação de méis tenha sido feita tradicionalmente através da análise polínica, Oddo *et al.* [33] discorrem sobre as dificuldades associadas à classificação em relação à origem polínica, já que existe uma série contínua de possibilidades intermediárias entre os méis monoflorais e os poliflorais. Existem dezenas de variedades de méis que podem ser diferenciadas pela flora, pela localidade (ou região) ou época de colheita, ou ainda, segundo as técnicas de preparação. [34]

Além disso, a análise polínica depende de grande experiência por parte do analista, mesmo assim, muitas vezes, há grande dificuldade de se identificarem alguns grãos de pólen presentes nas amostras, geralmente muito heterogêneas. Ao encontrar um grão de identificação duvidosa, o especialista pode recorrer ao banco de imagens já existente para fazer comparações que facilitem o seu reconhecimento. Porém, devido à grande quantidade de imagens armazenadas, pode-se demorar muito tempo para que tal reconhecimento seja efetivado. [14, 42] Outro elemento de incerteza para a interpretação dos resultados de análise de pólen é uma consequência dos padrões da Comissão Européia [43] e do *Codex Alimentarius*. [44] Ambos indiretamente permitem a remoção do pólen por filtração quando a remoção de matérias orgânicas ou inorgânicas estranhas torna-se inevitáveis.

1.6.3 Análise sensorial

A análise sensorial é uma técnica de avaliação de atributos perceptíveis pelos órgãos do sentido (atributos organolépticos) e é usada em muitos campos, permitindo estabelecer o perfil organoléptico de diversos produtos, indicando a preferência do consumidor. [45] As características sensoriais

estimulam os sentidos e provocam vários graus de reações de desejo ou rejeição, em que o consumidor escolhe um alimento pelo seu nível de qualidade sensorial. [46]

As propriedades sensoriais são os principais parâmetros na determinação da qualidade do mel, segundo Anupama *et al.* [47]. Elas são expressas pela análise sensorial que mede e quantifica as características do produto através dos sentidos humanos.

O uso do controle de qualidade sensorial considera atributos como cor, aroma, consistência e sabor. Estes atributos estão sempre interligados e dependem de substâncias voláteis que se relacionam à fragrância original das flores onde o néctar foi coletado. A cor do mel está correlacionada com a sua origem floral, o processamento e armazenamento, fatores climáticos durante o fluxo do néctar e a temperatura na qual ele amadurece na colméia. Logo, as suas características sensoriais são dadas de acordo com vários fatores. Méis com coloração mais escura apresentam um sabor mais proeminente, ou seja, há a possibilidade evidente de se criar uma inter-relação entre a sua coloração e o seu sabor. [34]

Bastos [48] observou que méis diferentes apresentam aroma e sabor diferentes e que pessoas treinadas podem identificar méis de uma fonte pelo seu aroma e sabor. Entretanto, segundo Coultate [49], a mistura de substâncias encontradas em um único alimento, dificulta sua identificação pelos provadores. O aroma e o sabor do mel dependem quase que exclusivamente da origem floral. O envelhecimento, armazenamento, temperatura, são fatores que podem afetar essas características. Segundo Arpana e Rajalaksmi [50], os méis com sabor delicado são sempre luminosos e, os escuros, normalmente

têm um sabor forte concluindo que a cor pode oferecer informações sobre o sabor.

As razões pelas quais a análise sensorial do mel é realizada são a aquisição de dados complementares aos obtidos pelas análises instrumentais, a classificação de méis monoflorais e reconhecimento da mistura desses méis, manutenção das propriedades sensoriais, relativas a mel *in natura*, através da otimização das condições de coleta e processamento, e a agregação de valor de mercado por meio da avaliação da qualidade do mel de procedência conhecida. [48]

É complexo o uso de provas sensoriais para o estabelecimento de atributos que contribuam para a qualidade de méis, tendo em vista o caráter oneroso deste processo que implica em gastos de tempo. Tal processo também está altamente sujeito a erros devido à própria variabilidade e subjetividade do analista sensorial. Existem métodos calorimétricos, texturimétricos e químicos que proporcionam boas correlações unidimensionais dos atributos sensoriais. [34]

1.6.4 Análise físico-química

Como o mel é resultado da desidratação e transformação do néctar, a quantidade de mel que pode ser obtida de uma determinada planta varia com os fatores que influenciam a produção e a concentração de néctar e, ainda, com a concentração e proporções de seus carboidratos, com a quantidade de flores da área e com o número de dias em que as flores estão secretando néctar. A composição do mel depende, basicamente, da composição do néctar de cada espécie vegetal produtora, conferindo-lhe características específicas

enquanto que as condições climáticas e o manejo do apicultor têm influência menor.

Existe no Brasil uma legislação específica para mel [51] a qual estabelece parâmetros de controle de qualidade para o produto, com indicação das análises e métodos a serem empregados. [52]

Análises físico-químicas de méis são determinadas com a finalidade de comparar os resultados obtidos com os padrões estipulados por instituições internacionais e nacionais. [53]

As análises físico-químicas para caracterização de méis indicadas pela legislação brasileira são: determinação de umidade, determinação de HMF, açúcares redutores, sacarose aparente, cinzas, acidez livre, sólidos insolúveis em água e atividade diastásica. [54, 55]

Dentre os açúcares existentes no mel, os monossacarídeos constituem a maior parte, variando entre 85% a 95% da sua composição. Outro parâmetro importante é a umidade que pode influenciar na viscosidade, no peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade. Com a descristalização do mel, pode se formar o HMF o qual aumenta com a elevação da temperatura, com armazenamento do mel, adição de açúcar invertido, sendo também afetado por alterações de pH, água e minerais. Dentre as enzimas, a diastase é a mais encontrada, sendo um parâmetro importante na avaliação da qualidade do mel. Os méis brasileiros possuem uma variação grande de cor o que pode influenciar na preferência do consumidor, que, na maioria das vezes, escolhe o produto apenas pela aparência. Tal é a relevância deste parâmetro que este assunto foi abordado em um fórum na cidade de Geneva [56] que considerou a cor como uma das características do mel que tem particular importância no mercado

internacional. A cor do mel está correlacionada com a sua origem floral, o processamento e armazenamento, fatores climáticos durante o fluxo do nectar, a temperatura na qual o mel amadurece na colméia e o conteúdo de minerais presentes, que muitas vezes são expressos como cinzas. A condutividade elétrica pode ser utilizada como método suplementar na determinação da origem botânica do mel e tem correlação com o conteúdo de cinzas, pH, sais minerais, além das proteínas e outras substâncias presentes no mel. [52] Os parâmetros físico-químicos não asseguram isoladamente a origem botânica e/ou floral do mel.

1.7 Métodos alternativos e/ou complementares aos métodos tradicionalmente empregados na identificação da origem botânica e/ou geográfica do mel

Em função dos problemas relativos aos métodos anteriormente descritos, existe a necessidade do desenvolvimento de uma metodologia não subjetiva, rápida e confiável, que possibilite identificação unívoca da origem botânica do mel, aumentando seu valor agregado com a particularização dos tipos e de suas características. [12] É bem conhecido que o aroma e sabor de alimentos são dependentes dos compostos orgânicos voláteis presentes no *headspace*¹ e da interação desses compostos voláteis com a matriz do alimento. [57]

O perfil do aroma é uma das características mais típicas de um alimento para a avaliação da qualidade organoléptica e da autenticidade do mesmo. Em função do elevado número de compostos

¹ espaço existente acima do nível da amostra.

orgânicos voláteis, seus perfis representam uma impressão digital (*fingerprint*) do produto, que poderia ser usada para determinar a origem botânica do mel. [58]

A composição do mel (inclusive voláteis) pode variar muito com a origem floral e o manuseio. [59] Moreira *et al.* [60] avaliaram as mudanças no perfil de voláteis de méis brasileiros durante o armazenamento em condições tropicais.

Não são todos os compostos voláteis que têm um impacto sobre o aroma de mel. No entanto, alguns compostos com baixa concentração podem contribuir significativamente para modificação do mesmo. [61]

Certos compostos específicos são característicos de méis com origem floral e/ou geográfica determinada: o uso destes chamados **marcadores** é uma possibilidade para a determinação da origem a partir da determinação da composição de sua fração volátil. [12] Atualmente encontrar marcadores confiáveis para determinar a origem do mel é prioridade na pesquisa da apicultura industrial.

Na análise dos compostos voláteis a maior parte dos compostos detectados não pode ser utilizada como marcadores confiáveis porque estão presentes em outros tipos de mel. Contudo, a busca de substâncias características é sempre de grande valor, para servir de subsídios para confirmação de sua origem. A pesquisa de substâncias voláteis características do mel significa uma avanço muito grande, pois através destas, pode ser possível a caracterização e diferenciação do mel. [62]

Estudos da composição do aroma de méis, como em todos os alimentos, tradicionalmente envolve extratos aromáticos. O aroma do mel é uma mistura complexa, envolvendo muitas classes de compostos voláteis. O isolamento da

fração volátil é realizado usando diferentes técnicas. Como resultado, a composição de aromas obtido é dependente do procedimento empregado. [3] A determinação quantitativa e qualitativa dos compostos voláteis a partir de uma matriz complexa, como o mel, é uma tarefa bastante difícil. [58] Os compostos são isolados dos componentes principais do mel (açúcar e água) e pré-concentrados. [3] A análise dos mesmos geralmente é realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), com uma etapa prévia de extração, a qual é sempre necessária. [58]

1.7.1 Microextração em fase sólida

Métodos adequados para o isolamento de voláteis do mel devem ser aplicados porque [63] artefatos (compostos que não estão presentes no aroma original do mel) [15] podem ser gerados devido a efeitos de aquecimento dos carboidratos e aminoácidos presentes no mel. Ainda, há uma variação na seletividade de voláteis detectados por diferentes métodos, dependendo dos sorventes utilizados e as condições de extração.

A microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*) é a técnica de extração mais apreciada pela indústria de alimentos e que vem se demonstrando eficaz no isolamento dos voláteis de vários tipos de mel. [64, 65]

Introduzida por Arthur e Pawliszyn em 1990 [66], a técnica baseia-se na sorção de analitos em uma fase sorvente imobilizada sobre uma fibra de sílica fundida. Trata-se, em princípio, de uma técnica de equilíbrio [67] que integra amostragem, extração e concentração dos compostos voláteis [25] e requer a

otimização dos parâmetros de extração que afetam a eficiência no isolamento dos voláteis. [67]

Algumas vantagens significantes do uso de SPME são: utilização de pequeno volume de amostra, baixo custo por análise, alta reprodutibilidade e repetibilidade. [68] Trata-se de uma técnica de extração livre de solventes, rápida, versátil [25] e de fácil manuseamento, que não necessita de equipamentos complicados e pode ser usada para isolar e concentrar compostos voláteis e não voláteis em amostras líquidas, gasosas ou sólidas, permitindo obter resultados lineares e reprodutíveis dentro de um amplo intervalo de concentrações. [67] O dispositivo básico de SPME consiste de um bastão de sílica fundida (FS, do inglês *fused silica*) (10 mm de comprimento, diâmetro de 110 a 160 μm) recoberto com filmes de até 100 μm de espessura de polímeros sorventes (polidimetilsiloxano (PDMS, do inglês *polydimethylsiloxane*), poliacrilato (PA, do inglês *polyacrilate*), carbowax (CW, do inglês *carbowax*) ou sólidos adsorventes (como carvão ativo microparticulado – Carboxen (CAR, do inglês *carboxen*), divinilbenzeno (DVB, do inglês *divinylbenzene*) dispersos em polímeros ou misturas destes materiais (CAR-PDMS, CW-DVB). A Figura 4 ilustra uma fibra comercial em que o recobrimento, ou filme extrator, tem espessura de 100 μm . [69]

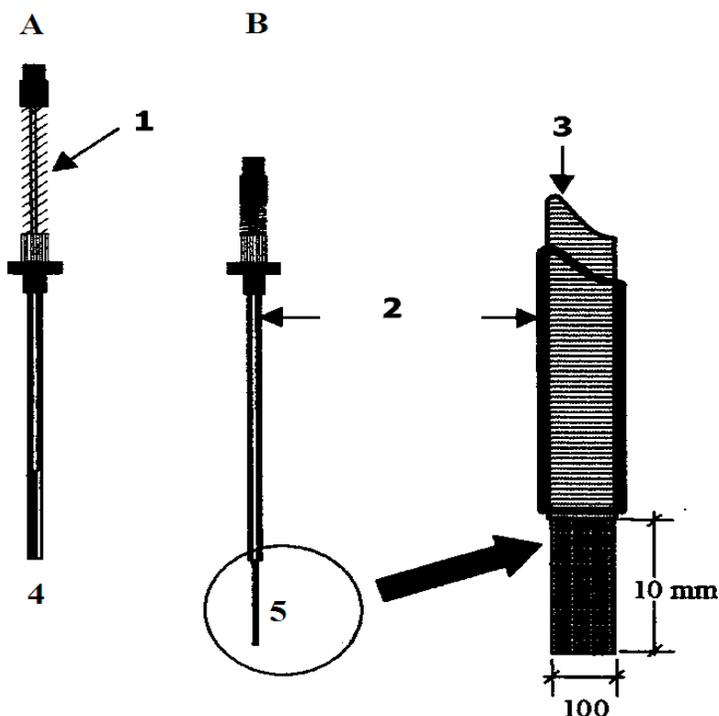


Figura 4. Dispositivo da fibra de SPME: (A) Posição da fibra retraída na agulha (tubo hipodérmico com diâmetro externo 0,56 mm), (B) posição com a fibra exposta. No detalhe são mostradas as dimensões típicas da seção com recobrimento de 100 µm de espessura. **1.** mola; **2.** tubo hipodérmico (agulha); **3.** tubo de fixação da fibra (interno ao hipodérmico); **4.** fibra retraída; **5.** fibra exposta.

Desde a introdução da técnica, a SPME tem sido extensivamente estudada e aplicada a diversas matrizes como alternativa às metodologias convencionais de preparo de amostra. [69]

A extração dos analitos por SPME pode ser realizada em dois diferentes modos: extração direta (os analitos são transferidos diretamente da matriz para a fase extratora), extração através do *headspace* (HS) (os analitos são extraídos através da fase gasosa equilibrada com a amostra). A seleção do modo de extração depende da natureza da matriz, dos compostos a serem

analisados e do tipo de matriz. Para o *screening* de compostos voláteis de mel, o modo de extração através do HS é o mais adequado. [25]

A principal vantagem da análise utilizando SPME através do *headspace* é que a extração pode ser realizada sem nenhum tratamento da amostra. [70]

A Figura 5 ilustra um esquema básico de HS-SPME. Na etapa de sorção, os analitos são extraídos da matriz pela exposição do recobrimento da fibra de sílica fundida diretamente ao seu headspace por um certo tempo pré-determinado [71, 72]. Após a etapa de sorção a fibra é retraída e os analitos retidos são desorvidos em um instrumento analítico apropriado (GC, HPLC, etc.) [72]. Na GC, a desorção é realizada termicamente sobre um fluxo de gás de arraste e os analitos são arrastados para a coluna cromatográfica. [71]

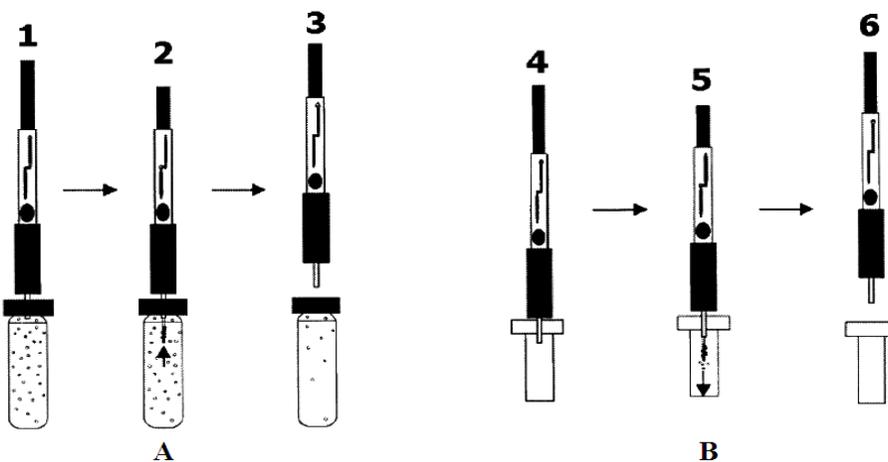


Figura 5. Procedimento básico para HS-SPME. A = extração; e B = dessorção. 1. perfuração do septo do frasco de amostra; 2. exposição da fibra de SPME/extração dos analitos; 3. retração da fibra; 4. perfuração do septo do injetor do GC; 5. exposição da fibra/dessorção dos analitos; 6. retração da fibra.

A eficiência da extração é dependente da constante de distribuição da espécie de interesse e da espessura do recobrimento da fibra extratora. A

escolha do recobrimento a ser usado na extração vai depender da natureza química das espécies em estudo. [71]

A separação dos voláteis de mel isolados por SPME é realizada por cromatografia gasosa convencional unidimensional em colunas capilares. [73]

1.7.2 Cromatografia gasosa unidimensional

A cromatografia unidimensional vem sendo utilizada por muitos anos como uma ferramenta padrão de separação para analisar compostos de uma variedade de matrizes incluindo análise de alimentos. Grande atenção tem sido dada para simplificar pré-tratamentos que são importantes fontes de erros principalmente para amostras complexas (como alimentos ou outras matrizes relacionadas). [74] Entretanto, a cromatografia gasosa unidimensional nem sempre possibilita resolução e separação necessárias para obtenção dos melhores resultados em termos de identificação dos analitos em amostras de alimentos. Este problema freqüentemente ocorre mesmo considerando o grande número de detectores desenvolvidos nos últimos anos, incluindo detectores por espectrometria de massas.

A cromatografia gasosa monodimensional (¹D-GC) é reconhecida por oferecer maior capacidade de pico¹ que outras técnicas cromatográficas convencionais. [75] Entretanto, quando se trata de amostras complexas a capacidade de pico torna-se limitada (100 a 150 picos em uma corrida) [76] mesmo em condições nas quais a separação é otimizada. [77]

Devido à complexidade do aroma do mel, quando se utiliza GC monodimensional, são necessários cerca de 30 a 90 min de análise para a

¹ o número máximo de compostos que podem ser separados em uma mesma análise

aquisição de cromatogramas com resolução cromatográfica aceitável para os compostos eluídos. Mesmo assim há possibilidade de ocorrer coeluição de alguns voláteis presentes na amostra [73], levando a uma identificação ambígua ou problemática.

O acoplamento, através de uma interface, de duas ou mais colunas independentes, a chamada cromatografia gasosa multidimensional (MDGC, do inglês *multidimensional gas chromatography*) é uma opção para aumentar o poder de separação de amostras complexas. Uma vez que, os incrementos tecnológicos (como novas tecnologias de colunas) parecem se aproximar do nível máximo.

A cromatografia multidimensional possibilita através de dois ou mais mecanismos de separação independentes ou quase independentes, aumento significativo do poder de separação das correspondentes técnicas unidimensionais (aumento da capacidade de pico) e, ainda, a separação física dos compostos em misturas complexas.

Outros acoplamentos envolvendo sistemas cromatográficos a gás, líquido ou fluído supercrítico para a análise de uma grande variedade de compostos em diferentes matrizes de alimentos (mel, vinho, leite, queijo, óleo, etc.) tem sido utilizados com a mesma finalidade mas não serão aqui discutidos. [74]

1.7.3 Cromatografia gasosa multidimensional

O objetivo geral de novas tecnologias para cromatografia gasosa é viabilizar a separação, identificação e quantificação rápidas do maior número de constituintes em misturas complexas, usando equipamentos simples e robustos.

A princípio, a existência de sistemas cromatográficos com eficiência e sensibilidade muito superiores às atuais demandaria, necessariamente, novos paradigmas nas pesquisas em GC. Porém, uma das vertentes mais promissoras para esses desenvolvimentos se baseia em um conceito já há muito conhecido: o de separação multidimensional, no qual a amostra é submetida sequencialmente a diferentes processos de eluição. Separações bidimensionais são muito usadas em cromatografia planar. A amostra é aplicada no canto de uma cromatoplaça quadrada e eluída. Em seguida, a cromatoplaça é seca, girada em um ângulo de 90° e eluída novamente com uma segunda fase móvel diferente da usada na primeira eluição. Também são disponíveis diversos modos de separação bidimensional para cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*), sendo a segunda eluição feita em outra coluna de HPLC ou mesmo com outras técnicas, como eletroforese capilar ou GC. Em qualquer caso, espécies coeluídas na primeira etapa podem ser separadas na segunda eluição, especialmente se os mecanismos de separação das etapas forem diferentes, ou seja, se eles forem totalmente ortogonais. [78]

A cromatografia gasosa bidimensional de frações parciais (GC-GC, do inglês *heartcut two-dimensional gas chromatography*) começou a ser aplicada mais intensivamente, sendo ainda hoje eventualmente usada para amostras complexas. Nestas frações selecionadas do eluato de uma coluna, contendo analitos não separados, são desviadas para uma segunda coluna, possibilitando somente a inspeção das frações selecionadas. [73, 78]

Os princípios da cromatografia gasosa bidimensional, aspectos instrumentais, nomenclatura e aplicações a diversas matrizes encontram-se abordados na literatura científica. [75, 78, 79-82]

A cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC, do inglês *comprehensive two-dimensional gas chromatography*) é uma técnica relativamente recente, idealizada em 1991 por Phillips [76] que melhorou substancialmente a capacidade de pico de uma amostra, sem prolongar o tempo de análise em relação a cromatografia convencional. [76, 78, 83]

Na GC×GC, duas colunas cromatográficas de diferentes mecanismos de retenção são acopladas em série, sendo a primeira de dimensões convencionais e a segunda mais curta e mais eficiente, compatível com *fast-GC*. O modulador é considerado o “coração” da técnica e é acoplado entre as duas colunas, tendo a função de amostrar e focalizar as estreitas frações eluídas da primeira coluna e, em seguida, liberar estas porções, rapidamente, para a segunda coluna. O termo “abrangente” é utilizado para designar que todo o efluente da primeira dimensão, ou uma parte representativa do mesmo, seja introduzido na segunda dimensão (²D), sem perda das características da separação na ¹D (primeira dimensão). [84]

A Figura 6 ilustra um esquema básico dos principais componentes do GC×GC.

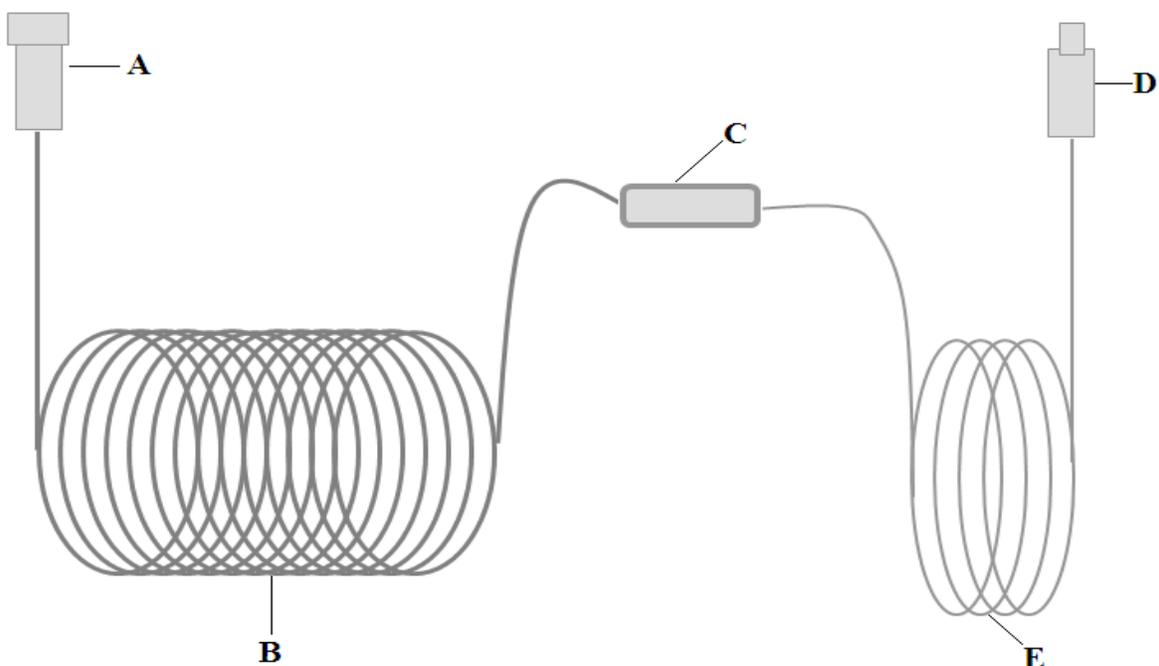


Figura 6. Diagrama do sistema de cromatografia gasosa bidimensional abrangente adaptado de Liu e Phillips. [76] **A.** injetor; **B.** coluna da 1^a dimensão (15 - 30 m x 0,25 – 0,32 mm x 0,1 - 1 mm); **C.** modulador; **D.** detector; **E.** coluna da 2^a dimensão (0,5 - 2 m x 0,1 mm x 0,1 mm)

A principal diferença entre GC×GC e ¹D-GC é o acoplamento de duas colunas capilares em série, geralmente por conectores e presença de uma interface que continuamente coleta os analitos eluídos da primeira coluna, que são concentrados e transferidos para a segunda coluna de seletividade diferente. Conseqüentemente, a compressão da banda durante a modulação resultada em aumento da detectabilidade e larguras de banda mais estreita na metade da altura, variando de 70 ms a 400 ms, gerando melhorias consideráveis de relação sinal-ruído por GC×GC, em comparação com ¹D-GC (25-50 vezes). [85, 86]

Embora existam moduladores comercialmente disponíveis, alguns usuários de GC×GC ainda confeccionam seus próprios moduladores e programas computacionais para controlá-los.

Os moduladores podem ser classificados em três tipos, de acordo com seu princípio operacional. O primeiro engloba dispositivos baseados em válvulas diversoras de comando eletrônico ou pneumático instaladas entre as colunas, que coletam frações do efluente da primeira coluna e as transferem para a segunda coluna. Esses moduladores apresentam como grande inconveniente o fato de não haver focalização das frações. A segunda forma de realizar a modulação consiste na captura do eluato da primeira coluna em uma armadilha contendo um sorvente adequado, seguida de dessorção térmica para a segunda coluna. O modulador original de Liu e Phillips, enquadra-se nesse grupo. O modulador térmico de varredura (*thermal sweeper modulator*) - um aperfeiçoamento desse conceito - foi o primeiro modulador para GC×GC disponível comercialmente.

Os dispositivos baseados em válvulas ou interfaces sorventes têm sido preteridos em favor de uma terceira forma de modulação, que é realizada através de moduladores criogênicos, que são mais simples e robustos. Nestes moduladores, a coleta e reconcentração de frações do eluato da primeira coluna são feitas por armadilhas criogênicas.

A principal razão para o aumento da capacidade de pico é o fato de que os componentes da amostra serão separados por meio de dois mecanismos diferentes e independentes. [87]

Em geral, GC×GC apresenta quatro vantagens sobre a ¹D-GC: aumento de resolução, aumento de detectabilidade devido à reconcentração da banda do soluto durante o processo de modulação (favorecendo a detecção de

componentes em nível de traços) e construção de cromatograma ²D (bidimensional) com estruturação por compostos quimicamente similares. Sendo a retenção nas duas colunas por diferentes mecanismos de interação analito-fase estacionária, a capacidade teórica de pico na GC×GC se aproxima do produto das capacidades de pico das duas dimensões. [85, 87, 88]

Outra diferença entre GC×GC e ¹D-GC é a forma de representação gráfica dos cromatogramas. O registro do sinal do detector em função do tempo em um sistema GC×GC é uma sequência contínua e encadeada dos cromatogramas curtos para cada fração eluída na ²D. A partir desse registro digitalizado, e conhecido o período de modulação (intervalo de tempo para cada ciclo de modulação) pode-se construir gráficos tridimensionais sinal do detector x tempo de retenção na 1^a coluna (¹t_R) × tempo de retenção na 2^a coluna (²t_R). Na Figura 7 uma banda cromatográfica larga, consistindo de três analitos não separados na ¹D, (A) é fracionada e eluída na ²D, gerando um cromatograma bruto (B). Cada um dos cromatogramas individuais das frações pode ser destacado do cromatograma bruto (C) e a partir deles pode-se gerar gráficos sinal × ¹t_R × ²t_R como diagrama tridimensional (3D Plot, D), como uma série de curvas de nível monocromáticas chamadas de diagrama de contorno (Contour Plot, E) ou usando escalas cromáticas de intensidade de sinal, o diagrama de cores (Colour Plot, F). Outro aspecto fundamental de GC×GC também pode ser destacado na Figura 7. A compressão das bandas cromatográficas decorrente da modulação ocasiona um aumento significativo da detectabilidade: ao invés de eluir como um pico largo e pouco intenso, cada analito elui como uma série de picos estreitos e intensos (altas relações sinal/ruído), sendo facilmente detectados.

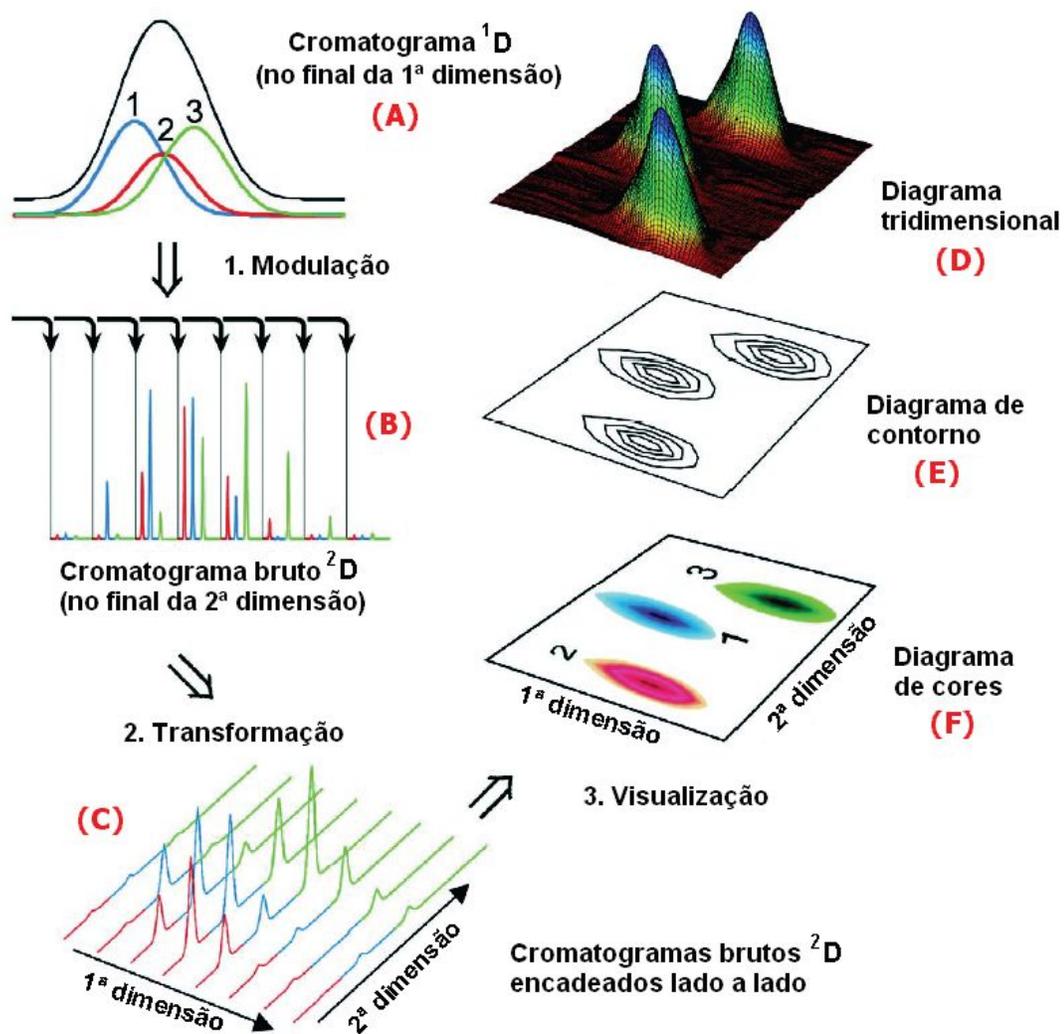


Figura 7. Construção de diagramas tridimensionais sinal \times ¹tR \times ²tR em GC \times GC. [78]

Entre os detectores cromatográficos mais populares, o detector por ionização em chama (FID, do inglês *flame ionization detector*) é o mais compatível com as bandas cromatográficas estreitas geradas por GC \times GC e as altas taxas de coleta (número de leituras do sinal digitalizado do detector por segundo): 100 Hz ou mais. Os FID modernos têm volumes internos desprezíveis e possibilitam taxas de coleta de até 200 Hz; assim, seu uso tem sido muito difundido em GC \times GC.

O uso do detector por captura de elétrons (ECD, do inglês *electron capture detector*) exige otimização mais cuidadosa de parâmetros operacionais, já que os volumes internos comparativamente grandes dos ECD (150 μ L) tendem a resultar em respostas mais lentas e maior dispersão das bandas cromatográficas.

Já a detecção por espectrometria de massas que é comumente utilizada em 1 D-GC, tem sido bastante discutida visto que o uso para GC \times GC não é trivial. Espectrômetros de massas com analisadores quadupolares (QMS) convencionais apresentam taxa de aquisição de pouco mais que dois espectros de massas por segundo, sendo lentos para as bandas cromatográficas estreitas do GC \times GC. Contudo, hoje em dia QMS mais rápidos já são disponíveis e, além disso, é possível diminuir a faixa de massas investigada ou monitorar apenas alguns íons durante a corrida, resultando assim em uma maior taxa de aquisição.

A espectrometria de massas por tempo de voo (TOFMS, do inglês *time off flight mass spectrometry*) permite a coleta de até 500 espectros de massas por segundo e, portanto, mostra-se superior aos QMS em análises qualitativas e quantitativas. Além disso, dado o elevado número de espectros de massas por pico, torna-se possível a deconvolução espectral de picos que coeluem na 1 D e na 2 D, o que aumenta a capacidade de separação. Para isso, algoritmos para reconhecimento de picos, deconvolução espectral e comparação com a biblioteca de espectros de massa necessitam ser empregados no processamento e interpretação dos cromatogramas GC \times GC-MS o que torna a análise mais complexa e demorada. Devido às características de cada detector, o TOFMS parece ser a detecção ideal para GC \times GC, embora o seu custo seja proibitivo para muitos usuários. [77]

Nos últimos anos muitos trabalhos têm sido publicados abordando aplicações da GC×GC. Recentes desenvolvimentos e aplicações da técnica foram relatados por Adahchour *et. al.* [79]

Schmarr e Stanimirova [89, 90] relataram procedimentos de classificação de amostras de frutas e mel, através de seus HS.

Stanimirova empregou SPME-GC×GC-TOFMS na diferenciação de méis de diferentes origens geográficas (Áustria, Brasil, República Checa, Itália, Eslováquia).

Apesar de todas as vantagens inerentes a SPME, durante a extração dos analitos através do *headspace*, obtida com o aquecimento da solução aquosa da amostra, espécies que não estavam presentes na amostra original são formadas (os chamados artefatos).

Uma importante classe de artefatos é representada pelos produtos da bem conhecida reação de *Maillard*, (reação que ocorre devido à ligação química do açúcar (glicose) às proteínas presentes no alimento) durante aquecimento ou armazenamento por longo período de tempo. [91]

Muitos autores têm feito estudos sobre a determinação da fração volátil em diversas amostras utilizando cromatografia convencional ¹D-GC via HS como café Arábico, frutas tropicais, cacau, cerveja, liquor, vinho, sem nenhuma identificação dos artefatos específicos formados durante o procedimento de extração a elevadas temperaturas além do HMF. [73, 92-98]

Durante a otimização do método SPME para voláteis e semi-voláteis em mel, Cajka *et al.* [73] relataram aumento nas respostas para alguns componentes, quando a temperatura da amostra foi aumentada (acima de 70-80 °C). Ao invés de atribuir esse efeito ao aumento da extração por SPME,

eles concluíram que o aumento das respostas foram resultados da decomposição e reações de formação a temperaturas elevadas. Ou seja, após a incubação da amostra a temperaturas variando entre 30 e 90 °C, seguida pela extração a 30 °C, os perfis cromatográficos obtidos foram significativamente diferentes em temperaturas acima de 40°C. Estas implicações sugerem que o manuseio inadequado da amostra durante a extração de HS pode levar a geração de perfis cromatográficos que não são representativos da composição da amostra original e resultados errôneos para classificação.

A identificação de artefatos, que atuam como um "ruído químico", em ¹D-GC convencional foi dificultada devido à alta complexidade do aroma da amostra, coeluições cromatográficas, que impossibilitam a identificação, devido à pobre separação e menor sensibilidade, em relação ao GC×GC. Estes artefatos, se não forem previamente designados, fornecem resultados enganosos, especialmente se os marcadores químicos são utilizados para fins de quantificação e classificação. Quanto aos aromas de fruta e de amostras de mel, por exemplo, se os artefatos foram formados durante o processo de extração e não tinham sido previamente designado como tal, todo o procedimento e os resultados decorrentes da impressão digital, classificação e quantificação poderiam ser comprometidos. Este ruído químico deve ser excluído a partir dos parâmetros de análise, pois não pertencem à verdadeira amostra química, a partir de um procedimento de preparação da amostra cuidadosamente otimizado de forma a eliminar a geração de artefatos.

Por outro lado, temperaturas elevadas melhoram o processo de transferência de massa da matriz da amostra para o revestimento da fibra de SPME e, conseqüentemente, para alguns componentes, a quantidade de analitos extraídos é maior. [99]

Portanto, uma avaliação crítica deve ser feita para encontrar um compromisso entre maior eficiência de extração e potencial de formação de artefato, além de considerar prós e contras de cada técnica analítica.

CAPÍTULO 2:

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Alguns métodos têm sido empregados no monitoramento da qualidade básica de méis. Em geral, são baseados na identificação morfológica e quantificação dos grãos de pólen, atributos sensoriais, propriedades físico-químicas e perfil de compostos voláteis representativos. Estes métodos serão relatados nos itens 2.1 e 2.2 a seguir.

2.1 Métodos convencionais tradicionalmente empregados na identificação da origem botânica e/ou geográfica do mel

A análise polínica foi introduzida no Brasil em 1961 e é até hoje empregada na qualificação do mel por cooperativas e associações de apicultores em vários estados [37]

A técnica baseia-se em métodos estabelecidos pela *International Commission for Bee Botany* [15] Apesar das inúmeras desvantagens associadas, [58] a diferenciação por tipagem polínica ainda é um método indispensável para a autenticação da origem botânica do mel [33, 100] e é até agora a única técnica instrumental que permite uma discriminação entre os tipos polifloral e diferentes de méis unifloral, [101] fornecendo também uma indicação sobre as proporções das contribuições de néctar diferentes em uma amostra de mel.

A análise por parâmetros físico-químicos baseia-se na legislação em vigor [54] que segue as mesmas prerrogativas da legislação preconizada pela FAO (do inglês *Food and Agriculture Organization*) que foi estabelecida para o mel da abelha *Apis mellifera L.* (tipo de mel mais consumido nos países europeus e Estados Unidos). Porém as características químicas e nutricionais são, em parte, diferentes para o mel de abelhas nativas no nosso país [102]

2.2 Métodos alternativos e/ou complementares empregados na identificação da origem botânica e/ou geográfica do mel

Algumas plataformas analíticas como GC-MS, ressonância magnética nuclear (NMR, *nuclear magnetic resonance spectroscopy*), espectroscopia no infravermelho (IR, *infrared spectroscopy*), espectroscopia de fluorescência, espectroscopia de emissão ótica (OES, do inglês *optical emission spectroscopy*) e espectroscopia de emissão ótica acoplada ao plasma (ICP/OES, *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) têm sido propostas para a classificação química de méis. [103, 104]

Alguns autores têm sugerido a classificação através do uso de marcadores como flavonóides, aminoácidos, proteínas e compostos voláteis. [58] Será dada ênfase apenas a classificação com o uso de compostos voláteis.

Mais de 600 compostos orgânicos têm sido identificados em diferentes tipos de mel de diferentes origens. [63]. Os principais compostos voláteis encontrados são alcoóis, cetonas, aldeídos, ácidos, ésteres e terpenos. [61] Entre estes, (E)- β -damascenona, fenilacetaldeído, 2-fenietanol, linalol, p-anisalaldeído e benzaldeído, foram relatados como importantes contribuintes do sabor e aroma. [63] Conforme Belitz [105] os ésteres do ácido fenilacético possuem aroma típicos do mel.

Compostos como 1,3-propanodiol, 2-metil ácido butanóico, 3,4-dimetil-3-hexen-2-ona, e 6-metil-5-octen-2-ona foram relatados pela primeira vez por Barra *et al.* em um trabalho recente. [61]

Alguns compostos voláteis naturais são característicos da origem botânica e podem ser considerados como marcadores específicos, tais como a 2- aminoacetofenona para o mel de castanha [63], antranilato de metila em mel cítrico [3, 65, 106], o qual já havia sido relatado por Graddon et al. [107] e Serra e Coll. [108] Outros compostos voláteis são sugeridos como marcadores de mel cítrico incluindo aldeído lilálico [106, 65] , limoneno [70], hotrienol [109] e 1-p-menten-al. [106]

O mel de *Tília spp*, apresenta o composto 8-p-menteno-1,2 diol; o mel de *Calluna vulgaris*, o ácido fenil lático, e o mel de *Brassica napus var. oleifera*, o ácido fenilpropiônico. No mel de eucalipto, entre várias substâncias, estão dimetil disulfeto, dicetonas (2,3-butanodiona, pentano-2,3-diona) e hidroxicetonas (acetoína, 3-hidroxi-pentan-2-ona e 2-hidroxi-pentan-3-ona) [59, 105, 110, 111]

Méis de eucalipto provenientes da Espanha apresentaram 2-hidroxi-5-metil-hexan-3-ona e 3-hidroxi-5-metil-hexan-2-ona que podem ser indicadores de origem botânica por não terem sido detectados em outras amostras de diferentes origens florais. [112] Em geral, o mel de eucalipto tem sido diferenciado pelo conteúdo de compostos como nonanol, nonanal, ácido nonanóico [109] e acetoína. [113, 114] Este último também foi mencionado como marcador deste tipo floral por Graddon *et al.* [105].

A presença de dimetilsulfeto, 2,3-butanodiona e acetoína em méis de outras origens reduz a utilidade como marcadores para eucalipto. 2,3-pentadiona, 3-hidroxi-pentan-2-ona e 2-hidroxi-pentan-3-ona não podem ser considerados como marcadores confiáveis porque estes compostos ainda não foram encontrados em algumas amostras de mel de eucalipto. [112]

O mel de castanha analisado por Piasenzotto *et al.* [70] produz compostos voláteis identificados como marcadores característicos como acetofenona, 1-feniletanol e 2-acetofenona.

Em outros casos, a origem do mel floral também pode ser caracterizada por uma maior concentração ou ausência de certos compostos (terpenos, norisoprenóides, compostos derivados de benzenos e outros). [63] Compostos voláteis tais como 2-metilciclopentanol e dietilfenol também foram mencionados como característicos deste mel monofloral por causa de sua detecção e abundância. [67]

Em outros, a origem do mel pode ser erroneamente atribuída porque compostos voláteis podem ser gerados durante o processamento do mel e confundidos com marcadores. Em 1988 Visser *et al.* [115] relataram a presença de 5-(hidroximetil) furan-2-carbaldeído (também denominado hidroximetilfurfural (HMF) durante o processamento do mel a temperaturas elevadas [85], e então este marcador foi correlacionado somente a exposição térmica indevida. Em 2002 Tosi *et al.* [116] relataram o efeito do tratamento térmico do mel sobre o teor de hidroximetilfurfural sugerindo que a produção de HMF é fortemente influenciada pela temperatura.

Há ainda um grande número de compostos voláteis a serem identificados e muitos tipos de méis que ainda não foram estudados. [117]

2.2.1 Técnicas analíticas empregadas para análise de misturas complexas de voláteis

A eficiência de separação e a sensibilidade da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa tem demonstrado ser útil na análise de misturas complexas de voláteis. [63] Métodos tradicionais empregando solventes orgânicos como a hidrodestilação (HD, do inglês *hydrodistillation*) e a extração-destilação simultânea (SDE, do inglês *simultaneous steam distillation-extraction*) são comumente usados no isolamento dos compostos voláteis da matriz. [3, 25]

Muitas outras técnicas de extração [62], têm sido empregadas para análise de compostos voláteis de méis, extração direta com solvente [105], extração em fase sólida [118, 119] *headspace* dinâmico [59, 62, 103], purga e trapeamento (P&T, do inglês *purge and trap*), extração assistida por ultrassom (USE, do inglês *ultrasound-assisted extraction*) [3, 63] ou até mesmo a combinação de duas técnicas como SE (do inglês, *solvent extraction*)-SDE, [25] e USE-SPME [120, 121].

Entretanto, todas as técnicas mencionadas apresentam algumas limitações na aplicação para o isolamento dos componentes voláteis do mel, principalmente em função do aquecimento da amostra e do uso de grande volume de solventes orgânicos. [25]

A extração de voláteis de mel por HD e SDE leva a formação de artefatos, principalmente devido ao aquecimento dos açúcares. Além disso, alguns compostos são facilmente oxidados ou decompostos a novos componentes que não fazem parte do aroma. [3, 25]

No fracionamento dos voláteis por P&T, a necessidade de um equipamento específico e a dependência da recuperação obtida com a volatilidade e/ou a polaridade dos compostos são as principais limitações. [25]

Ribeiro *et al.* [120] avaliaram o perfil da fração volátil de mel assa-peixe (*Veronia sp.*) por GC-FID e GC-MS. O tempo total de análise foi de 6 h, 3 h para sorção dos analitos em Porapak Q e mais três horas para condicionamento do material. Além do tempo elevado para uma análise de rotina, apenas 12 compostos voláteis foram identificados.

Atualmente, métodos alternativos aos clássicos, mais seletivos e fáceis, tem sido utilizados como SPME e a extração sortiva em barra de agitação (SBSE, do inglês *stir bar sorptive extraction*). [67] Desde 1992 a SPME tem sido aplicada em análise de alimentos, dentre outras (fragrâncias, farmacêuticas, forense, etc.). Nos últimos anos, atenção tem sido dada a aplicação da técnica na análise de compostos voláteis de mel por SPME [68] a qual tem sido empregada com sucesso para tal propósito. [117]

Alissandakis *et al.* comparou algumas técnicas de extração como SPME, HD, SDE e USE no isolamento dos voláteis de mel unifloral de cítrico da região de Argos na Grécia. [3] O aquecimento da amostra por 4 h em HD levou a formação de muitos artefatos devido degradação ou oxidação, sendo o furfural o artefato mais abundante. O cromatograma GC-MS obtido por SDE apresentou menor quantidade de picos sendo que hotrienol foi o composto predominante. O perfil cromatográfico mais representativo foi obtido com USE, o qual não empregava aquecimento. O perfil obtido por SPME foi muito diferente e dependente da fibra empregada. Hotrienol foi descrito como presente naturalmente em mel de cítrico porque foi isolado por USE, isto é não foi gerado por aquecimento.

Alguns compostos característicos do mel de cítrico foram isolados pelos quatro métodos empregados como hotrienol, aldeídos lilálicos, furano óxidos de linalol e metil antranilato, sendo este último um bem-conhecido marcador para este tipo de mel. Os isômeros α -4-dimetil-3-ciclohexeno-1-alcetaldeídos (I, II, III e IV) foram isolados empregando-se HD e SDE. USE e SPME detectaram somente dois deles (Isômeros III e IV). Benzaldeído, fenilacetaldéido e 2-feniletanol também foram isolados por estes métodos, entretanto estes compostos tem sido encontrados no aroma de vários tipos de méis. Dióis característicos deste tipo de mel (2,6-dimetil-3,7-octadieno-2,6-diol, 2,6-dimetil-1,7-octadieno-3,6-diol, 3,7-dimetil-1,6-octadieno-3,5-diol, (E) -2,6-dimetil-6-hidroxi-2,7-octadienal, (Z) -2,6-dimetil-2,7-octadieno-1,6-diol, E) -2,6-dimetil-2,7-octadieno-1,6-diol) foram isolados somente por USE, com exceção do (E) -2,6-dimetil-2,7-octadieno-1,6-diol.

Provavelmente as condições drásticas empregadas em HD e MSDE levaram a oxidação e degradação destes compostos e a fibra empregada em SPME (PDMS/DVB/Carboxen) não apresentou melhor desempenho para adsorção destes compostos. O emprego de calor levou a geração de artefatos devido a oxidação dos compostos do aroma através de reações de *Maillard*.

Em contrapartida, foi observado que o aquecimento pode favorecer o isolamento de outros compostos que não foram isolados apenas por USE. Compostos como 6-metil-5-hepten-2-ona, linalol, óxido de nerol, cis-óxido de rosa somente foram isolados por SPME e a técnica foi a única que não possibilitou a detecção de indol. Os resultados sugeriram que há uma variedade nos compostos de aroma isolados, dependendo do procedimento empregado.

O trabalho, assim como outros descritos na literatura [20, 58, 68, 70, 113, 114, 122-127] mostram que SPME é uma técnica promissora porque seletivamente isola e concentra compostos que podem ser utilizados como marcadores. A seletividade no isolamento de voláteis por SPME está associada ao tipo de recobrimento da fibra empregado. [3]

Diferentes tipos de recobrimentos têm sido avaliados, com a finalidade de identificar qual fibra comercial é mais adequada para extrair os voláteis do mel. Verzera *et al.* [113] encontraram melhores resultados com a fibra PDMS/DVB do que com a fibra PA quando analisaram mel derivado de eucalipto, laranja, flores silvestres e castanha. Entretanto Perez *et al.* [114] descobriram um maior número voláteis do mel com a fibra CAR/PDMS do que com a fibra PDMS/DVB. Piasenzotto *et al.* [70], em contrapartida, verificaram que a fibra de PA apresentava melhor desempenho que a fibra de CAR/PDMS. [68]

Soria *et al.* [127] comparou o uso de quatro fibras com diferentes características: PA, PDMS, CW/DVB, CAR/PDMS. Destas, melhor precisão foi obtida com PA, enquanto CAR/PDMS forneceu a melhor sensibilidade. Outras fibras, como CAR/DVB e camadas de composições misturadas também tem sido usadas na extração dos voláteis de mel. [58, 125, 128-130]

Um trabalho mais recente avaliou o uso simultâneo de duas fibras de SPME (PA e CAR/PDMS) na extração de 40 amostras de méis de diferentes origens. Este teve o objetivo de explorar o potencial da técnica na caracterização completa de méis comerciais de composição volátil complexa e misturas de méis. O uso de duas fibras ao invés de uma única mostrou ser vantajoso por fornecer perfis cromatográficos complementares para uma caracterização abrangente do aroma de mel. Um total de 166 voláteis foram

caracterizados (146 identificados). Os dados obtidos com a fibra CAR/PDMS mostraram que esta foi mais apropriada para isolamento de compostos de baixa massa molecular, enquanto PA foi melhor para a extração de compostos polares semivoláteis. [25] .

Pontes *et al.*[67] realizaram um *screening* preliminar com cinco fibras comerciais de diferentes recobrimentos do HS de mel (quatro variedades monoflorais produzidos em Madeira-Portugal). Das fibras avaliadas, a fibra DVB/CAR/PDMS foi aquela que resultou em melhor sinal no GC-QMS. Foram avaliadas dezesseis amostras de méis multiflorais de diferentes regiões da Ilha de Madeira (Portugal). A Figura 8 compara os perfis cromatográficos de quatro amostras de um mel da mesma região, obtidos com a fibra DVB/CAR/PDMS.

Foram identificados mais de cem compostos, incluindo monoterpenos, C₁₃-norisofrenóides, sesquiterpenos, álcoois pesados, ésteres etílicos e ácidos graxos. Os principais componentes foram etanol, hotrienol, benzenoacetaldeído, furfural, óxido de trans-linalool e 1,3-dihidroxi-propan-2-ona. [67]

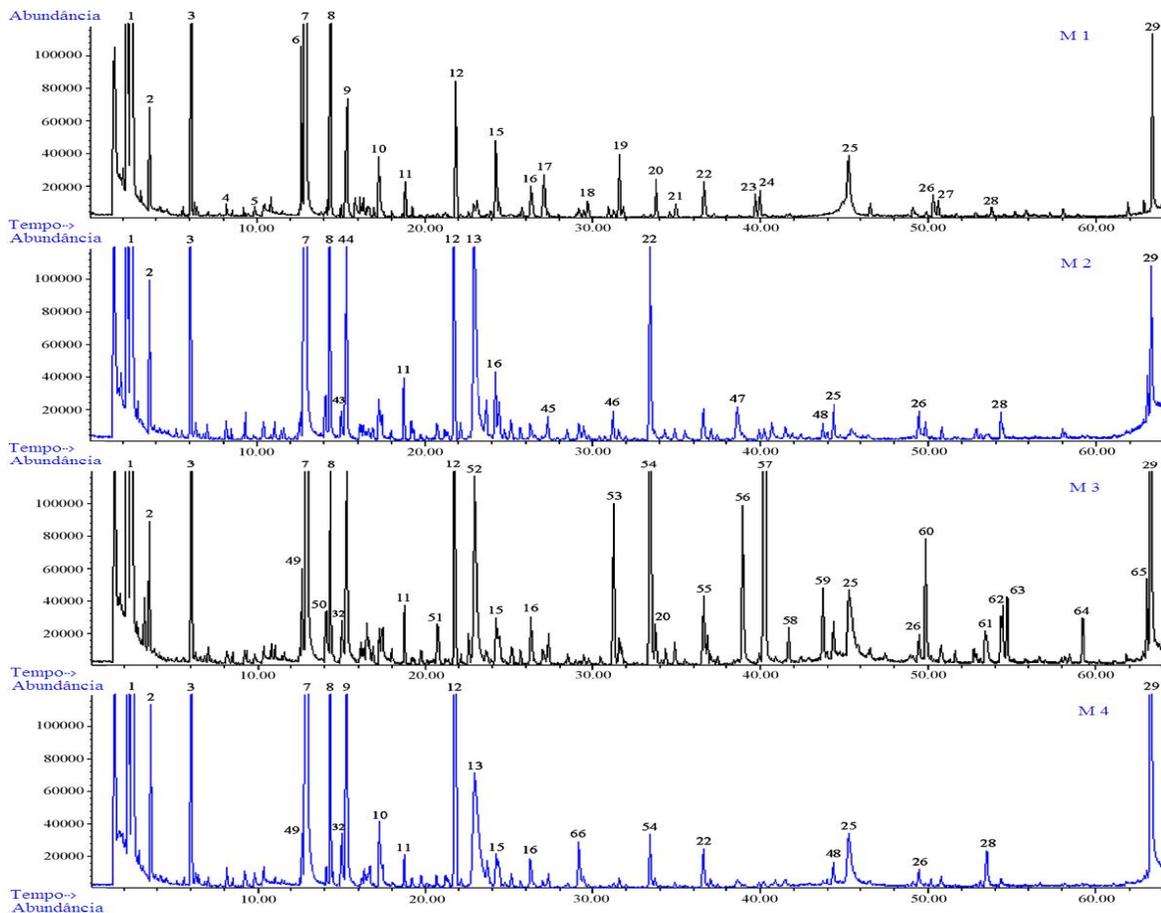


Figura 8. Comparação de perfis GC-QMS obtidos por HS-SPME DVB/CAR/PDMS de quatro extratos de um mel de mesma procedência, M1-M4, obtidos a 60°C durante 40 min. Identificação dos picos: (1) etanol; (2) tolueno; (3) 4-metil-pentan-2-ol (padrão interno); (4) butano-1,3-diol; (5) 1-hidroxi-2-propan-2-ona; (6) nonanal; (7) octan-3-ol (padrão interno); (8) trans- óxido de linalol; (9) furfural; (10) benzaldeído; (11) linalol; (12) hotrienol; (13) benzoacetaldeído; (14) acetofenona; (15) nonan-1-ol; (16) eicosano; (17) naptaleno; (18) 3-etil-pent-2-eno; (19) 2-metil-2-fenil propanoato de etila; (20) E-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona; (21) α -2-propenil-benzenometanol; (22) heptadecano; (23) 2-etil-ácido hexanóico; (24) 1-etil-2-heptil-ciclopropano; (25) 1,3-dihidroxi-propan-2-ona; (26) ácido nonanóico; (27) N-(4-hidroxifenil)acetamida; (28) 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona; (29) 5-hidroximetilfurfural; (31) α -ionol (32) ácido acético; (33)–(42) (compostos de 33 a 42 não foram detectados com esta fibra); (43) 1-metil-4-(1-metiletil)-benzeno; (44) cis – óxido de linalol; (45) 2-undecanol; (46) 2-metil-ciclopentanona; (47) 2,3,4,5-tetrametil- hexa-1,4-dieno; (48) ácido octanóico; (49) 2-nonen-1-ol; (50) octanoato de etila; (51) decanoato de metila; (52) decanoato de etila; (53) dodecanoato de metila; (54) dodecanoato de etila; (55) fenol; (56) 2-etil ácido hexanóico; (57) o-metoxiacetofenona; (58) tetradecanoato de metila; (59) tetradecanoato de etila; (60) ciclododecano; (61) hexadecanoato de etila; (62) hexadecanoato de etila E11; (63) 5,7,8-trimetil coumarin; (64) 3,5-dimetoxi-benzoato de metila; (65) ácido dodecanóico; (66) 2-hidroxi benzoato de metila. Adaptada de Pontes *et. al.*[67]

Diversos trabalhos têm sido realizados com o propósito de otimizar as condições de extração para análise de voláteis de mel por SPME. Alguns destes focaram no tamanho do frasco, adição de sal, agitação, temperatura, tempo de equilíbrio e de extração, tempo de dessorção no GC. Verzera *et al* [113]., diferentemente de Soria *et al* [127], encontraram que a adição de sal aumenta a extração de voláteis, desde que compostos hidrofílicos são menos solúveis na fase aquosa. Condições ótimas de extração incluem tempo e temperatura de equilíbrio entre 15 e 30 min e 60 – 70 ° C, tempo e temperatura de extração entre 20 e 30 min e 60 – 70 ° C. Entretanto, artefatos como produtos da reação de *Maillard* podem ser gerados por estes parâmetros de tempo e temperatura. Alguns tamanhos de frasco tem sido utilizados, embora Verzera *et al* [113]. tenha elaborado um critério para seleção (as amostras variam de 1g de mel não diluído em frascos de 4 mL a 16 g de mel diluído em frascos de 40 mL). O propósito de variar o tamanho do frasco é obter a maior quantidade de compostos extraídos pela exposição da fibra ao *headspace*. A diluição do mel em água foi usada para diminuir a densidade da matriz e facilitar a evaporação dos analitos de interesse retidos pelo açúcar. A agitação magnética aumenta a extração dos voláteis, entretanto a otimização deste parâmetro não foi estabelecida. [68,114]

O tempo de dessorção, usando modo *splitless*², tem sido variado de 2 a 5 min. Soria *et al*. encontrou melhores resultados empregando 2 min de tempo de dessorção no injetor do cromatógrafo. A temperatura de dessorção é aquela sugerida no manual do fornecedor da fibra (Supelco, 1998). [131] Comparado-se a imersão direta (DI, *direct immersion*) e a extração através do

² Modo de injeção utilizado em colunas capilares, muito similar ao modo de injeção direta, onde todo ou quase todo o vapor da amostra é introduzido na coluna [133]

headspace para extração de monoterpenos em mel floral melhores resultados foram obtidos com DI-SPME. [68, 128]

A SPME em combinação com GC-MS tem sido útil na identificação de um grande número de compostos em diferentes tipos de méis. Bertelli *et al.* desenvolveram e validaram uma metodologia que emprega HS-SPME-GC para determinação de antranilato de metila em mel *Cítrico spp*, mostrando que a técnica pode ser aplicada com sucesso na análise deste composto em méis para certificação da origem floral. [117]

Um trabalho recente [132] comparou HS-SPME-GC-MS e USE-GC-MS na busca por marcadores químicos de origem de méis provenientes de espécies uniflorais *Paliurus spina-christi* provenientes da Croácia. Somente HS-SPME viabilizou a detecção de compostos que podem ser marcadores, como aldeído lilálico, decanal, nonanoato de metila, ácido hexanóico e 2-etil-ácido hexanóico. Os compostos isolados por USE (hidrocarbonetos alifáticos saturados, álcoois e ácidos alifáticos saturados) tiveram sua origem atribuída a cera. As Figuras 9 e 10 ilustram os perfis cromatográficos obtidos por cada uma das técnicas mencionadas.

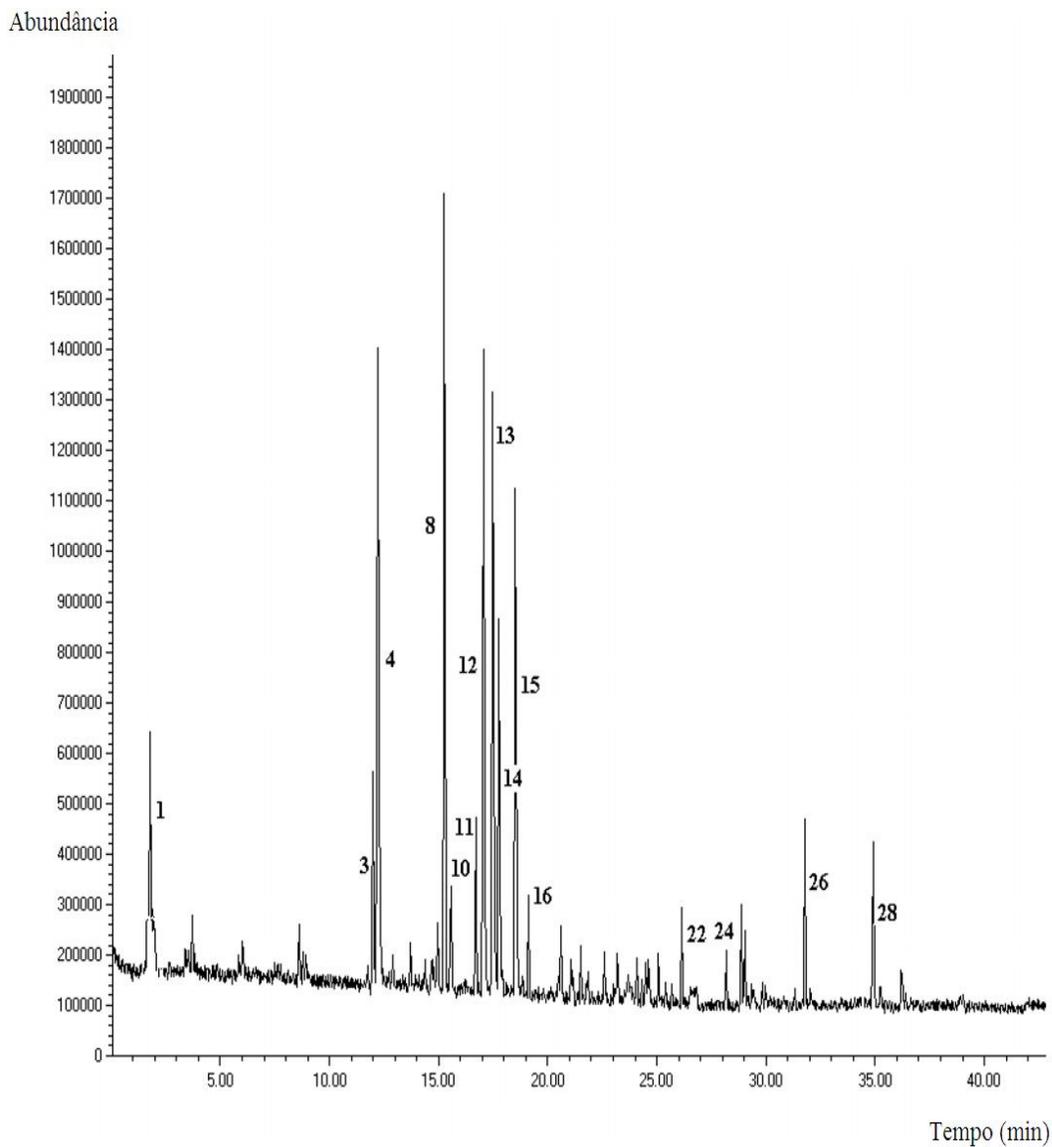


Figura 9. Cromatograma representativo dos voláteis de mel da espécie *Paliurus*, obtidos por HS-SPME (fibra PDMS/DVB). (1) dodecano; (3) nonanal; (4) óxido de cis-linalol; (8) ácido propanóico; (10) 2-metilácido propanóico; (11) butano-2,3-diol; (12) hexadecano; (13) hotrienol; (14) ácido butanóico; (15) 3-metilácido butanóico; (16) ácido pentanóico; (22) álcool benzílico; (24) 2-feniletanol; (26) 2-hidroxi-3-metil-4H-piran-4-ona (maltol).

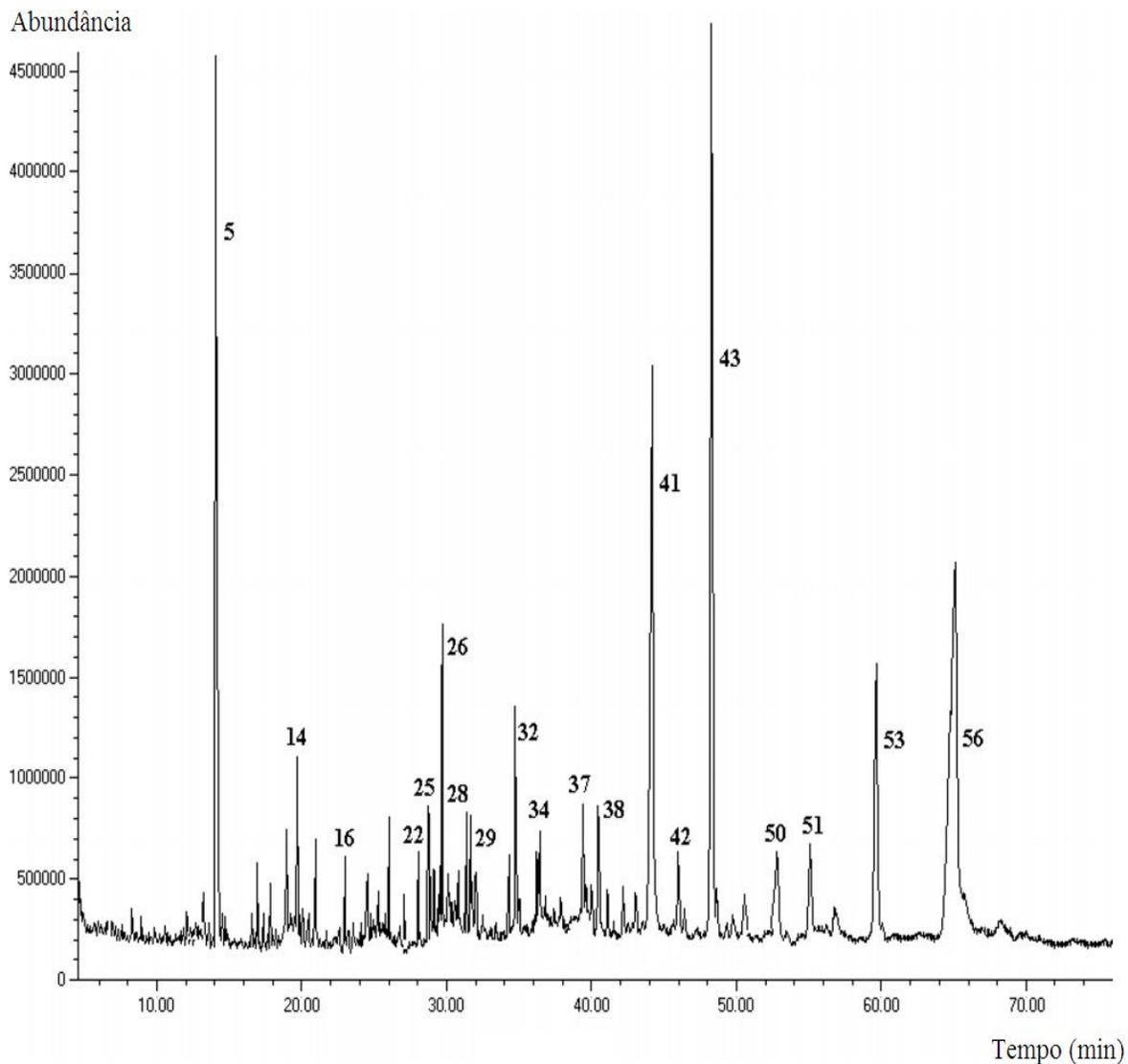


Figura 10. Cromatograma representativo dos compostos do mel da espécie *Paliurus* extraídos com éter por USE. (5) ácido acético; (14) ácido butanóico; (16) ácido pentanóico; (22) álcool benzílico; (25) 3,7-dimetil-octa-1,5-dien-3,7-diol; (26) 2-hidroxi-3-metil-4H-piran-4-ona (maltol); (28) metil-2-furancarboxilato (29) ácido octanóico; (32) ácido nonanóico; (34) 4-vinil-2-metoxifenol; (37) 2,3-dihidroxi-3,5-dimetil-4-H-piran-4-ona; (38) 3,5-dihidroxi-2-metil-4H-piran-4-ona; (41) hexadecan-1-ol; (42) dihidroxibenzenofuran; (43) ácido benzóico; (50) 3-metil-1H-indol; (51) 5-hidroxi-2-metilfurfural; (53) ácido fenilacético; (56) (Z)-9-octadecen-1-ol.

Mel de tomilho é o mel mais apreciado não só na Grécia como em todo o mundo. Allissandrakis *et al.* investigaram a composição deste tipo de mel e avaliaram 28 amostras por SPME-GC-MS. Estas amostras apresentaram frequências relativas de pólen de tomilho entre 18 e 41% na tipagem polínica. Um total de 62 compostos foram isolados, sendo fenilacetaldéido o mais abundante. Possíveis marcadores botânicos como 1-fenil-butano-2,3-diona, 3-hidroxi-4-fenil-butan-2-ona, 3-hidroxi-1-fenil-butan-2-ona, fenilacetnitrila e carvacrol foram encontrados somente em mel de tomilho. [134]

Odeh *et al.* [20] demonstraram que HS-SPME-GC-MS pode ser empregado na caracterização de méis uniflorais da Palestina. A espécie *Thymus capitatus* apresentou seis compostos marcadores: 1,3-difenil-propan-2-ona, 3-metilbutilbenzeno, 3,4,5-trimetoxi benzaldeído, 3,4-dimetoxi benzaldeído, vanilina e timol. A espécie *Thymelaea hirsuta* é caracterizada pela presença de um grupo de álcoois e fenóis como benzeno propanol, álcool benzílico, nonanol, hexanol e 4-metoxifenol. *Talpis virgata*, entretanto, apresenta dois compostos marcadores 3,5-dihidroxitolueno e tridecano. [20]

Allissandrakis *et al.* [135] investigaram amostras de mel de cítrico originárias da Grécia por SPME-GC-MS. Não foram encontradas diferenças significativas entre amostras de origem grega e italianas e, portanto, a discriminação geográfica não pode ser estabelecida.

Outros méis uniflorais têm sido analisados por SPME-GC-MS como mel de lavanda, flores sicilianas, acácia, tomilho, alecrim, etc. No entanto, outros estudos ainda são necessários para chegar a um consenso sobre resultados relativos aos compostos voláteis marcadores desses méis. [68]

Como relatado, alguns compostos específicos de aroma têm sido propostos como marcadores para caracterizar alguns tipos de méis.

Confiabilidade, reprodutibilidade, sensibilidade tem sido alcançados para a extração e identificação dos voláteis de mel por SPME-GC-MS, sem a complexidade dos métodos tradicionais. [68]

No entanto, em muitos casos, a falta de amostras de referência e a probabilidade de méis de origens diferentes serem misturados dificulta a aplicação de métodos estatísticos para a classificação do mel. [68]

Tipicamente, a análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal component analysis*) tem sido aplicada para a inspeção preliminar dos dados, seguido de vários métodos de classificação como análise linear discriminante (LDA, do inglês *linear discriminant analysis*), (DPLS, do inglês *discriminant partial least squares regression*, (SIMCA, do inglês *soft independent modelling of class analogy*) ou rede neural artificial (ANN, do inglês *artificial neural networks*) [23] e máquinas de vetores de suporte (SVMs, do inglês *Support vector machines*). [90]

Um trabalho de classificação de méis da Espanha por SPME-GC-MS destaca a importância dos métodos estatísticos. Amostras classificadas por análise discriminante foram selecionadas como “amostras referências” e usadas nas análises de regressão múltipla para identificar os compostos mais representativos de cada mel. Ao utilizar este método foi possível a classificação em dois tipos de méis: mel de eucalipto e mel de cítrico. No entanto outros méis foram difíceis de classificar provavelmente porque foram misturados. [68]

Stanimirova e *et al.* [90] e Aliferis *et al.* [103] empregaram métodos estatísticos como técnicas de reconhecimento de padrões na verificação do perfil de compostos voláteis para classificação de méis em função da origem geográfica.

No primeiro, dados analíticos foram coletados e supervisionados por técnicas de reconhecimento de padrões para construção de regras de classificação/discriminação de previsão da origem geográfica das amostras de méis com base no perfil de compostos voláteis. Ferramentas quimiométricas como LDA, SIMCA, DPLS, SVM foram empregadas para discriminação de amostras da Córzia em relação a amostras de outra origem. Os resultados da combinação de SPME e cromatografia gasosa mostraram que LDA, DPLS e SVM possibilitam a identificação da origem geográfica de méis.

O segundo trabalho mostra que a combinação de SPME e cromatografia gasosa com os recursos quimiométricos OPLS-DA, SIMC e OPLS-HA possibilita a classificação botânica e estudo de diferenças na composição dos méis de diferentes plantas da região da Grécia.

2.2.2 Aplicação da cromatografia gasosa bidimensional no estudo do mel

Nos últimos anos, tem sido intensa a aplicação da GC×GC para separação dos componentes de matrizes que são de alta complexidade. Produtos alimentícios como café, vinho, cerveja, aroma de frutas e **mel** têm sido alvo de trabalhos com GC×GC, para a determinação do *fingerprint*, classificação ou identificação de origem geográfica. [75, 89, 90, 136-138]

Os resultados mais comuns até as últimas décadas têm sido identificar marcadores químicos específicos, que são indicativos da qualidade dos alimentos. Antes da GC×GC, ¹D-GC era limitada àqueles marcadores bem resolvidos cromatograficamente resultando na identificação baseada em pesquisa da biblioteca espectral de massas ou na aplicação de técnicas quimiométricas para fins de deconvolução.

Com os resultados recentes da técnica, dados obtidos por GC×GC têm sido extensivamente explorados, pois podem proporcionar domínios espaciais para os grupos de substâncias quimicamente relacionadas, e os padrões de separação específicos são utilizados para a identificação dos componentes. A partir do *fingerprint* bidimensional específico, cada amostra é definida com muito mais informação, comparadas com as oferecidas por um perfil ¹D, portanto, a comparação da amostra pode ser realizada através de inspeção visual dos cromatogramas GC×GC.

A detectabilidade e o poder de separação foram aprimorados em GC×GC, portanto, compostos nunca relatados na literatura têm sido descobertos e protocolos de classificação, possivelmente, ainda devem ser atualizados.

Devido aos dados multivariados, as ferramentas como solução aproximada de matriz de análise de componentes principais (MPCA, do inglês *multi-way principal component analysis*), análise linear discriminante (LDA, do inglês *linear discriminant analysis*), mínimos quadrados parciais (DPLS, do inglês *discriminant partial least squares*), e técnicas de processamento de imagens, tornam os procedimentos de classificação cada vez mais confiáveis e menos subjetivos. [89, 90]

GC×GC-FID combinado com processamento multivariado de dados pode ser uma poderosa ferramenta para resolver problemas analíticos similares onde misturas complexas, como por exemplo a identificação e quantificação dos componentes individuais da gasolina e seus adulterantes. [139]

Ribeiro *et al.* [98] verificaram que o perfil cromatográfico de voláteis e semi-voláteis do café Arábico brasileiro torrado poderia ser usado para prever as propriedades sensoriais atribuídas à qualidade do café torrado.

Essas características revelam novas oportunidades na aplicação à química de alimentos, especialmente nas questões de detecção e quantificação de adulteração, gerando protocolos de certificação (rótulos de qualidade, denominação de origem geográfica, determinação de propriedades sensoriais, etc.)

Existem poucos trabalhos que aplicam GC×GC ao estudo do mel. Cajka *et al.* [73] mostraram que na separação dos voláteis do mel por GC×GC isolados por HS-SPME, o tempo de análise é reduzido. A separação completa dos componentes ocorreu em 19 min de corrida, um tempo aproximadamente 1,6 a 4,6 vezes menor que em outros trabalhos publicados empregando GC convencional. [3, 59, 65, 125, 127, 140]

O mesmo trabalho mostra que o número de componentes identificados por GC×GC (164) é maior que o relatado em alguns trabalhos publicados empregando GC convencional (35 a 110 compostos). [59, 65, 70, 114, 125, 127, 140]

Stanimirova *et al.* [90] descreveram um procedimento de classificação por HS-SPME e GC×GC-TOFMS associado a técnicas como LDA (*linear discriminant analysis*), DPLS (*discriminant partial least squares*) e SVM (*support vector machines*) para diferenciar amostras de mel da Córseica baseado no perfil de compostos voláteis.

Cajka *et al.* [23] empregaram HS-SPME–GC×GC acoplado ao TOFMS como uma ferramenta eficaz, em combinação com rede neural artificial (ANN, do inglês *artificial neural networks*), na interpretação dos dados para diferenciar os méis da Córseica de outros países da Europa.

2. 3 Mel brasileiro

O estudo do perfil de compostos voláteis de méis do Brasil é recente e, portanto, os resultados ainda são escassos. [141] Dos trabalhos publicados, geralmente os procedimentos usados para isolamento dos voláteis do mel envolvem extração dinâmica, técnicas de extração em coluna e extração com solventes. [12]

O primeiro trabalho foi realizado com méis de eucalipto e de laranja do Estado de São Paulo [141]. Bastos e Franco [24] analisaram os compostos voláteis de mel de eucalipto e laranja colhidos no estado de São Paulo e de Minas Gerais por *headspace* dinâmico e GC-MS. O perfil de compostos voláteis presentes em méis de eucalipto e laranja diferiram entre si, indicando que existe um perfil característico em função da origem botânica do mel.

Entre os compostos identificados, o nonanal e o nonanol apresentaram contribuição sensorial importante no mel de eucalipto, enquanto fenilacetaldéido e o benzaldeído foram relacionados com os principais descritores do mel de laranja.

O nonanol foi descrito por Guidotti e Vitali [109] como um possível marcador para caracterização de méis de eucalipto, porém o mesmo não foi observado por Bouseta e colaboradores. [110, 111] Overton e Manura [143] também identificaram o fenilacetaldéido e o benzaldeído em méis de laranja, porém Bouseta *et al.* [110] não detectaram nenhum desses 2 compostos. O benzaldeído também foi apontado como um composto importante para o aroma de mel de avelã [119], enquanto o fenilacetaldéido foi considerado de relevância para os méis de avelã [119] e tília [144]

Moreira *et al.* [142] estudaram os compostos do aroma de méis monoflorais de *Anacardium occidentale* (caju) e *Croton* sp. (marmeleiro), ambos oriundos do Nordeste brasileiro. Esses méis monoflorais são tipicamente brasileiros, já que essas plantas são nativas do Brasil. A espécie *Croton* sp., popularmente conhecido como marmeleiro no Nordeste, não deve ser confundida com a espécie *Cydonia vulgaris*, que também é conhecida como marmeleiro, a qual é encontrada na região do cerrado mineiro. Somente a última espécie, oriunda da Ásia e bem aclimatada no Brasil, produz frutos que são conhecidos como marmelos. Esses autores isolaram a fração volátil dos méis de caju e marmeleiro através de SPE do extrato aquoso com o adsorvente comercial Porapak Q[®]. Os compostos foram dessorvidos com acetona. Durante todo o processo de isolamento e enriquecimento da fração volátil a temperatura se manteve entre 20 a 25 °C, minimizando a formação de artefatos. O mel de caju apresentou cerca de 82% mais compostos voláteis que o mel de marmeleiro. Cerca de 50% dos compostos voláteis identificados por GC-MS foram confirmados com padrões [142]. As principais classes de compostos identificadas no mel de caju foram hidrocarbonetos (19), alcoóis (13), ácidos (6) e compostos aromáticos (6). Já no mel de marmeleiro foram identificados alcoóis (12), ácidos (5), ésteres (3) e compostos aromáticos (3). O mel de caju apresentou um alto teor de hidrocarbonetos, enquanto somente o pentacosano foi identificado no mel de marmeleiro. Em contrapartida, seis derivados do linalol (como os isômeros *cis*- e *trans*-furanóides do óxido de linalol) foram identificados no mel de marmeleiro, enquanto que no mel de caju foi identificado somente um deles (*trans*-furanóide do óxido de linalol). O butirato de butila, guaiacol, furfuril mercaptano (caju), linalol (marmeleiro), mentol, ácido isovalérico, deltaoctalactona, gama-decalactona e o eugenol

(caju e marmeleiro) foram identificados por tentativa através da comparação da análise olfatométrica (na diluição do extrato, aplicação no GC e percepção do aroma) das amostras com aquela de padrões. Nenhum desses compostos foi identificado por GC-MS. Foi possível identificar 4 compostos de relevância no mel de marmeleiro: o ácido isovalérico, o ácido benzóico, a gamadecalactona e a vanilina, todos com um fator de diluição de 16. A vanilina e o ácido benzóico também foram identificados por GC-MS. Já no mel de caju foram considerados de relevância os seguintes compostos: furfurilmercaptano, álcool benzílico, delta-octalactona, a gamadecalactona, eugenol e o ácido benzóico, todos com um fator de diluição de 16, ácido isovalérico, com um fator de 32, álcool feniletílico, com um fator de 128 e guaiacol, com um fator de 1024. O álcool feniletílico, álcool benzílico e ácido benzóico também foram identificados por GC-MS. Foram detectados alguns outros odores agradáveis em ambos os méis, porém todos com um baixo fator de diluição (FD) (ex. ácido benzenoacético, FD = 0; butirato de butila FD = 8, todos no mel de caju; linalol, FD = 0, presente no mel de marmeleiro). [142]

Silva [13] trabalhou com a tipificação de méis brasileiros por HS-SPME e GC-MS. Foram avaliados vários tipos de mel, de eucalipto, laranjeira, angico-de bezerro, aroeira, assa-peixe, cambará, marmeleiro, morrão de candeia, laranjeira, camborã ou cupânia, canudo-de-Pito, capixingui, cipó-cabeludo, cip-uva, espinheiro, jitirana, palmeira, tataré. A Tabela 1 descreve os compostos florais sugeridos como potenciais marcadores por não serem encontrados em méis de outras procedências avaliados por Silva. Para os demais méis avaliados o estudo não teve caráter conclusivo, uma vez que apenas uma amostra de cada tipo de mel foi avaliada. Entretanto, foram os primeiros estudos sobre a composição destes méis exóticos

brasileiros. Silva [13] também verificou perfis cromatográficos diferenciados para os méis estudados.

Tabela 1. Compostos voláteis de impacto detectados em méis brasileiros por Silva. [13]

Origem floral	possível marcador
Assa-peixe (<i>Vernonia palianthes less</i>)	isoforona
Cambará (<i>Lantana montevidensis</i>)	benzoni-trila
Morrão –de-candeia (<i>Croton sp</i>)	orcinol (3,5-diidroxitolueno)
Eucalipto (<i>Eucayptus tereticornis, Eucaliptus robusta</i>)	L-pinocarveol, fenchol e pinocanfona
Laranjeira (<i>Cítrico airantum</i>)	isômeros do aldeído lilálico e antranilato de metila

O perfil de voláteis do mel de assa-peixe também já foi estudado por Ribeiro *et al.* [121] que utilizou cromatografia de adsorção em Porapak Q[®] e dessorção com acetona utilizando GC-MS. Foram encontrados um total de doze compostos voláteis, sendo alguns descritos pela primeira vez neste tipo de mel (3-penten-2-ona, dodecano, tridecano e benzaldeído). Como já relatado anteriormente, o preparo de amostra demandou 6 h.

Até o momento existe um único trabalho publicado por Stanimirova [90] aplicando GC×GC a amostra de mel brasileiro.

CAPÍTULO 3:

JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

3. Justificativas e objetivos

O interesse da certificação do mel brasileiro surge do conhecimento de que a flora apícola do país ainda é pouco estudada e, em consequência disso, o produto tem sido exportado atualmente pelos produtores brasileiros em grandes quantidades a preço baixo. A região nordeste, em específico, é reconhecida como uma das áreas de maior potencial para a apicultura do país. Entretanto, as pesquisas iniciadas na década de 60, concentram-se na região sudeste [26].

Baseado nestes fatos, o objetivo geral desse trabalho é o desenvolvimento de método para classificação de méis da região nordeste brasileira, utilizando HS-SPME e GC unidimensional e bidimensional, usando amostras de méis provenientes do nordeste brasileiro.

Para o desenvolvimento, os objetivos secundários foram: i) otimização HS-SPME para extração dos voláteis de mel; ii) avaliação da adequabilidade das técnicas cromatográficas empregadas e iii) análise exploratória.

CAPÍTULO 4:

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes: para determinação dos índices de retenção dos compostos foi empregada uma mistura de n-alcanos ($C_8 - C_{20}$) (Fluka, Sigma-Aldrich, Suíça). Para incrementar a força iônica do meio de extração foi utilizado cloreto de sódio (NaCl) P.A (Ecibra, Brasil).

4.1.2 Outros materiais: as extrações foram realizadas com a fibra de SPME (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) com recobrimento de 65 μm de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB). Para as extrações, as amostras foram acondicionadas em frascos de fundo cônico (Wheaton, Millville, NJ, EUA) de 4 mL selado com septo de silicone de politetrafluoretileno (PTFE, do inglês *polytetrafluoroethylene*) (Supelco, Bellefont, PA, EUA). Para aquecimento das amostras foi utilizado um banho com estabilizador térmico Polystat (Cole-Parmer, USA).

4.1.3 Amostras: para avaliar o preparo de amostra e otimizar a metodologia HS-SPME, preparou-se uma mistura com 20 méis bem diferentes em relação a florada e cidade de origem, com o objetivo de obter uma mistura complexa que simulasse a diversidade que existe em relação a composição do mel. A mistura foi preparada com 5% (m/m) de cada amostra de mel, seguida de homogenização e armazenamento em frasco fechado e local seco (à temperatura ambiente).

As amostras coletadas no Piauí-Brasil foram fornecidas pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) com relatório de ensaios físico-químicos, microbiológicos, local e florada de origem.

Para a análise exploratória inicial do mel por região geográfica, foram empregadas 13 amostras de mel de mesma florada - marmeleiro (*Croton sonderianus*) porém de diferentes regiões do Piauí, descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Amostras de mel de marmeleiro empregadas na análise exploratória

nº	coleta	local	município
15	28/03/08	Saco dos polidórios	Brasileira-PI
17	28/03/08	Saco dos polidórios	Brasileira-PI
18	28/03/08	Saco dos polidórios	Brasileira-PI
38	06/04/08	Comunidade (C.) Birindibinha	Cocal-PI
58	02/05/05	C. Tanque Velho	São Braz-PI
59	02/05/08	C. Baixão do Junco	Caracol-PI
60	03/05/08	C. São Vitor	São Raimundo Nonato-PI
61	03/05/08	C. São Vitor	São Raimundo Nonato-PI
62	03/05/08	C.Poldrinho	São Raimundo Nonato-PI
64	03/05/08	C. Queimada da Roça	São Lourenço-PI
65	03/05/08	C. Queimada da Roça	São Lourenço-PI
66	03/05/08	C. Queimada da Roça	São Lourenço-PI
79	16/05/08	-	Picos-PI
80	16/05/08	-	Picos-PI
87	21/05/08	-	Simplício-Mendes-PI

A numeração das amostras corresponde a mesma fornecida pela EMBRAPA

4. 1.4 Equipamentos:

4.1.4.1 GC-FID: HP 6850 (Agilent Technologies Wilmington, DE), equipado com FID . A coluna cromatográfica empregada foi HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, 5% fenilmetilsiloxano). Os dados foram adquiridos pelo software Chemstation® versão B 04.01. Hélio (1,0 mL min⁻¹) foi usado como gás de arraste. As condições cromatográficas empregadas em todas as análises são as mesmas utilizadas em [145] e serão mencionadas a seguir. O injetor operou no modo *splitless*.

A temperatura do injetor e detector foram as mesmas: 250 °C. A programação do forno foi 60 °C com aquecimento de 3 °C min⁻¹ até 250 °C.

4.1.4.2 GCxGC-FID: HP-6890 Série GC-FID (Hewlett-Packard, Wilmington, DE), equipado com injetor *split-splitless* (operando no modo *splitless*). Hidrogênio (0,6 mL min⁻¹) foi usado como gás de arraste. Como detector foi usado FID e jogo de colunas HP-5 e SPWax (30m x 0,25mm x 0,25 μ m + 1 m x 0,1 mm x 0,1 μ m), ¹D e ²D, respectivamente. Este protótipo usa um modulador criogênico de quatro jatos projetado por Márcio Pedroso. [77] O programa de controle de válvulas foi desenvolvido, na plataforma Labview, por Ernesto Ferreira. [146] Os dados foram adquiridos pelo software Chemstation, exportado como ASCII e processado por um software de integração para detectar e integrar os picos. Os cromatogramas foram construídos como gráficos de contorno coloridos usando o programa Matlab 6.5 (Mathworks, Natick, MA,USA). O período de modulação, intervalo fixo de tempo em que ocorrem as etapas de coleta do eluato da ¹D, concentração e reinjeção na ²D, foi de 6 s. A pressão de focagem e coleta foi de 12,5 psi. A

vazão do gás quente foi de 20 L min^{-1} , a uma temperatura de $350 \text{ }^\circ\text{C}$. A taxa de aquisição de dados foi de 100 Hz . As condições cromatográficas foram as mesmas do item 4.1.4.1. A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação entre os espectros de massa de cada eluato com os espectros da biblioteca mainlib do *National Institute of Standards and Technology* (NIST), utilizando os programas *Automated Spectral Deconvolution and Identification System* (AMDIS) v. 262 e *NIST Mass Spectral Search Program* v. 2.0 (NIST, Washington – DC, EUA). Além da similaridade entre os espectros de massas, os valores experimentais LTPRI dos compostos identificados nas análises por GC-MS obtidos para a primeira dimensão foram comparados com os valores tabelados [19]. Para obtenção dos LTPRI, $2 \text{ }\mu\text{L}$ da solução de alcanos lineares foram adicionados diretamente ao frasco de extração por SPME; o frasco foi mantido destampado por 5 min para evaporação de parte do solvente, antes da transferência da amostra para o frasco. Selecionou-se uma relação sinal/ruído de 5.

4.1.4.3 GC-QMS: HP-5890 série II (Hewlet-Packward, Wilmington, DE, USA), equipado com um detector seletivo de massas HP5970, coluna capilar HP-5MS de (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm) e injetor *split/splitless* operando no modo *splitless*. Hélio 5.0 foi utilizado como gás de arraste (0,6 mL min⁻¹). A programação do forno foi 60 °C a 3 °C min⁻¹ até 250 °C. O processamento dos dados obtidos no GC-QMS foi feito usando a deconvolução espectral e o software sistema de identificação AMDIS v. 262 combinado com o programa NIST v. 2.0 (NIST, Washington, DC, USA). A identificação dos compostos foi realizada de acordo com o item 4.1.4.2 sendo o volume da solução de alcanos lineares de 5 μL.

4.1.4.4 GC×GC-TOFMS: Agilent 6890, LECO Pegasus sistema 4 D, modulador de quatro jatos criogênicos (Zoex, Houston, TX), equipado com jogo de colunas SLB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) + SPWax (1,30 m x 0,1 mm x 0,1 μm), ¹D e ²D, respectivamente. Foi utilizado hidrogênio como gás de arraste (0,6 mL min⁻¹). A programação de temperatura da primeira coluna foi 0,20 min a 60 °C até 250 °C, com taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹. A segunda coluna foi programada para 0,20 min a 65 °C até 255 °C, com taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹. A temperatura da linha de transferência foi 260 °C. A temperatura do injetor e detector foi ajustada a 260 °C. O intervalo de análise foi de 30 – 400 m/z e aquisição de 200 Hz. A voltagem do detector foi de 1600 V e a temperatura de ionização foi de 220 °C. Os dados do GC×GC-TOFMS foram coletados pelo ChromaToF software v. 4.22 (LECO); para a detecção do pico e identificação espectral utilizou-se a biblioteca NIST, selecionando-se um sinal/ruído de 50.

4.1.4.5 GC×GC-QMS: Cromatógrafo a gás QP 2010 Plus – Shimadzu, adaptado com GC×GC-QMS com tecnologia desenvolvida no laboratório de cromatografia gasosa da Unicamp. O cromatógrafo é equipado com um detector de massas quadrupolar. Foi empregado um conjunto de colunas: HP-5MS (5% de fenil-dimetilpolisiloxano), coluna de sílica fundida (30 m×0.25mm, 0.25 mm film thickness) + Supelcowax (polietilenoglicol-PEG) (1m×0.1 mm, 0.1 mm film thickness). A programação do forno foi 60 °C a 3 °C min⁻¹ até 250 °C. O gás de arraste foi hidrogênio a vazão de 0.6 mL/min. O injetor operou a 250 °C. As amostras foram injetadas no modo *splitless*. Os parâmetros do MS foram: temperatura da linha de transferência: 240 °C; com taxa de escaneamento foi de 40 – 400 m/z e temperatura da fonte de ionização: 200 °C. A identificação dos compostos foi realizada de acordo com o item 4.1.4.2 sendo o volume da solução de alcanos lineares de 1 µL. Os dados foram adquiridos pelo programa *GCMS Real Time Analysis* (GCMS Solutions, Shimadzu corp.) e processados usando o software *GC Image*, versão 2.1 (GC Image, LLC, Lincoln, NE). Um software específico (GC Image 2.0) foi usado para avaliação dos dados. Similaridade espectral acima de 900 foi fixado como aceitável para identificação.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo da amostra.

Nesta etapa experimental empregou-se o equipamento descrito em 4.1.4.1.

As amostras de méis foram aquecidas a 60 °C por alguns segundos no forno de um cromatógrafo e agitada por cerca de 1 min para assegurar a homogeneidade. Utilizando-se a fibra PDMS/DVB, foram testados três tipos de preparo de amostra: o primeiro constituiu no preparo imediato: 1 g da amostra foi pesada no momento da extração em frasco de 5 mL (selado com septo de silicone) contendo 1 mL da solução concentrada 18% m/m de NaCl. O segundo tipo de preparo foi prévio: preparo de uma solução de 4 g da amostra e 6 mL de solução NaCl 18% m/m, seguida de agitação em placa de agitação e armazenamento a temperatura ambiente até o momento da análise de 2 mL desta solução. O terceiro tipo de preparo foi prévio sem adição de solução salina: preparou-se uma solução de 4 g de mel e 6 mL de água, seguida de agitação e armazenamento até o momento da análise, utilizou-se 2 mL desta solução. No momento da extração adicionou-se 0,18 g de NaCl. A extração dos analitos foi feita por HS-SPME e a dessorção no equipamento e condições descritos em 4.1.4.1.

Para as etapas seguintes, adotou-se o preparo de imediato da amostra por ser o que apresentou melhores resultados em relação à área extraída dos analitos avaliados.

4.2.2 HS-SPME.

O tempo de equilíbrio foi de 5 min e o tempo de extração (t) 40 min. A temperatura de extração (T) utilizada foi de 60 °C. A velocidade de agitação foi de 1200 rpm e tempo de dessorção de 5 min.

Posteriormente, os efeitos de força iônica, expresso como concentração de NaCl (C_{NaCl}), diluição do mel (D), T e t, foram otimizados com o auxílio de um planejamento experimental envolvendo uma matriz *Doehlert*.

A matriz ou planejamento *Doehlert* descreve um domínio experimental esférico e uniforme no espaço envolvido. Os pontos da matriz *Doehlert* correspondem aos vértices de um hexágono gerado de um simplex regular e, em geral, o número total de pontos experimentais o planejamento é igual a k^2+k+pc , em que k é o número de fatores e pc é o número de experimentos no ponto central. Replicatas no ponto central devem ser realizadas a fim de validar o modelo pela estimativa da variância experimental. Embora suas matrizes não sejam ortogonais nem rotacionais, elas não apresentam divergências significativas que comprometam a qualidade necessária para seu efetivo uso.

No planejamento *Doehlert* o número de níveis não é o mesmo para todas as variáveis. Por exemplo, em um planejamento *Doehlert* com duas variáveis, uma variável será estudada em 5 níveis enquanto a outra em 3. Esta propriedade permite a livre escolha de quais fatores serão avaliados em um número maior ou menor de níveis. Como regra geral é preferível escolher a(s) variável(is) com maior(es) efeito(s) para os níveis de maior magnitude, a fim de obter mais informação a cerca de suas variações no sistema.

Outra característica da matriz *Doehlert*, é que este tipo de planejamento necessita um número menor de experimentos em relação a outros planejamentos para construção de superfície de resposta, o que o torna mais eficiente. A eficiência de um planejamento experimental é definida como o número de coeficientes do modelo estimado dividido pelo número de experimentos. O menor número de experimentos solicitados pelo

planejamento *Doehlert* para se chegar à região ótima vem do fato de que o domínio da vizinhança é facilmente explorado pelo ajuste de poucos experimentos, já que o próximo hexágono utiliza pontos experimentais já explorados pelo hexágono anterior. [148]

A matriz *Doehlert* (Tabela 3) foi construída com 5, 7, 7 e 3 níveis, para os efeitos de força iônica, expresso como concentração de NaCl (C_{NaCl}), diluição do mel (D), temperatura (T) e tempo de extração (t). Estes níveis estavam compreendidos entre os seguintes valores mínimos e máximos: 0,00 e 0,36 g mL⁻¹ para C_{NaCl} ; 1 e 2 mL para D; 15 e 60 para t; 30 e 60° C para T. Para o ponto central da matriz foram feitas 10 repetições.

A somatória das áreas dos picos cromatográficos foi utilizada como resposta. As injeções foram realizadas em triplicata.

Tabela 3. Matriz *Doehlert* para as variáveis estudadas: Concentração de NaCl (C_{NaCl}) em g mL⁻¹, Temperatura de extração (T) em °C, tempo de extração (t) em min e diluição do mel (D) em mL. Baseado em [148]

Ensaio	C_{NaCl}	T	t	D
1	1,0 (0,36)	0,000 (45,0)	0,000 (37,5)	0,000 (1,5)
2	0,5 (0,27)	0,866 (60,0)	0,000 (37,5)	0,000 (1,5)
3	0,5 (0,27)	0,289 (50,0)	0,817 (60,0)	0,000 (1,5)
4	0,5 (0,27)	0,289 (50,0)	0,204 (43,1)	0,791 (2,0)
5	-1,0 (0,00)	0,000 (45,0)	0,000 (37,5)	0,000 (1,5)
6	-0,5 (0,27)	-0,866 (30,0)	0,000 (37,5)	0,000 (1,5)
7	-0,5 (0,27)	-0,289 (40,0)	-0,817 (15,0)	0,000 (1,5)
8	-0,5 (0,27)	-0,289 (40,0)	-0,204 (31,9)	-0,791 (1,0)
9	0,5 (0,27)	-0,866 (30,0)	0,000 (37,5)	0,000 (1,5)
10	0,5 (0,27)	-0,289 (40,0)	-0,817 (15,0)	0,000 (1,5)
11	0,5 (0,27)	-0,289 (40,0)	-0,204 (31,9)	-0,791 (1,0)
12	-0,5 (0,09)	0,866 (60,0)	0,000 (37,5)	0,000 (1,5)
13	0,0 (0,18)	0,577 (55,0)	-0,817 (15,0)	0,000 (1,5)
14	0,0 (0,18)	0,577 (55,0)	-0,204 (31,9)	-0,791 (1,0)
15	-0,5 (0,09)	0,289 (50,0)	0,817 (60,0)	0,000 (1,5)
16	0,0 (0,18)	-0,577 (35,0)	0,817 (60,0)	0,000 (1,5)
17	0,0 (0,18)	0,000 (45,0)	0,613 (54,4)	-0,791 (1,0)
18	-0,5 (0,09)	0,289 (50,0)	0,204 (43,1)	0,791 (2,0)
19	0,0 (0,18)	-0,577 (35,0)	0,204 (43,1)	0,791 (2,0)
20	0,0 (0,18)	0,000 (45,0)	-0,613 (20,6)	0,791 (2,0)
21*	0,0 (0,18)	0,000 (45,0)	0,000 (37,5)	0,000 (1,5)

*Ponto central com 10 repetições

4.2.3 Monitoramento da formação de artefatos.

Para avaliar a possível geração de artefatos por hidrólise e/ou termólise durante o processo de extração, foram realizados experimentos variando o tempo de equilíbrio amostra/HS (para o método otimizado). Os frascos de extração contendo a mesma quantidade da mistura de mel e solução aquosa de NaCl foram deixados por períodos variando de 0 a 4,0 h a temperaturas de 45 °C e 60 °C. Para a diferenciação entre os artefatos de extração e os compostos formados por tratamento térmico realizado pelos apicultores, uma alíquota de mel puro foi deixada a 45 °C por 48 h em frasco selado sem *headspace*.

4.2.4 Classificação das amostras.

Foram obtidos os perfis cromatográficos das amostras de mel de marmeleiro por HS-SPME-GC-MS nas condições otimizadas. A identificação dos compostos foi checada por comparação com ¹D-LTPRI com dados de literatura obtidos em condições similares [145]

CAPÍTULO 5:

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Manipulação da amostra

Para extrair os voláteis do mel por SPME através do *headspace*, a amostra deve ser inicialmente solubilizada em solução salina. A primeira etapa do trabalho foi verificar a possibilidade de preparar a solução (amostra + solução salina) e armazená-la até o momento da análise. Este procedimento facilita a etapa de manipulação da amostra em análise de rotina, uma vez que a metodologia poderá ser adotada no protocolo de certificação de méis brasileiros.

Sendo assim, foram comparadas três formas de manipulação da amostra: a primeira constituiu na pesagem do mel e inserção da solução salina no momento da análise (imediato). Posteriormente, analisou-se o preparo e armazenagem prévia da solução salina (prévio). Finalmente avaliou-se o preparo e armazenamento prévio da solução de amostra adicionando-se NaCl no momento da extração (prévio sem solução salina).

Para avaliar qual a melhor maneira de manipular a amostra, foram selecionados alguns analitos mais voláteis, com tempo de retenção entre 0 e 20 min (Figura 11), os quais poderiam melhor ilustrar possíveis perdas nesta etapa.

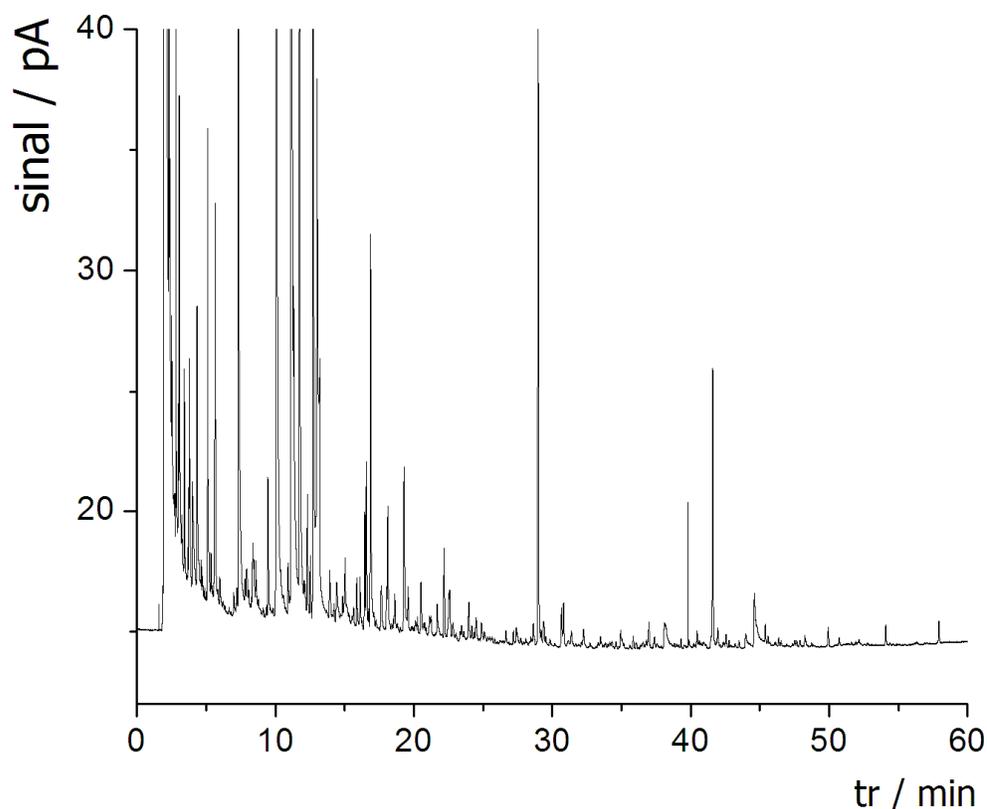


Figura 11. Cromatograma típico obtido por GC-FID para a mistura de méis. A temperatura do injetor e detector foi de 250 °C. Temperatura inicial da coluna = 60°C e Temperatura final = 250°C, com taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹. Vazão de gás de arraste = 1,0 mL min⁻¹. Fibra = PDMS/DVB 65 µm)

Foram comparados os resultados das médias dos valores de área e das estimativas de desvio padrão relativos calculados para as replicatas (triplicata). Os resultados estão ilustrados na Figura 12. Analisando-se os dados da figura, verifica-se que a manipulação da amostra no momento da análise resulta em uma maior eficiência de extração, sendo o modo de manipulação adotado para as etapas seguintes.

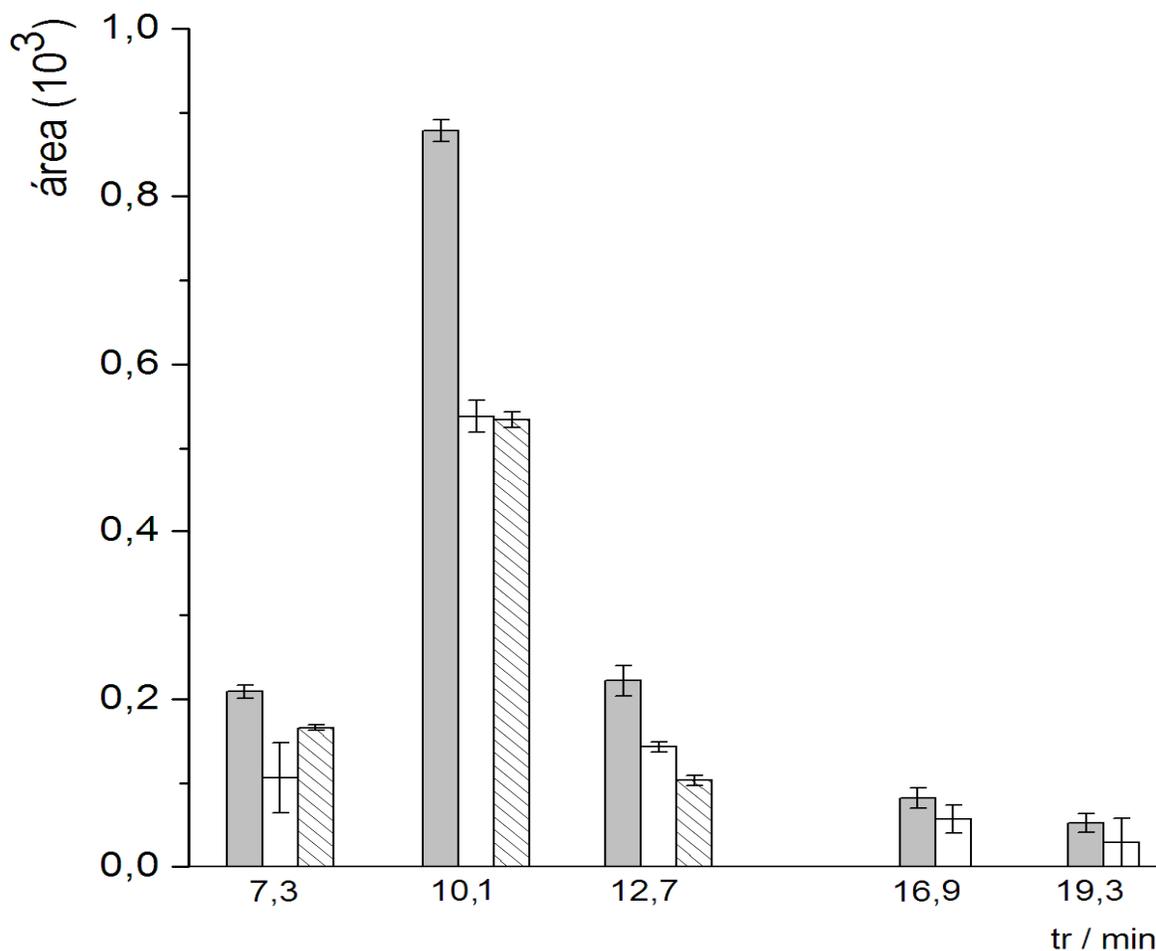


Figura 12. Valores de área e estimativa de desvio padrão (5 a 10 %) obtidos para procedimentos diferentes de manipulação da amostra. ■ imediato □ prévio e ▨ prévio sem solução salina. Analitos identificados: octanal (7,3 min), 5-formilfurfural (10,1 min), 4 oxoisoforona (12,7 min), 2-fenil acetato de etila (16,9 min), nonanoato de etila (19,3 min).

5.2 Otimização SPME

Para otimização dos parâmetros operacionais relacionados a SPME, utilizou-se um planejamento multivariado. O planejamento *Doehlert* foi empregado porque não só permite avaliar as variáveis consideradas mais

importantes, ou seja, que apresentam efeitos mais pronunciados em um número maior de pontos no espaço [146], como também emprega um menor número de experimentos quando comparado a outros planejamentos experimentais para a construção de superfícies de resposta. [146, 148]

Para avaliar os resultados, utilizou-se a somatória dos valores de área de pico cromatográfico, sendo posteriormente calculado os efeitos das variáveis e construídos os modelos de regressão usando um polinômio quadrático para o nível de significância de 0,05, utilizando planilhas eletrônicas elaboradas no software Excel 2003 [146].

Em função dos altos valores de desvio padrão observados para compostos com $t_r < 3,8$ min, foram comparados os resultados da regressão, obtidos com a somatória dos valores de área de todos os picos cromatográficos (modelo A) e com a somatória daqueles gerados a partir de $t_r = 3,8$ min (modelo B). Os resultados estão descritos nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Avaliação da regressão e da falta de ajuste, ao nível de significância de 0,05 para a somatória das áreas de todos os picos cromatográficos (modelo A).

	F calculado	Distribuição F
Regressão	2,48	0,0892
Falta de Ajuste	2,34	0,1881
Coefficiente de determinação (R^2)	0,792	
% da variação (v) explicada	79,3	
% máxima da v explicável	92,8	

Tabela 5. Avaliação da regressão e da falta de ajuste, ao nível de significância de 0,05 para a somatória das áreas a partir de 3,8 min os picos cromatográficos (modelo B).

	F calculado	Distribuição F
Regressão	12,93	0,0003
Falta de Ajuste	10,88	0,0111
Coefficiente de determinação (R^2)	0,952	
% da variação (v) explicada	95,2	
% máxima da v explicável	99,5	

Valores sublinhados indicam valores de F_{cal} significativos em relação aos valores distribuição de F Tabelado.

Observando-se os dados da análise de variância verifica-se que o modelo B apresenta uma regressão significativa. Embora o F calculado para falta de ajuste tenha sido significativo, os gráficos de diagnóstico do modelo, indicam um bom ajuste aos dados experimentais. Através da análise do gráfico de valor observado em relação ao valor estimado e do gráfico de resíduos (Figura 13), pode-se verificar que os resíduos são aleatórios, sem indício de heteroscedacidade [146] e que existe uma boa concordância entre os valores

observados e os valores estimados. Tais observações evidenciam que o modelo de regressão foi adequado.

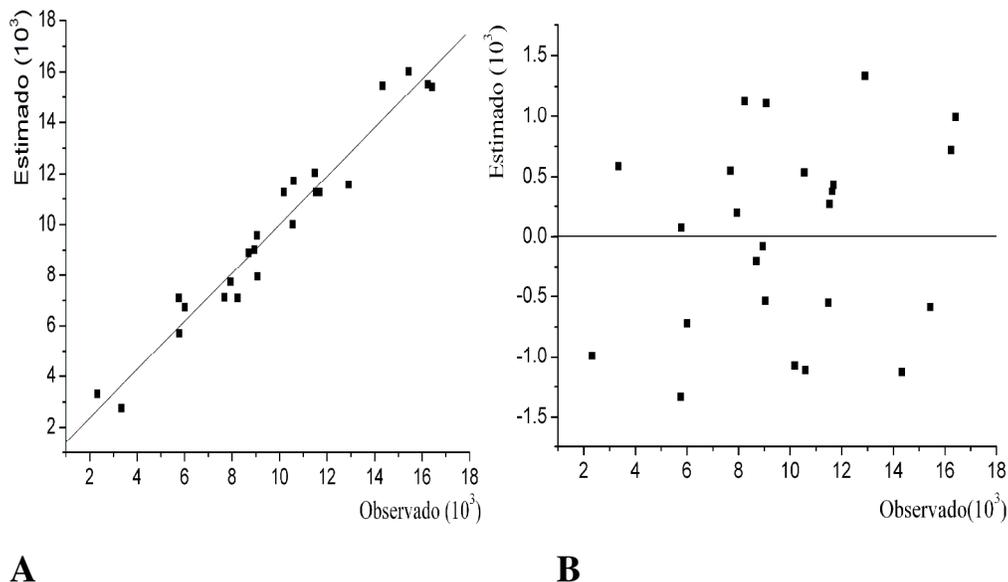


Figura 13. **A.** Gráfico dos valores de área medidos contra os valores de área estimados pelo modelo obtido do planejamento Doehlert, para o nível de significância de 0,05. **B.** Gráfico de resíduos.

A equação 1 mostra a forma genérica do modelo de regressão utilizando a somatória de áreas dos picos a partir de 3,8 min, onde os valores desta somatória podem ser correlacionados com as variáveis experimentais C_{NaCl} , T , t e D . Tal correlação pode ser realizada considerando-se apenas os efeitos significativos (Tabela 5).

$$z = b_0 + b_1 C_{NaCl} + b_2 T + b_3 t + b_4 V + b_{11} (C_{NaCl})^2 + b_{22} T^2 + b_{33} t^2 + b_{44} V^2 + b_{12} C_{NaCl} T + b_{13} C_{NaCl} t + b_{14} C_{NaCl} V + b_{23} T t + b_{24} T V + b_{34} t V \quad (\text{equação 1})$$

Os dados da Tabela 6 confirmam o que já é bem estabelecido em literatura, ou seja, que os efeitos individuais da temperatura, tempo de extração e força iônica influenciam as extrações por SPME. Quando uma fibra é exposta ao *headspace* de alguma amostra, após o transporte dos analitos para a superfície da fibra por difusão ou convecção através do meio, estes são sorvidos pelo material polimérico de recobrimento da fibra. Os equilíbrios entre as espécies sorvidas nas fases presentes no sistema (material de recobrimento da fibra, amostra e *headspace*) podem ser alcançados, após esse tempo de equilíbrio, a eficiência de extração é máxima e constante. O equilíbrio da massa extraída é uma função da concentração do analito na amostra e das constantes de equilíbrio dos processos de distribuição envolvidos. Estas constantes são função da temperatura e tipicamente temperaturas muito altas causam decréscimo nas quantidades extraídas. [148]

A adição de um eletrólito forte (tal como NaCl na condição de saturação), aumenta a força iônica do meio e altera o equilíbrio possibilitando que uma maior quantidade de analito seja extraído [148]. Esse fenômeno é atribuído ao aumento da polarização da molécula de água pelos íons presentes no sal e conseqüente diminuição do efeito de solvatação dos analitos pela água, diminuindo a solubilidade dos compostos hidrofóbicos com aumento da pressão de vapor e da concentração destes compostos disponíveis no *headspace*.

A variável diluição não apresentou influência no sistema podendo ser fixada em qualquer valor dentre os níveis avaliados.

Tabela 6. Otimização multivariada (Doehlert) – parâmetros significativos

Efeito ($\times 10^3$)	força iônica (C_{NaCl}) [*]	4,43 \pm 0,32
	Temperatura (T) [*]	5,12 \pm 0,32
	Tempo (t) [*]	2,91 \pm 0,32
	volume de diluição (V)	-0,11 \pm 0,32
Interação ($\times 10^3$)	força iônica x temperatura	0,06 \pm 0,83
	força iônica x tempo	2,44 \pm 0,93
	força iônica x volume de diluição	1,23 \pm 0,96
	temperatura x tempo	-0,75 \pm 0,92
	temperatura x volume de diluição	0,73 \pm 0,96
	tempo x volume de diluição	-0,64 \pm 0,96

*coeficientes significativos

Para facilitar a visualização dos melhores valores de trabalho das variáveis C_{NaCl} , T e t: 0.36 mg L⁻¹, 60 °C e 40 min, foram construídas as superfícies de resposta ilustradas na Figura 14. Para fins práticos, o fator de diluição foi fixado em 1 mL. Para análise de rotina o tempo de extração poderá ser diminuído.

Os valores ótimos foram encontrados com os recursos do software Matlab através da rotação das superfícies.

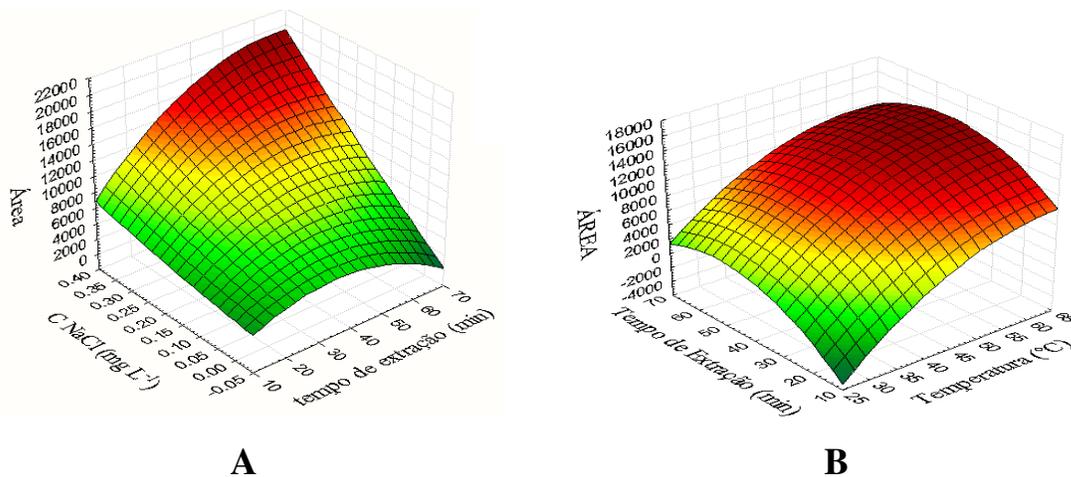


Figura 14. Superfícies de resposta. **A.** C_{NaCl} ($mg L^{-1}$) vs tempo de extração (min) e **B.** Tempo de extração vs temperatura.

5.3 Adequabilidade das técnicas cromatográficas avaliadas

As Figuras 15A, 15B e 15C ilustram cromatogramas típicos obtidos usando GC-QMS, GC×GC-FID e GC×GC-TOFMS para o extrato da amostra de mel obtido por HS-SPME. Considerando as diferenças entre estas técnicas, os cromatogramas foram obtidos em condições similares.

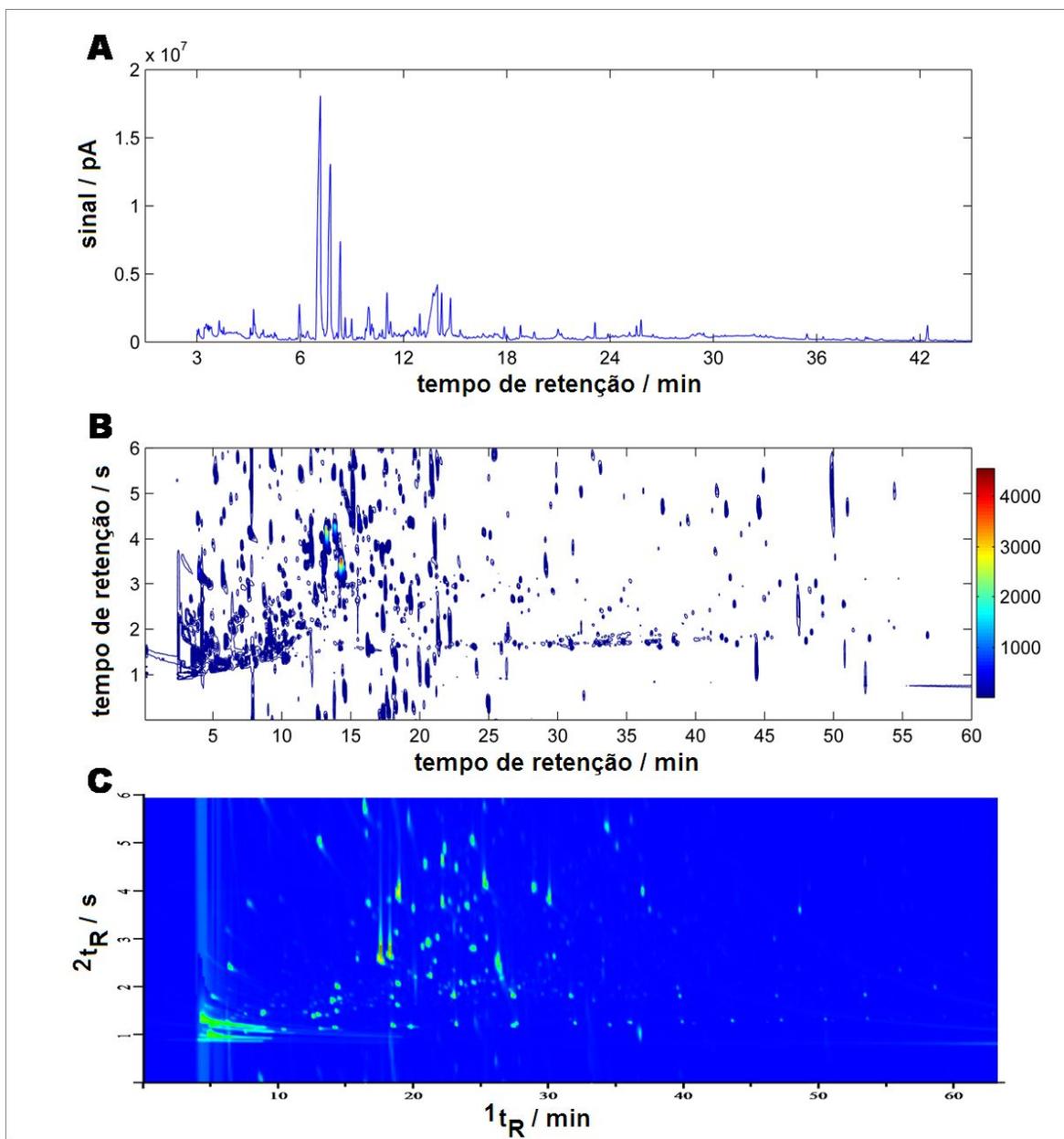


Figura 15. Cromatogramas modulados da mistura de méis adquirido por **A.** GC-MS **B.** GC x GC-FID e **C.** GCxGC-TOFMS.

As diferenças visuais dos cromatogramas dependem não somente do desempenho destes sistemas, como também do software e hardware empregados para processar os dados e gerar as figuras os quais são diferentes de sistema para sistema e suas representações visuais são altamente

dependente de vários (e nem sempre diretamente comparáveis) e diferentes parâmetros selecionados pelo usuário, como a resolução gráfica, relação de aspecto, o número de níveis de cor, etc. No entanto, mesmo considerando essas limitações potenciais associadas à reprodução equivalente das representações gráficas dos dados analisados (sob as mesmas condições) uma inspeção cuidadosa destas figuras pode ser útil para a avaliação qualitativa da adequação dessas técnicas tanto para identificação futura de origem floral e geográfica dos méis através da análise de sua fração volátil, bem como na aplicação generalizada de GC×GC para a identificação sistemática e classificação de materiais, utilizando cromatogramas como impressões digitais das amostras. Além disso, embora subjetiva, a inspeção visual dos cromatogramas ainda é essencial em GC×GC, uma vez que no estado atual de desenvolvimento da técnica e das ferramentas de processamento de dados, ainda não é possível detectar a estrutura cromatográfica e localizar os grupos estruturais nos cromatogramas usando algoritmos automatizados.

Como esperado, o cromatograma obtido no GC-MS é muito mais simples e contém menor número de picos detectados que em ambos os cromatogramas GC×GC, devido a coeluições cromatográficas ou a diminuição da sensibilidade. Entretanto, a comparação entre os cromatogramas GC×GC – FID e GC×GC-TOFMS não é tão simples. Mas, quando os parâmetros de integração são incluídos nessa comparação, o sistema que emprega o FID mostrou um registro de aproximadamente 300 picos, e para o sistema TOF/MS o registro foi de 5967 picos (considerando-se razão sinal/ruído de 5 para o FID e 50 para o TOFMS).

Certamente, a maioria dos picos são detectados no GC×GC-TOFMS, devido a maior sensibilidade do TOFMS em relação ao FID. No entanto,

considerando-se o objetivo deste trabalho, algumas conclusões em relação a presença de artefatos de extração durante o equilíbrio amostra/headspace foram obtidas a partir de ambos os sistemas, com base em aspectos visuais. A identificação da maioria dos principais constituintes da mistura de mel também é possível por GC×GC-FID em combinação com GC-MS, conforme mostrado na Tabela 6. O uso do GC×GC-TOFMS seria recomendado para a identificação dos constituintes em misturas desconhecidas porque além dos dois mecanismos de separação cromatográficos empregados, tem-se uma dimensão de separação adicional que é o espectrômetro de massas.

5.4 GC×GC-FID + GC-MS e GC×GC-TOFMS

O sistema comercialmente disponível GC×GC-TOFMS 4 D possui dois fornos cromatográficos. O forno primário é usado para melhorar a separação convencional na primeira dimensão e um forno secundário empregado principalmente por duas razões: ajustar a capacidade de retenção e de separação da segunda coluna e eliminar o *wrap-around* (pico fora do ciclo de modulação). Embora muitos autores possam debater a necessidade de um secundário, a temperatura entre a coluna primária e a coluna secundária é um parâmetro utilizado não só para eliminar o *wrap-around*, mas também, permitir o uso de períodos mais curtos de modulação (amostragem mais freqüente).

Considerando-se que os sistemas GC×GC-TOFMS e GC×GC-FID empregados possuem diferentes sistemas de modulação e diferentes comprimentos de coluna da segunda dimensão, e que essas variações afetarão a retenção na segunda dimensão, a temperatura entre as duas colunas no

sistema GC×GC-TOFMS foi definido para o mínimo (ou seja, 5 ° C), a fim de possibilitar a comparação da segunda dimensão entre os sistemas. Além disso, observando-se a figura 16, é óbvio que o *wrap-around* é observado em ambos os cromatogramas GC×GC/TOFMS e GC×GC-FID, no entanto, esse fenômeno pode ser tolerado, desde que os picos fora de ciclo de modulação não coeluem com outros componentes da amostra.

Portanto, ao invés de empregar maior período de modulação, o tempo de modulação foi selecionado em 6 segundos como uma solução entre preservar a separação na primeira dimensão e reduzir o *wrap-around*.

É conhecido que as diferenças na programação de temperatura, fluxo de gás de arraste, coluna e espessura do filme afetam a reprodutibilidade do índice de retenção. Portanto, a fim de aumentar a confiabilidade dos valores do índice de retenção, fases estacionárias, programação de temperatura e espessura do filme equivalentes foram usados em todas as análises para os três sistemas, para o cálculo dos índices de van den Dool e Kratzs ¹D-LTPRI. A programação de temperatura foi ajustada de acordo com a literatura [145] para diminuir a flutuação dos valores de índices de retenção. Uma compilação composta por identidades dos compostos, similaridade espectral e valores de índice de retenção foi construída para os dados do GC-MS. Cromatogramas GC×GC-FID do mel, também enriquecidos com n-alcanos, foram usados para construir uma segunda base de dados de picos não identificados, seus valores de ¹D-LTPRI e seus respectivos ²t_R. Então, agrupando as identidades dos compostos obtidos a partir do GC-MS com os picos desconhecidos do GC×GC-FID, e com base em seus valores de ¹D-LTPRI ajudou a aferir a identidade dos picos nos cromatogramas GC×GC. Além disso, quando dois analitos apresentavam o mesmo (ou similar) tempo de retenção na primeira

dimensão nos cromatogramas GC-FID, o pico correspondente no GC-MS poderia ser re-analizados para melhor deconvulação do espectro de massa e identificação. Os principais constituintes presentes no mel foram identificados por GC×GC-FID e GC-QMS, e estão listados na Tabela 7 . A Figura 16 ilustra um cromatograma típico GC×GC-FID da mistura de méis brasileiros onde os principais constituintes foram identificados.

Foram observados alguns artefatos, alguns compostos heterocíclicos como furfural, 5-metilfurfural, benzaldeído e 5-hidroximetilfurfural. O mel também foi analisado por GC×GC-TOFMS para confirmar a identidade dos artefatos listados na Tabela 7 os quais foram originalmente corretamente atribuídos através do uso dos sistemas GC×GC-FID e GC-QMS.

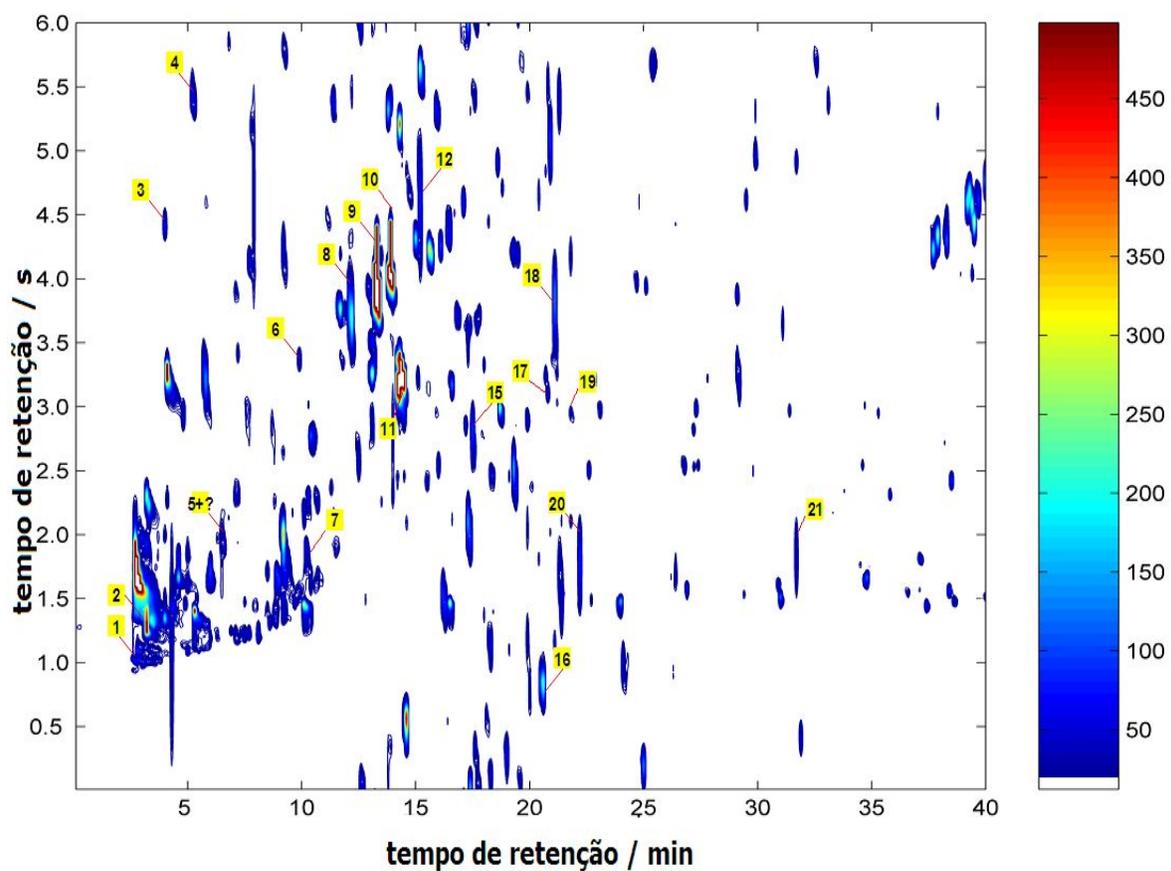


Figura 16. Cromatograma modulado da mistura (GC × GC-FID). T_{coluna} : 60 °C à 3 °C min⁻¹ à 250 °C; T_{inj} : T_{detector} : 250 °C.

Tabela 7. Identificação dos principais constituintes da mistura de méis brasileiros por GC-QMS, GC×GC - FID e GC×GC-TOFMS

#	Composto	LTPRI Lit.	GC-QMS		GC × GC - FID	GC × GC - TOFMS	
			LTPRI	Similaridade	LTPRI	LTPRI	Similaridade
1	Hexano	600	-	93.9	-	-	819
2	Acetato de etila	606	-	94.2	-	-	838
3	2-metil butan-1-ol	724	-	84.5	-	-	908
4	2-metilfurano (furfural)	828	828	97.7	819	839	960
5	Acetato de isoamila	872	870	83.6	875	875	906
6	Benzaldeído	952	957	96.9	960	971	971
7	5-metilfurfural	957	961	90.5	964	971	941
8	Benzenoacetaldeído	1036	1041	95.5	1043	1052	954
9	<i>cis</i> -Óxido de linalol	1067	1075	89.9	1075	1080	817
10	<i>trans</i> -Óxido de linalol	1084	1089	90.1	1091	1093	886
11	Hotrienol	1110	1105	87.7	1100	1100	888
12	Álcool feniletílico	1106	1113	96.4	1107	1119	962
13	Isoforona	1118	1120	92.2	-	1124	949

Tabela 7. CONTINUAÇÃO

14	Oxisoisoforona	1152	1147	85.8	-	1148	948
15	Aldeído lilálico B	1141	1155	85	1154	1140	895
16	Dietilsuccinato	1176	1180	94.8	1185	1176	906
17	Decanal	1201	1205	87.4	1207	1207	906
18	5-Hidroximetilfurfural	1224	1226	90.5	1217	1231	653
19	Benzoacetato de etila	1246	1249	92.2	1236	1247	946
20	<i>p</i> -Anisaldeído	1250	1250	94.5	1248	1269	953
21	<i>p</i> -Anisato de etila	1457	1447	90.8	1451	1459	908

* identificados apenas por GC×GC - TOFMS

Com o aquecimento excessivo do mel pode ocorrer a formação de compostos de degradação formados através de reações de *Maillard* [150]. Estes compostos de degradação são descritos na literatura como artefatos, que são substâncias que não existiam originalmente na amostra e foram geradas em alguma etapa de manipulação pós colheita.

Čajka *et al.* [73] estudaram a formação de artefatos pelo aquecimento do mel, entretanto a influência do tempo de aquecimento bem como a diferenciação dos artefatos formados não foram relatados. Neste trabalho, a formação de artefatos foi estudada em função da variação de ambos: tempo e temperatura de exposição do mel. Também foram avaliados os possíveis mecanismos de formação destes artefatos.

A maioria dos artefatos de extração são indetectáveis por GC convencional, devido a coeluição ou baixa detectabilidade devido a ausência de um modulador. Estes artefatos foram detectados nos cromatogramas GC×GC. Se não previamente definidos, estes picos podem ser confundidos como marcadores de origem floral/ geográfica do mel quando se trabalha com cromatografia gasosa bidimensional abrangente.

Portanto, um estudo comparativo foi realizado para discriminar os artefatos de extração daqueles compostos formados por tratamento térmico do mel, um procedimento ilegal mas habitual muitas vezes realizado pelos produtores para facilitar a transferência do mesmo para a embalagem na qual o mel será comercializado.

Dois grupos de análises foram feitas de acordo com o item 4.2.3. O primeiro consistiu em simular as condições de extração, a amostra foi adicionada a um frasco de 5 mL contendo a solução salina e exposta a 45 °C por 1 h antes da extração dos voláteis por HS-SPME . No segundo, a amostra

de mel foi colocada em frasco selado (sem solução salina) e estocada a 45 °C por 48 h. Após este período foi realizada a extração dos voláteis por HS-SPME. Os perfis cromatográficos para os dois grupos avaliados estão representados na figuras 17A e 17 B.

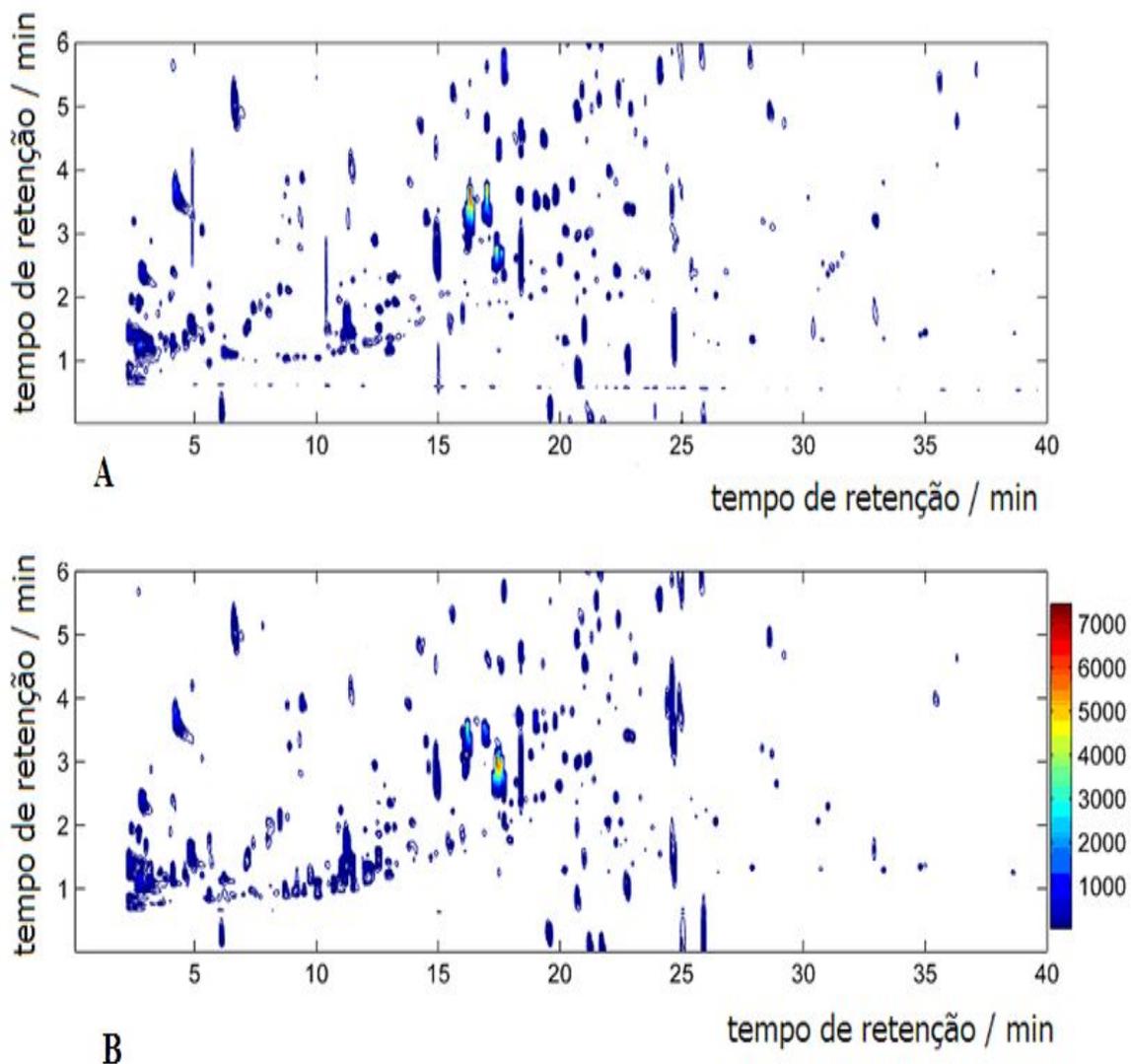


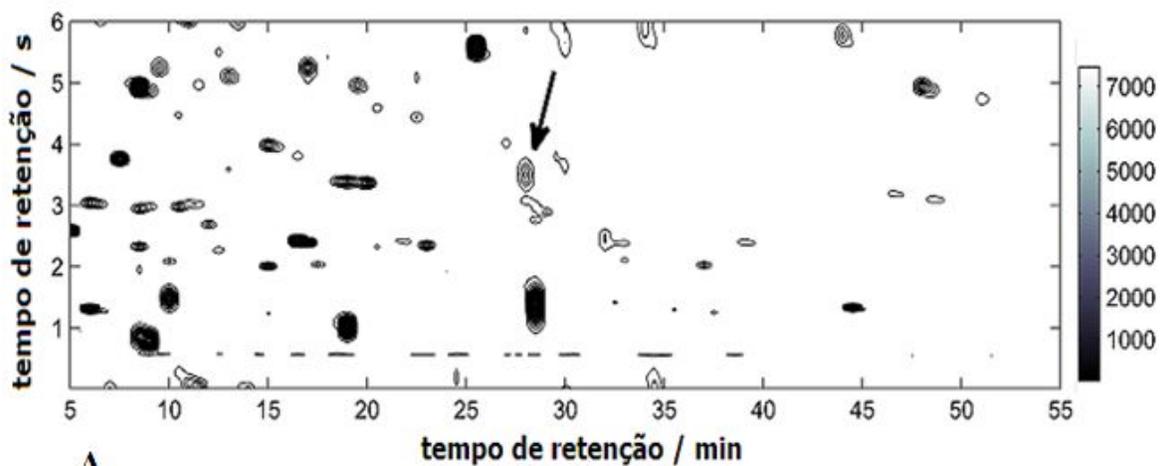
Figura 17. A. Cromatograma GCxGC-FID do mel com pré-tratamento aquoso a 45 °C por 1h. B. cromatograma GCxGC-FID do mel armazenado em frasco selado a 45 °C por 48 h.

A figura 18 ilustra a sessão ampliada do cromatograma GCxGC-FID aquecido em presença de água (figura 18 A) onde a seta indica a presença do

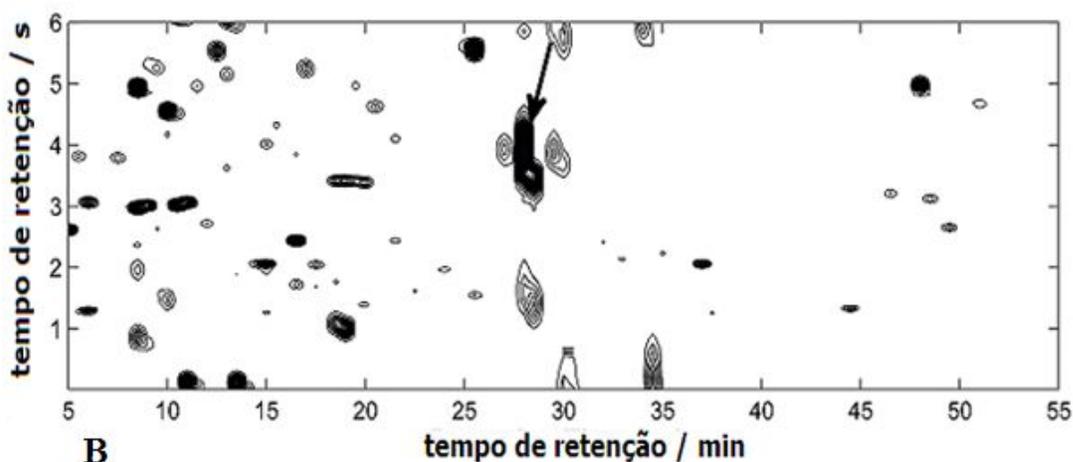
hidroximetilfurfural (HMF), um bem conhecido artefato no controle de qualidade de alimentos. Este artefato é gerado pela degradação térmica das moléculas de glicose. A figura 18 B ilustra a sessão ampliada do cromatograma GC×GC-FID do mel aquecido sem água e sem *headspace*, onde o HMF foi detectado em baixa concentração. Este fato sugere que os artefatos, relatados neste estudo, foram originados durante extração e podem ser classificados como artefatos de extração. A presença de água durante o tratamento aumenta significativamente a quantidade de HMF. Portanto, a detecção do HMF deve é influenciada pelo teor de umidade ou diluição ilegal de mel e tempo e temperatura ao qual é a amostra é exposta. Estes dois últimos efeitos já foram relatados por Tosi. [116] Portanto, na HS-SPME estes artefatos estarão presentes no cromatograma do mel.

Outros compostos heterocíclicos contendo átomos de oxigênio, como 2-metil furano (furfural) e 5-metilfurfural, são conhecidos como resultantes de tratamento térmico inapropriado, um procedimento ilegal comumente praticado entre os apiaristas. Estes compostos também foram identificados neste estudo e seus mecanismos de formação devem ser por hidrólise, já que ambos foram igualmente afetados pelo teor de umidade e temperatura de exposição. Embora muitos outros picos nos cromatogramas da Figura 17 apresentem o mesmo comportamento, alguns compostos pesados de baixa polaridade e compostos de média polaridade são degradados. Estes fatos sustentam que em meio aquoso, moléculas de água reagem com constituintes da amostra, seja por hidrólise, oxidação e termólise para formar artefatos, com nenhuma informação química relevante da amostra.

Estes resultados fornecem informações valiosas para futuros desenvolvimentos sobre este problema específico de análise.



A



B

Figura 18. **A.** Porção ampliada do cromatograma GC×GC-FID do mel bruto em frasco selado a 45 °C por 48 h. **B.** Porção ampliada do cromatograma GC×GC-FID do mel com pré-tratamento aquoso a 45 °C por 1 h. O artefato HMF é indicado pela seta. A escala de cor é a mesma da figura 17.

Por último, foi avaliada a influência da temperatura de exposição ao tratamento térmico. Para realizar esta etapa, foi realizado um estudo para determinar a variação dos perfis cromatográficos em função dos diferentes tratamentos térmicos a 30, 45 e 60 °C. Previamente a extração, a amostra foi submetida a estas temperaturas por um período de 1 h. Nenhuma variação no procedimento de extração ocorreu durante a análise. Portanto, o único

parâmetro relacionado as variações dos perfis cromatográficos foi a temperatura. Verificou-se que a quantidade de HMF, 2-metil furano e furfural aumentou com o aumento da temperatura, em meio aquoso, como era esperado. Mas as mudanças mais significativas foram observadas após exposição da amostra a 45 e 60 ° C.

A fim de avaliar a influência da temperatura e do tempo, durante o equilíbrio *headspace* (HS), três tempos de extração foram monitorados: 0, 90 e 240 min, de acordo com item 4.2.3, a duas temperaturas diferentes (45 e 60 °C). Um teste preliminar demonstrou que a 30°C o resultado não era relevante. A Figura 19 mostra os cromatogramas GC×GC relevantes. Após uma observação detalhada destes cromatogramas, notou-se que a 45 °C haviam menos diferenças significativas ao longo dos cromatogramas em 0, 90 e 240 min, representados nas Figuras 19 A, B e C, respectivamente, como a perda de compostos de baixa polaridade e maior massa molecular durante o tratamento térmico. Entretanto, isto não infere na ausência de artefatos de extração, pois o estudo anterior permitiu o mapeamento de cada espécie, ilustrado nas Figuras 17 e 18. Ao analisar as mesmas regiões nos cromatogramas GC×GC, esses padrões foram localizados e conseqüentemente, observou-se que os artefatos de extração já estavam presentes nos cromatogramas a 45 °C, mas, suas intensidades não variaram com o aumento dos períodos de exposição. A 60 °C, entretanto, os mesmo padrões foram identificados e portanto a presença de artefatos foi confirmada. Também, com o aumento do período de exposição ao pré-tratamento térmico, as intensidades dos compostos marcados como artefatos aumentaram significativamente como esperado, indicando que o período de exposição é um parâmetro significativo a 60 °C.

Também, nos cromatogramas adquiridos de 0 a 90 min, representados nas figuras 19 D e E, foi observada a formação de compostos com alta polaridade, em função do *wrap-around*, com o decréscimo dos analitos correspondentes a alguns voláteis e compostos pesados não polares.

Embora quando se compara o último conjunto de cromatogramas com o tempo de exposição de 240 min, ilustrado na Figura 19 F, a quantidade de espécies voláteis de alta polaridade aumentou excessivamente, alterando pelo menos 20% do perfil cromatográfico original observado a 0 min. Como resultado, o cromatograma na Figura 19 F não mostra nenhuma informação química, devido à intensa presença de espécies que não são relevantes a composição original do mel e certificação das amostras de mel. Como estes artefatos estão distribuídos ao longo do intervalo de 5 a 30 min, porção do cromatograma GC×GC que poderia conter a maioria da informação química relevante das amostras esta sendo escondida por coeluição. Estes artefatos detectados, nestas condições, tem intensidades de 15 a 150 pA nos cromatogramas GC×GC –FID, e com uma amplificação de 21 x a intensidade do sinal é esperado que este deveriam ser observados na faixa de 0.7 a 7 pA no GC convencional.

Conseqüentemente, eles não seriam detectados, nem seriam mascarados por coeluição. Entretanto, com o aumento da sensibilidade e poder de separação oferecidos pelo GC×GC, a quantidade de artefatos detectados é muito maior que no convencional ¹D-GC.

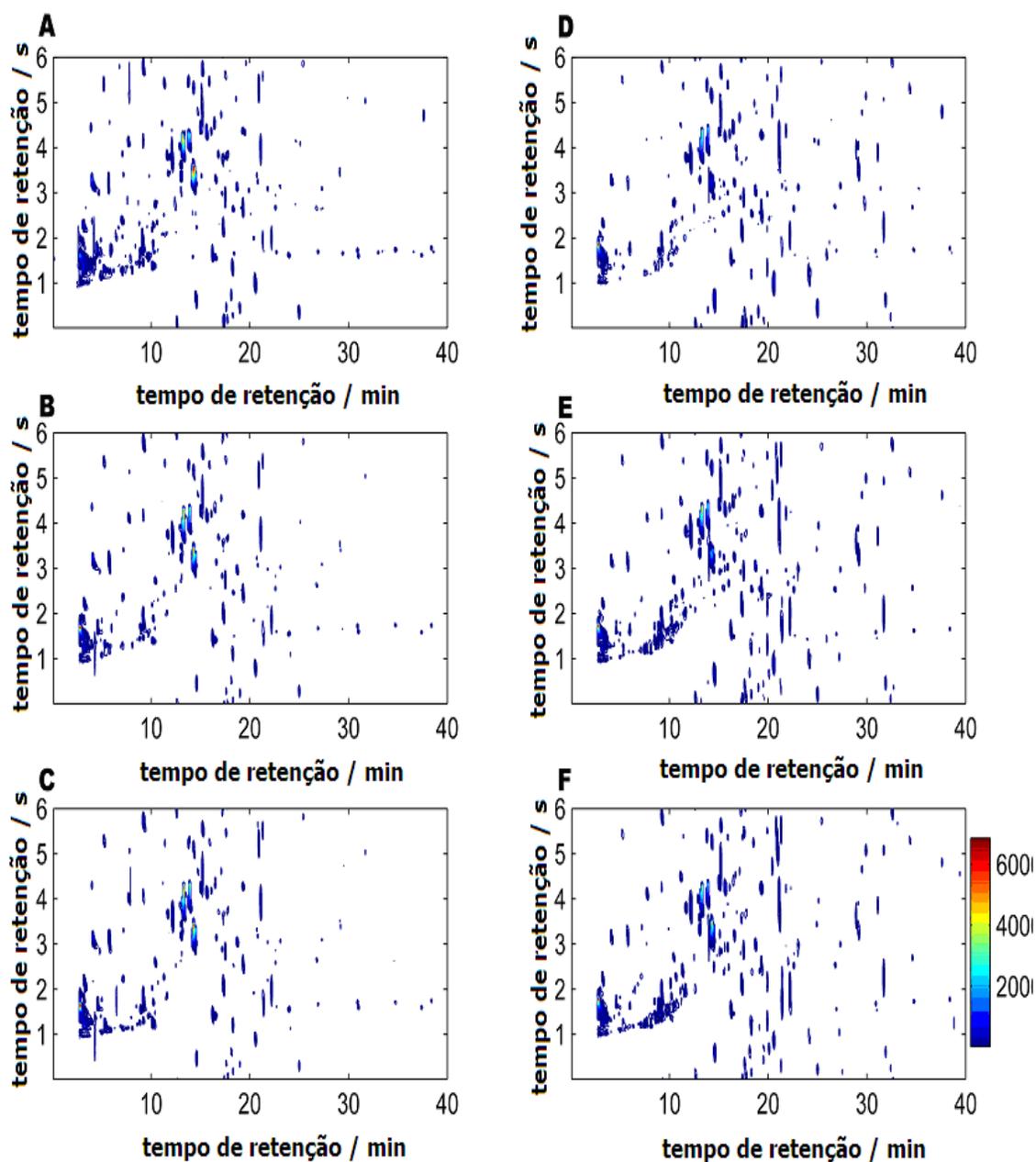


Figura 19. Cromatogramas GCxGC-FID da mistura de óleos submetida a tratamento térmico a diferentes temperaturas e tempos de extração. **A.** 45 °C por 0 min (extração realizada imediatamente após a amostra atingir a temperatura de 45°C). **B.** 45 °C por 90 min. **C.** 45 °C por 240 min. **D.** 60 °C por 0 min. **E.** 60 °C por 90 min. **F.** 60 °C 240 min.

.5 Análise exploratória

Para uma avaliação inicial foram selecionadas algumas amostras de mel de marmeleiro (*Croton sonderianus*), provenientes de diferentes regiões do Piauí-Brasil. As informações de cada amostra encontram-se na Tabela 2 do item 4.1.3.

Para estas amostras foram identificados, os principais voláteis já listados na Tabela 7, eugenol e alguns derivados (metileugenol, isoeugenol) e os outros compostos relacionados na Tabela 8.

O eugenol está associado ao aroma de cravo-da-índia [15] aroma característico que torna este tipo de mel muito apreciado pelos consumidores.

Tabela 8. Compostos detectados nas amostras de marmeleiro (*Croton sonderianus*) (similaridade ≥ 85) por GC-QMS

t _R (min)	LTP RI ^a	LTPR I ^b	Composto	Amostras															
				15	17	18	38	58	59	60	61	62	64	65	66	79	80	87	
1,87	740	735	3-metil butanal									X							
2,28	752	759	2,4,5-trimetil-1,3-dioxolano	X	X	X		X	X		X		X	X				X	X
2,85	785	793	butan-2,3-diol		X				X		X								
2,96	800	799	hexanal				X										X		
2,96	800	801	butanoato de etila							X									
3,41	828	828	furfural	X		X	X		X	X	X	X		X	X	X			
	841	838	3-metil pentanol															X	
3,65	848	842	2-metilbutanoato de etila	X		X													
3,72	858	846	3-metilbutanoato de etila	X	X	X					X								
4,12	871	876	3-metilbutan-1-ol							X									
4,60	901	896	heptan-2-ol								X								
6,00	-	962	n.i	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6,10	957	955	5-metilfurfural		X	X											X		
6,20	952	960	benzaldeído	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X

6,80	985	981	6-metil 5-hepten-2-ona				X	X	X			X			X	X	X	
7,00	991	989	óxido de linalol (dehidroxi-trans)			X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	
7,17	1002	995	n.i	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7,20	991	986	hexanoato de etila			X					X							X
7,39	998	1003	octanal	X	X		X	X	X		X		X	X	X	X	X	X
7,47	1006	1005	óxido de linalol (dehidroxi -cis)		X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X
8,10	1024	1023	cimeno														X	
8,20	1032	1025	2-etil-hexan-1-ol	X														
8,26	1024	1019	d-limoneno					X										
8,52	1034	1034	lavanda lactona				X										X	
8,78	1036	1041	benzenoacetaldéido	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9,01	1056	1048	etil furan-2-carboxilato	X	X				X		X		X					X
9,34	1056	1056	o-cresol												X			
9,55	1059	1063	acetofenona	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X
9,89	1071	1072	óxido de linalol (cis-furanóide)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9,96	1078	1074	2,5 - furandicarboxaldéido			X	X											
10,46	1084	1088	óxido de linalol (trans-furanóide)	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10,89	1098	1100	linalol	X		X		X	X	X	X	X	X	X	X		X	
11,05	1100	1104	hotrienol	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
11,35	1106	1111	álcool feniletílico	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
11,61	1122	1117	α -ciclocitral	X	X	X					X	X	X		X		X	X
11,72	1121	1120	α - isoforona	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
11,82	1127	1122	octanoato de metila	X	X	X						X	X					X
12,04	1135	1127	(E, E) -2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno			X												
12,06	1115	1128	p-mentatrieno (possível)	X	X			X		X	X	X	X	X	X		X	
12,53		1139	aldeído lilálico (isômero A)	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
12,67	1145	1143	4-oxoisoforona	X	X		X	X	X	X		X	X	X	X	X	X	X
12,87		1147	aldeído lilálico (isômero B)	X	X	X		X		X		X		X		X	X	X
12,98	1148	1149	óxido de nerol						X				X				X	X
13,47		1162	aldeído lilálico (isômero C)	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X	X		X	
13,74	1170	1168	óxido de linalol	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

			(cis - piranóide)														
13,95	1173	1173	óxido de linalol (trans- piranóide)	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14,19	1176	1178	dietil succinato	X	X	X			X		X						X
14,46	1189	1186	trans-isocarveol					X									
14,52	1189	1187	(3E)-2,6- dimetilocta-3,7- diene-2,6-diol		X											X	
	1183	1185	dill éter														X
14,79	1186	1193	α -terpineol	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14,95		1197	álcool lilálico B	X													
14,95	1197	1197	safranal			X		X	X	X	X		X	X	X	X	
15,30	1201	1205	decanal	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X		X	X
15,60		1212	dimetilbenzaldeí do		X	X	X	X	X	X	X	X					X
15,80	1219	1216	β -ciclocitral			X				X		X					
15,76		1216	p-ment-1-en-9- al				X									X	X
15,83	1217	1218	4-metileno isoforona	X		X		X	X		X			X	X		
15,85		1218	p-ment-1-en-9- al (isômero)				X										
16,02	1224	1222	nonoato de metila	X						X		X			X	X	
16,21	1228	1226	bornileno														X
16,57	1239	1235	o-anisaldeído														X
16,79	1243	1240	2-fenilacetato de etila	X	X	X		X	X		X			X			X
17,27	1251	1251	p-anisaldeído	X	X	X	X									X	
17,28	1258	1252	fenil acetato de etila							X							X
19,15	1294	1294	nonanoato de etila	X		X							X				X
19,59	1306	1304	p-vinilguaiacol										X		X		
	1326	1322	caprato de metila													X	
20,88	1335	1335	megastigma- 4,6(Z),8(E)- trieno							X		X	X	X	X		
21,17	1348	1341	1,3-dimetoxi-2- hidroxibenzeno (siringol)						X								
21,28	1351	1344	etil dihidrocina- mato	X						X							
21,40	1356	1347	eugenol	X		X			X		X				X		
22,59	1364	1375	β - dasmascenona						X		X	X		X	X		
21,76	1360	1355	megastigma- 4,6(E),8(E)- trieno							X	X			X	X		
23,39	1395	1394	caprato de etila			X			X		X						X
23,53	1403	1397	metileugenol					X	X	X		X	X		X		

23,97	1405	1407	dodecanal	X						X					X	X	X	
25,34	1451	1441	isoeugenol							X	X	X	X	X	X			
25,49	1444	1445	p-anisato de etila	X	X	X												
25,52	1453	1445	5,9-undecadien-2-one, 6,10-dimetil (geranil acetona)				X	X	X			X				X	X	
26,23	1462	1462	cinamato de etila	X	X	X											X	X
31,42	1595	1593	dodecanoato de etila															X
45,40	1993	1989	hexanoato de etila															x

a. literatura; b. encontrado; n.i = não identificado.

Dois compostos com índices de retenção 962 (± 10) e 995 (± 10) foram encontrados em todas as amostras. É provável que estes compostos possam caracterizar o mel de marmeleiro como sendo da região do Piauí. Para avaliar esta possibilidade foi necessário comparar os resultados com amostras de outras regiões para um estudo conclusivo.

As Figuras 20 e 21 ilustram cromatogramas típicos para o mel de marmeleiro desta região do nordeste. Uma breve comparação desta amostra com aquela ilustrada na Figura 22, um mel silvestre da região sul, mostra que o composto com índice 996 é encontrado apenas na amostra do Piauí, sendo um possível marcador de origem. Entretanto, seria conveniente comparar estes resultados com outras amostras de marmeleiro do nordeste para um estudo conclusivo. Para as amostras de marmeleiro do Piauí também foram observadas algumas diferenças (Tabela 8) que devem estar diretamente relacionadas com o ponto de origem e com a época em que os méis foram produzidos porque a composição do néctar e das flores varia de acordo com o período da florada.

Os cromatogramas unidimensionais (GC-QMS) das amostras de méis analisados foram transformados em uma matriz. Os dados foram

autoescalados e submetidos à análise das componentes principais (PCA) usando-se o programa Matlab. A Figura 24 ilustra o gráfico de escores para as amostras avaliadas. O gráfico de escores possibilitou a separação em grupos de acordo com a procedência destas amostras.

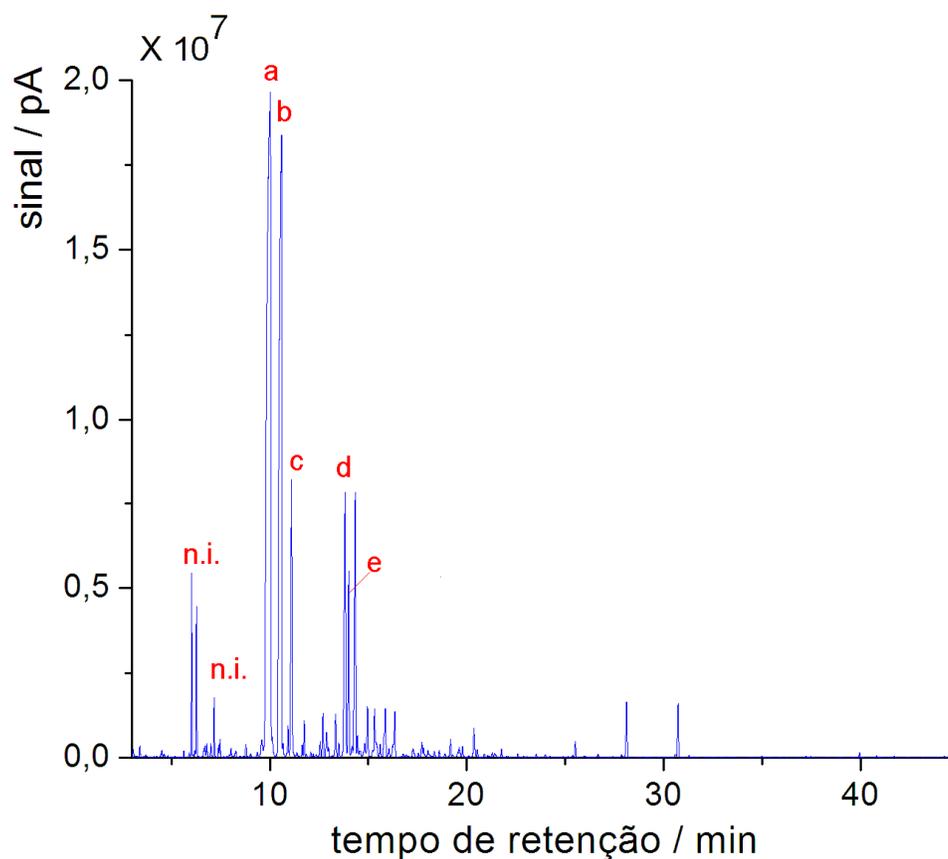


Figura 20. Cromatograma unidimensional típico para o mel de marmeleiro do nordeste do Brasil (amostra 60), obtido por GC-QMS. n.i = não identificado, óxido de linalol: a) cis-furanóide, b) trans-furanóide, c) hotrienol, óxido de linalol: d)cis-piranóide, e) trans-piranóide. A temperatura do injetor e detector foi de 250 °C. Temperatura inicial da coluna = 60°C e Temperatura final = 250°C, com taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹. Gás de arraste = 1,0 mL min⁻¹.

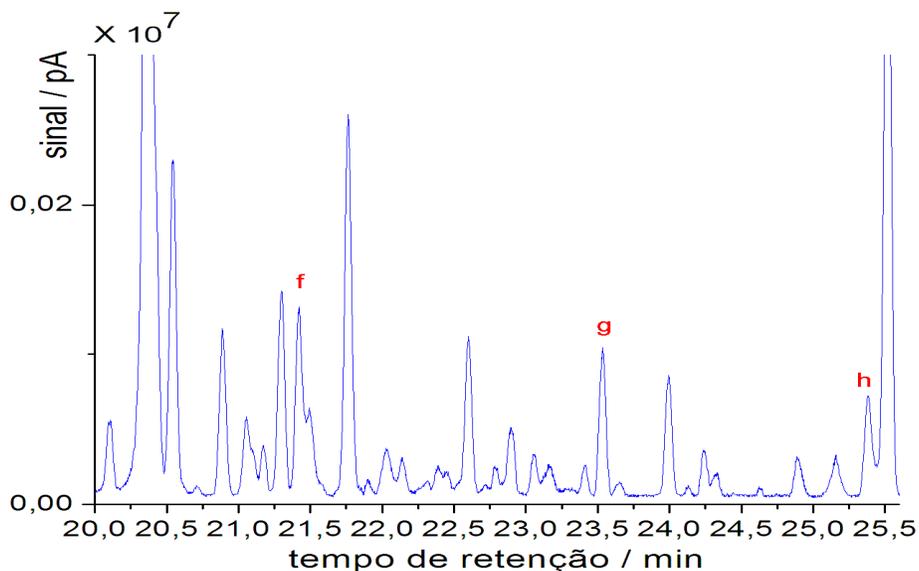


Figura 21. Porção estendida do cromatograma unidimensional típico para o mel de marmeleiro do nordeste do Brasil (amostra 60), obtido por GC-MS. f) eugenol, g) metileugenol, h) isoeugenol.

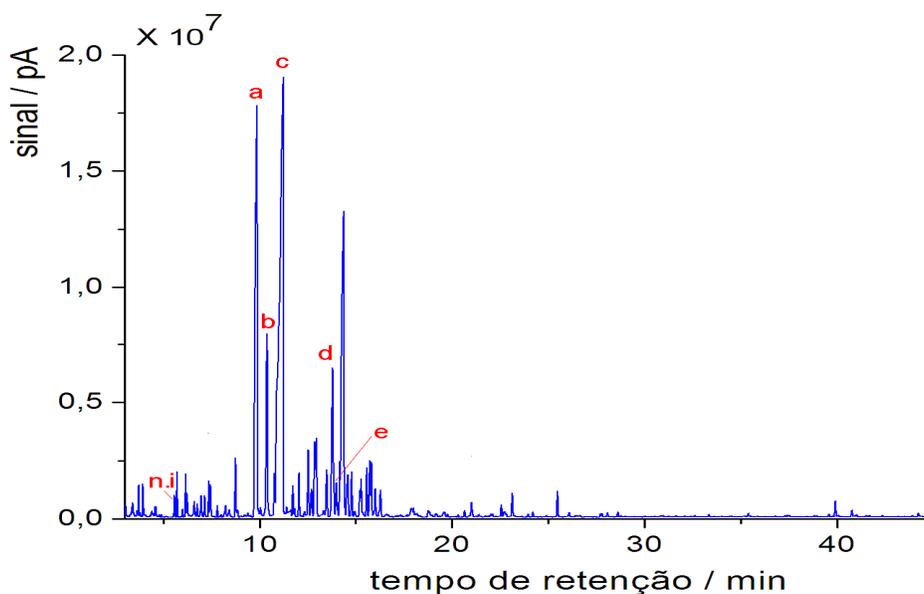


Figura 22. Cromatograma unidimensional típico para mel de silvestre do sul do Brasil, obtido por GC-QMS. n.i = não identificado, óxido de linalol: a) cis-furanóide, b) trans-furanóide, c) hotirenol, óxido de linalol: d) cis-piranóide, e) trans-piranóide. Temperatura inicial da coluna = 60°C e temperatura final = 250°C, com taxa de aquecimento de 3 °C min⁻¹. Gás de arraste = 1,0 mL min⁻¹.

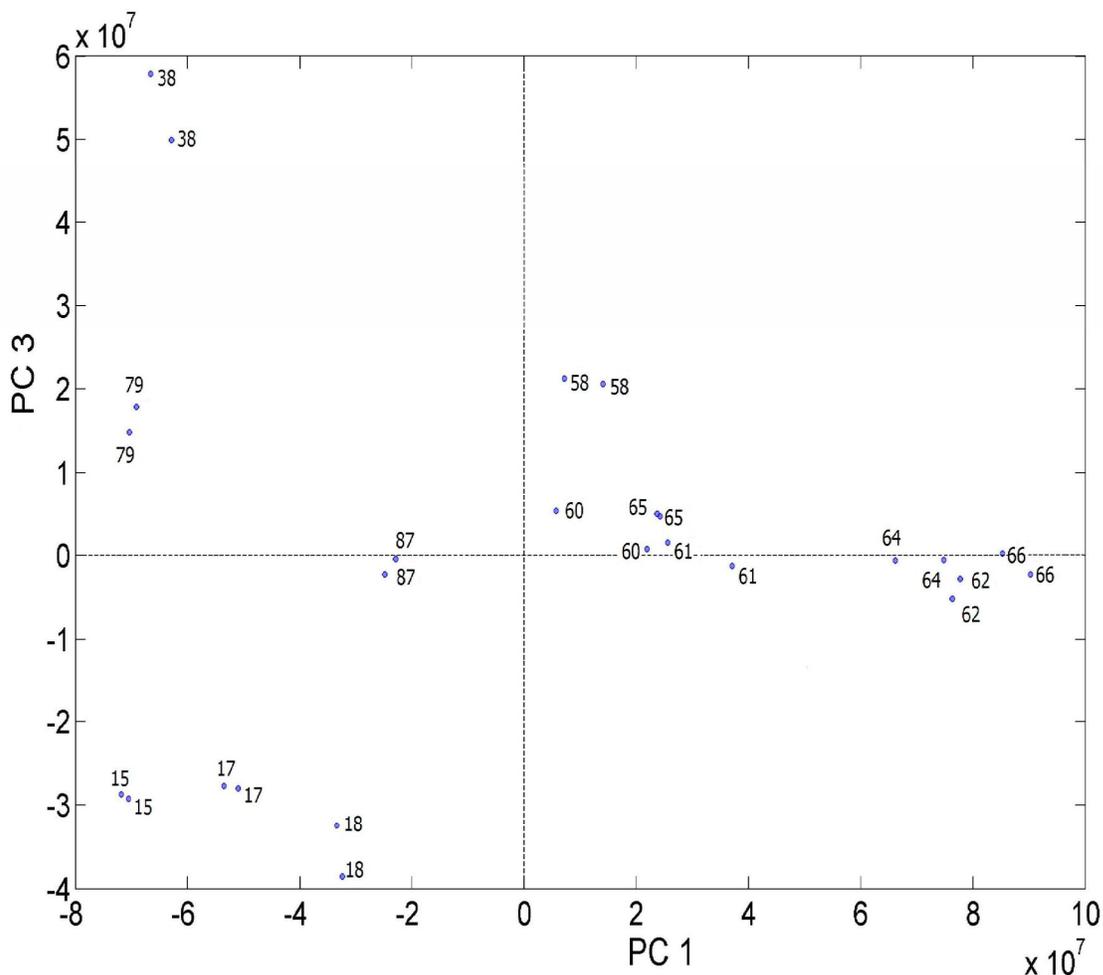


Figura 23. Gráfico de escores normalizado a partir dos cromatogramas obtidos por GC-QMS.

5.5.1 Comparação GC convencional e GC bidimensional

Um perfil cromatográfico de duas amostras de mel de marmeleiro de regiões distintas foi obtido por GC unidimensional e bidimensional. Foram selecionadas as amostras 58 e 87 que correspondem a florada de marmeleiro/canela de cunha de São Braz-PI e de marmeleiro/silvestre - Simplício-Mendes-PI, respectivamente.

As figuras 24 e 25 comparam os cromatogramas convencionais e bidimensionais obtidos para estas amostras. Enquanto no modo unidimensional são observadas várias coeluições, no modo bidimensional há uma maior quantidade de compostos detectados.

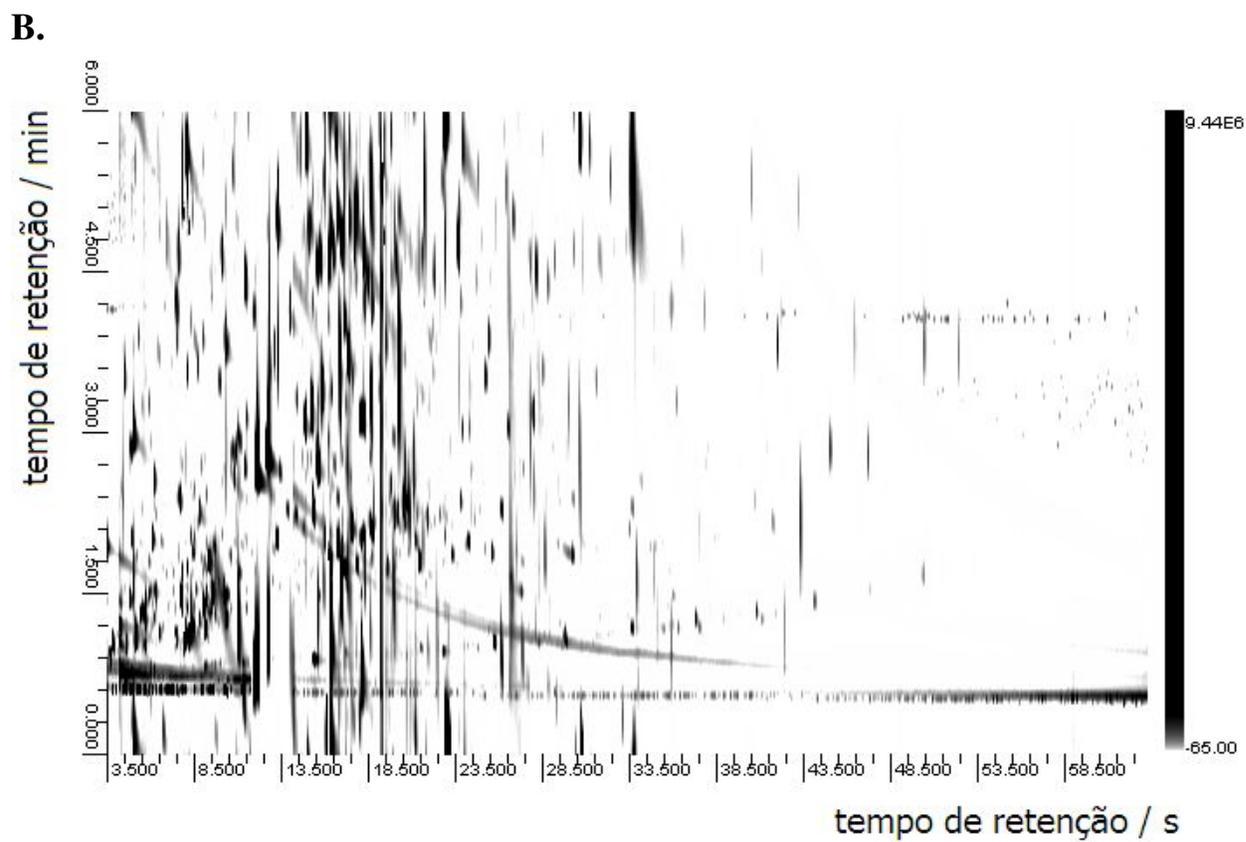
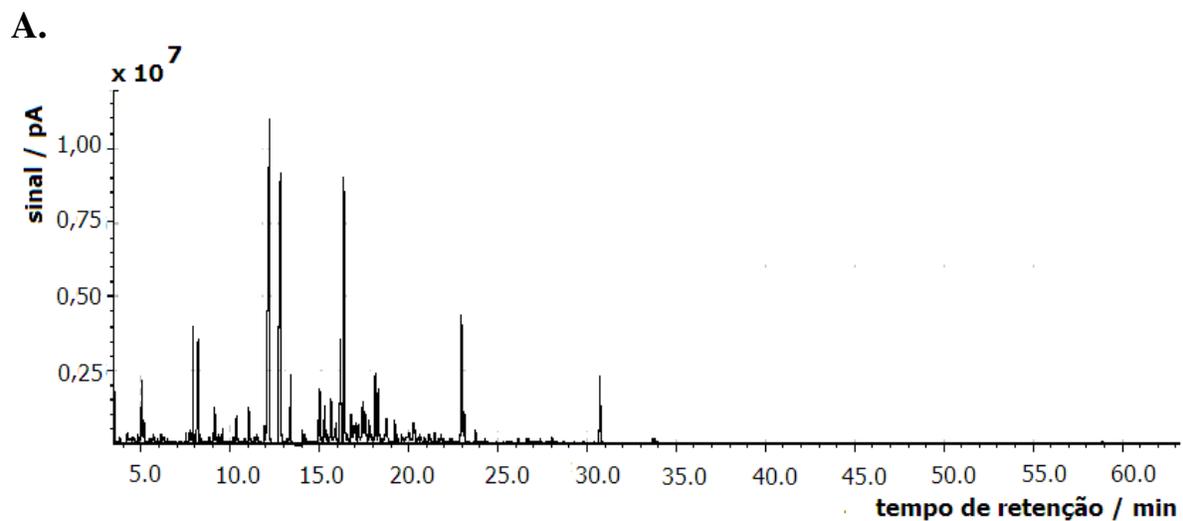
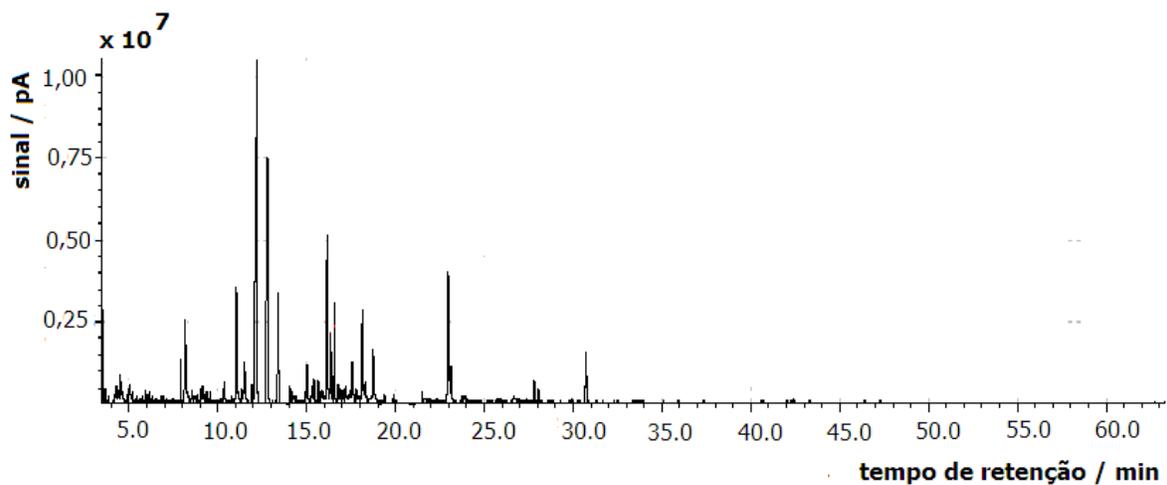


Figura 24. Amostra 58 **A.** GC-QMS e **B.** GCxGC-QMS.

A.



B.

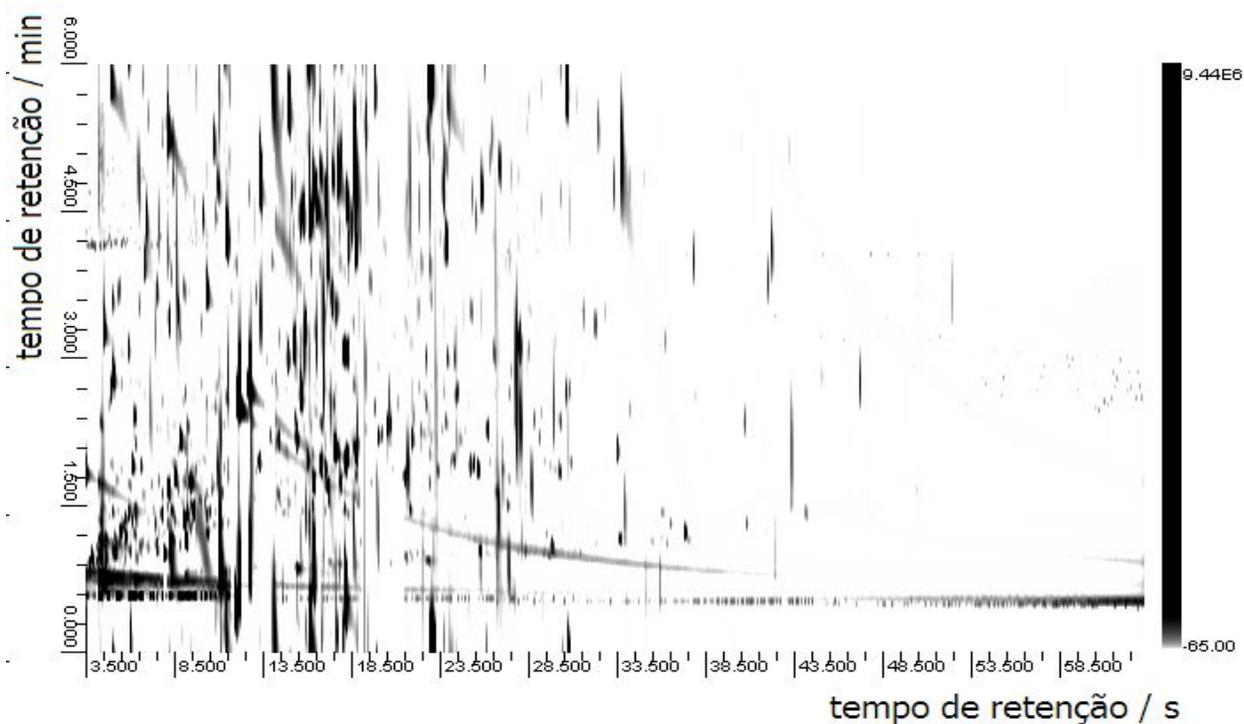


Figura 25. Amostra 87 A. GC-QMS e B. GCxGC-QMS

A Tabela 9 relata os compostos identificados para cada amostra e as diferenças entre elas. A técnica possibilitou a identificação do monoterpene com índice 996, sendo ele 3-careno, um possível marcador de origem.

Tabela 9: Identificação dos compostos em duas amostras de mel (GC×GC-QMS)

	t_R(min)	t_R(s)	LTPRI^a	LTPRI^b	Identificação	058	087
1	4,90	6,24	828	831	furfural	X	X
2	5,00	3,00	841	836	3-metilpentan-1-ol	X	X
3	5,20	1,08	848	847	isovalerato de etila	X	
4	5,30	3,66	850	852	(Z) -hex-3-en-1-ol		X
5	5,50	2,13	896	862	heptan-2-ol		X
6	6,30	1,50	901	903	heptanal	X	X
7	8,00	2,73	948	960	valerolactona	X	X
8	8,10	5,34		963	benzaldeído		X
9	8,60	3,81	974	980	oct-1-en-3-ol	X	
10	8,80	2,25	985	986	6-metilhept-5-en-2-ona	X	X
11	9,00	3,87	999	993	6-metilhept-5-en-2-ol	X	X
12	9,10	1,17	1002	996	3-careno	X	X
13	9,10	2,64	991	996	octan-3-ol		X
14	9,30	1,8	998	1002	octanal	X	X
15	10,30	1,26	1024	1029	d-limoneno	X	
16	10,30	3,84	1032	1029	2-etil-hexan-1-ol	X	X
17	11,00	1,20	1036	1047	benzenoacetaldeído	X	X

18	11,10	2,19	1039	1050	salicilaldeído		X
19	11,40	2,67	1049	1057	octen-1-al	X	
20	11,90		1057	1071	acetofenona	X	X
21	12,00	4,47	1068	1073	octan-1-ol	X	X
22	12,10	3,12	1078	1076	óxido de linalol (cis-furanóide)	X	X
23	12,70	3,15	1084	1092	óxido de linalol (trans-furanóide)	X	X
24	12,80	4,23	1074	1094	2,5-furandicarboxaldeído	X	
25	13,00	4,41	1089	1100	guaiacol		X
26	13,10	3,78	1098	1102	linalol	X	
27	13,30	3,72	1100	1107	hotrienol	X	X
29	13,30	1,92	1100	1107	nonanal		X
30	13,90	2,28	1122	1121	α -ciclocitral	X	X
31	14,00	4,14	1121	1123	isoforona	X	X
32	14,10	5,79	1106	1126	álcool feniletílico		X
33	14,30	2,25	1127	1131	E,E-2,6-dimetil-1,3,5,7-tetraeno	X	X
34	14,40	1,59	1125	1133	óxido de rosa		X
35	14,90	5,79	1145	1145	4-oxoisoforona	X	X
36	14,90	3,09		1145	aldeído lilálico A	X	X
37	14,90	1,59		1145	aldeído lilálico B	X	X

38	15,10	4,86	1144	1150	cis-beta terpineol	X	
39	15,20	3,21	1162	1152	aldeído lilálico C	X	X
40	15,40	2,19	1158	1157	óxido de nerol		X
41	15,60	1,35	1169	1161	nonan-1-ol	X	
42	16,00	6,45	1174	1171	óxido de linalol (cis piranóide)	X	X
43	16,00	2,01		1201	decanal	X	X
44	16,20	4,05	1179	1176	isomentol	X	
45	16,40	3,39	1177	1181	terpinen-4-ol	X	
46	16,40	4,68	1176	1183	dietilsuccinato		X
48	16,70	5,67		1188	naftaleno	X	
47	16,90	1,53	1193	1192	dihidro carveol	X	
48	17,00	4,77	1188	1195	α -terpineol	X	X
49	17,20	1,71	1196	1200	octanoato de etila	X	X
50	17,40	3,69	1197	1204	safranal	X	X
51	17,40	4,86	1219	1204	álcool lilálico B		X
52	17,50	2,13	1201	1207	decanal	X	X
53	17,60	6,15		1209	2,4-dimetilbenzaldeído		X
54	17,80	4,44	1205	1214	verbenona	X	
55	18,10	0,84		1221	3,5-dimetilbenzaldeído	X	

56	18,10	3,12	1216	1221	p-ment-1-en-9-al	X	X
57	18,20	4,59	1223	1223	eucarvona		X
58	18,30	3,12	1219	1225	β -ciclocitral	X	X
59	18,30	1,68	1216	1225	trans-carveol	X	
60	18,60	1,14	1232	1232	álcool lilálico D	X	X
61	18,70	5,22		1235	5-hidroxi metilfurfural (HMF)	X	
62	19,30	5,43	1243	1248	fenil etanoato de etila	X	
63	19,50	3,84	1252	1253	geraniol	X	X
64	19,80	5,79	1254	1260	2-feniletacetato	X	X
65	20,00	1,47	1251	1265	anisaldeído	X	X
66	21,40	1,80	1294	1297	nonanoato de etila	X	
67	21,70	1,86		1304	p-ment-1-en-9-ol		X
68	21,90	2,19	1305	1309	undecanal	X	
69	23,40	1,83		1345	megastigma-4,6(Z),8(E)-trieno	X	X
70	24,30	1,98	1355	1366	megastigma-4,6(E),8(E)-trieno		X
71	25,00	4,80	1377	1383	α - ionol	X	
72	25,30	3,45	1392	1390	dasmacone		X
73	25,60	1,89	1395	1397	decanoato de etila	X	X
74	26,20	2,28	1405	1412	dodecanal	X	X

75	26,20	0,81	1403	1412	metileugenol	X	X
76	28,00	3,18	1453	1456	cis-geranilacetona	X	X
77	28,60	1,89	1462	1470	cinamato de etila	X	X
78	28,80	4,41	1469	1465	dodecan-1-ol	X	
79	29,80	1,11	1500	1500	pentadecano	X	
80	42,00	3,81	1833	1836	oxaciclohexadecan-2-ona	X	

a. literatura; b. encontrado.

A Tabela 10 compara a identificação nos modos unidimensional e bidimensional. Como já era esperado, o número de compostos identificados no modo bidimensional é superior ao convencional, para a amostra analisada chega a ser o dobro.

Tabela 10: Compostos identificados em duas amostras de mel (Comparação GC×GC-QMS e GC-QMS)

LTPRI ^a	LTPRI ^b	Identificação	058		087	
			GC×GC-QMS	GC-QMS	GC×GC-QMS	GC-QMS
828	831	furfural	x		x	x
841	836	3-metilpentan-1-ol	x		x	
848	847	isovalerato de etila	x			x
850	852	(Z) -hex-3-en-1-ol			x	
896	862	heptan-2-ol			x	
901	903	heptanal	x		x	x
948	960	valerolactona	x		x	
	963	benzaldeído		x	x	x
974	980	oct-1-en-3-ol	x			
985	986	6-metilhept-5-en-2-ona	x	x	x	

999	993	6-metilhept-5-en-2-ol	x		x	
1002	996	3-careno	x		x	
991	996	octan-3-ol			x	
998	1002	octanal	x		x	x
1024	1029	d-Limoneno	x	x		
1032	1029	2-etil-hexan-1-ol	x		x	
1036	1047	benzenoacetaldeído	x	x	x	x
1039	1050	salicilaldeído			x	
1049	1057	octen-1-al	x			
1057	1071	acetofenona	x	x	x	x
1068	1073	octan-1-ol	x	x	x	
1078	1076	óxido de linalol (cis-furanóide)	x	x	x	x
1084	1092	óxido de linalol (trans-furanóide)	x	x	x	x
1074	1094	2,5-furandicarboxaldeído	x			
1089	1100	guaiacol			x	
1098	1102	linalol	x	x		

1100	1107	hotrienol	x	x	x	x
1100	1107	nonanal			x	
1122	1121	α -ciclocitral	x		x	
1121	1123	isoforona	x	x	x	
1106	1126	álcool feniletílico		x	x	x
1127	1131	E,E-2,6-dimetil-1,3,5,7- ctatetraeno	x		x	
1125	1133	óxido de rosa			x	
1145	1145	4-oxoisoforona	x		x	
	1145	aldeído lilálico A	x	x	x	
	1145	aldeído lilálico B	x	x	x	
1144	1150	cis-beta terpineol	x			
1162	1152	aldeído lilálico C	x	x	x	
1158	1157	óxido de nerol			x	x
1169	1161	nonan-1-ol	x			
1174	1171	óxido de linalol cis piranóide	x		x	
	1201	decanal	x		x	

1179	1176	isomentol	x			
1177	1181	terpinen-4-ol	x			
1176	1183	dietilsuccinato			x	x
	1188	naftaleno	x			
1193	1192	dihidro carveol	x			
1188	1195	α -terpineol	x	x	x	
1196	1200	octanoato de etila	x		x	
1197	1204	safranal	x	x	x	
1219	1204	álcool lilálico B			x	x
1201	1207	decanal	x	x	x	x
	1209	2,4-dimetilbenzaldeído		x	x	x
1205	1214	verbenona	x			
	1221	3,5-dimetilbenzaldeído	x			
1216	1221	p-ment-1-en-9-al	x		x	
1223	1223	eucarvona			x	
1219	1225	β -ciclocitral	x		x	
1216	1225	trans-carveol	x	x		

1232	1232	álcool lilálico D	x		x	
	1235	5-hidroxi metilfurfural (HMF)	x			
1243	1248	fenil etanoato de etila	x			
1252	1253	geraniol	x		x	
1254	1260	2-feniletilacetato	x		x	x
1251	1265	anisaldeído	x		x	x
1294	1297	nonanoato de etila	x			
	1304	p-ment-1-en-9-ol			x	
1305	1309	undecanal	x			
	1345	megastigma-4,6(Z),8(E)-trieno	x		x	
1355	1366	megastigma-4,6(E),8(E)-trieno			x	
1377	1383	α - ionol	x			
1392	1390	dasmacone			x	
1395	1397	decanoato de etila	x		x	
1405	1412	dodecanal	x		x	
1403	1412	metileugenol	x	x	x	

1453	1456	cis-geranilacetona	x	x	x	
1462	1470	cinamato de etila	x		x	x
1469	1465	dodecan-1-ol	x			
1500	1500	pentadecano	x			
1833	1836	oxaciclohexadecan-2-ona	x			

a. literatura; b. encontrado.

Sabendo-se da complexidade dos dados gerados por GC×GC, foi empregado mPCA para classificar amostras de mel coletadas em diferentes localidades durante a mesma florada. Para aplicação do método para análise exploratória, fez-se um alinhamento prévio das matrizes. A Tabela 11 apresenta a relação das amostras (resultantes de uma mesma florada de marmeleiro) de procedência relacionadas na Tabela 2, assim como o número das amostras. A Figura 26 apresenta os resultados da análise exploratória.

Tabela 11: Amostras de mel empregadas na análise exploratória

replicata	Amostra nº
(1,2)	15
(3,4)	17
(5,6)	18
(7,8)	38
(9,10)	58
(11)	59
(12, 13, 14)	60
(15, 16)	61
(17, 18, 19)	62
(20, 21)	64
(22, 23)	65
(24, 25)	66
(26, 27)	79
(28 – 31)	80

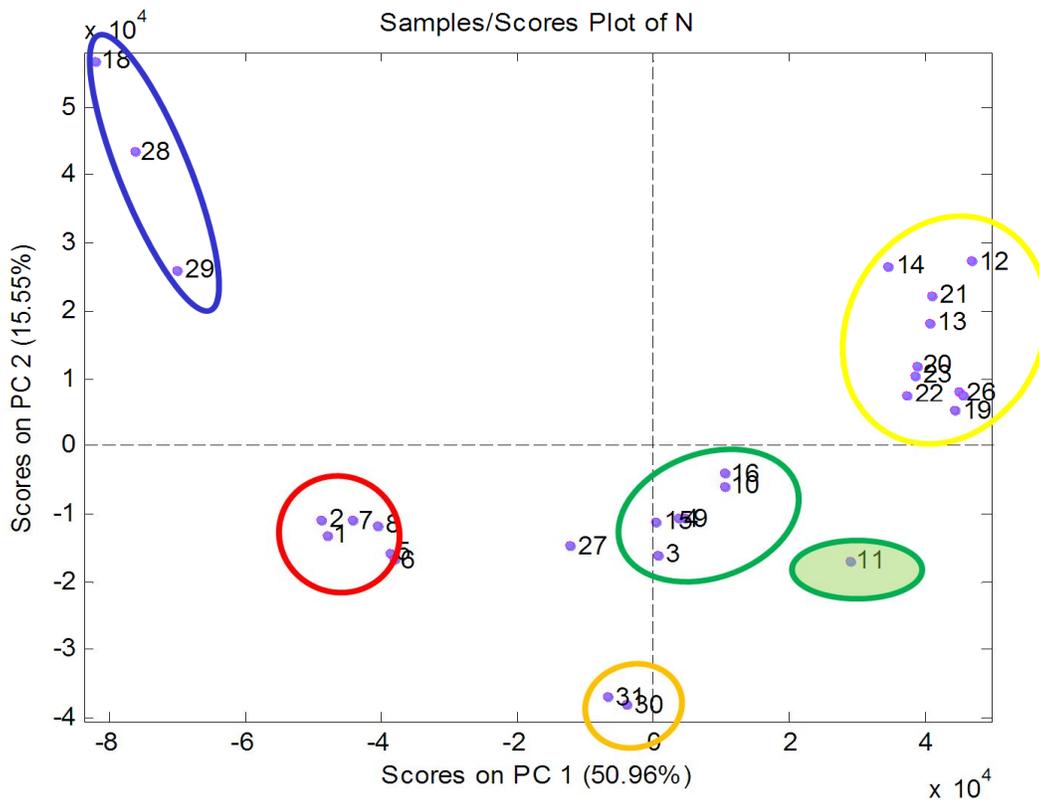


Figura 26. Gráfico de escores normalizado a partir dos cromatogramas obtidos por GCxGC-QMS.

Os resultados indicam que amostras que deveriam se apresentar no mesmo grupo que outras não o estão, é possível que tenha ocorrido algum tipo de contaminação de algumas amostras ou um processo diferenciado de envelhecimento.

Algumas amostras mais similares puderam ser separadas sugerindo que as estratégias e os métodos aplicados possibilitariam a aplicar a metodologia em dados de alta complexidade. Os resultados mostraram ainda que mesmo amostras provenientes de localidades vizinhas podem apresentar composição diferente e em alguns casos, localidades mais distantes apresentar composição similar.

CAPÍTULO 6:

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

A identificação de origem floral e/ou botânica de méis brasileiros atualmente vem sendo realizada através da análise polínica e parâmetros físico-químicos. A tipagem polínica é feita por comparação dos grãos de pólen encontrados com aqueles existentes em um banco de imagens. Contudo, como há uma variedade de formas e tipos de grãos de pólen, o método demanda tempo e necessita de especialistas bem qualificados para fazer a diferenciação.

Recentemente tem sido proposta a busca por compostos voláteis específicos que possam ser relacionados ao local de coleta e florada de origem do mel. Como o estudo de compostos voláteis de méis brasileiros ainda é recente e os resultados são escassos, a proposta do trabalho foi avaliar a possibilidade de diferenciação de méis do Piauí-Brasil empregando SPME para isolamento dos voláteis e análise por GC mono ou bidimensional

A metodologia de extração por SPME para voláteis de mel foi otimizada por meio de planejamento por matriz *Doehlert*. Os valores ótimos encontrados foram os mesmos descritos em [12]. Para implementação do método em análise de rotina, pode-se avaliar a possibilidade de diminuir o tempo de extração otimizado em 40 min para 10 ou 15 min.

Entretanto, um estudo de degradação da amostra por GC×GC sugeriu uma temperatura de extração inferior devido a formação de artefatos classificados como artefatos de extração, formados por processos de termólise, hidrólise e/ou oxidação. A influência no tempo de pré-tratamento da amostra foi avaliada, mostrando que a 60 °C por 240 min os cromatogramas bidimensionais são diferentes daqueles a 60 °C e 0 min. Cerca de 20 % do perfil cromatográfico bidimensional sofre alteração nos primeiros 30 min de

corrida, mascarando informação química valiosa (como marcadores de origem botânica e floral) devido a presença de artefatos. A maioria destes artefatos foram identificados como sendo compostos oxigenados heterocíclicos como HMF, 5-metilfurfural, furfural e benzenoacetaldeído. O aumento na detectabilidade e separação comparado a ¹D-GC unidimensional, deve ser levado em consideração na escolha por GC×GC ou ¹D-GC. Outro fator importante é que os artefatos de extração podem ser confundidos com marcadores de origem floral/geográfica quando a escolha é a cromatografia bidimensional.

A identificação dos compostos principais foi feita combinando-se informações presentes no GC×GC-FID com o poder de identificação do GC-MS, comparação do ¹D-LTPRI e os picos coeluídos foram identificados com procedimentos de deconvolução do GC-QMS.

Os resultados da classificação das amostras ainda não foram conclusivos porque foram avaliadas apenas amostras de um tipo de mel monofloral de algumas regiões distintas do Piauí. Entretanto, a combinação da HS-SPME com a cromatografia uni e/ou bidimensional aliado aos recursos da identificação por GC-QMS e ¹D-LPTRI demonstrou ser capaz de fornecer informações químicas valiosas na classificação destas amostras.

Seria viável a estruturação dos laboratórios brasileiros com GC-MS para o controle de qualidade do mel. Para um estudo de classificação de amostras de mel, tendo em vista a complexidade da mistura, a avaliação da fração volátil pode ser uma escolha viável. Os constituintes orgânicos da mistura podem ser relacionados com o local de coleta das amostras, e com o auxílio de ferramentas quimiométricas, seus cromatogramas poderiam ser usados como impressões digitais, possibilitando como resposta a separação de grupos de amostras provenientes de diferentes localidades e ou floradas.

“Não é digno de saborear o mel aquele que se afasta da colméia com medo das picadelas das abelhas”. *William Shakespeare*

CAPÍTULO 7:
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

1. CNNPA, 12 (1978). Disponível em: www.anvisa.gov.br > Acesso em: 24 de set. 2010.
2. Passamani, Lara. Estudo das características físicas, químicas e micromicrobiológicas de compostos de mel produzidos no Estado do Rio de Janeiro. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
3. Alissandrakis, E.; Tarantilis, P. A.; Harizanis, P. C.; Polissiou, M.; J. Sci. Food Agric., **85** (2005) 91.
4. <<http://www.sebrae-sc.com.br/noticias/default.asp?materia=18594>> Acesso: 24 de set. 2010.
5. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 23 de outubro de 2000.
6. BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº 685 de 27 de agosto de 1998. Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos - Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 28 de agosto de 1998.
7. Brasil, Ministério da Saúde. Decreto nº 55871 de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 09 de abril de 1965.
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 10 de 14 de abril de 2008. Programa Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, 17 de abril de 2008.
9. Schlabitz, C.; Ferreira da Silva, S. A. F.; Volken de Souza, C. F.; Rev. Bras. Tecnol. Agroind., 4, (2010) 80.
10. <<http://www.global21.com.br/materias/materia.asp?cod=30734&tipo=noticia>> Acesso em: 24 set. 2010
11. <<http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=44340>> Acesso: 24 de set. 2010.
12. <http://www.revistarural.com.br/edicoes/2008/Artigos/rev128_mel.htm> Acesso: 24 de set. 2010.

13. A. C. L. Silva. Tipificação de Méis Brasileiros por Micro-extração em Fase Sólida combinada com Cromatografia Gasosa (SPME-CG). Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
14. Moreira, R. F. A.; De Maria, C. A. B., *Quim. Nova.*, **24** (2001) 516.
15. Moreira, R. F. A.; De Maria, C. A. B.; *Quim. Nova.*, **26** (2003) 90.
16. Rossi, N. F.; Martinelli, L. A.; Lacerda, T. H. M.; Camargo, P. B. de.; Victoria, R. L.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **19** (1999) 199.
17. De Abreu Nunes, T.; *B. Enciclopédia Biosfera.*, **1** (2005) 1809.
18. Melo, Z. F. N.; Duarte, M. E. M.; Mata, M. E. R. M. C.. *Rev. Bras. Prod. Agroind.*, **5** (2003) 89.
19. <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/agosto2006/ju333pag4a.html > Acesso em: 12 dez. 2010
20. Odeh, I.A.; Abu-Lafi, S.; Dewik, H.; Al-Najjar, I.; Imam, A. ; M. Dembitsky, V. ; Hanus, L. O. ; *Food Chem.*, **101** (2007) 1393.
21. Tan, S.T.; Holland, P.T.; Wilkins, A.L.; Molan, P.C. ; *J. Agri. Food Chem.*, **36** (1988) 453.
22. Esti, M.; Panfili, G.; Marconi, E.; Trivisonno. ; *Food Chem.*, **58** (1997) 124.
23. Cajka, T.; Hajslova, J.; Pudil F.; Riddellova, K.; *J. Chromatogr A.*, **1216** (2009) 1458.
24. Bastos, D. H. M.; Franco, M. R. B.; Pereira da Silva, M. A. A. ; Janzanti, N. S. ; Marques, M. O. M.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **22** (2002) 122.
25. Soria, A. C.; Sanz J.; Martínez-Castro, I.; *Eur. Food Res. Technol.*, **228** (2009) 579.
26. Aire, E. R. B.; Freitas B. M.; *Ciênc. Agron.*, **32** (2001) 22.
27. <http://www.revistarural.com.br/edicoes/2008/Artigos/rev128_mel.htm > Acesso: 24 de setembro 2010.
28. Arruda, C. M. F.; Marchini, L. C.; Sodré G. S.; Moreti, A. C. C.; *B. Ind. Anim.*, **61** (2004) 141.
29. <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/marco2007/ju350pag4a.html> Acesso: em 30 set. 2010.
30. <<http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=1134&bd=1&pg=1&lg> > Acesso: em 12 nov. 2010.
31. Bogdanov, S.; Ruoff, K.; Persano Oddo, L.; *Apidologie.*, **35** (2004) 4.
32. Persano Oddo, L.; Bogdanov, S.; *Apidologie.*, **35** (2004) 2.
33. Persano Oddo, L.; Piazza, M. G.; Sabatini, A.G.; Accorti, M.; *Apidologie.*, **26** (1995) 453.

34. Lirio, F. C. Caracterização Físico-Química, Microbiológica e Sensorial de Méis Florais Irradiados. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
35. Bastos, D. H. M.; Franco, M. R. B.; Da Silva, M. A. A. P.; Janzantti, N. S.; Marques, M. O. M.; Cienc. Tecnol. Aliment., **22** (2002) 122.
36. Barth, O.M. O Pólen no Mel Brasileiro. Rio de Janeiro: Gráfica Luxor, 1989. p. 152
37. Barth, O.M.; Sci. Agric., 61(2004) 342.
38. Métodos de pesquisa, laboratório de abelhas USP. Disponível em <http://www.webbee.org.br/pesquisa/melissopalino.htm>> Acesso: em 12 nov. 2010.
39. Análise do mel, laboratório de farmacognosia, Universidade Federal do Paraná. Disponível em: http://people.ufpr.br/~cid/farmacognosia_I/Apostila/mel.pdf> Acesso: em 22 nov. 2011.
40. M. Maria, P. A. Russo- Almeida, J.O. B. Pereira.; Rev. Port. Zotec., **IX** (2002) 79.
41. Luz, C. F. P.; Thomé M. L.; Barth, O. M.; Rev. Bras. Bot., **30** (2007), 29.
42. Alves, L.R.; Araújo, A. A.; Bastos, E.; Siqueira Neto, J.L. Aplicação da Computação na Identificação de Pólen em Produtos Apícolas, Relatório Técnico, 1999, Belo Horizonte, MG.
43. Codex Alimentarius Committee on Sugars. Codex standard 12, Revised Codex Standard for Honey. Stand. Methods 2001, 11, 1.
44. European Commission. Council Directive 2001/110/EC de 20 December 2001 relating to honey. Off. J. Eur. Communities 2002, L10, 47.
45. PIANA, M. L. et al.; Apidologie., **35** (2004) 26.
46. ARAÚJO, A. H.; Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17. Fortaleza, 2000. **Anais** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1 (2000). p. 344.
47. Anupama, D.; Bhat, K. K.; Sapna, V. K.; Food Res. Int., **36** (2003) 183.
48. Bastos, D. H. M. Aroma de méis de laranja e eucalipto. In: Franco, M. R. B. Aroma e Sabor de Alimento: Temas Atuais. São Paulo: Varela, 2003. p. 143.
49. Coultate, T. P. Alimentos: a Química dos Seus Componentes. 3^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 368.
50. Arpana, A. R.; Rajalaksmi. ; Food Rev. Int., **15** (1999) 455.
51. Brasil, Ministério da Agricultura. Portaria SIPA n° 367 de 04 de setembro de 1997. Normas higiênico-sanitárias e tecnológicas para mel, cera de abelha e derivados.

52. Marchini, L. C.; Moreti.; A. C. C. C. Otsuk, I. P.; Ciênc. Tecnol. Aliment., 25 (2005) 8.
53. Carvalho, C. A. L. et al.; Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia; Seagri-BA, 2005. 32 p
54. BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 23 out.2000. p.16.
55. Bera, A.; Almeida-Muradian, L. B.; Ciênc. Tecnol. Aliment., 27 (2007) 49.
56. International Trade Forum Upswing in the honey market. International Trade Forum, Geneva, 13 (1997) 21.
57. Deborah H. Markowicz Bastos, D. H. M.; Silva, M. A. A. P.; Franco, M. R. B.; Aliment. Nutr., 9 (1998) 77.
58. Baroni, M.V.; Nores, M.L.; Diaz, M. P.; Chiabrande, G. A., Fassano, J. P.; Costa, C.; Wunderlin, D. A.; J. Agric. Food Chem., 54 (2006) 7235.
59. Radovic, B. S.; Careri, M.; Mangia, A.; Musci, M.; Gerboles, M.; Anklam, E.; Food Chem., 72 (2001) 511.
60. Moreira, R. F.A.; De Maria, C. A. B.; Pietroluongo, M.; Tugo, L. C.; Food Chem., 121 (2010) 697.
61. Barra, M. P. G.; Ponce-Díaz, M. C.; Venegas-Gallego, C.; Chil. J. Agric. Res., 70 (2010) 75.
62. Campos, G.; Nappi, G. U.; Raslan, D. S; Augusti, R.; Ciênc. Tecnol. Aliment., 20 (2000) 18.
63. Jerković, I.; Marijanović, Z.; Kezić, J.; Gugić Mirko.; Molecules., 14 (2009) 2717.
64. Alissandrakis, E.; Tarantilis, P.A.; Harizanis, P.C.; Polissiou, M. ; J. Agric. Food Chem., 55 (2007) 8152.
65. Alissandrakis, E.; Tarantilis, P. A.; Harizanis, P. C.; Polissiou, M.; Food Chem., 100 (2007) 396.
66. Arthur, C. L.; Pawliszyn, J.; Anal. Chem., 62 (1990) 2145.
67. Pontes, M.; Marques, J.C.; Câmara, J.S.; Talanta 74 (2007) 91.
68. Cuevas-glory et al., Food Chem., 103 (2007) 1032.
69. Lopes, Alexandre Leite. Preparo, Caracterização e Aplicação de Materiais Sorventes para Microextração Orgânica. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
70. Piasenzotto, L., Gracco, L., Conte, L.; J. Sci. Food Agric., 83 (2003) 1037.
71. Lopes, A. L.; Valente, A. L. P.; Augusto, F.; Analytica, 2 (2002) 25.

72. Nome, R. C. Uso de Um Novo Método de Agitação para Microextração em Fase Sólida – SPME – na Determinação de Fenóis em Água. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2002.
73. Cajka, T.; J. Hajslova, J. Cochran, K. Holadov, E. Klimankova., J. Sep. Sci. **30** (2007) 534.
74. Miguel Herreroa, M.; Ibáñez E.; Cifuentesb, A.; Bernalb, J.; J. Chromatogr. A., **1216** 7110.
75. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. T.; Trends Anal. Chem., **25** (2006) 438.
76. Liu, Z. Y.; Phillips, J.; J. Chromatogr. Sci., **29** (1991) 227.
77. Pedroso, Marcio Pozzobon. Projeto e Avaliação de um Modulador Criogênico para Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
78. Pozzobon, M. P.; Godoy, L. A. F.; Fidélis, C. H. V.; Ferreira, E. C.; Poppi, J. R.; Augusto, F; Quim. Nova., **32** (2009) 421.
79. Adahchour, M.; Beens, J.; Brinkman, U. A. Th.; J. Chromatogr. A **1186** (2008) 67.
80. Von Mühlen, C.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Marriott, P. J.; Quim. Nova., **29** (2006) 765.
81. Von Mühlen, C.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Marriott, P. J.; Quim. Nova., **30** (2007) 682.
82. Hantao, Leandro Wang. Microextração em Fase Sólida e Cromatografia Bidimensional Abrangente: Aplicações em Lipidômica. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.
83. Ledford, E. B.; Field Anal. Chem. Technol., **1** (1996) 23.
84. Silva, J. M.; Zini, C. A.; Caramão, E. B. ; Quim. Nova., **33** (2010) 591.
85. L. Mondello, P. Q. ; Tranchida, P. Q.; Dugo,G.; Mass Spectrom. Rev. **27** (2008) 101.
86. Pursch, M.; Eckerle, P.; Biel, J.; Streck.; Cortes, H.; Sun, K.; Winniford, B., J. Chromatogr. A., **1019** (2003) 43.
87. Phillips, J. Beens.; J. Chromatogr. A **856** (1999) 331.
88. Dallüge, J.; Beens, J.; Brinkman, U. A. Th.; J. Chromatogr. A., **1000** (2003) 69.
89. Schmarr, H. G.; Bernhardt, J. ; J. Chromatogr. A., **1217** (2010) 565.
90. Stanimirova, B. Ustun, T. Cajka, K. Riddelova, J. Haslova, L. M. C. Buydens, B. Walczak, Food Chem., **118** (2010), 171.
91. Maillard, L. C., Action des acides amines sur les sucres; formation de melanoidines par voie méthodique, Compt. Rend. Acad. Sci. Ser.2, 154, 66-68 (1912).

92. Augusto, F.; Valente, A. L. P.; Tada, E. S.; Rivellino, S. R.; J. Chromatogr. A., **873** (2000) 117.
93. Sartoratto, A.; Augusto, F., Chromatographia., **57** (2003) 351.
94. Augusto, F.; Silva, G. A.; Poppi, R. J.; Food Chem., **111** (2008) 1057.
95. Pini, F. G.; Brito, E. S.; Garcia, N. H. P.; Valente, A. L. P.; Augusto, F.; J. Braz. Chem. Soc., **15** (2004) 267.
96. Oliveira, A. M.; Pereira, N. R.; Junior, A. M.; Augusto, F.; J Chromatogr. A., **1025** (2004) 115.
97. Setkova, L.; Risticovic, S.; Pawliszyn, J.; J. Chromatogr. A., **1147** (2007) 224.
98. Ribeiro, J.; Augusto, F.; Salva, T.; Thomaziello, R.; Ferreira, M.; Anal. Chim. Acta., **634** (2009) 172.
99. J. Pawliszyn, Anal. Chem. **75** (2003) 2543.
100. Von der Ohe, W.; Persano Oddo, L.; Piana, M. L.; Morlot, M.; Apidologie., **35** (2004) 18.
101. Mateo, R.; Bosch-Reig, F.; J. Agric. Food Chem., 46 (1998) 393.
102. Marchini, L.C.; Sodr e, G.S.; Moreti, A.C.C. Mel Brasileiro: Composi o e Normas. Ribeirão Preto: A.S.P., 2004, p. 111.
103. Aliferis, K. A.; Tarantilis, P.A.; Harizanis, P.C.; Alissandrakis, E.; Food Chem. **121.**, (2010) 856.
104. Liang, Y.; Cao, W.; Chen, W.; Xiao, X.; Zheng, J.; Food Chem. **114** (2009) 1537.
105. H. D. Belitz W. Grosch, Food Chem. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg, 1987
106. Alissandrakis, E.; Kibaris, A.C.; Tarantilis, P.A.; Harizanis P.C.; Polissiou, M.; J Sci Food Agric **85** (2005)1444.
107. Graddon, A. D.; Morrison, J. D.; Smith, J. S.; J. of Agric. Food Chem., **27** (1979) 832.
108. Serra, B. J.; Coll, V.; J. Agric. Food Chem. **43** (1995).
109. Guidotti M.; Vitali, M.; Ind Aliment., **37** (1998) 351.
110. Bouseta, A., Collin, S., Dufour, J.P. J. Apic. Research., **31** (1992) 96.
111. Bouseta, A.; Scheirman, V., Collins, S.; J. Food Science **61** (1996) 683-687.
112. Fuente, E.; Valencia-Barreta, R. M.; Martinez-Castro, I.; Food Chemistry **103** (2007) 1176.
113. Verzera, A.; Campisi S.; Zappala M.; Bonaccorsi, I.; Am. Lab News **7** (2001)18.
114. Pérez, R. A.; Sánchez-Brunete C.; Calvo, R. M.; Tadeo, J. L.; J. Agric. Food Chem., **50** (2002) 2633.
115. Visser, J. W.; Allen, J. M.; Shaw, G. J., J. Apic. Res. **27** (1988) 175.

116. Tosi, E.; Chiappini, M. Ré, E. *Food Chem.* **77** (2002) 71.
117. Bertelli, Davide.; Papotti, G.; Lolli, M.; Sabatini, A. G.; Plessi, M.; *Food Chem.*, **108** (2008) 297.
118. Glória, M.B.A.; Gray, J. I.; Grulke, E.A.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **11** (1991) 36.
119. Shimoda, M., Wu, Y., Osajima, Y.; *J. Agric. Food Chem.*, **44** (1996) 3913.
120. Jerkovic, I.; Marijanovic, Z.; Tuberoso C.I.G.; Bubalo, D.; Kezic, N.; *Mol Divers* **14** (2010) 237.
121. Ribeiro, M. C.; Moreira, R. F. A.; De Maria, C.A.B.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **28** (2008) 169.
122. Verzera, A.; Campisi, S.; Zapalla, M.; Bonaccorsi, I.; *Am. Lab.*, **7** (2001) 15.
123. Pérez R.A, Sánchez-Brunete C, Calvo R.M, Tadeo .JL.; *J. Agric. Food Chem.*, **50** (2002) 2633.
124. Cuevas-Glory, L. F.; Pino, J. A.; Santiago, L. S.; Sauri-Duch, E.; *Food Chem.*, **103** (2007) 1032.
125. De la Fuente, E., Martínez-Castro, I., Sanz, J.; *J. Sep. Sci.*, **28** (2005).
126. Soria, A. C.; Gonzalez, M.; De Lorenzo, C.; Martinez-Castro, I.; Sanz.; *Food Chem.*, **85** (2004) 121.
127. Soria, A. C.; Martinez-Castro, I.; Sanz, J.; *J. Sep. Sci.*, **26** (2003) 793.
128. D'Auria, M.; Fedeli, P.; Mauriello, G., Racioppi, R., *Int. J. Food Sci. Technol.* **39** (2004) 1079.
129. Ampuero S.; Bogdanov S.; Bosset, J. O; *Eur. Food Res. Technol.* **218** (2004) 198.
130. Mannas, D.; Altug, T.; *Int. J. Food Sci Technol.*, **42** (2007) 133.
131. Supelco, Bellefonte, PA 16823-0048 USA.
132. Jerković, I.; Tuberoso C.I.G.; Marijanović, Z.; Jelić, M.; Kasum, A.; *Food Chem.* **112** (2009) 239.
133. M. Sklee, Inlet Systems in Gas Chromatography, in: R. L. Grob, *Modern Practice of Gas Chromatography*, J. Wiley, New York, 1995.
134. Alissandrakis, E.; Tarantilis, P. A.; Harizanis, P. C.; Polissiou, M.; *J. Agric. Food Chem.*, **55** (2007) 8152.
135. Alissandrakis, E.; Tarantilis, P. A.; Harizanis, P. C.; Polissiou, M.; *Food Chem.*, **111** (2008) 988.
136. Mayadunne, R.; Nguyen, T. T.; Marriot, P. J.; *Anal. Bioanal. Chem.* **382** (2005) 836.
137. Mondello, L.; Casilli, A.; Tranchina, P. Q.; Dugo, P.; Costa, R.; Festa, S.; Dugo, G., *J. Sep. Sci.* **27** (2004) 442.

138. Ristisevic, S.; Carasek, E.; Pawliszyn, J.; *Anal. Chim. Acta*, **617** (2008) 72.
139. Pedroso, M. P.; L. A. F. de Godoy, E. C. Ferreira, R. J. Poppi, F. Augusto; *J. Chromatogr. A.*, 1201 (2008) 176
140. Bentivenga, G.; D'Auria, M. ; Fegeli, P.; Mauriello, G.; Racioppi, R.; *Inter. J. Food Sci. Technol.*, **39** (2004) 1079.
141. Bastos, D. H. M; Compostos voláteis de méis de eucalipto e laranja. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
142. Moreira, R. F. A.; Trugo, L. C.; Pietroluongo, M.; De Maria, C. A. B., *J. Agric. Food Chem.*, **50** (2002) 7616.
143. Overton, S. V., Manura, J. J.; *Am. Lab.*, **26** (1994), 45.
144. Blank, I.; Fischer K.H.; Grosch W. ; *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1989, 189, 426.
145. Adams, R. P.; *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*; Altire, Carol Stream (1995).
146. Ferreira, E. C. Softwares para Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC x GC). Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
147. Teófilo, R. F.; Ferreira, M. C.; *Quim. Nov.*, **29** (2006) 338.
148. Silva, G. A. Utilização de Métodos Quimiométricos em Cromatografia Gasosa com Microextração em Fase Sólida. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
149. Rivellino, S. R. Desenvolvimento de uma Sistemática para SPME-GC com Injetores de Controle Eletrônico. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
150. D'arcy, B. D.; Rintoul, G.B.; Rowland, C. Y.; Blackman, A. J.; *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997) 1834.