



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Departamento de Química Analítica

TESE DE DOUTORADO

**TIPIFICAÇÃO DE MÉIS BRASILEIROS POR MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE
SÓLIDA COMBINADA COM CROMATOGRAFIA GASOSA (SPME-CG)**

Autora
Ana Claudia Lemes da Silva

Orientador
Prof. Dr. Fabio Augusto

Campinas

Dezembro/2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP

Si39t	<p>Silva, Ana Claudia Lemes da. Tipificação de méis brasileiros por micro-extração em fase sólida combinada com cromatografia gasosa (SPME-CG) / Ana Claudia Lemes da Silva. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.</p> <p>Orientador: Fabio Augusto</p> <p>Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. Mel. 2. Voláteis . 3. SPME. 4. Tipificação. I. Augusto, Fabio. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	---

Título em inglês: Characterization of Brazilian honeys by solid phase microextraction gas chromatography (SPME-GC)

Palavras-chaves em inglês: Honey, Volatiles, SPME, Characterization

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Fabio Augusto (orientador), Janete Harumi Yariwake (IQSC-USP-São Carlos), Maria Cristina Marcucci Ribeiro (UNIBAN-SP), Anita Jocelyne Marsaioli (IQ-Unicamp), Carol Hollingworth Collins (IQ-Unicamp)

Data de defesa: 18/12/2006

*“Nada me perturbe, nada me amedronte, tudo passa,
a paciência tudo alcança!”*

*Tereza de Cepeda y Ahumada
(1515 – 1582)*

DEDICO ESTE TRABALHO,
A DEUS, POR SE FAZER PRESENTE EM TODOS OS MOMENTOS DA MINHA VIDA;

A LEONARDO, MEU MARIDO, PELOS MOMENTOS COMPARTILHADOS E
PELO APOIO INCONDICIONAL NA BUSCA DOS MEUS SONHOS E METAS;

E AOS MEUS PAIS, WILSON E ANA, PELO EXEMPLO DE VIDA E DEDICAÇÃO.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Fabio Augusto, pela orientação e apoio no desenvolvimento deste trabalho, pelo exemplo de postura acadêmica e pela disponibilidade em me “adotar” como orientada após o falecimento do prof. Pires.

Ao Prof. Dr. Antonio Luiz Pires Valente (in memoriam) pela amizade, pela boa convivência, pelo exemplo de vida acadêmica e de amor pelo ensino da Química.

Ao Prof. Dr. Nivaldo Baccan pela amizade e pela oportunidade de convivência.

Ao pessoal da Naturalabor por despertarem meu interesse no estudo dos méis e pelo fornecimento de algumas amostras.

Ao colega Luiz Carlos Pataca pelo compartilhamento de amostras de mel.

Ao José Luiz Paz Jara pela obtenção dos espectros de massa, pelas conversas e divertida convivência, mesmo quando as análises não iam bem.

Ao pessoal do Laboratório de Cromatografia Gasosa, aqueles que já passaram, Gláucia, Ana Maria, Alexandre, Rogério, Claudine e Cássio e aqueles que ainda estão por aqui, Adilson, Adriano, Carlos, Claudia, Eduardo, Ernesto, Gago, Gilmare e Raquel.

A Fernanda e a Rita, pelo trabalhos extras, com produtos naturais.

As amigas, Alexandra e Eliana, pelos exemplos de vida e de fé.

Ao pessoal da Faculdade de Paulínia, em especial prof. Dr. Nelson Gentil, Solange e Adriana por acreditarem no meu trabalho e me incentivarem a prosseguir.

A Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química pela infraestrutura e apoio oferecidos, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

A todos, muito obrigada !

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Mestrado em Química Analítica – Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas – SP, 2001. Título: “Modificação, Caracterização e Avaliação de um Protótipo para uso em Sistema de Detecção por Emissão Atômica para Cromatografia Gasosa.” Orientador: Prof. Dr. Antonio Luiz Pires Valente.

Licenciatura em Química – Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas – SP, 1998.

Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas – Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, Campinas – SP, 1997.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

VALENTE A. L. P., AUGUSTO F., LEMES A. C., LUKJANENKO K., “Use of a computer controlled hand-scanner for quantitative thin layer chromatographic analysis”. *Anal. Commun.* **34** (7): 193-194 JUL 1997.

ATIVIDADE DOCENTE

Instituto de Educação Superior São Paulo - Faculdade de Paulínia (fev/2002 – jul/2006).
Afastada por 2 anos (ago/2006 – jul/2008) devido a mudança para os EUA.

- Docente responsável pelas disciplinas de Química Geral, Química Analítica e Análise Instrumental (teoria e prática).
- Coordenadora do Curso de Bacharelado em Química, responsável pelo Reconhecimento do Curso pelo Ministério da Educação (Portaria 223 de 7 de junho de 2006).

Prefeitura Municipal de Paulínia – Escola Técnica de Paulínia (fev/1999 – mar/2006).
Afastada por 2 anos (mar/2006 – mar/2008) devido a mudança para os EUA.

- Orientadora e Supervisora de Estágios dos Alunos do Curso Técnico em Química.
- Elaboradora e corretora das provas para ingresso de novos alunos (Vestibulinho).
- Docente responsável pelas disciplinas de Análise Quantitativa (teoria e prática), Análise Instrumental (teoria e prática), Química Orgânica (teoria e prática), Química do Meio Ambiente (teoria e prática) e Gestão da Qualidade (teoria).

Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial – Senai Paulínia (fev/2001 – mar/2006)

- Instrutora do Curso de Formação de Novos Operadores de Produção e Refino de Petróleo e Gás - Replan na área de Química.

- Instrutora do Curso de Formação Continuada de Operadores da Replan na área de Toxicologia Industrial.

- Docente responsável pelas disciplinas de Análise Instrumental, no curso de Técnico em Química; Química Geral e Análise Quantitativa, no curso de Laboratorista Industrial; Química Geral, Química Inorgânica, Química Orgânica e Gestão Ambiental no curso de Operador de Indústrias Químicas.

Unicamp – Universidade Estadual de Campinas (2003) - Campinas – SP

- Programa de Capacitação Docente (PED) nível I, livre docência. Aulas teóricas da disciplina de Química Geral para alunos do curso de Engenharia Mecânica (1º sem/2003).

- Programa de Capacitação Docente (PED) nível I, livre docência. Aulas práticas da disciplina de Química para alunos dos cursos de Engenharia Elétrica e Ciência da Computação (2º sem/2003).

CURSOS E PALESTRAS MINISTRADOS

“Pesquisa para o Ensino de Química” - IV SIMPEQ – set/2004.

“O uso da Micro-extração em Fase Sólida para Análise de Compostos Voláteis em Mel” - I Workshop de Pesquisas Natural Labor/Ciatec – set/2004.

“Cromatografia: Ciência e Arte” - Ciclo de Palestras do Conselho Regional de Química – IV Região – jun/2004.

“Transformando a Química em Arte” – curso promovido pela Secretaria de Educação do Município de Paulínia, no 13º Encontro de Educadores – jul/2003.

“Poluição e Qualidade de Vida” – palestra promovida pela Fundação José Pedro de Oliveira, no Projeto Educação Ambiental Comunitária – out/2001.

“Gestão Ambiental” – curso promovido pelo Centro de Treinamento Senai Paulínia – jun/2001.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS (nos últimos 3 anos):

Nacionais: 28

Internacionais: 3

RESUMO:

TIPIFICAÇÃO DE MÉIS BRASILEIROS POR MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COMBINADA COM CROMATOGRAFIA GASOSA (SPME-CG)

O mel é uma das misturas mais complexas de carboidratos produzida pela natureza. É um alimento energético muito importante pelas suas propriedades nutritivas, pelo seu aroma e sabor que dependem fortemente das plantas, flores e condições climáticas presentes na região geográfica onde está localizada a colméia. Não existem metodologias que possibilitem identificação não subjetiva, rápida e confiável da origem floral do mel. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia que permitisse a identificação da origem floral de méis brasileiros a partir da caracterização química de sua fração de voláteis utilizando micro-extração em fase sólida através do *headspace* e cromatografia gasosa (HS-SPME-CG). Para o desenvolvimento da metodologia, foram avaliadas 90 amostras de méis brasileiros de vinte origens florais diferentes e variadas procedências geográficas. Onze destas amostras eram unitárias e permitiram apenas um estudo exploratório. Cada tipo de mel apresentou um perfil cromatográfico diferente. Foram identificados potenciais marcadores para os méis de eucalipto (*Eucalyptus sp*), laranja (*Citrus sp*), assa-peixe (*Vernonia polianthes*), cambará (*Lantana montevidensis*), morrão de candeia (*Croton sp*) e marmeleiro (*Cydonia vulgaris*). Os resultados obtidos mostraram que SPME-CG é útil na tipificação de méis e pode eventualmente ser utilizada na sua certificação.

ABSTRACT:

CHARACTERIZATION OF BRAZILIAN HONEYS BY SOLID PHASE MICROEXTRACTION GAS CROMATROGRAPHY (SPME-GC)

Honey is one of the most complex mixtures of carbohydrates produced by Nature. It is a very important energetic food for its nutritional properties and for its aroma and flavor that depend strongly on the fauna, flowers and on the climatic conditions in the geographic region where the beehive is located. There are no objective, fast and reliable methodologies for the identification of the floral source of honeys. The objective of this work was to develop a methodology to allow identification of the floral source of Brazilian honeys through characterization of its volatile fraction using headspace solid phase microextraction and gas chromatography (HS-SPME-GC). To develop the methodology, 90 samples of Brazilian honeys of twenty different botanical sources and several geographic locations were employed. Eleven honey types had just one sample, allowing only exploratory studies. Different chromatographic profiles were obtained for honeys from different floral sources. Potential chemical markers were identified for the honeys of eucaliptus (*Eucalyptus sp*), orange (*Citrus sp*), assa-peixe (*Vernonia polianthes*), lantana (*Lantana montevidensis*), morrão of candeia (*Croton sp*) and quince (*Cydonia vulgaris*). The results obtained showed that SPME-GC is useful to identify the floral origin of honey and may eventually be used for its certification.

SUMÁRIO:

LISTA DE TABELAS	xxvii
LISTA DE FIGURAS	xxix
1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	01
1.1 <i>O mel</i>	03
1.2 <i>Cenário Brasileiro</i>	04
1.3 <i>Determinação da Origem Floral de Méis</i>	05
1.4 <i>O Problema</i>	07
2. OBJETIVOS	09
3. ESTUDOS COM MÉIS	11
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	13
1.1 ABELHAS	13
1.2 MEL DE ORIGEM FLORAL	15
1.3 MÉTODOS EMPREGADOS PARA CARACTERIZAÇÃO DE MÉIS	17
1.3.1 <i>Métodos Gerais</i>	17
1.3.2 <i>Análise de Compostos Voláteis</i>	22
1.4 MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	25
1.5 ANÁLISE DE MÉIS BRASILEIROS	28
CAPÍTULO 2 – ESTUDOS PRELIMINARES – OTIMIZAÇÃO	31
2.1 MATERIAIS	33
2.1.1 <i>Reagentes</i>	33
2.1.2 <i>Méis</i>	33
2.1.3 <i>Outros Materiais</i>	33
2.1.4 <i>Condições Cromatográficas</i>	33
2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
2.2.1 <i>Avaliação do Efeito da Força Iônica</i>	34
2.2.2 <i>Estudo do Tempo de Extração e Seleção da Fibra de SPME</i>	39
2.2.3 <i>Otimização da Extração por SPME</i>	41
2.2.4 <i>Avaliação da Influência da Massa de Amostra Utilizada</i>	45
2.3 CONCLUSÕES PARCIAIS	47
CAPÍTULO 3 – CARACTERIZAÇÃO DE MÉIS BRASILEIROS	49
3.1 MATERIAIS	51
3.1.1 <i>Reagentes</i>	51
3.1.2 <i>Méis</i>	51
3.1.3 <i>Outros Materiais</i>	51

3.1.4	<i>Condições Cromatográficas</i>	52
3.1.5	<i>Software para Processamento dos Cromatogramas</i>	52
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.2.1	<i>Mel de Angico de Bezerro (Piptadenia moniliformis)</i>	54
3.2.2	<i>Mel de Aroeira (Schimus terenthifolius)</i>	57
3.2.3	<i>Mel de Assa-Peixe (Vernonia polianthes less)</i>	61
3.2.4	<i>Mel de Cambará (Lantana montevidensis)</i>	63
3.2.5	<i>Mel de Marmeleiro (Cydonia vulgaris)</i>	66
3.2.6	<i>Mel de Morrão de Candeia (Croton sp)</i>	69
3.3	CONCLUSÕES PARCIAIS	71
CAPÍTULO 4 – CARACTERIZAÇÃO DE MÉIS DE EUCALIPTO		73
4.1	MATERIAIS	75
4.1.1	<i>Reagentes</i>	75
4.1.2	<i>Méis</i>	75
4.1.3	<i>Outros Materiais</i>	76
4.1.4	<i>Condições Cromatográficas</i>	76
4.1.5	<i>Software</i>	76
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.2.1	<i>Amostras com Informações de Análise Melissopalinológica</i>	76
4.2.2	<i>Amostras sem Informações de Análise Melissopalinológica</i>	79
4.3	CONCLUSÕES PARCIAIS	84
CAPÍTULO 5 – CARACTERIZAÇÃO DE MÉIS DE LARANJEIRA		85
5.1	MATERIAIS	87
5.1.1	<i>Reagentes</i>	87
5.1.2	<i>Méis</i>	87
5.1.3	<i>Outros Materiais</i>	87
5.1.4	<i>Condições Cromatográficas</i>	87
5.1.5	<i>Software</i>	87
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.2.1	<i>Avaliação de Amostras de Mel de Laranja</i>	87
5.2.2	<i>Reclassificação de uma Amostra de Outra Variedade de Mel</i>	91
5.3	CONCLUSÕES PARCIAIS	93
CAPÍTULO 6 – CARACTERIZAÇÃO DE OUTROS MÉIS BRASILEIROS		95
6.1	MATERIAIS	97
6.1.1	<i>Reagentes</i>	97
6.1.2	<i>Méis</i>	97
6.1.3	<i>Outros Materiais</i>	97
6.1.4	<i>Condições Cromatográficas</i>	97
6.1.5	<i>Software</i>	97
6.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
6.2.1	<i>Mel de Camboatã ou Cupânia (Cupania oblongifolia)</i>	98
6.2.2	<i>Mel de Canudo- de-Pito (Senna bicapsularis)</i>	100
6.2.3	<i>Mel de Capixingui (Croton floribundus)</i>	102

6.2.4 Mel de Cipó-cabeludo (<i>Mikania hirsutissima</i>)	104
6.2.5 Mel de Cip-uva (<i>Serjania sp.</i>)	106
6.2.6 Mel de Espinheiro(<i>Stryhnos nigricans</i>)	108
6.2.7 Mel de Jitirana (<i>Ipomoea glabra</i>)	110
6.2.8 Mel de Palmeira (<i>Archontophoenix cunningamiana</i>)	112
6.2.9 Mel de Tataré (<i>Chloroleucon tortum</i>)	114
6.3 CONCLUSÕES PARCIAIS	117
4. CONCLUSÕES	119
5. REFERÊNCIAS	121

LISTA DE TABELAS:

TABELA 1.1	Compostos identificados e apontados como possíveis marcadores de origem floral ou geográfica de méis.....	23
TABELA 2.1	Área total do cromatograma obtido com diferentes fibras de SPME nos tempos de de extração estudados.....	40
TABELA 2.2	Fatores e níveis empregados no planejamento fatorial 2^4	42
TABELA 2.3	Condições de extração previstas no planejamento fatorial 2^4 completo e áreas totais dos cromatogramas obtidos.....	43
TABELA 2.4	Efeitos calculados para o planejamento fatorial 2^4	44
TABELA 2.5	Valores de área para alguns picos identificados na amostra de mel silvestre.....	46
TABELA 3.1	Relação das amostras de méis brasileiros classificadas pela florada.....	51
TABELA 3.2	Relação das amostras de méis brasileiros classificadas pela região de origem.....	53
TABELA 3.3	Compostos identificados nas amostras de mel de angico-de-bezerro.....	56
TABELA 3.4	Compostos identificados nas amostras de mel de aroeira.....	59
TABELA 3.5	Compostos identificados nas amostras de mel de assa-peixe.....	62
TABELA 3.6	Compostos identificados nas amostras de mel de cambará.....	64
TABELA 3.7	Compostos identificados nas amostras de mel de marmeleiro.....	67
TABELA 3.8	Compostos identificados nas amostras de mel de morrão de candeia.....	70
TABELA 4.1	Resultados da Análise Melissopalínológica para amostras de mel de eucalipto.....	77
TABELA 4.2	Compostos identificados nas amostras de mel de eucalipto com informações de Análise Melissopalínológica.....	79

TABELA 4.3	Compostos identificados nas amostras de mel de eucalipto sem informações de Análise Melissopalínológica.....	82
TABELA 4.4	Compostos detectados em folhas de eucalipto [65] e nos diferentes méis de eucalipto estudados	83
TABELA 5.1	Compostos identificados nas amostras de mel de laranjeira.....	89
TABELA 6.1	Relação das amostras de méis brasileiros classificadas pela florada.....	97
TABELA 6.2	Compostos identificados na amostra de mel de camboatã	99
TABELA 6.3	Compostos identificados na amostra de mel de canudo-de-pito.....	101
TABELA 6.4	Compostos identificados na amostra de mel de capixingui.....	103
TABELA 6.5	Compostos identificados na amostra de mel de cipó-cabeludo.....	105
TABELA 6.6	Compostos identificados na amostra de mel de cipó-uva.....	107
TABELA 6.7	Compostos identificados na amostra de mel de espinheiro.....	109
TABELA 6.8	Compostos identificados na amostra de mel de jitirana.....	111
TABELA 6.9	Compostos identificados na amostra de mel de palmeira.....	113
TABELA 6.10	Compostos identificados na amostra de mel de tataré.....	115

LISTA DE FIGURAS:

- FIGURA 1.1 Anatomia interna da abelha [23, 24]. Em destaque o papo ou estômago de mel, local onde a abelha armazena e processa o mel enquanto transporta o material para ser regurgitado no interior da colméia14
- FIGURA 1.2 (A) Esquema do fluxo da análise melissopalínológica. Microfotografias obtidas de lâminas preparadas para análise de (B) mel europeu (C) mel americano [42].....21
- FIGURA 1.3 Procedimento básico para micro-extração em fase sólida através do *headspace*. Primeira etapa: (A) saturação do *headspace*, (B) exposição da fibra de SPME para extração dos analitos, e (C) retração da fibra para o interior da agulha hipodérmica. Segunda etapa: (D) perfuração do septo do injetor do cromatógrafo a gás, (E) exposição da fibra para dessorção dos analitos, e (F) retração da fibra para o interior da agulha.....25
- FIGURA 2.1 Perfil cromatográfico obtido por GC-FID para mel silvestre com amostragem em *headspace* e fibra de PDMS.....35
- FIGURA 2.2 Perfil cromatográfico obtido por GC-FID para mel silvestre com amostragem em *headspace* e fibra de CBXEN.....35
- FIGURA 2.3 Perfil cromatográfico obtido por GC-FID para amostragem em *headspace* de mel silvestre em solução aquosa (50% m/v) com fibra de PDMS.....36
- FIGURA 2.4 Perfil cromatográfico obtido por GC-FID para amostragem em *headspace* de mel silvestre em solução aquosa (50% m/v) com fibra de CBXEN.....36
- FIGURA 2.5 Perfil cromatográfico obtido por GC-FID para amostragem em *headspace* de mel silvestre em solução salina (50% m/v) com fibra de PDMS.....37
- FIGURA 2.6 Perfil cromatográfico obtido por GC-FID para amostragem em *headspace* de mel silvestre em solução salina (50% m/v) com fibra de CBXEN.....38
- FIGURA 2.7 Perfis de extração obtidos para as diferentes fibras estudadas.....40
- FIGURA 2.8 Cromatograma de íons totais típico para amostra de mel silvestre. Picos identificados na Tabela 2.5.....46
- FIGURA 3.1 Cromatogramas de íons totais para mel de angico de bezerro (amostras A, B, C, D e E)55
- FIGURA 3.2 Espectro de massas para o composto não identificado (RI = 1083).....56

FIGURA 3.3	Espectro de massas do composto identificado como 3,7-dimetil- 1,5-octadieno-3,7-diol (terpenodiol-I) (RI = 1099).....	57
FIGURA 3.4	Cromatogramas de íons totais para mel de aroeira (amostras A , B e C).....	58
FIGURA 3.5	Espectro de massas do composto identificado como 2-metil-2-(3-metil-2-oxobutil)-1-cicloexanona (RI = 1063).....	60
FIGURA 3.6	Cromatograma de íons totais típico para mel de assa-peixe (amostra C)	61
FIGURA 3.7	Cromatograma de íons totais típico para mel de cambará (amostra A).....	64
FIGURA 3.8	Cromatograma de íons totais típico para mel de marmeleiro (amostra C) ..	67
FIGURA 3.9	Espectro de massas para o composto não identificado (RI = 1108).....	68
FIGURA 3.10	Cromatograma de íons totais para mel de morrão de candeia (amostras A , B e C).....	69
FIGURA 4.1	Microfotografias de grãos de pólen das espécies encontradas nos méis de eucalipto. (1) <i>Eucalyptus</i> ; (2) <i>Vernonia</i> ; (3) <i>Astronium</i> ; (4) <i>Baccharis</i> ; (5) <i>Cecropia</i> ; (6) <i>Serjanea</i> [97].....	77
FIGURA 4.2	Cromatogramas de íons totais para mel de (PUR) eucalipto puro, (HET) heterofloral com predominância de eucalipto e (ANT) eucalipto com <i>Antigonon leptopus</i>	80
FIGURA 5.1	Cromatogramas de íons totais para mel de laranjeira: (A) amostra 1 (B) amostra 2 (C) amostra 3.....	88
FIGURA 5.2	Cromatogramas de íons totais (A) mel de laranjeira (Figura 5.1C, p.78), (B) suposto mel de marmeleiro, (C) mel de marmeleiro (Figura 3.8, p. 58). Destaque para os grupos de compostos característicos do mel de laranjeira (linha contínua) e do mel de marmeleiro (linha pontilhada).....	92
FIGURA 6.1	Cromatograma de íons totais para mel de camboatã.....	98
FIGURA 6.2	Cromatogramas de íons totais para mel de canudo-de-pito.....	100
Figura 6.3	Cromatograma de íons totais para mel de capixingui.....	102
FIGURA 6.4	Cromatograma de íons totais para mel de cipó-cabeludo.....	104
FIGURA 6.5	Cromatograma de íons totais para mel de cipó-uva.....	106
FIGURA 6.6	Cromatograma de íons totais para mel de espinheiro.....	108

FIGURA 6.7	Cromatograma de íons totais para mel de jitirana.....	110
FIGURA 6.8	Cromatograma de íons totais para mel de palmeira.....	112
FIGURA 6.9	Cromatograma de íons totais para mel de tataré.....	114
FIGURA 6.10	Espectro de massa para composto não identificado (RI = 1055).....	116

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

“Entende-se por mel, o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colméia.” [1, 2]

1.1 O MEL

O mel é uma solução concentrada de açúcares, contendo uma mistura complexa de outros carboidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen [1]. Sua composição aproximada típica é 70 % de monossacarídeos (glicose e frutose), 10 % de dissacarídeos (incluindo sacarose), de 17 a 20 % de água [3] e menos de 3 % de substâncias responsáveis pelo *flavor*, definido pelo aroma e sabor do mel.

Segundo a resolução 89/99 do Grupo Mercado Comum do Mercosul [1], 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. O mel de origem floral é obtido dos néctares das flores, e o mel de melato é obtido a partir de secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores [1, 2]. O mel de origem floral, foco deste trabalho, é subdividido em duas classes: **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** ou polifloral, quando é obtido a partir de diferentes origens florais.

1.2 CENÁRIO BRASILEIRO

O Brasil produz entre 35 mil a 45 mil toneladas de mel por ano, empregando aproximadamente 350 mil pessoas e sendo classificado em 11º no *ranking* mundial de produtores. Em 2005, as exportações somaram 14,5 mil toneladas (equivalentes a 18,94 milhões de dólares), sendo que o país é o 5º maior exportador de mel do mundo [4]. O mel brasileiro tem boa aceitação no mercado exterior, sendo livre de antibióticos, pois as abelhas melíferas brasileiras acidentalmente cruzaram com abelhas africanas. Isso produziu abelhas mais resistentes a infecções e, normalmente, não apresentam necessidade de tratamentos a base de antibióticos [5]. Além disso, o Brasil apresenta condições climáticas que permitem a produção de mel durante todo o ano, e uma ampla flora apícola, que permite uma variedade de sabor e aroma exóticos, apreciados principalmente pelos europeus [6]. Um estudo realizado no final de 2005 pela Agência Norte-Americana para o Desenvolvimento Internacional (USAID) constatou que a demanda mundial de mel cresce 2,4 % ao ano [7]. Os países importadores compram tradicionalmente da Argentina e da China méis que podem conter antibiótico e utilizam o mel brasileiro, que é usualmente livre dessas substâncias, para fazer *blends* para correção de méis com eventuais problemas. Entretanto, em 2005, houve um embargo europeu devido à falta de certificação do produto brasileiro, que levou a uma queda significativa da quantidade exportada (de 21 ton para 14 ton).

Segundo Marchini [8], a produção de mel no Brasil poderia ser dez vezes maior, mas para isso seria necessária uma padronização nacional que atestasse sua qualidade e permitisse aperfeiçoar as técnicas de produção. No estudo coordenado por

ele em colaboração da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, muitos méis brasileiros avaliados estão fora dos padrões exigidos pela Norma Brasileira para parâmetros físico-químicos [2]; e embora não esteja prevista na legislação brasileira, a identificação de minerais e da origem floral do mel seria fundamental para atestar a qualidade do produto. Estas análises deveriam fazer parte de uma futura normatização - inclusive para impedir falsificações, pois a composição e o valor nutritivo de mel dependem fundamentalmente da origem floral. Como a flora apícola brasileira é muito diversificada e varia de um lugar para outro, seria fundamental conhecer a composição e as qualidades dos produtos obtidos em cada região, para caracterizá-los e estabelecer padrões. A normatização também seria fundamental para expandir o mercado internacional ao produto brasileiro, levando ao desenvolvimento da apicultura que se tornou uma atividade rentável, considerando o enorme potencial do país para produção do mel orgânico [8].

1.3 DETERMINAÇÃO DA ORIGEM FLORAL DE MÉIS

Tradicionalmente, a origem floral de um mel é obtida através da análise do pólen presente em amostras do produto [9]. A delimitação da origem botânica do mel é um dos objetivos prioritários da indústria apícola [10] e é de grande importância econômica, pois alguns tipos de méis são mais apreciados por consumidores do que outros e os valores de mercado para cada tipo também são muito diversificados [11, 12]. A técnica clássica [5, 13-16] utilizada para esta determinação é a análise melissopalínológica. Esta técnica é baseada no princípio de que flores de diferentes espécies vegetais possuem diferentes

tipos de grãos de pólen, e a origem floral e geográfica do mel é estabelecida através da identificação microscópica e contagem dos grãos de pólen presentes em amostras de mel. Entretanto, a conveniência desta metodologia é discutida por vários pesquisadores [8, 15-19] que apontam como fator crítico a alta dependência da experiência do analista, incluindo sua memória visual e capacidade de discriminação de tipos polínicos para classificação de gênero e espécie [15, 16, 19]. Segundo Guyot *et alii*, [20] a interpretação do termo “predominante” atribuída ao pólen encontrado em méis monoflorais é ambígua: alguns tipos de pólen são considerados representativos mesmo estando presentes em quantidades muito baixas. Além disso, outras variações podem ocorrer; por exemplo, a quantidade de pólen de uma planta pode variar entre as estações do ano; abelhas podem coletar pólen sem coletar o néctar de plantas (de plantas não nectaríferas); o mel pode ser filtrado antes do processo de embalagem; finalmente, grãos de pólen podem ser intencionalmente adicionados com intenção fraudulenta [9].

Outras técnicas usadas são baseadas em análises físico-químicas e determinações sensoriais [10]. Entretanto, segundo Guyot *et alii* [20], parâmetros físico-químicos ou análise de pólen isoladas não são suficientes para determinar a origem floral de um mel. Da mesma forma, a análise sensorial é ainda mais subjetiva do que a melissopalínológica, apesar das referências de propriedades organolépticas terem sido bem estabelecidas. Isso foi confirmado por Tzouros e Arvanitoyannis [21], que enfatizaram que análises microscópicas não são adequadas para classificação de méis, sendo necessário complementar estas informações com determinações químicas ou físico-químicas consistentes. Além disso, não existem garantias de que estas classificações definam as propriedades organolépticas do produto que chega ao consumidor final.

1.4 O PROBLEMA

O mel brasileiro é exportado na forma de misturas (*blends*), deixando de ser apreciado e valorizado por seus tipos diferenciados de floradas de origem, que geram méis de qualidade superior com boa aceitação no mercado externo. Existe a necessidade do emprego de uma metodologia não subjetiva, rápida e confiável, que possibilite identificação unívoca da origem floral do mel, aumentando seu valor agregado com a particularização dos tipos e de suas características, e evitando bloqueios comerciais pela falta de certificação.

2. OBJETIVOS

Geral:

Desenvolver uma metodologia que permita a tipificação de méis brasileiros a partir da caracterização química de sua fração de voláteis utilizando Micro-extração em Fase Sólida em *headspace* (HS-SPME) e Cromatografia Gasosa (GC).

Específicos:

1. Otimizar a metodologia de SPME para extração de voláteis de méis.
2. Obter perfis cromatográficos de méis brasileiros provenientes de diferentes floradas.
3. Identificar os principais componentes voláteis presentes nas amostras de méis por Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massas (GC-MS) buscando possíveis marcadores da origem floral para os méis brasileiros estudados.

3. ESTUDOS COM MÉIS

Para o desenvolvimento da metodologia foi necessário compor um conjunto de amostras cuja variabilidade fosse tanto quanto possível representativa da produção nacional. Os resultados são apresentados em diferentes capítulos, sendo o Capítulo 3 reservado para amostras de méis brasileiros que tinham pelo menos 3 amostras disponíveis. Os méis de eucalipto e de laranjeira são apresentados nos Capítulos 4 e 5, respectivamente, devido à sua importância em termos de quantidade produzida (principalmente no estado de São Paulo). Amostras de outros tipos de mel brasileiros, para os quais eram disponíveis apenas uma amostra, têm seus resultados apresentados no Capítulo 6.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 ABELHAS

As abelhas pertencem à ordem dos Himenópteros, da qual também fazem parte as formigas e as vespas. Existem abelhas de muitas espécies e nem todas são sociais. Ao contrário do que se pensa, a maioria delas se compõe de abelhas solitárias, que constroem seu ninho em ocos de árvores ou embaixo da terra. O corpo de uma abelha raramente ultrapassa 3,75 cm de comprimento e é constituído de três partes: cabeça, tórax e abdômen, conforme é mostrado na Figura 1.1. No tórax encontram-se dois pares de asas e três pares de pernas. As fêmeas possuem um ovopositor na extremidade do abdômen, que é utilizado para depositar os ovos e contém um ferrão para defesa contra inimigos. Só as abelhas sociais são domesticáveis; destas a *Apis mellifera* é a espécie mais utilizada na produção comercial de mel, juntamente com as subespécies *carnica* (abelha cárnica), *remipes* (abelha caucásica), *ligustica*, *aurea* (variedades de abelhas italianas) e *adansonii* (abelha africana) [22].

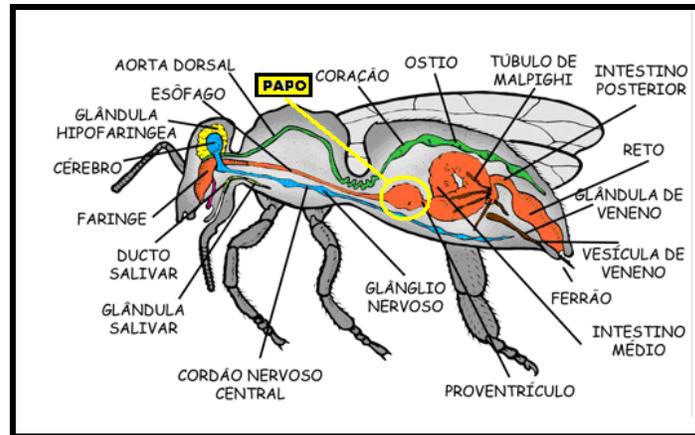


FIGURA 1.1. Anatomia interna da abelha [23, 24]. Em destaque o papo ou estômago de mel, local onde a abelha armazena e processa o mel enquanto transporta o material para ser regurgitado no interior da colméia.

Segundo Kerr [25], a criação das abelhas no Brasil pode ser dividida em cinco fases distintas: a primeira, anterior a 1840, onde só se criavam meliponíneos (abelhas nativas); no Sul, as abelhas mandaçaiais, mandaguaris, uiuvas, jatais, manduris e guarupus; no Nordeste, a uruçú, a jandaíra e a canudo; e no Norte, a uruçú, a jandaíra, a uruçú-boca-de-renda, dentre outras. A segunda fase foi iniciada em 1840, com a introdução no Brasil da *Apis mellifera mellifera*, que se tornou a nossa abelha "europa" ou "abelha-do-reino". De 1845 a 1880, com a migração de alemães, várias colônias de *Apis mellifera mellifera* foram trazidas da Alemanha, tendo início a apicultura nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo (Limeira, Piracicaba, São Carlos). A terceira fase começou ao redor de 1940, com os primeiros movimentos associativos que levou ao início da comercialização. A quarta fase vai de 1950 até 1970, com a introdução da abelha africana para fins de cruzamentos e segregações de linhagens que aliassem suas propriedades àquelas das melhores linhagens italianas. Entretanto, um acidente em sua manipulação provocou a enxameação de 26 colméias, que iniciaram a africanização descontrolada da apicultura brasileira. O problema da abelha africana e a

aliança entre apicultores e cientistas inaugurou uma quinta fase na Apicultura Brasileira, de 1970 até os dias atuais, onde cientistas, apicultores e governo se unem para resolver problemas relacionados à apicultura [25].

1.2 MEL DE ORIGEM FLORAL

O mel é uma das mais complexas misturas de carboidratos produzida pela natureza [26], sendo um alimento energético muito importante pelas suas propriedades nutritivas, pelo seu aroma e sabor [26, 27]. Os diferentes sabores e aromas encontrados dependem fortemente das plantas, flores e condições climáticas presentes na região geográfica onde está localizada a colméia [28]. O mel é produzido pelas abelhas que coletam o néctar das flores, digerem no seu próprio organismo e depositam nos favos no interior das colméias, onde ocorre um processo conhecido como maturação. O néctar das flores - um líquido pegajoso - é produzido nas flores por glândulas específicas e armazenado nas pétalas.

Na maioria dos casos, este néctar contem aldeídos, que pelo ambiente oxidante do interior da colméia, são convertidos nos méis aos ácidos carboxílicos respectivos. O néctar coletado é armazenado na estrutura conhecida como papo da abelha, que tem capacidade para até 60 μL de líquidos. As enzimas presentes na saliva das abelhas, produzidas pela glândula cervical, degradam sacarose em glicose e frutose, e quebram glicosídeos, transformando-os em diversas outras substâncias. Uma porção do mel é transferida para os intestinos e digerido para gerar energia para os longos vôos das

abelhas ou é estocado para a hibernação. O conteúdo restante no estômago é regurgitado nos favos da colméia para alimentação das abelhas da colméia e para maturação [23]. Segundo Evangelista-Rodrigues *et alii* [29], nem todas as plantas que apresentam flores são visitadas pelas abelhas. Além disso, as abelhas podem preferir determinada fonte em detrimento de outra, em vista da facilidade de coleta, da qualidade e quantidade de néctar e da interação com competidores [29].

Existem poucos estudos que relacionam os constituintes das flores com seus respectivos méis ou néctares. Naef *et alii* [23] realizaram um estudo com flores de *Tilia cordata*, visando acompanhar as rotas de transformação dos compostos voláteis presentes no néctar até o mel maduro. Foram coletados o líquido do estômago destas abelhas na entrada da colméia, o néctar das flores visitadas e o mel obtido por centrifugação após um mês de maturação. No néctar das flores, foram detectados produtos de degradação de ácidos graxos (nonanal e decanal), fenilpropanóides, isoprenóides, alcalóides e uma complexa mistura de monoterpenos, muitos deles não identificados. Os compostos alifáticos, isoprenóides e alcalóides permaneceram inalterados no estômago das abelhas; por outro lado, alguns álcoois e aldeídos monoterpênicos (três deles derivados de linalool, como um isômero do aldeído lilálico (2,6-dimetil-6-hidroxioceta-2,7-dienal), foram detectados, além de outros compostos não identificados. No mel maduro, foram encontrados intactos monoterpenos, cafeína e teofilina [23]. Foram identificados também os ácidos benzóico e fenilacético, característicos do aroma de mel, os quais junto aos dois ácidos monoterpênicos novos não identificados foram os componentes majoritários do mel estudado.

Rowland *et alii* [30] estudaram mel australiano de *Eucryphia lucida* (nome popular, *Leatherwood*), bem como as flores e folhas desta árvore. Concluíram que muitas das diferenças entre o *flavor* dos méis são provenientes dos componentes de origem floral, e que uma variação na composição pode ocorrer em detrimento de fatores que influenciam a produção e a concentração do néctar, como a quantidade de flores na área e o número de dias em que as flores estão secretando este néctar, além das condições climáticas deste período. O terpeno encontrado em maior quantidade nesse mel, o trienol (3,7-dimetil-1,5,7-octatrien-3-ol), está originariamente no néctar; muitas das substâncias detectadas nos extratos metilados do mel também foram encontradas nos extratos de flores.

1.3 MÉTODOS EMPREGADOS PARA CARACTERIZAÇÃO DE MÉIS

1.3.1 MÉTODOS GERAIS

Segundo Anklan e Radovic [31], a identificação da origem floral de méis é uma tarefa difícil e não existe atualmente um método que gere resultados inequívocos. Existem muitas fontes florais, e estas são influenciadas pelo clima e condições de crescimento, isto aponta para a necessidade da elaboração de bancos de dados empregando amostras autênticas (o que facilitaria as análises e classificações); admite-se, porém, que não é possível a obtenção de amostras absolutamente puras para os méis habitualmente encontrados.

Anklan [9], lista algumas das diferentes abordagens que podem ser empregadas para a caracterização de méis, sendo: análise enzimática, que pode ser usada apenas para verificar situações de aquecimento do mel; análise dos produtos de fermentação, que dependem da quantidade de microrganismos presentes no néctar e geram informações apenas sobre o modo de processamento; determinação do teor de minerais; que pode ser empregada para determinar a origem geográfica do mel; e determinação do perfil de flavonóides (por CLAE) e compostos fenólicos, que pode ser útil na determinação da origem floral e geográfica do mel. A determinação de parâmetros isolados (por exemplo, o teor em hidroximetilfurfural e de outros resíduos) não gera informações sobre sua origem botânica ou geográfica; apenas a análise de alguns perfis composicionais – de ácidos orgânicos alifáticos, aminoácidos, flavonóides e compostos do aroma – pode ser útil para este propósito, em combinação com análise estatística multivariada. Moreira e De Maria [19] sugerem que o perfil de glicídeos é um parâmetro complementar à análise microscópica do mel para identificação do tipo floral. O perfil de oligossacarídeos também pode ser útil na determinação da origem geográfica. Anupama *et alii* [32] estudaram méis indianos e determinaram que propriedades sensoriais como cor, aroma e sabor variam de acordo com condições geográficas e climáticas, assim como com a origem floral do mel; estes seriam segundo Anupama *et alii* [32] os melhores parâmetros para determinar sua qualidade. Qiu *et alii* [33] avaliaram méis através de espectroscopia de absorção no infravermelho próximo, concluindo que esta técnica pode ser usada para determinação rápida dos seus principais constituintes. Amostras de méis americanos, mexicanos e argentinos foram avaliadas por Tewari e Irudayaraj [34], que indicaram a espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier como um

método adequado para determinação rápida (aproximadamente 5 min) e simultânea de sacarose, glicose, frutose e maltose nessas amostras. A determinação da cor foi usada para classificação de méis por Castro *et alii* [35]. Díez *et alii* [14] avaliaram amostras de mel e melato espanhóis e afirmam não ser possível diferenciar estes dois produtos usando parâmetros físico-químicos (pH, teor de minerais, condutividade elétrica, teor de açúcares e cor) e análises polínicas. Bonaga *et alii* [36] destacam a utilidade das informações geradas pela determinação de hidrocarbonetos em méis para correlacioná-las com parâmetros geográficos, botânicos e climáticos. Classificação quimiométrica de méis, obtida a partir de dados de controle de qualidade (acidez total e diástase) e empregando técnicas de reconhecimento de padrões [37], se mostrou útil para extrair informações que podem ser usadas para correlacionar a composição química de méis e o tipo de processamento pelo qual as amostras passaram. Méis venezuelanos foram avaliados por Rodríguez *et alii* [26], que determinaram teores de cinzas, acidez, pH, atividade de diástase, teor de HMF, nitrogênio e composição de carboidratos. Cordella *et alii* [38] determinaram o perfil de açúcares de méis franceses através de cromatografia de troca iônica e métodos quimiométricos, concluindo que o que os perfis cromatográficos obtidos são uma ferramenta útil para caracterização da origem floral de méis e podem eventualmente ser utilizados para detecção de possíveis adulterações nos méis estudados.

A análise melissopalínológica é utilizada habitualmente para caracterização e classificação de méis [12]. Esta técnica foi introduzida no Brasil em 1961 e até hoje é empregada para qualificação do mel por cooperativas e associações de apicultores em vários estados [39]. Segundo Barth [39], a melissopalínologia é a ciência que relaciona grãos de pólen com abelhas e seus produtos e baseia-se em métodos estabelecidos pela

International Commission for Bee Botany [40]. Quando as abelhas coletam o néctar das flores, os grãos de pólen ficam ocasionalmente aderidos em suas patas e abdômem e são levados para a colméia, onde são transferidos junto com o néctar, de abelha em abelha, para as celas de estocagem para secar e originar o mel. Segundo Barth [39] é possível determinar a origem floral de um mel a partir do reconhecimento dos grãos de pólen dominantes onde suas características morfológicas indicam a espécie floral de origem e a quantidade pode indicar a qualidade do mel. O termo **unifloral** é usado para descrever méis produzidos principalmente por uma única espécie de planta. Geralmente, um mel é assim caracterizado quando 45 % do pólen total pertence a uma única espécie vegetal. Entretanto, isso pode não ser verdadeiro quando uma única espécie transfere para o néctar quantidades de pólen diferentes daquelas típicas [9]. Por exemplo, esse é o caso de plantas como a alfazema, que tem pequena capacidade de transferência de pólen; o mel de alfazema é classificado melissopalínologicamente quando contém apenas de 10 – 13 % deste tipo de pólen [19]. Bousetta *et alii* [10] observam que o mesmo ocorre com méis cítricos e de alecrim, da mesma forma que Bianchi *et alii* [15] relatam este fato para o mel de morango. Por outro lado, o mel de castanha requer pelo menos 90 % deste tipo de pólen para ser assim classificado [9].

A Figura 1.2A mostra o esquema básico da análise melissopalínógica. A amostra de mel (normalmente, 10 g) é aquecida, homogeneizada e diluída em água. Algumas gotas de amostra diluída são transferidas para uma lâmina de microscópio e o analista, com o auxílio de um microscópio, identifica e conta os grãos de pólen de cada espécie encontrada. A partir destas informações o mel é classificado em relação à sua origem floral. A Figura 1.2B é um exemplo de uma microfotografia de lâmina preparada para

análise de um mel europeu onde foram identificados pólen de três espécies diferentes (*Castanea*, *Rubus* e *Ericaceae*) e a Figura 1.2C de um tipo de mel americano onde foram identificadas 2 espécies diferentes (*Compositae* e *Haemotohylu*) [41, 42].

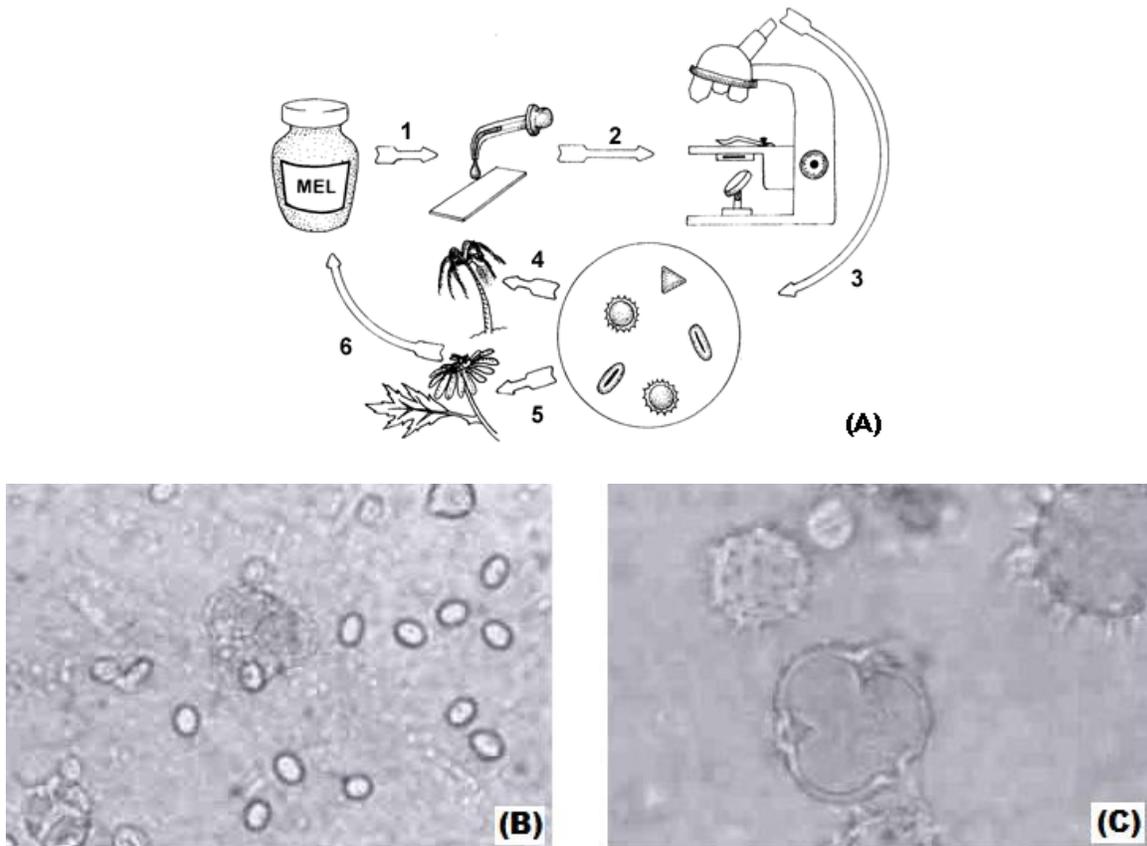


FIGURA 1.2. (A) Esquema do fluxo da análise melissopalínológica. Microfotografias obtidas de lâminas preparadas para análise de (B) mel europeu (C) mel americano [42].

Ramalho *et alii* [13] descrevem a análise de grãos de pólen como útil para caracterização da origem botânica de méis após avaliarem 256 amostras de méis brasileiros. Os méis avaliados foram classificados, sendo que 54 amostras foram atribuídas como eucalipto, 49 amostras como mel de laranjeira e 153 amostras de méis silvestres. Barth *et alii* [3] observaram grande divergência entre a origem botânica

informada pelos produtores e aquela determinada pela análise polínica: de trinta amostras avaliadas, apenas em duas foi observada concordância. De Arruda *et alii* [28] estudaram méis brasileiros do Ceará, avaliando características físico-químicas como teor de açúcares totais e redutores, sacarose, umidade, teor de hidroximetilfurfural, proteínas, cinzas, pH, índice de metanal, condutividade elétrica, cor e viscosidade, assim como a análise melissopalinológica. Os resultados mostraram que, embora as 21 amostras fossem bastante uniformes com relação à origem floral e geográfica, elas se dividiam claramente em doze grupos diferentes. Anklan [9] destaca que as análises melissopalinológicas são úteis para determinar a origem geográfica quando se tem plantas que crescem em áreas específicas.

1.3.2 ANÁLISE DE COMPOSTOS VOLÁTEIS

Segundo Radovic *et alii* [17], o perfil de um aroma é uma das principais características de um produto alimentar. Os méis possuem aromas altamente específicos devido à presença de constituintes voláteis, na sua maioria derivados do néctar de origem [10]. Esse grande número de compostos voláteis presentes em méis faz com que o perfil de seu aroma possa ser usado como um *fingerprint* do produto [17], possibilitando que este seja usado para determinar sua origem floral [17, 43]. 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 de origem a partir da determinação da composição de sua fração volátil [17, 44]. Segundo Anklan [9], uma análise cuidadosa da composição de voláteis pode ser uma ferramenta poderosa para

caracterização da origem floral e pode auxiliar no entendimento dos fatores que causam as diferenças de sabores. Bentivega *et alii* [45] afirmam que mais de 400 compostos já foram identificados e descritos em méis de diferentes origens florais, entretanto, ainda é esperado que um grande número de outros compostos seja identificado no futuro.

A Tabela 1.1 relaciona alguns méis e seus respectivos marcadores já identificados na literatura.

TABELA 1.1. Compostos identificados e apontados como possíveis marcadores de origem floral ou geográfica em méis

AMOSTRA	MARCADOR	Ref.
Mel de urze (Portugal)	ácidos <i>cis, trans-</i> e <i>trans, trans-</i> absínico	47
Mel de laranjeira (Espanha)	hesperitina	48
Mel de laranjeira (Espanha)	antranilato de metila	46
Mel de castanheira (Itália)	3-aminoacetofenona	36
Mel de castanheira (França e Itália)	acetofenona, 1-feniletanol, 2-aminacetofenona	20
Mel de castanheira (França, Alemanha e Itália)	álcool α -metilbenzílico, 3-hexen-1-ol	17
Mel de lavanda (França)	ácido heptanóico	49
Mel de lavanda (França)	fenilacetaldéido	49
Mel de lavanda (França e Portugal)	heptanal	17
Mel de limeira (Itália)	<i>cis-</i> e <i>trans-</i> óxido de rosa	12
Mel de limeira (Itália)	etilmetilfenol, estragol, carvacrol	20
Mel de morango (Itália)	α -isoforona, β -isoforona e 4-oxoisoforona	15
Mel de acácia (França, Alemanha e Itália)	<i>cis</i> -linalool e heptanal	17
Mel de eucalipto (Itália e Espanha)	1-octeno ou 2,3-pentanodiona	17
Mel de rape (Dinamarca, França e Alemanha)	dissulfeto de dimetila	17
Mel de alecrim (Portugal e Espanha)	ausência de 2-acetilfurano	17
Mel de girassol (França e Itália)	α -pineno ou 3-metil-2-butanol	17

Anklan [9] aponta que os resultados das análises dos compostos dos aromas de méis dependem das técnicas de isolamento e dos modos de detecção, ressaltando que o

isolamento dos componentes de uma mistura complexa como o mel para obtenção de um extrato representativo é muito difícil. Além disso, o aroma do mel depende dos métodos de processamento e estocagem, em adição à origem botânica.

Muitas técnicas, quase sempre combinadas à cromatografia, têm sido empregadas para análise dos compostos voláteis de méis, dentre as quais pode-se citar: extração por solventes [30, 50, 51, 52], extração-destilação simultâneas em aparato de Likens-Nickerson [10, 20, 44, 49, 53], extração em fase sólida [54] e *headspace* dinâmico [15, 17]. Bianchi *et alii* [15] caracterizaram amostras de méis de morango, da região da Sardenha (Itália), através de extração por *headspace* dinâmico seguida de GC-MS, identificando vinte e oito compostos provenientes do aroma deste tipo de mel. Castro-Vázquez *et alii* [55] compararam as técnicas de destilação e extração simultâneas, extração líquido-líquido e extração em fase sólida na extração de diferentes frações do mel, concluindo que a destilação e extração simultânea possibilita o isolamento de uma maior quantidade de compostos, sendo mais eficiente para terpenos e ésteres e apresentando baixa recuperação para compostos de alta polaridade e baixa volatilidade. Para extração de furanos e piranos, demonstrou-se ser mais adequado utilizar extração líquido-líquido para evitar a formação de artefatos. Resultados similares foram obtidos com a extração em fase sólida, que apresenta baixa recuperação apenas para ésteres. Todas as técnicas citadas apresentam algumas características que podem ser vistas como desvantagens; dentre elas, pode-se citar a necessidade de grandes quantidades de amostra (15 g a 50 g) e a utilização de solventes extratores como diclorometano [30], o que implica em maior risco ocupacional para os analistas e necessidade de tratamento dos resíduos gerados.

1.4 MICRO-EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A micro-extração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*) foi introduzida em 1990 por Arthur e Pawlinszyn [56]. É uma técnica baseada na sorção de analitos presentes em matrizes, líquidas, sólidas ou gasosas, por uma fase sorvente immobilizada sobre uma fibra de sílica fundida, através da imersão na amostra ou pela exposição ao vapor em equilíbrio com a mesma (*headspace*). Após a etapa de extração, que é livre de solventes, é realizada a dessorção térmica dos analitos no injetor de um cromatógrafo a gás [57]. A SPME é considerada, em comparação às técnicas convencionais de extração, como rápida e adequada para extração de compostos orgânicos voláteis em diferentes matrizes [45, 58]. A Figura 1.3 ilustra como é realizada a extração e dessorção por SPME dos analitos, no injetor aquecido do cromatógrafo a gás.

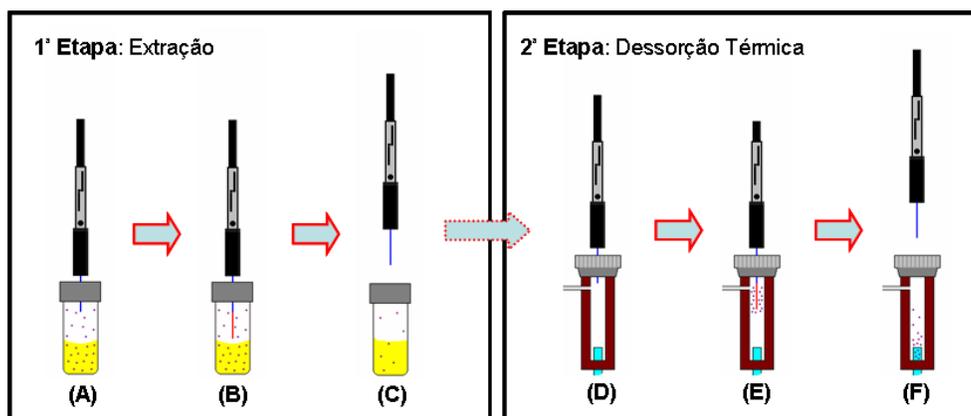


FIGURA 1.3 Procedimento básico para micro-extração em fase sólida através do *headspace*. Primeira etapa: (A) saturação do *headspace*, (B) exposição da fibra de SPME para extração dos analitos, e (C) retração da fibra para o interior da agulha hipodérmica. Segunda etapa: (D) perfuração do septo do injetor do cromatógrafo a gás, (E) exposição da fibra para dessorção dos analitos, e (F) retração da fibra para o interior da agulha.

Em SPME ocorre o equilíbrio de sorção do analito entre o revestimento da fibra, a matriz em que este se encontra e o *headspace* em contato com a amostra. A massa de analito sorvida no equilíbrio pode ser descrita pela Equação 1, válida igualmente para extrações diretas ou através do *headspace* [57]:

$$n = \left(\frac{K_{fs} \cdot V_{am} \cdot V_f}{V_{am} + K_{fs} \cdot V_f + K_{hs} \cdot V_{hs}} \right) \cdot C_s^0 \quad (\text{Equação 1})$$

sendo n é a massa sorvida; V_f , V_{am} e V_{hs} são os volumes do recobrimento da fibra, da amostra e do *headspace* em equilíbrio com a amostra, respectivamente; K_{fs} e K_{hs} são o coeficientes de distribuição do analito entre o recobrimento e a matriz e entre a matriz e o *headspace*, respectivamente; e C_s^0 é a concentração inicial do analito na amostra. Sendo V_f , V_{am} , V_{hs} , K_{fs} e K_{hs} constantes ou parâmetros experimentais fixáveis, atingido o equilíbrio a massa extraída é proporcional à concentração na amostra, tornando a técnica aplicável a análises quantitativas.

O tempo de exposição da fibra à amostra ou ao seu *headspace* necessário para atingir o equilíbrio - onde a eficiência de extração é maximizada – depende de diversas variáveis, como temperatura e espessura do filme de recobrimento da fibra. Espécies com valores altos de coeficientes de distribuição – *i.e.*, com grande afinidade pelo recobrimento sortivo – tipicamente apresentam tempos de equilíbrio longos, já que mais moléculas do analito precisam difundir através de uma camada estática de matriz ou *headspace* que cerca a fibra. A espessura desta camada estática da matriz diminui se a amostra for vigorosamente agitada. A agitação mecânica pode ser substituída por sonicação em banho de ultrassom; uma desvantagem da sonicação é o aquecimento da

amostra gerado por este tipo de agitação [59]. Zhang e Pawliszyn [60] sugerem que o tempo de equilíbrio pode ser drasticamente reduzido com a extração realizada através do *headspace* da amostra (HS-SPME), já que a difusão dos analitos na fase de vapor é quatro vezes maior do que na fase aquosa, e atingido o equilíbrio a quantidade extraída é necessariamente a mesma, tendo sido a extração efetuada por imersão direta da fibra na amostra ou por exposição ao seu *headspace*. Além disso, a micro-extração em fase sólida através do *headspace* (HS-SPME) amplia o uso da técnica para amostras mais complexas, que podem conter sólidos em suspensão ou compostos de alta massa molar (particulados, proteínas, células, etc.). Para se obter maior detectabilidade para métodos baseados em HS-SPME, o *headspace* da amostra deve ter o menor volume possível [61].

HS-SPME têm se estabelecido como a melhor alternativa para extração e pré-concentração de espécies voláteis associadas a aromas e fragrâncias [62]. Dentre os exemplos que têm sido descritos na literatura, podem-se incluir as caracterizações das frações voláteis de frutas brasileiras [63,64], de folhas de eucalipto [65] e de plantas aromáticas [66-69]. Existem algumas aplicações de HS-SPME para caracterização de méis. Dentre elas pode-se destacar a descrita por Guidotti e Vitali [70], que investigaram a composição do *headspace* de amostras de méis italianos buscando classificar os méis de diferentes floradas com base nesses dados. Pérez *et alii* [71] também mostraram que a composição de voláteis podem ser usada para caracterizar a origem floral de méis. Ampuero *et alii* [72] estudaram méis da Suíça, comparando três técnicas: *headspace* dinâmico, HS-SPME e extração dinâmica em agulha (microtubo preenchido com polímeros sorventes e conectado a uma seringa onde o *headspace* da amostra é forçado através do tubo por movimentos do êmbolo desta seringa, possibilitando a sorção dos

analitos) e concluíram que os melhores resultados, avaliados pela classificação dos méis analisados, foram obtidos com uso de SPME . Piasenzotto *et alii* [12] utilizaram a SPME para controle de qualidade de méis italianos, assim como Soria *et alii* [27, 73] utilizaram a SPME para análise dos voláteis de seis tipos de espanhóis e diferenciaram méis florais de méis de melato através de estudos físico-químicos e da fração de voláteis obtida por SPME.

1.5 ANÁLISE DE MÉIS BRASILEIROS

A maioria dos méis brasileiros (80% a 90%) é multifloral, originados principalmente de flores nativas, florestas secundárias e campos de cultivo. No estado de São Paulo, predominam as plantações de laranja, eucalipto e café [74]. No Nordeste, os cajueiros e plantas nativas produzem méis uniflorais [5] correspondentes de 10 a 20 % da produção brasileira. O interesse na caracterização de méis brasileiros é recente e os resultados até o momento são escassos [75]. Os procedimentos até agora usados para caracterização dessas amostras envolvem extração dinâmica [76, 77], técnicas de extração em coluna [78, 79], extração com solventes [77], e análises mesopalinológicas [13]. Silva *et alii* [80] avaliaram méis do Estado do Piauí através métodos físico-químicos (determinação de umidade, hidroximetilfurfural, açúcares redutores, sacarose aparente, cinzas, acidez livre, sólidos insolúveis em água, atividade diastásica) concluindo que todos os méis estudados estavam dentre dos padrões exigidos pela Instrução Normativa do Ministério da Agricultura e do Abastecimento brasileiro. De Arruda *et alii* [28] afirmam que as análises físico-químicas são de fundamental importância na sua

caracterização de méis brasileiros, para criação de padrões, segundo fatores climáticos e florísticos de cada região. Komatsu *et alii* [74] avaliaram o teor de açúcares e proteína em méis silvestres, de eucalipto e de laranjeira, concluindo que os teores de açúcares reductores variam de 75% para méis de laranjeira para 72% para méis silvestres e de eucalipto.

Não foram encontrados estudos publicados utilizando SPME para análises de méis brasileiros.

CAPÍTULO 2

ESTUDOS PRELIMINARES - OTIMIZAÇÃO

Com o objetivo de otimizar a metodologia de extração, foram estudados os seguintes parâmetros: natureza da fibra extratora, tempo e temperatura de extração, condicionamento e massa de amostra. Todas as etapas de otimização foram realizadas utilizando uma mesma amostra de mel silvestre (multifloral), que apresentava maior complexidade e era a mais representativa do universo de amostras estudadas.

2.1 MATERIAIS

2.1.1 REAGENTES: Foi empregada uma mistura de n-alcenos ($C_8 - C_{20}$) em heptano (Merck & Co. Gibbstown, NJ, EUA) para determinação dos índices de retenção dos compostos. Como condicionadores do meio de extração, foram utilizados: NaCl (Synth Química, Diadema, SP, Brasil), Triton X-114 (Roche, Penzberg, Alemanha) e metanol (Synth Química, Diadema, SP, Brasil).

2.1.2 MÉIS: Foi empregada uma amostra de mel silvestre fornecida por um produtor do Estado de São Paulo. A amostra foi armazenada em frasco fechado, em local seco e à temperatura ambiente.

2.1.3 OUTROS MATERIAIS: Foram utilizadas fibras para SPME (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) com os seguintes recobrimentos: 100 μm de polidimetilsiloxano (PDMS); 85 μm de poliacrilato (PA); 65 μm de polidivinilbenzeno/Carbowax (CBW); 65 μm de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) e 75 μm de polidimetilsiloxano/Carboxen (CBXEN). Para as extrações, as amostras foram acondicionadas em frascos (Wheaton, Millville, NJ, EUA) de diferentes volumes (4 mL, 7 mL) selados com septo de PTFE (Supelco, Bellefont, PA, EUA).

2.1.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: Foi empregado um Cromatógrafo a Gás AutoSystem XL (Perkin Elmer, Wellesley, MA, EUA) com detector de ionização em chama e coluna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , 5 % fenilmetilsiloxano). Temperaturas: injetor variada de acordo com especificação do fabricante para o recobrimento da fibra empregada = 240 °C (PDMS), 270 °C (PA), 250 °C (CBW), 210 °C

(PDMS/DVB), 250 °C (CBXEN); detector = 280 °C; coluna = 2 min @ 40 °C → 5 °C min⁻¹ até 175 °C → 20 °C min⁻¹ até 270 °C → 2 min. O injetor foi operado no modo splitless. Hélio 5.0 foi utilizado como gás de arraste, na vazão de 1,0 mL min⁻¹. Foram considerados para as avaliações picos com área igual ou superior a 1 % do somatório das áreas de todos picos detectados. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FORÇA IÔNICA

Na SPME, a quantidade de analito sorvida pela fibra pode ser afetada pela composição da amostra. Para avaliar esta influência foram realizadas extrações através do *headspace* de amostras de mel puro, com adição de água e com adição de solução aquosa de cloreto de sódio 36 % m/v.

Na primeira condição estudada, foram utilizados 1,50 g de mel silvestre acondicionado em frascos com fundo cônico de 7 mL selados com septo. Esta amostra foi termostaticada por 5 min a 60 °C, sob agitação de 525 rpm. Após este período, mantendo-se a agitação e o aquecimento, a fibra de SPME foi exposta ao *headspace* da amostra por 30 min. A fibra foi então retraída e transferida para o injetor de um cromatógrafo a gás onde os analitos foram dessorvidos por 5 min nas condições descritas em 2.1.4. Este procedimento foi realizado com as fibras recobertas com PDMS e CBXEN. As figuras 2.1 e 2.2 apresentam os resultados obtidos para as fibras de PDMS e CBXEN, respectivamente.

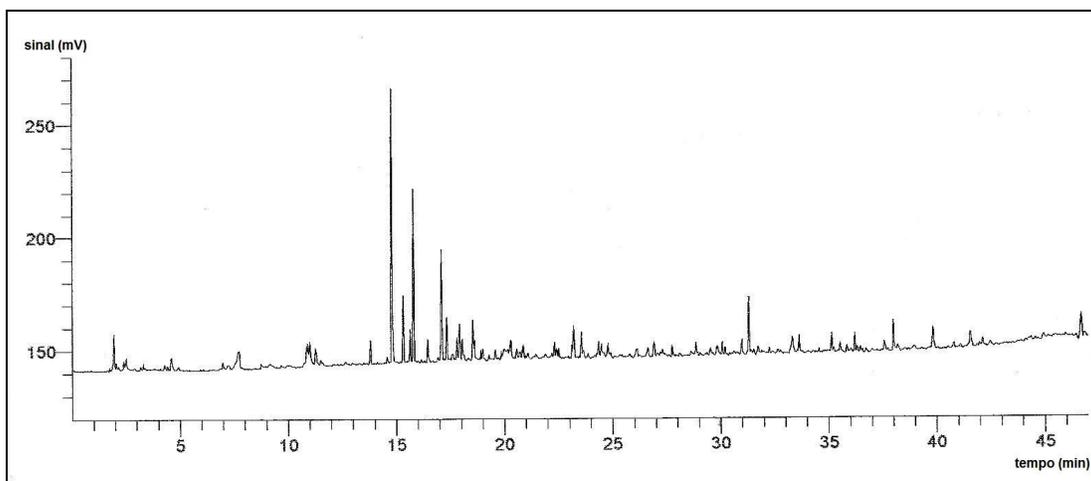


FIGURA 2.1 Perfil cromatográfico obtido por GC-FID para mel silvestre com amostragem em *headspace* e fibra de PDMS.

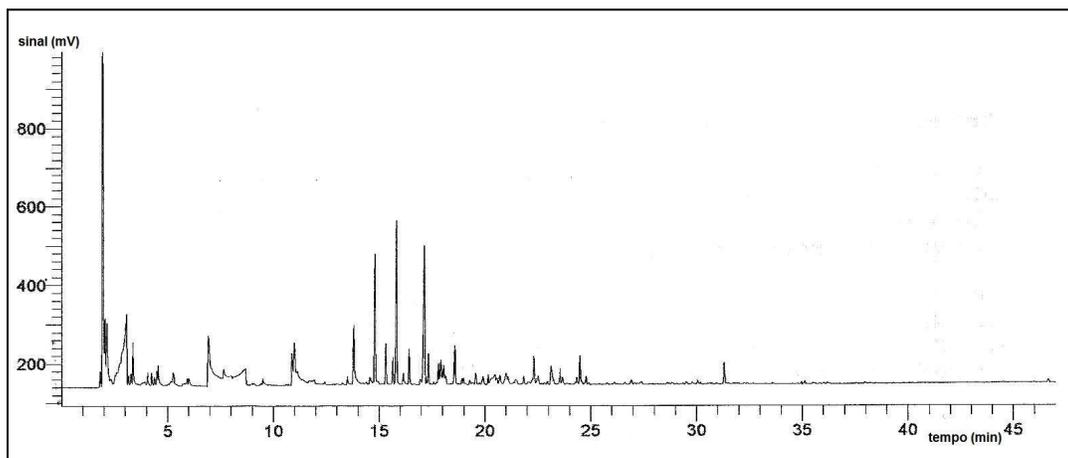


FIGURA 2.2 Perfil cromatográfico obtido por GC-FID para mel silvestre com amostragem em *headspace* e fibra de CBXEN.

Foi avaliada um segunda condição, onde foi preparada uma solução contendo 5,00 g de mel e 5,00 mL de água destilada. Um volume de 2,00 mL desta solução foi transferido para um frasco com fundo cônico de 7 mL selado com septo. Esta amostra foi termostatizada por 5 min a 60 °C, sob agitação magnética a 525 rpm. Após este período,

mantendo-se a agitação e o aquecimento, a fibra de SPME foi exposta ao *headspace* da amostra por 30 min. A fibra foi então retraída e transferida para o injetor de um cromatógrafo a gás onde os analitos foram desorvidos por 5 min nas condições descritas em 2.1.4. As figuras 2.3 e 2.4 apresentam os resultados obtidos para as fibras de PDMS e CBXEN, respectivamente.

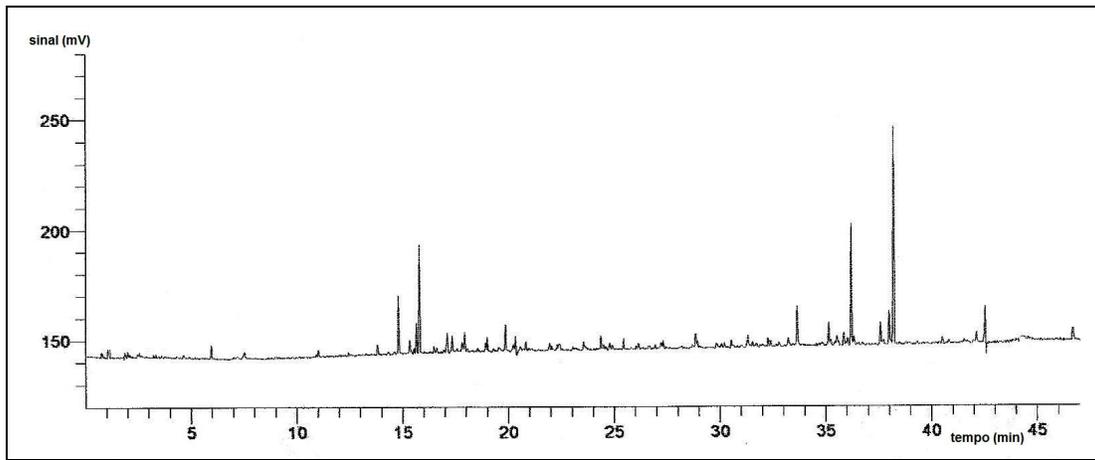


FIGURA 2.3 Perfil cromatográfico obtido por GC-FID para amostragem em *headspace* de mel silvestre em solução aquosa (50 % m/v) com fibra de PDMS.

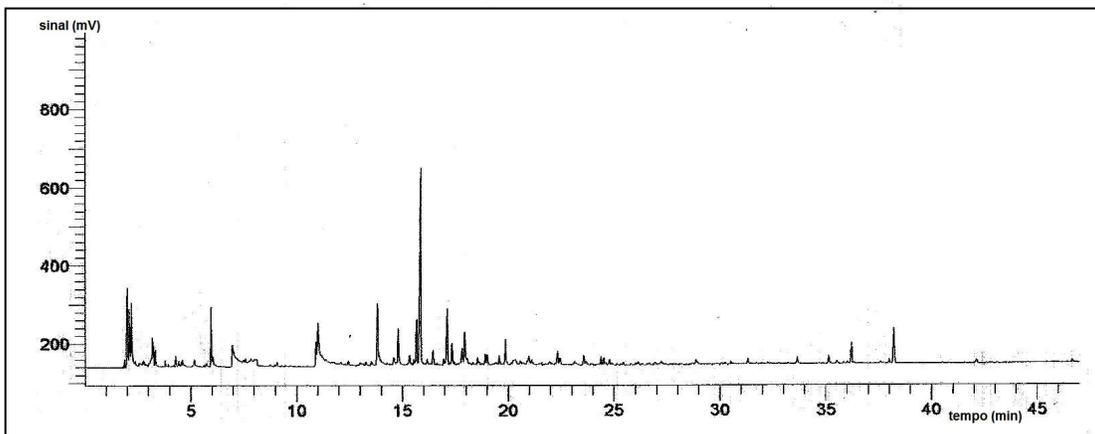


FIGURA 2.4 Perfil cromatográfico obtido por GC-FID para amostragem em *headspace* de mel silvestre em solução aquosa (50 % m/v) com fibra de CBXEN.

É possível verificar, comparando os cromatogramas obtidos para o *headspace* de mel puro (Figuras 2.1 e 2.2) e mel diluído (Figuras 2.3 e 2.4) que para as duas fibras estudadas a diluição diminui a eficiência de extração, especialmente dos compostos menos retidos, que devem corresponder aos compostos com menor massa molar.

Para a terceira condição avaliada foi preparada uma solução contendo 5,00 g de mel e 5,00 mL de solução aquosa 36 % m/v de cloreto de sódio. Um volume de 2,00 mL desta solução foi transferido para um frasco com fundo cônico de 7 mL selado com septo. Esta amostra foi termostaticada por 5 min a 60 °C, sob agitação magnética a 525 rpm. Após este período, mantendo-se a agitação e o aquecimento, a fibra de SPME foi exposta ao *headspace* da amostra por 30 min. A fibra foi então retraída e transferida para o injetor de um cromatógrafo a gás onde os analitos foram desorvidos por 5 min nas condições descritas em 2.1.4. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 2.5 para fibra de PDMS e Figura 2.6 para fibra de CBXEN.

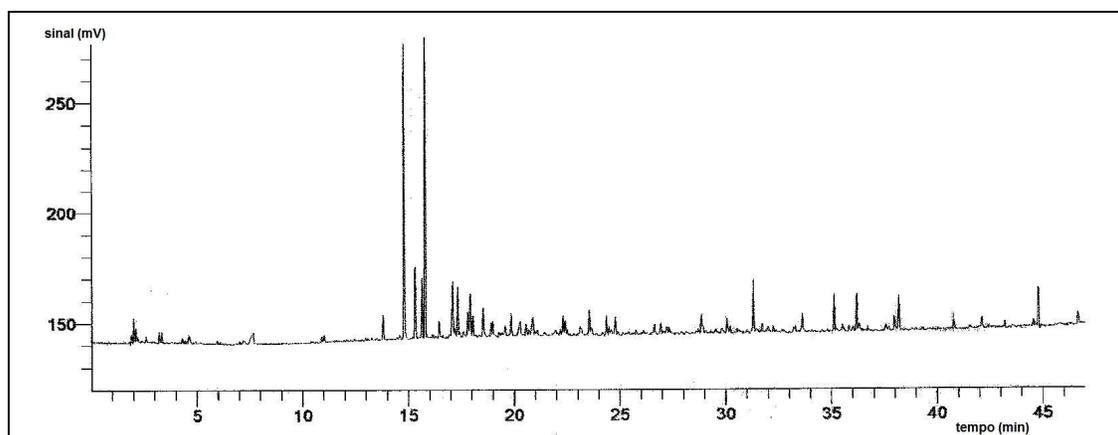


FIGURA 2.5 Perfil cromatográfico obtido por GC-FID para amostragem em *headspace* de mel silvestre em solução salina (50 % m/v) com fibra de PDMS.

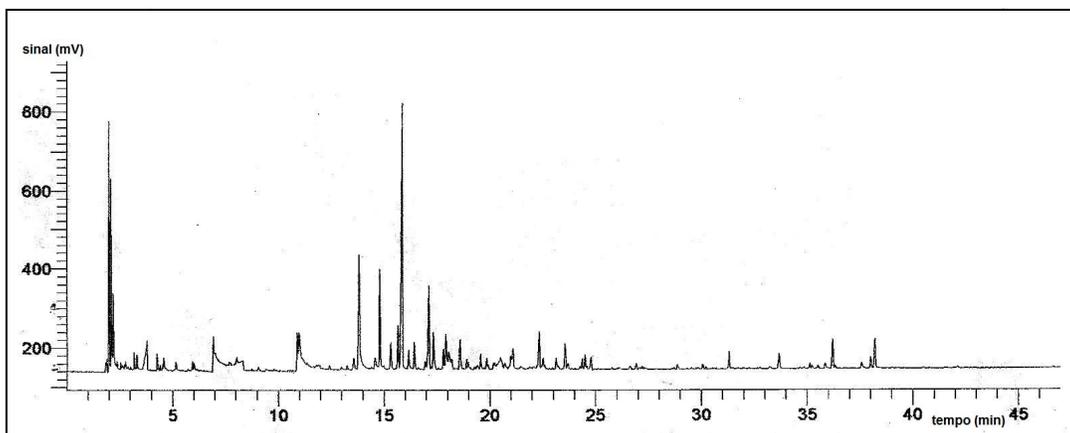


FIGURA 2.6 Perfil cromatográfico obtido por GC-FID para amostragem em *headspace* de mel silvestre em solução salina (50 % m/v) com fibra de CBXEN.

Sendo um eletrólito forte, o cloreto de sódio aumenta a força iônica do meio, permitindo a extração de maior quantidade de analitos [59, 61, 81]. Este fenômeno é atribuído à diminuição da solubilidade dos compostos hidrofóbicos com consequente aumento de sua pressão de vapor e da concentração destes compostos disponíveis no *headspace*. A partir da comparação dos cromatogramas é possível verificar que obteve-se um maior número de compostos detectados, o que resultou em maior área total, para os cromatogramas obtidos na presença de solução de cloreto de sódio. Além disso, foi observada uma maior repetibilidade dos resultados quando utilizada esta condição. Sendo assim, a solução salina foi então empregada nos ensaios realizados neste trabalho.

2.2.2 ESTUDO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO E SELEÇÃO DA FIBRA DE SPME.

Foram estudados os tempos de extração de 15 min, 30 min e 45 min para os diferentes recobrimentos das fibras de SPME. Para cada extração foram utilizados 1,50 g de mel silvestre acondicionado em frascos com fundo cônico de 7 mL selado com septo. As amostras foram termostatizadas por 10 min a 60 °C, sendo então adicionado 1,00 mL solução aquosa 36 % m/v de cloreto de sódio pré-aquecida a 60°C. A mistura foi agitada magneticamente por 5 min a 1200 rpm. A velocidade de agitação foi aumentada de 525 rpm (item 2.2.1) para 1200 rpm para de melhorar a homogeneização da amostra e facilitar a passagem dos compostos para o *headspace*. Após este período, a fibra de SPME foi exposta ao *headspace* da amostra, mantendo-se a agitação e o aquecimento, pelos tempos variando de 15 min a 45 min. A fibra foi então retraída e transferida para o injetor de um cromatógrafo a gás onde os analitos foram dessorvidos por 5 min nas condições descritas em 2.1.4. O tempo de exposição da fibra no injetor do cromatógrafo foi estabelecido em 5 min, pois, através de dados da literatura [58, 82] sabe-se que a dessorção ocorre em um intervalo de tempo muito pequeno, sendo inferior a 1 min para os compostos estudados. O tempo de 5 min é, portanto, superior ao necessário para a dessorção completa dos analitos. Para constatar esta informação, foram realizadas exposições da fibra no injetor, entre as análises, para avaliar o *carryover* (efeito de memória) do material sorvente. Este efeito não foi observado em nenhum dos testes realizados, concluindo-se que o tempo de 5 min é adequado.

A eficiência de extração de cada fibra, nos diferentes tempos estudados, é apresentada na Tabela 2.1. Pode-se observar que as fibras recobertas com CBW, PA e

PDMS apresentaram eficiência de extração, representada pela área total dos cromatogramas obtidos, significativamente menor do que as fibras de CBXEN e PDMS/DVB.

TABELA 2.1 Área total do cromatograma obtido com diferentes fibras de SPME nos tempos de de extração estudados

Recobrimento	15 min	30 min	45 min
CBW	1,0	1,2	1,3
PA	0,7	0,8	1,0
PDMS	0,3	0,3	0,4
CBXEN	3,5	4,7	7,4
PDMS/DVB	3,7	4,9	6,3

Nota: valores de área x10⁶

As fibras de CBXEN e PDMS/DVB apresentam eficiência superior às outras estudadas, pois atuam principalmente pelo mecanismo de adsorção, um mecanismo mais genérico; praticamente todos os analitos são potencialmente adsorvíveis. Este tipo de recobrimento é mais adequado para amostras complexas que possuem grande variedade de compostos de diferentes naturezas químicas.

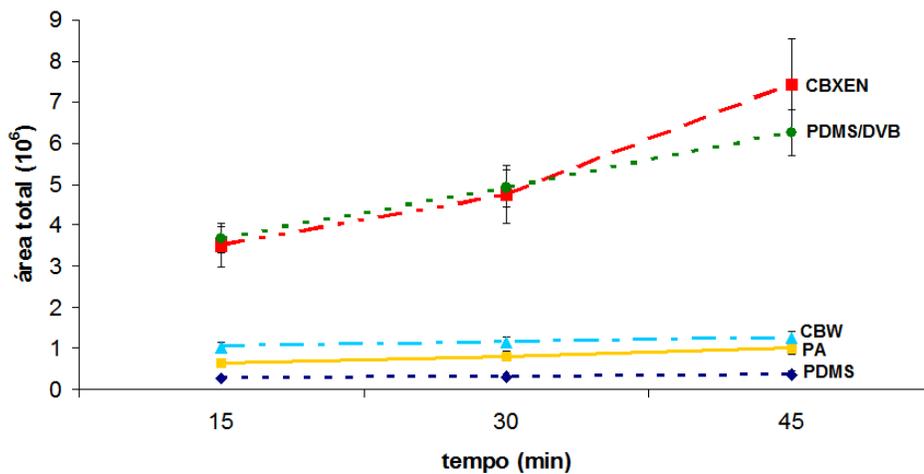


FIGURA 2.7. Perfis de extração obtidos para as diferentes fibras estudadas.

Para todas as fibras testadas, a eficiência da extração, medida pela área total do cromatograma obtido, aumenta com tempo de extração (Tabela 2.1). A Figura 2.7 mostra que este aumento na eficiência de extração é mais significativo para as fibras CBXEN e PDMS/DVB. Nos estudos futuros manteve-se a possibilidade de 15 min ou 30 min de extração, uma vez que 45 min seria inviável na prática, já que a análise completa levaria em torno de duas horas por amostra.

Optou-se pelo uso da fibra recoberta com PDMS/DVB por ser adequada e apresentar maior durabilidade. Verzera *et alii* [83], em seus estudos com méis, também determinaram PDMS/DVB como mais adequado para extrações dos voláteis deste tipo de matriz, pois ele atua com um misto dos mecanismos de partição e adsorção, permitindo a extração de compostos polares e não polares. A durabilidade da fibra foi constatada experimentalmente no decorrer deste trabalho, onde uma única fibra de PDMS/DVB foi utilizada para mais de 250 extrações.

2.2.3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO POR SPME

Foram otimizadas variáveis potencialmente relevantes para o condicionamento da matriz e para a extração por SPME, através de ensaios arranjados segundo um planejamento fatorial 2^4 completo. O planejamento fatorial é de grande utilidade em investigações preliminares, quando se deseja conhecer a influência de determinados fatores sobre uma resposta. Para realizá-lo é necessário definir os fatores de interesse e os níveis - normalmente dois - em que cada fator será variado. Os experimentos, para todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores, devem ser realizados em duplicata para permitir uma estimativa do erro experimental associado à determinação de uma resposta

individual. A estimativa deste erro é importante na decisão da significância estatística dos fatores sobre as respostas [84]. As variáveis definidas para este estudo foram: o tempo de extração (**A**); a adição de 5 % de metanol (**B**); a adição de 1 % de tensoativo não iônico (**C**), que potencialmente pode minimizar a viscosidade do meio e a tensão superficial da matriz, facilitando a transferência da amostra para o *headspace*; e a temperatura da extração (**D**). Os níveis estudados para cada fator são apresentados na Tabela 2.2.

TABELA 2.2 Fatores e níveis empregados no planejamento fatorial 2⁴

	Fatores	Nível 1 (-)	Nível 2 (+)
A	tempo de extração	15 min	30 min
B	metanol (5 %)	ausente	presente
C	tensoativo (1 %)	ausente	presente
D	temperatura	30 °C	60 °C

Os ensaios foram realizados em duplicata. Para cada extração foram utilizados 1,50 g de mel silvestre acondicionado em frascos com fundo cônico de 7 mL selados com septo. Estas amostras foram termostatizadas por 10 min à temperatura **D**. Foi então adicionado 1,00 mL de solução aquosa 36 % m/v de NaCl ou 1,00 mL de solução aquosa 36 % m/v de NaCl contendo 5 % m/v de metanol (**B**) ou 1,00 mL de solução aquosa 36 % m/v de NaCl contendo 1 % m/v de tensoativo (**C**) ou 1,00 mL de solução aquosa 36 % m/v de NaCl contendo 5 % m/v de metanol e 1 % m/v de tensoativo, todas pré-aquecidas à temperatura **D**. A mistura foi agitada magneticamente por 5 min a 1200 rpm. Após este período, a fibra de SPME foi exposta ao *headspace* da amostra, mantendo-se o aquecimento e a agitação, pelo tempo de extração (**A**). A fibra foi então retraída e

transferida para o injetor de um cromatógrafo à gás onde os analitos foram dessorvidos por 5 min nas condições descritas em 2.1.4.

As condições dos ensaios realizados e as respostas obtidas em termos de média da área total das duplicatas (realizadas em ordem aleatória) estão apresentadas na Tabela 2.3.

TABELA 2.3 Condições de extração previstas no planejamento fatorial 2^4 completo e áreas totais dos cromatogramas obtidos

Ensaio	A (min)	B (%)	C (%)	D (°C)	Área (10^6)
1	15	0	0	30	0,66
2	30	0	0	30	0,94
3	15	5	0	30	0,67
4	30	5	0	30	1,08
5	15	0	1	30	0,55
6	30	0	1	30	0,72
7	15	5	1	30	0,50
8	30	5	1	30	0,83
9	15	0	0	60	1,96
10	30	0	0	60	2,35
11	15	5	0	60	1,90
12	30	5	0	60	2,40
13	15	0	1	60	1,97
14	30	0	1	60	2,22
15	15	5	1	60	1,61
16	30	5	1	60	1,94

Através da inspeção da Tabela 2.3, pode-se notar que a temperatura de extração influencia fortemente a eficiência de extração. Entretanto, já foi relatado que o aquecimento excessivo do mel gera produtos das reações de Maillard [50]. Assim como, Visser *et alii* [85] discutem que ocorre a formação de artefatos em amostras de méis mantidas em temperaturas superiores a 40 °C e Bonvehi e Coll [44] sugerem a formação de novos compostos e uma variação significativa na quantidade de compostos extraídos

com aquecimentos superiores a 50 °C. Por este motivo, foi avaliado o perfil de extração do mel em diferentes temperaturas e não foi observado nenhum novo pico nos cromatogramas quando as amostras eram aquecidas de 25 °C a 60 °C. Sendo assim, escolheu-se a temperatura de 60 °C.

O tempo de extração se mostra uma variável com efeito positivo, sendo que a área média dos cromatogramas obtidos a 60 °C aumenta de $1,96 \times 10^6$ com 15 min de extração para $2,35 \times 10^6$ com 30 min. Os modificadores do meio parecem não ter um efeito pronunciado sobre a eficiência de extração. Estas observações exploratórias puderam ser confirmadas com os valores dos efeitos principais e suas interações calculados a partir dos dados do planejamento fatorial, apresentados na Tabela 2.4.

TABELA 2.4 Efeitos ($\times 10^{-6}$) calculados para o planejamento fatorial 2^4

Média =	1,39	
Efeitos Principais	(A) tempo =	0,33
	(B) metanol =	- 0,06
	(C) tensoativo =	- 0,20
	(D) temperatura =	1,30
Interações	AB =	0,06
	AC =	- 0,06
	AD =	0,03
	BC =	- 0,09
	BD =	- 0,11
	CD =	- 0,02
	ABC =	0,00
	ABD =	- 0,01
	ACD =	- 0,01
	BCD =	-0,07
	ABCD =	- 0,01

Através da Tabela 2.4, observa-se que incrementos na temperatura e no tempo de extração aumentam a quantidade de analitos extraídos, sendo que o efeito para temperatura é cerca de quatro vezes maior do que o obtido para o tempo, o que mostra a importância desta variável no processo estudado. A presença do tensoativo, no meio extrator, também gera um efeito significativo e negativo, o que indica a inconveniência de utilização deste reagente. Nenhuma das interações entre os fatores apresenta efeito significativo. Optou-se pelo tempo de 15 min por ser adequado e possibilitar uma redução considerável no tempo total da análise.

As condições de extração que maximizam o número e a quantidade de compostos voláteis extraídos do mel analisado são: temperatura de extração = 60 °C; tempo de extração = 15 min e não adição de tensoativo ou metanol.

2.2.4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA MASSA DE AMOSTRA UTILIZADA

Para minimizar o consumo de amostra, que eventualmente pode ser disponível em pequenas quantidades, foi avaliado um processo miniaturizado em substituição ao otimizado acima. Para isso, 0,5 g de mel foi acondicionado em um frasco de 4 mL com septo e foi termostatizado por 5 minutos a 60 °C. Adicionou-se através de uma seringa, 0,10 mL de solução aquosa 36 % m/v de cloreto de sódio pré-aquecida a 60 °C. A mistura foi agitada magneticamente por 5 min a 1200 rpm. Após este período, mantendo-se o aquecimento e a agitação, a fibra de SPME foi exposta ao *headspace* da amostra por 15 min. A fibra foi então retraída e transferida para o injetor de um cromatógrafo a gás onde os analitos foram desorvidos por 5 minutos nas condições descritas em 2.1.4. Na Tabela

2.5, estão relacionadas as áreas obtidas para os principais compostos detectados, apontados na Figura 2.8.

TABELA 2.5 Valores de área para alguns picos identificados na amostra de mel silvestre

Pico	Composto	RI	m = 0,5 g	m = 1,5 g
1	benzaldeído	961	0,04 ^a	0,03
2	fenilacetaldéido	1043	0,11	0,10
3	2-metil-2-(3-metil-2-oxobutil)-1-cicloexanona	1063	0,70	0,80
4	<i>cis</i> -óxido de linalool	1074	0,20	0,20
5	isômero do aldeído lilálico	1131	0,05	0,05
6	isômero do aldeído lilálico	1143	0,10	0,16
Área Total			2,7	3,4

Notas: picos 1-6 referentes a Figura 2.8; RI = índice de retenção; a) valores de área x10⁶.

Com base nos dados da Tabela 2.5 é possível verificar que uma redução da massa de amostra de 1,5 g para 0,5 g implica na redução de apenas 20 % na área total do cromatograma, afetando os picos mais intensos de modo pouco significativo.

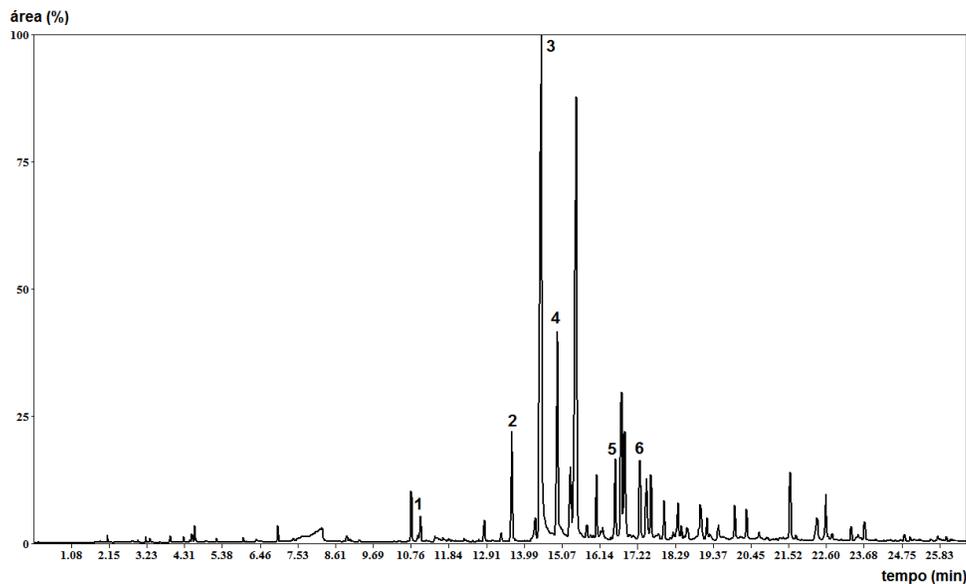


FIGURA 2.8 Cromatograma de íons totais típico para mel silvestre. Picos identificados na Tabela 2.5.

Os resultados mostraram pouca ou nenhuma variação no perfil cromatográfico conforme previamente relatado na literatura [59]. Assim, a miniaturização foi considerada como adequada.

2.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

As condições de extração consideradas adequadas após a otimização e que foram adotadas para os estudos subsequentes são:

- massa de amostra = 0,5 g;
- fibra de SPME recoberta com PDMS/DVB;
- uso de solução salina NaCl (36 % m/v), na razão de 1 %;
- não adição de tensoativo e metanol;
- temperatura de extração = 60 °C,
- tempo de extração = 15 min.

CAPÍTULO 3

Caracterização de Méis Brasileiros

Neste capítulo, são apresentados os resultados para seis variedades de méis brasileiros – aqueles que tinham pelo menos três amostras disponíveis. As amostras foram obtidas diretamente de produtores durante o Congresso Brasileiro de Apicultura (RN, 2004) e de outras fontes não comerciais. A identificação da florada foi atestada pelo próprio produtor, sendo assumida como verdadeira.

3.1 Materiais

3.1.1 REAGENTES: Foi empregada uma mistura de n-alcenos ($C_8 - C_{20}$) em heptano (Merck & Co. Gibbstown, NJ, EUA) para determinação dos índices de retenção dos compostos. Como condicionador do meio de extração, foi utilizado: o NaCl (Synth Química, Diadema, SP, Brasil).

3.1.2 MÉIS: foram empregadas amostras de méis de diferentes floradas e regiões brasileiras (relacionadas na Tabela 3.1), fornecidas por diferentes produtores. As amostras foram armazenadas em frascos fechados, em local seco e à temperatura ambiente.

TABELA 3.1 Relação das amostras de méis brasileiros classificadas pela florada

Origem Floral	n° amostras
Angico-de-bezerro / Quipé (<i>Pitadenia moniliformis</i>)	5
Aroeira / Fruto de Sabiá (<i>Schinus molle</i>)	3
Assa-peixe (<i>Vernonia polianthes less</i>)	4
Cambará (<i>Lantana montevidensis</i>)	3
Marmeleiro (<i>Cydonia vulgaris</i>)	7
Morrão de candeia (<i>Croton sp</i>)	3
Multiflorais	24
Eucalipto (<i>Eucalyptus tereticornis, Eucalyptus robusta</i>)	14
Laranjeira (<i>Citrus aurantium</i>)	3
Sem Identificação	6

3.1.3 OUTROS MATERIAIS: Foi utilizada fibra para SPME (Supelco, Bellefonte, PA, EUA) recoberta com 65 μm de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) previamente condicionadas segundo orientação do fabricante. Para as extrações as amostras foram acondicionadas em frascos (Wheaton, Millville, NJ, EUA) de 4 mL selados com septo de PTFE (Supelco, Bellefont, PA, EUA).

3.1.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: Para separação e identificação dos compostos extraídos dos méis foi utilizado um Cromatógrafo a Gás com Detector Espectrométrico de Massas por Trapeamento de Íons (GC-MS) Saturn IV 2100D (Varian, Walnut Creek, CA, EUA) e coluna Varian - ChromPack CP-SIL8 CB (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, 5 % fenilmetilsiloxano). Temperaturas: injetor = 210 °C; detector = 230 °C; coluna = 2 min @ 40 °C \rightarrow 3 °C min⁻¹ até 175 °C \rightarrow 20 °C min⁻¹ até 270 °C \rightarrow 2 min. O injetor foi operado no modo splitless. Hélio com pureza 5.0 foi utilizado como gás de arraste, na vazão de 1,0 mL min⁻¹. Parâmetros do detector de massas: temperatura da interface = 170°C; faixa de massas (*m/z*) varrida: 40 a 500; fonte de íons = 70 eV. Valores de áreas relativas (porcentagem da composição total de voláteis) obtidas diretamente dos cromatogramas de íons totais. Os índices de retenção (RI, do inglês, retention index) [86] foram determinados pela injeção de uma série de normal alcanos (C₈ a C₂₀) em uma análise com temperatura programada segundo os mesmos parâmetros utilizados para as amostras. Os valores calculados foram comparados, quando possível, com os relatados na literatura [87]. Não houve a possibilidade de comparação com padrões pela indisponibilidade destes. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

3.1.5 SOFTWARE PARA PROCESSAMENTO DOS CROMATOGRAMAS (GC-MS):

Os cromatogramas de íons totais foram processados com o software AMDIS 1.01 (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System; NIST, Gaithersburg, MD - USA) usando as bases de dados NIST 1.6 e Wiley 275.1 para pesquisa e comparação de espectros de massas comparando, quando possível, com os relatados na literatura [87].

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de méis estudadas eram provenientes de diferentes origens geográficas. A Tabela 3.2 relaciona as regiões brasileiras e o número de amostras avaliadas de cada uma delas.

TABELA 3.2 Relação das amostras de méis brasileiros classificadas pela região de origem

Região / Estado	n° amostras
NORTE (AM)	1
NORDESTE (BA, CE, MA,)	20
SE (ES, MG, RJ, SP)	32
SUL (RS, SC)	3
CO (DF, MT, MS)	14
Desconhecidas	18

Após extração e separação cromatográfica, verificou-se que cada tipo de mel apresenta um perfil cromatográfico diferente. Entretanto, também foi determinado que estes perfis não são uniformes para amostras classificadas como do mesmo tipo. Por definição, um mel pode ser considerado monofloral quando contem a partir de 45% do pólen de uma mesma planta. Sendo assim, 55% da composição polínica deste mel pode variar e o mesmo ainda receberá a mesma classificação melissopalínológica, o que resultará em diferentes perfis composicionais. Além disso, segundo a Embrapa [88], os apicultores se baseiam frequentemente em informações empíricas não validadas por dados científicos, o que acarreta dificuldades na padronização dos nomes comumente utilizados para a designação de uma mesma planta. Assim, méis podem ser classificados como os mesmos tendo características organolépticas diferentes.

A seguir, serão apresentados os resultados para cada uma das variedades de mel referidas neste capítulo.

3.2.1 MEL DE ANGICO-DE-BEZERRO (*Piptadenia moniliformis*)

O angico é o nome comum das árvores do gênero *Piptadenia*, da família *Leguminosiae*. Trata-se de uma árvore que pode atingir até 20 metros de altura, que tem crescimento rápido e é encontrada em quase todo o Brasil. Na Figura 3.1 são apresentados cromatogramas obtidos para amostras de mel de angico-de-bezerro. Na Figura 3.1 é possível verificar através de inspeção visual que as amostras **A**, **B** e **C** (lado esquerdo da Figura) apresentam semelhanças, principalmente para os picos de maior intensidade, enquanto que para os méis **D** e **E** verifica-se um perfil diferenciado. Em termos de procedência geográfica, as amostras **A**, **B**, e **C** são, respectivamente, de três diferentes localidades da Bahia, e as amostras **D** e **E** são provenientes do Piauí e do Rio de Janeiro. Os compostos identificados nestas amostras estão apresentados na Tabela 3.3. A Figura 3.2 apresenta o espectro de massas do composto não identificado com índice de retenção igual a 1083 e massa molar igual a 124, que foi encontrado nestas e em outras amostras de mel estudadas neste trabalho.

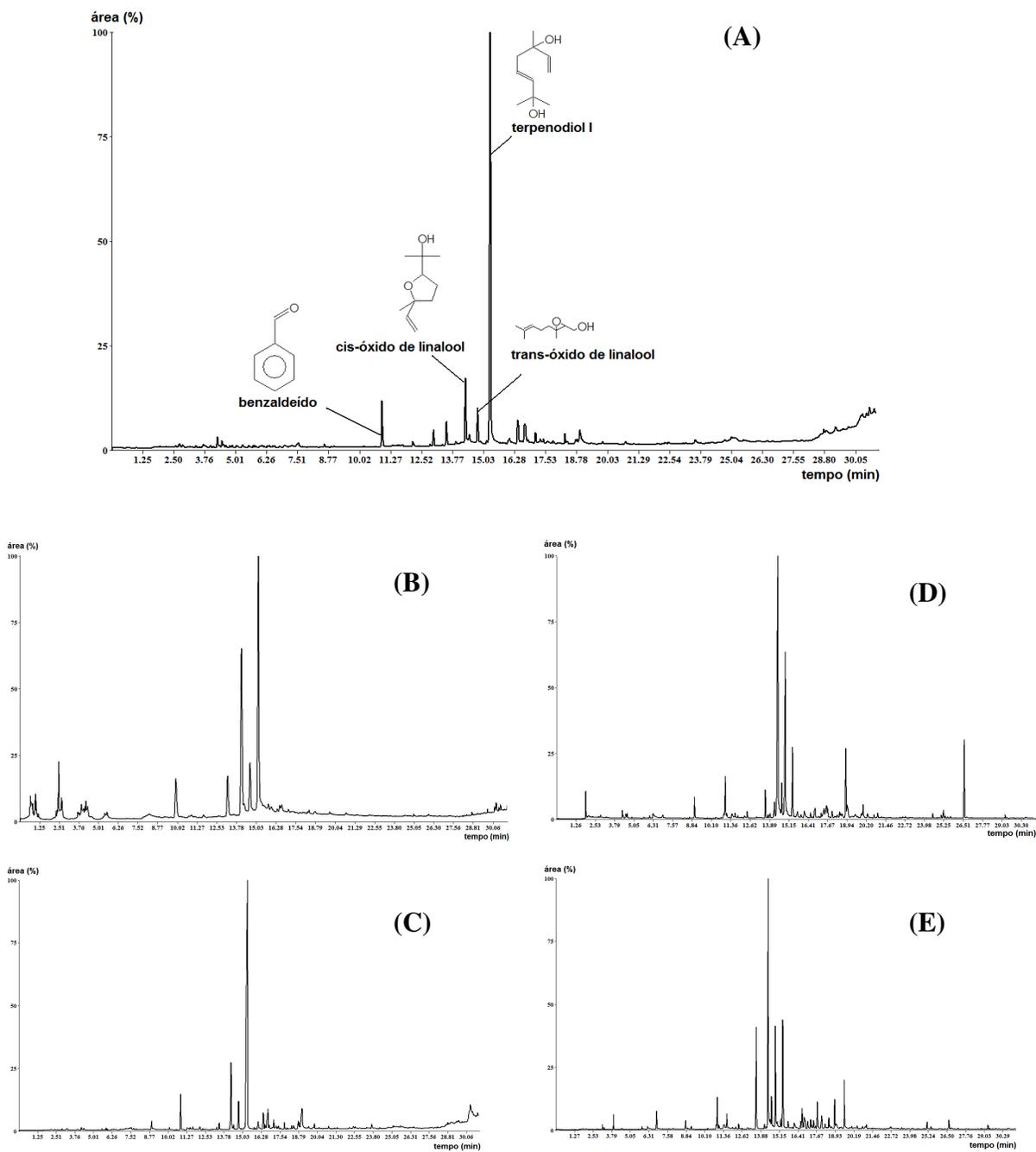


FIGURA 3.1 Cromatogramas de íons totais para mel de angico-de-bezerra (amostras A, B, C, D e E).

TABELA 3.3 Compostos identificados nas amostras de mel de angico-de-bezerro

Composto	RI	A ^b	B	C	D	E
furfural	830	nd	nd	nd	nd	X
benzaldeído	961	X	X	X	X	X
limoneno	1031	X	nd	nd	nd	nd
fenilacetaldeído	1043	X	X	nd	X	X
<i>cis</i> -óxido de linalool	1074	X*	X*	X*	X*	X*
n.i. ^a	1083	nd	nd	nd	X	X
<i>trans</i> -óxido de linalool	1088	X	X	X	X*	X
terpenodiol I	1099	X*	X*	X*	X	X
aldeído lilálico (isômero)	1131	X	nd	nd	nd	nd
aldeído lilálico (isômero)	1143	X	nd	nd	nd	nd
mentol	1165	nd	nd	nd	nd	X
naftaleno	1179	nd	nd	nd	nd	X
dimetilbenzaldeído	1201	nd	nd	nd	X	X
2,4-bis(t-butil)-fenol	2201	nd	nd	nd	X	nd

Notas: a) n.i. = composto não identificado; b) A, B, C, D e E correspondem aos cromatogramas da Figura 3.1; RI = índice de retenção; nd = composto não detectado; *compostos majoritários.

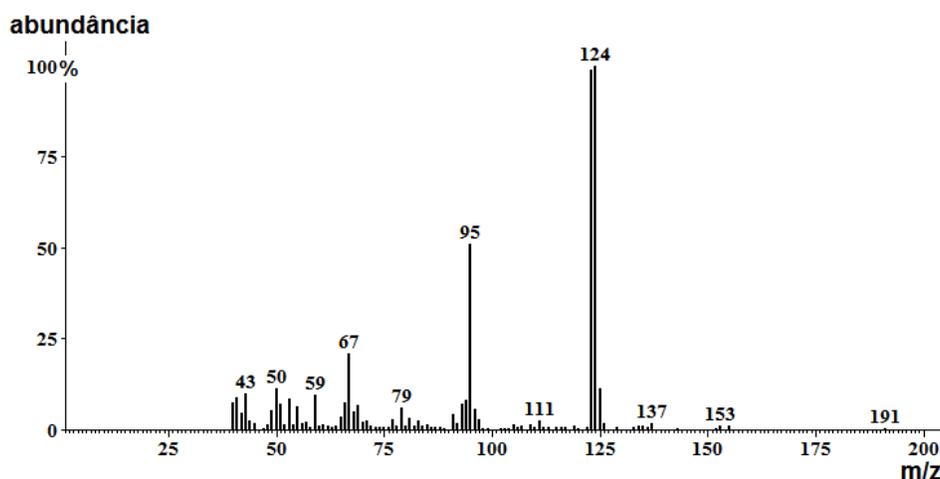


FIGURA 3.2 Espectro de massas para o composto não identificado (RI = 1083).

Os compostos encontrados nas cinco amostras desta variedade de mel são: benzaldeído, isômeros *cis* e *trans* do óxido de linalool e terpenodiol I. O último deles, denominado aqui de terpenodiol-I [3,7-dimetil-1,5-octadieno-3,7-diol)-terpenodiol], foi identificado pelo espectro de massas que é apresentado na Figura 3.3. Este composto,

derivado do linalool, foi identificado por Wilkins *et alii* [51] em amostras de mel de *Carduus nutans* provenientes da Nova Zelândia e por Rapp *et alii* [89] em aromas de vinho da uva *Morio-Muskat*.

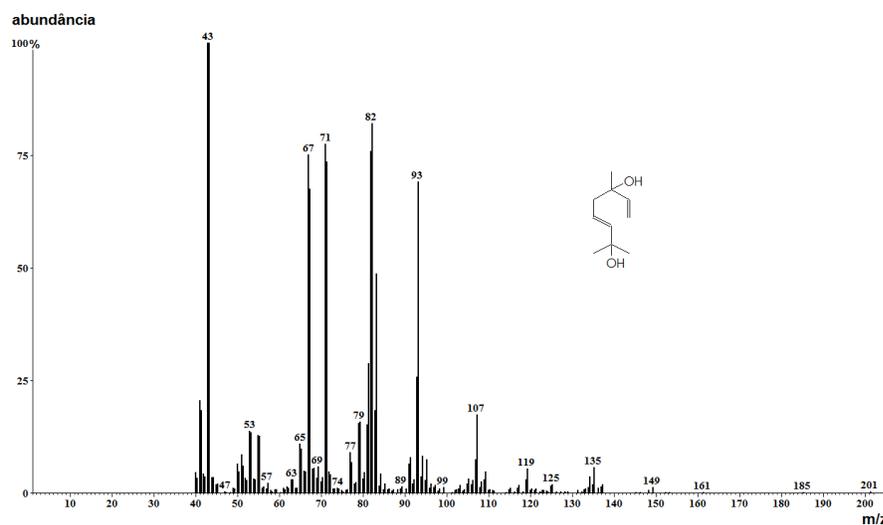


FIGURA 3.3 Espectro de massas do composto identificado como 3,7-dimetil-1,5-octadieno-3,7-diol (terpenediol-I) (RI = 1099).

Os compostos encontrados no mel de angico-de-bezerro também foram encontrados em outros tipos de méis avaliados. Não foram encontrados na literatura dados relativos à composição de voláteis deste tipo de mel; além disso, não foi possível definir qualquer relação entre as áreas dos picos principais da amostra que pudesse ser definida como característica deste mel.

3.2.2 MEL DE AROEIRA (*Schinus molle*)

A aroeira é uma planta silvestre, encontrada em grande parte de território brasileiro. Suas flores são pequenas e de coloração amarelo-clara e surgem no período de

setembro a janeiro. O mel oriundo da florada da aroeira tem coloração escura e sabor característico forte. A Tabela 3.4 apresenta os compostos identificados para as amostras de mel de aroeira cujos cromatogramas de íons totais, são apresentados na Figura 3.4.

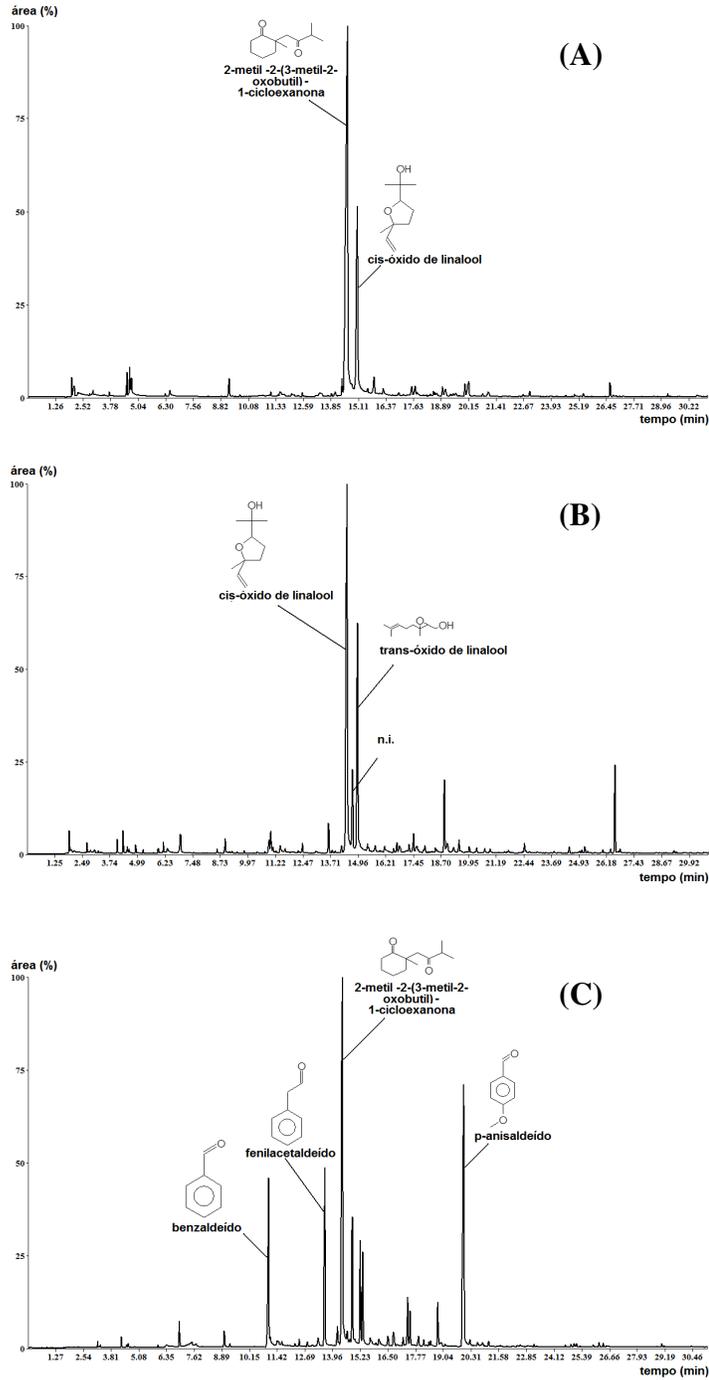


FIGURA 3.4 Cromatogramas de íons totais para mel de aroeira (amostras **A**, **B** e **C**).

TABELA 3.4 Compostos identificados nas amostras de mel de aroeira

Composto	RI^b	A	B	C
1-pentanol	768	X	nd	nd
3-metil-1-butanol	779	X	nd	nd
furfural	830	nd	X	nd
5-metil-2-furfural	961	nd	X	nd
benzaldeído	962	nd	X	X*
fenilacetaldeído	1043	nd	X	X*
2-metil-2-(3-metil-2-oxobutil)-1-ciclohexanona	1063	X*	nd	X*
<i>cis</i> -óxido de linalool	1074	X*	X*	X
n.i. ^a	1083	nd	X*	nd
<i>trans</i> -óxido de linalool	1088	nd	X*	nd
linalool	1098	nd	nd	X
terpenodiol I	1099	nd	nd	X
alcool feniletílico	1110	X	nd	nd
dimetilbenzaldeído	1201	X	X	X
2-feniletil éster do ácido acético	1248	X	nd	nd
<i>p</i> -anisaldeído	1252	nd	nd	X*
1,5,5-trimetilbicyclo[2.2.1] heptan-2-ol	1271	X	nd	nd
2,4- <i>bis</i> -(1,1-dimetiletil)-fenol	2201	X	X	nd

Notas: a) n.i. = composto não identificado; b) A, B, C correspondem aos cromatogramas da Figura 3.4; RI = índice de retenção; nd = composto não detectado; * compostos majoritários.

Nas amostras **A** e **C**, provenientes do Mato Grosso do Sul, um dos principais componentes identificado tentativamente (somente por comparação do espectro de massas) foi a 2-metil-2-(3-metil-2-oxobutil)-1-ciclohexanona. Esta cetona cíclica, cujo espectro de massas é apresentado na Figura 3.5, também aparece como componente importante em outros tipos de mel.

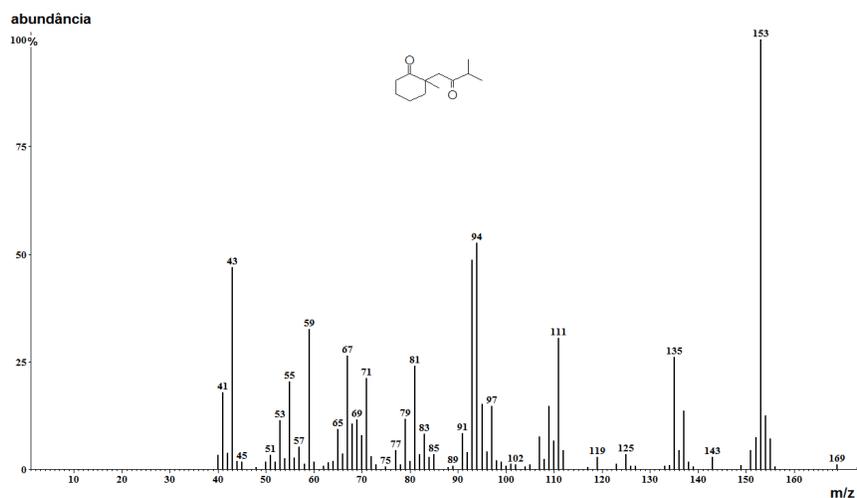


FIGURA 3.5 Espectro de massas do composto identificado como 2-metil-2-(3-metil-2-oxobutil)-1-ciclohexanona (RI = 1063).

A literatura cita o álcool feniletílico como tendo sido detectado no mel de tomilho [12] e na composição dos voláteis emitidos por abelhas-rainha [90]. Este composto é um semioquímico muito comum e pode ser encontrado como componente do feromônio sexual de diferentes insetos e como feromônio de alarme em formigas africanas.

Não foram encontrados na literatura dados relativos à composição de voláteis deste tipo de mel; além disso, não foi possível definir qualquer relação entre as áreas dos picos principais da amostra que pudesse ser definida como característica deste mel.

3.2.3 MEL DE ASSA-PEIXE (*Vernonia polianthes less*)

O assa-peixe é um arbusto tipicamente brasileiro que cresce espontaneamente e distribui-se geograficamente do Paraná à Bahia e na região Centro-Oeste. Em áreas antrópicas de Minas Gerais, a espécie *Vernonia scorpioides* é frequente, apresentando-se florida todo o ano e representando o maior potencial néctar polínifero destas áreas. Essa espécie apresenta-se tanto como pólen dominante (acima de 45%), quanto como acessório (de 10 a 15%) nos méis produzidos nesta região. Das amostras desta variedade de mel analisadas, aquela identificada pela letra **D** estavam disponíveis dados de avaliação melissopalínológica. Estes apontaram que 64,9 % do pólen presente neste mel é realmente de assa-peixe, devendo ele ser classificado como monofloral. As outras amostras não foram avaliadas quanto ao teor de pólen.

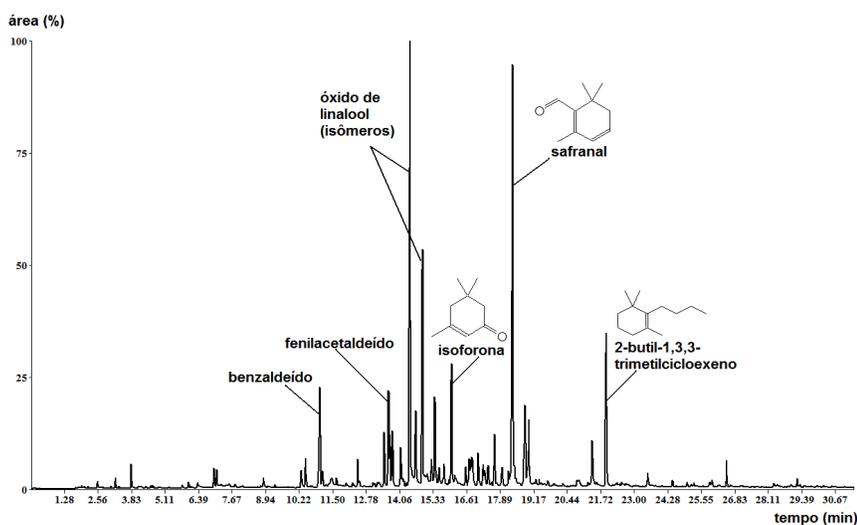


FIGURA 3.6 Cromatograma de íons totais típico para mel de assa-peixe (amostra C).

Os compostos identificados neste tipo de mel estão listados na Tabela 3.5. Segundo Matos *et alii* [78], a única referência localizada na literatura sobre mel de assa-peixe, ele apresenta predominantemente aldeídos, conforme pôde ser comprovado pelas amostras analisadas. O álcool feniletílico é considerado um poderoso odorante do mel de assa-peixe, mas este foi detectado apenas na amostra **D**. A 2,3-butadiona, considerada como um dos compostos ativos típicos no odor deste mel, não foi detectada em nenhuma das amostras avaliadas, assim como isômeros do ácido metilbutanóico, que, de acordo com o trabalho citado, parecem ser responsáveis pelo *off-flavor* deste tipo de mel.

TABELA 3.5 Compostos identificados nas amostras de mel de assa-peixe

Compostos	RI	A	B	C	D
2- furanometanol	875	X	nd	nd	nd
benzaldeído	956	X	nd	X	X*
octanal	1001	nd	nd	nd	X
álcool benzílico	1032	nd	X	nd	X*
fenilacetaldéido	1043	X	X	X	X*
<i>cis</i> -óxido de linalool	1074	X	X*	X*	X
<i>trans</i> -óxido de linalool	1088	X	nd	X*	X
terpenodiol I	1099	X	X*	X	nd
nonanal	1102	nd	nd	nd	X*
álcool fenil etílico	1110	nd	nd	nd	X
α -isoforona	1118	X	nd	X	X
safranal	1192	X	nd	X*	nd
hidroximetilfurfural	1195	X*	nd	nd	nd
dimetilbenzaldeído	1201	nd	nd	X	nd
cinelorona	1204	nd	nd	X	nd
2-butil-1,3,3-trimetilciclohexeno	1237	nd	nd	X*	nd

Notas: RI = índice de retenção; nd = composto não detectado, * compostos majoritários.

Na amostra **A** foi verificado um pico para hidroximetilfurfural (HMF) com área significativamente maior aos outros compostos. O HMF é um composto que resulta da quebra de açúcares simples, como glicose e frutose e por isso é considerado um indicador

da negativo na qualidade do mel, sendo possivelmente gerado pelo aquecimento excessivo da amostra [43]. Entretanto, alguns autores [91] afirmam que HMF também ocorre naturalmente em méis, principalmente em regiões de climas quentes. A isoforona foi detectada em três das quatro amostras estudadas de mel de assa-peixe, podendo ser apontada como um possível marcador para méis de assa-peixe, uma vez que, os outros compostos identificados, como álcool feniletílico (associado a notas de odor floral), foi detectado em outras variedades de méis [78], não podendo ser considerado um diferenciador.

3.2.4 MEL DE CAMBARÁ (*Lantana montevidensis*)

O cambará é um arbusto florífero de efeito ornamental comumente encontrado no bioma da Mata Atlântica. As inflorescências são compostas, formando mini-buquês das mais variadas cores, como laranja, rosa, vermelho, amarelo e branco. O mel de cambará, caracterizado pela presença de 15% a 45% de pólen específico desta espécie, sendo classificado um mel monofloral, é muito apreciado pelo seu aroma agradável e sabor delicado e característico [77, 82]. A Tabela 3.6 lista os compostos detectados e identificados nas amostras de mel de cambará analisadas, cujo cromatograma típico é apresentado na Figura 3.7.

Tabela 3.6 Compostos identificados nas amostras de mel de cambará

Compostos	RI	A	B	C
furfural	830	X	nd	X
ácido 2-metil butanóico	908	nd	nd	nd
benzaldeído	956	X*	X	X
fenilacetaldeído	1043	X	X*	X
<i>cis</i> -óxido de linalool	1074	X*	X	X*
<i>trans</i> -óxido de linalool	1088	X	X	X
álcool feniletílico	1110	X	X	X
benzonitrila	1125	X	X*	X
isômero do aldeído lilálico	1131	nd	nd	X
isômero do aldeído lilálico	1143	nd	nd	X
safranal	1197	nd	nd	X
dimetilbenzaldeído	1201	X	X	X
fenetilamina	1241	X	nd	nd
<i>o</i> -fenil-anisol	1263	X	X	nd
2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol	2201	X	nd	X

Notas: RI = índice de retenção; nd = composto não detectado; * composto majoritário.

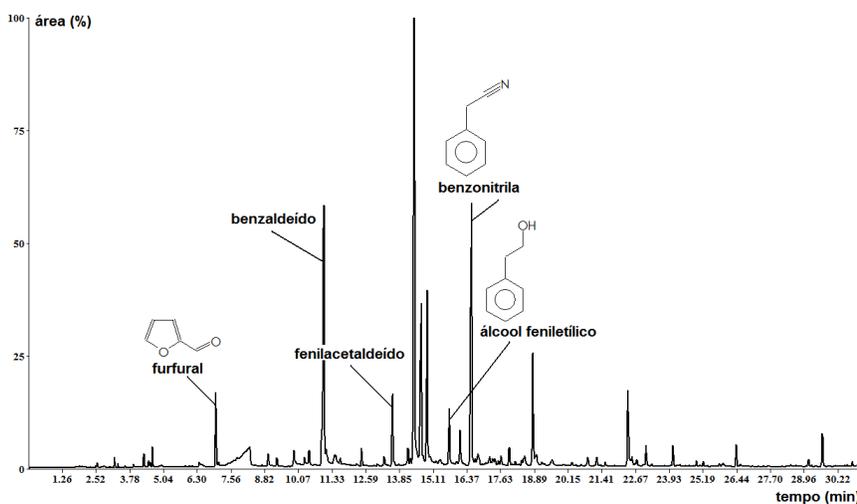


FIGURA 3.7 Cromatograma de íons totais típico para mel de cambará (amostra A).

É possível verificar que a composição das amostras A e B, ambas provenientes do Estado de Espírito Santo, é muito similar. A amostra C, do Rio de Janeiro, apresenta alguns compostos diferentes das amostras anteriores mas em quantidade inferiores,

provavelmente provenientes de plantas presentes na região onde está localizada a colméia e ausentes daquelas onde as amostras **A** e **B** foram produzidas. Os compostos benzaldeído, fenilacetaldeído, os isômeros *cis* e *trans* de óxido de linalool, álcool feniletílico, benzonitrila e dimetilbenzaldeído foram encontrados em todas as amostras estudadas desta variedade.

Recentemente, o aroma do mel de cambará foi estudado por Moreira e de Maria [77]. O ácido fenilacético, o benzaldeído e a benzonitrila foram ali identificados como sendo seus os componentes principais. Essas três substâncias são provavelmente de origem vegetal e poderiam estar presentes no néctar ou serem resultado de transformações bioquímicas durante a produção do mel. O ácido fenilacético geralmente não é encontrado no aroma de flores e pode ter sido formado a partir do fenilacetaldeído, um componente comum, devido ao ambiente oxidante dos favos, que favorece a transformação dos aldeídos em seus respectivos ácidos [23]. Segundo Stefanello *et alii* [92] os constituintes majoritários do óleo essencial de cambará variam de acordo com o período de floração, sendo que esta variação pode acarretar uma variabilidade química nos méis obtidos em diferentes períodos do ano. Os componentes principais no início da floração, detectados por Stefanello *et alii* [92], são eugenol e (*E*)-nerolidol e, no final da floração, fenilacetaldeído, composto indicado como responsável tanto pela atração de borboletas como de abelhas produtoras de mel. Moreira e de Maria [77] confirmaram que benzaldeído, benzonitrila e álcool feniletílico são compostos ativos no aroma do mel de cambará brasileiro sendo predominantes no *headspace* desta variedade de mel e responsáveis pelo seu aroma característico.

Os compostos identificados no mel de cambará não diferem muito dos de outras amostras analisadas, exceto pela presença de benzonitrila, que não foi detectada ou identificada em nenhum outro tipo de amostra avaliada neste trabalho. Esta informação, aliada ao fato de benzonitrila ser considerado característico do néctar da flor de cambará ser composto ativo no odor deste tipo de mel, sugere que ela pode ser usado como marcador para este tipo de mel.

3.2.5 MEL DE MARMELEIRO (*Cydonia vulgaris*)

O marmeleiro é um arbusto de porte altivo e floradas breves que ocorrem com as primeiras chuvas na caatinga hipoxerófila (áreas com solo menos seco que a caatinga tradicional), que cobre grande parte do semi-árido nordestino. Esta espécie não deve ser confundida com *Pyrus cydonia*, homônimo da qual se extraem frutos para fazer doces [93]. O mel obtido do néctar das floras de *Cydonia vulgaris* é um mel denso, claro, e é considerado raro e valioso, sendo cobiçado no mercado pelas condições de produção ambientalmente limpas e pelo seu sabor especial – o único que se conhece com sabor de cravo-da-índia [93].

Das amostras avaliadas, três (**A**, **C** e **E**) são provenientes do Rio Grande do Norte, um delas de São Paulo (**B**) e um do Piauí (**D**). A Figura 3.8 mostra um cromatograma de íons totais típico para mel de marmeleiro. Os compostos identificados estão listados na Tabela 3.7.

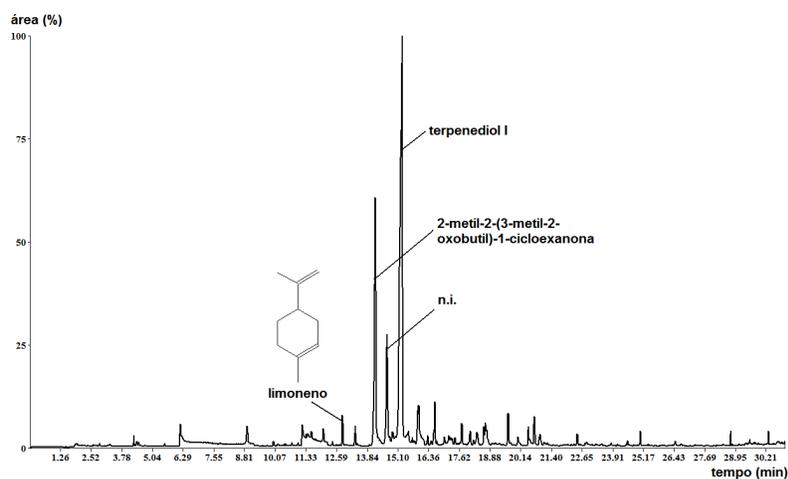


FIGURA 3.8 Cromatograma de íons totais típico para mel de marmeleiro (amostra C).

TABELA 3.7 Compostos identificados nas amostras de mel de marmeleiro

Compostos	RI	A	B	C	D	E
1-pentanol	768	nd	nd	X	nd	nd
2-metil-1-butanol	782	nd	nd	X	nd	nd
limoneno	1031	nd	nd	X	nd	nd
eucaliptol	1033	nd	X	nd	nd	nd
fenilacetaldéido	1043	X*	X	X	X	X
2-metil-2-(3-metil-2-oxobutil)-1-ciclohexanona	1063	nd	X*	X*	nd	X*
cis-óxido de linalool	1074	X*	nd	nd	X*	X*
n.i. ^a	1082	X*	X*	X*	X*	nd
terpenediol I	1099	X	nd	X*	nd	X*
n.i. ^a	1108	nd	X*	nd	X*	nd
isômero do aldeído lilálico	1143	nd	nd	X	nd	nd
óxido de nerol	1153	nd	X	X	X	nd
isômero do aldeído lilálico	1172	nd	nd	X	nd	nd
hidroximetilfurfural	1195	nd	X	nd	nd	nd
acetato de 2-feniletila	1248	nd	nd	X	nd	X
isoeugenol-metiléter	1402	X	nd	nd	nd	nd

Notas: a) n.i. = composto não identificado; RI = índice de retenção; nd = composto não detectado;
*compostos majoritários.

Apesar do esperado odor de cravo-da-índia, o eugenol - componente característico deste aroma - não foi detectado por Moreira *et alii* [79] que determinaram como compostos responsáveis pelo aroma do mel de marmeleiro o ácido isovalérico, o ácido benzóico, a γ -decalactona e a vanilina. Nenhum destes compostos foi encontrado nas amostras estudadas. Nestas amostras, somente a designada pela letra **A** apresentou um isômero do eugenol, o isoeugenol-metiléter que, segundo Frauendorfer e Schieberle [94], possui odor relacionado a fumaça. A Figura 3.9 mostra o espectro de massas do composto não identificado com índice de retenção 1108. Este composto foi detectado apenas no mel de marmeleiro, sendo um dos componentes majoritários nas amostras **B** e **D**. Não foi detectado nas amostras **A**, **C** e **E**, todas provenientes do Rio Grande do Norte, nem foi listado na referência acima citada. Assim, é um possível marcador de origem geográfica para este mel.

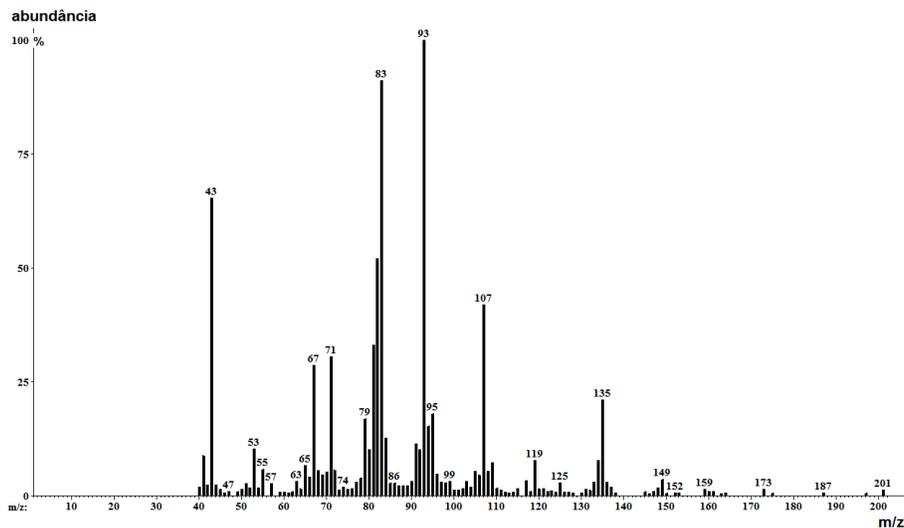


FIGURA 3.9 Espectro de massas para o composto não identificado (RI = 1108).

3.2.6 MEL DE MORRÃO DE CANDEIA (*Croton sp*)

Três amostras de mel de morrão-de-candeia foram avaliadas, sendo duas delas provenientes do Rio de Janeiro (**A** e **B**) e uma de Minas Gerais (**C**). A Figura 3.10 mostra os cromatogramas obtidos para este tipo de mel. Os compostos detectados e identificados estão apresentados na Tabela 3.8.

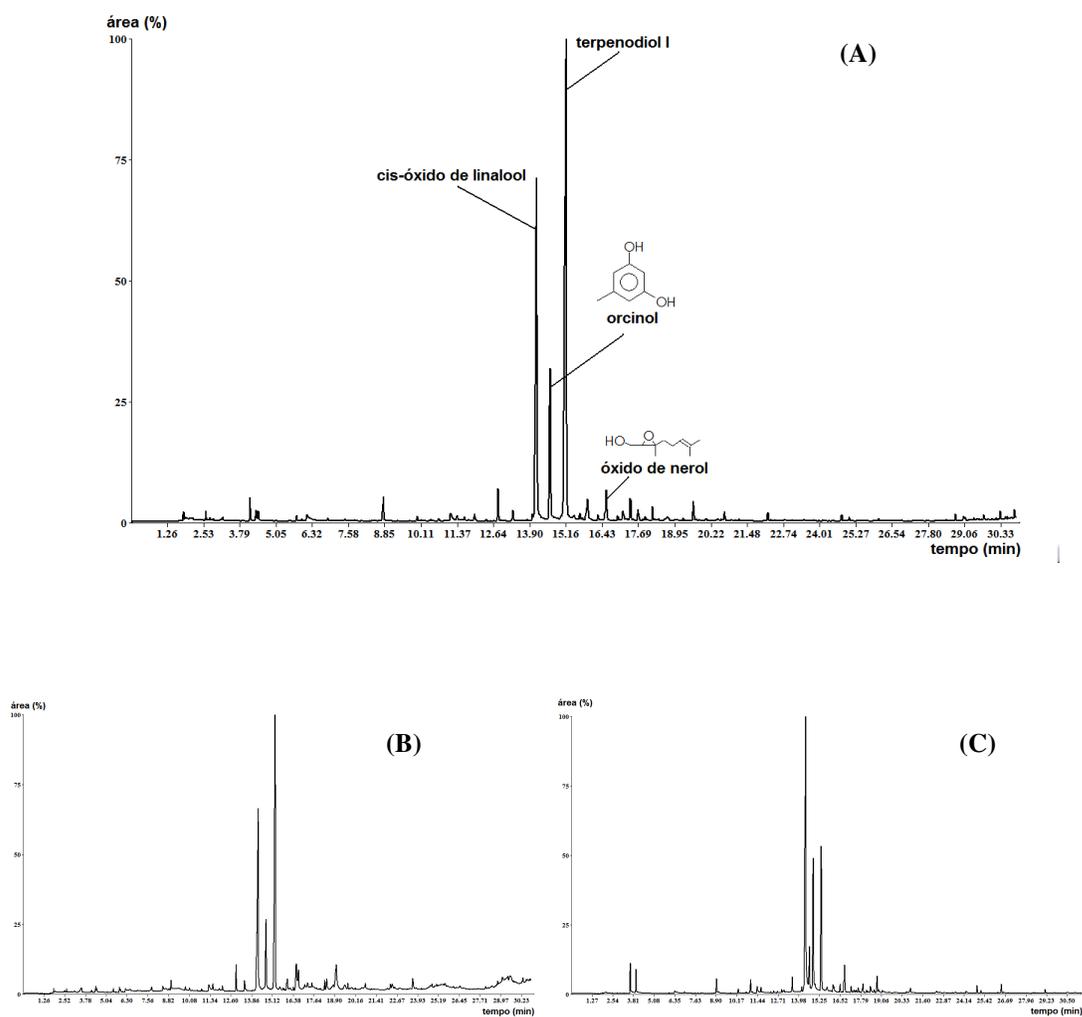


FIGURA 3.10 Cromatograma de íons totais para mel de morrão de candeia (amostras **A**, **B** e **C**).

TABELA 3.8 Compostos identificados nas amostras de mel de morrão de candeia

Compostos	RI	A ^a	B	C
benzaldeído	961	nd	nd	X
limoneno	1031	X	X	nd
fenilacetaldéido	1043	nd	X	X
2-metil-2-(3-metil-2-oxobutil)-1-ciclohexanona	1063	nd	nd	X*
<i>cis</i> -óxido de linalool	1074	X*	X*	X*
orcinol	1081	X*	X*	X
terpenediol I	1099	X*	X*	X*
óxido de nerol	1153	X	X	X
mentol	1165	X	nd	nd
2,6-dimetil-3,7-octadieno-2,6-diol	1182	X	nd	nd
hidroximetilfurfural	1195	nd	X	nd
acetato de 2-feniletila	1248	X	nd	nd

Notas: a) A, B e C correspondem aos cromatogramas da Figura 3.10; RI = índice de retenção; nd = composto não detectado; * compostos majoritários.

De acordo com a Tabela 3.8 é possível verificar que todas as amostras de mel de morrão-de-candeia apresentam quantidades significativas de óxido de linalool (isômero *cis*) e de terpenediol I. O 3,5-hidroxitolueno (orcinol) foi detectado apenas nas amostras **A** e **B**, que possuem perfil cromatográfico bastante similares, guardando a proporção entre os três principais compostos detectados, conforme pode ser observado pela comparação das **Figuras 3.10 A e B**. A amostra **C** do mel morrão de candeia apresentou majoritariamente cetonas [2-metil-2-(3-metil-2-oxobutil)ciclohexanona] e álcoois. A cetona, 2-metil-2-(3-metil-2-oxobutil)ciclohexanona, também foi observada em quantidade significativa no mel de assa-peixe. Matos *et alii* [78] avaliaram mel de morrão de candeia brasileiro (Espírito Santo) após extração em fase sólida e identificaram 51 compostos nesta variedade de mel, sendo que 24 destes também foram encontrados no mel de assa-peixe.

3. 3 CONCLUSÕES PARCIAIS

Nesta etapa do trabalho, foram analisados seis tipos de méis brasileiros. Para os méis de angico-de-bezerro e aroeira não foram localizadas na literatura informações sobre a composição de sua fração volátil. Foi constatado que algumas variedades de méis apresentam perfis cromatográficos característicos, enquanto para outras há grande variação entre amostras. Esta variação pode supostamente ser associada a origem geográfica do mel e a época em que a ele foi produzido, pois a composição do néctar das flores varia de acordo com o período da florada.

Para os méis angico-de-bezerro e aroeira não foram detectados compostos que possam ser usados como possíveis marcadores. Para o mel de assa-peixe, os dados obtidos sugerem que a **isoforona** é um potencial marcador, pois este composto foi detectado apenas nesta variedade de mel. No mel de cambará foi detectada a presença de **benzonitrila**, composto que é característico do néctar desta planta e considerado como odor ativo deste tipo de mel. A benzonitrila não foi identificada em outro tipo de mel, sendo um marcador potencial para esta variedade. O mel de marmeleiro não apresentou um composto específico que possa ser considerado marcador; entretanto, das amostras avaliadas, é possível diferenciar aquelas provenientes do Rio Grande do Norte das demais pela presença de um composto não identificado de índice de retenção 1108 - possivelmente um terpenol. No mel de morrão-de-candeia foi detectada a presença de **orcinol (3,5-diidroxitolueno)** em todas as três amostras avaliadas, aparecendo como um dos compostos de maior área relativa em duas delas. Este composto não foi identificado em outros tipos de mel, podendo ser um potencial marcador para esta variedade.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO DE MÉIS DE EUCALIPTO

No Brasil, especialmente no Estado de São Paulo, os méis monoflorais de eucalipto e laranjeira representam a maior porção da produção nacional, devido ao intenso esforço para o reflorestamento e o desenvolvimento da indústria de cítricos [95]. O mel de eucalipto tem coloração característica amarelo-ouro com reflexos alaranjados, cristaliza com granulação compacta, fina ou mediana, e é reconhecido por seu aroma intenso e persistente que recorda a madeira molhada.

A árvore de eucalipto pertence à família *Myrtaceae* e pode receber diferentes nomes populares: calipe, eucalipto-prateado, eucalipto-cheiroso, eucalipto-saligna, eucalipto-robusta, entre outros. Várias espécies de eucalipto podem ser encontradas, dentre as quais se destacam *E. grandis*, *E. robusta*, *E. saligna*, *E. citriodora* e *E. urophylla*. Esta espécie foi introduzida no Brasil em 1910, sendo que o primeiro Código Florestal Brasileiro (1934) incentivava o plantio de florestas homogêneas em detrimento das heterogêneas primitivas, derrubadas em grande parte para o plantio de eucaliptos. Inicialmente usada para a produção do carvão que movia as locomotivas a vapor, hoje é amplamente utilizado para produção de pasta de papel e celulose, na construção civil, em produtos medicinais, lenha para padarias e similares, móveis, entre outros. Suas floradas oferecem bom pasto para abelhas, produzindo mel de excelente qualidade. Sua grande utilidade para o homem, associada ao crescimento rápido (3 m / ano iniciais) faz do eucalipto uma das árvores mais plantadas do Brasil. A espécie mais plantada, *Eucalyptus grandis*, cobria em 1998 uma área de 3 milhões de hectares, equivalente à área do estado de Alagoas, segundo dados da ESALQ/USP [96].

4.1 MATERIAIS

4.1.1 REAGENTES: os mesmos descritos no capítulo anterior (p. 51).

4.1.2 MÉIS: foram empregadas onze diferentes amostras de méis de eucalipto de diferentes produtores, sendo que para oito delas foram fornecidos os resultados das análises melissopalínológicas. As amostras foram armazenadas em temperatura ambiente.

4.1.3 OUTROS MATERIAIS: OS mesmos descritos no capítulo anterior (p. 51).

4.1.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: mesmas descritas no capítulo anterior (p. 52).

4.1.5 SOFTWARE: o mesmo descrito no capítulo anterior (p. 52).

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 AMOSTRAS COM INFORMAÇÕES DE ANÁLISE MELISSOPALINOLÓGICA

Das onze amostras de mel de eucalipto avaliadas, para oito foram fornecidas pelos próprios apicultores análises melissopalínológicas, realizadas segundo procedimento convencional [66]. Na Tabela 4.1, são apresentados os resultados destas análises em porcentagem de grãos de pólen contados; a Figura 4.1 mostra microfotografias dos principais tipos de pólen encontrados nestas amostras. Todas as oito amostras estudadas podem ser classificadas com monoflorais, tendo o eucalipto como espécie dominante (45 % ou mais de pólen de flores de eucalipto). A amostra (A) possui aproximadamente 53 % de grãos de pólen identificados como de eucalipto e 15 % de pólen das espécies *Vernonia* e *Astronium*, sendo a porcentagem de outros tipos de pólen igual a 10,7%. A amostra (B) tem eucalipto como pólen principal 54 % e 17,9 % de pólen de *Cecropia*, uma espécie não nectarífera. A amostra (C) apresenta além de 55,4% de pólen de eucalipto, aproximadamente 15 % das espécies *Astronium* e *Baccharis*. A amostra (D) é a que apresenta a maior variação na composição polínica, sendo que nenhuma das espécies classificadas na Tabela 4.1 como “outros” ultrapassa 5 % de frequência. As amostras que contem mais de 80 % de grãos identificados como de eucalipto, apresentam como esperado, maior uniformidade, com destaque para as amostras (E) e (F) que possuem

respectivamente 4,6 % de pólen de *Baccharis* e 6,1 % de pólen de *Astronium*. Sendo assim, todas as amostras classificadas como monoflorais de eucalipto, possuem composição polínica bastante variada, apesar de terem o eucalipto como pólen dominante, podendo-se esperar uma composição de voláteis também diferenciada.

TABELA 4.1 Resultados da Análise Melissopalínológica para amostras de mel de eucalipto

Amostra	ESPÉCIE						
	<i>Eucalyptus</i>	<i>Vernonia</i>	<i>Astronium</i>	<i>Baccharis</i>	<i>Cecropia</i>	<i>Serjanea</i>	Outros ^b
A	53,2 ^a	14,9	14,8	4,3	----	2,1	10,7
B	54,0	1,6	----	0,8	17,9	8,9	16,8
C	55,4	2,9	15,2	14,5	----	5,1	6,9
D	58,3	1,7	----	----	----	----	40,0
E	84,4	----	0,7	4,6	0,2	1,3	8,8
F	86,4	----	6,1	----	----	1,4	6,1
G	93,7	----	----	2,3	----	----	4,0
H	97,8	----	1,1	1,1	----	----	----

Notas: a) porcentagem de grãos de pólen encontrados de cada espécie; b) incluí *Antigonum*, *Commelinaceae*, *Croton*, *Cyperaceae*, *Datura*, *Elephantopus*, *Eupatorium*, *Fabaceae*, *Gramineae*, *Hyptis*, *Ipomea*, *Lauraceae*, *Melastomataceae*, *Mimosa*, *Myrcia*, *Persea*, *Piptadenia*, *Protium*, *Rellia*, *Schinus*, *Schrankia*.

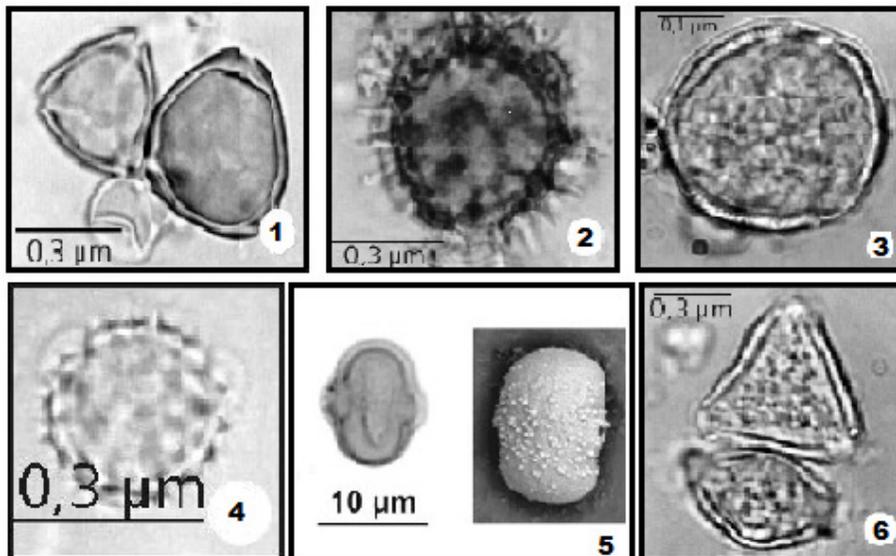


FIGURA 4.1 Microfotografias de grãos de pólen das espécies encontradas nos méis de eucalipto. (1) *Eucalyptus*; (2) *Vernonia*; (3) *Astronium*; (4) *Baccharis*; (5) *Cecropia*; (6) *Serjanea* [97].

Os compostos detectados e identificados nas amostras de mel relacionadas na Tabela 4.1 estão apresentados na Tabela 4.2. Com base nos dados da Tabela 4.2, é possível verificar que os isômeros *cis*- e *trans*- do óxido de linalool estão presentes em todas as amostras como componentes majoritários. Estes compostos já foram detectados em méis de eucalipto australianos [50] e espanhóis [11], sendo que os méis australianos também apresentaram furfural e os méis espanhóis apresentaram quantidades significativas de benzaldeído e fenilacetaldéido. Um composto não identificado de massa molar 124 (RI = 1083) foi detectado em todas as amostras, sendo que para os méis com mais de 80 % de pólen de eucalipto a concentração deste composto é inferior à dos outros méis. Este isômero não identificado (RI = 1083) também foi detectado por D'Arcy *et alii* [50] em méis de eucalipto australiano dos gêneros *E. Leucoxydon* e *E. Melliodora*. Nonanal, 1-nonanol, ácido nonanóico, ácido dodecanóico e ácido hexadecanóico, detectados em méis de eucalipto italianos [70], não foram detectados nas amostras aqui avaliadas. Fuente *et alii* [11] sugerem que os compostos acetoína, 2,3-butanodiona e *cis*-óxido de linalool sejam usados como discriminantes para o mel de eucalipto espanhol. Destes compostos, apenas o *cis*-óxido de linalool foi encontrado nas amostras estudadas de mel de eucalipto italiano [70], australiano [11], grego [98] e nestas amostras de mel brasileiro. Entretanto, o *cis*-óxido de linalool foi encontrado em praticamente todas as amostras estudadas neste trabalho independente da florada, não sendo útil como marcador. Em méis de eucalipto gregos [98], avaliados por SPME e extração assistida por ultrassom, foram detectados apenas álcool benzílico, fenilacetaldéido, *p*-tolualdeído, álcool feniletílico, ácido benzóico e ácido fenilacético.

TABELA 4.2 Compostos identificados nas amostras de mel de eucalipto com informações de Análise Melissopalínológica

Composto	RI	A ^b	B	C	D	E	F	G	H
furfural	830	nd	nd	1,1	nd	2,4	1,2	6,1	9,3
benzaldeído	961	3,9 ^c	1,6	6,0	16,0	nd	nd	nd	nd
cimeno	1022	nd	nd	1,1	1,1	nd	nd	nd	nd
limoneno	1031	2,4	2,0	2,0	2,4	2,0	1,4	nd	nd
<i>cis</i> -óxido de linalool	1074	19,4	30,2	21,9	15,3	19,3	12,6	13,1	13,2
n.i. ^a	1083	8,9	11,2	11,6	3,8	5,4	2,0	2,2	2,1
<i>trans</i> -óxido de linalool	1088	16,3	34,2	14,3	16,7	15,0	33,3	29,2	38,0
fenchol	1112	nd	nd	nd	1,2	1,4	1,9	1,2	1,2
isoforona	1118	nd	nd	nd	nd	nd	1,7	nd	1,5
l-pinocarveol	1139	6,1	2,6	5,7	2,4	7,0	1,7	2,6	2,0
pinocanfona	1160	1,4	1,2	3,5	2,9	nd	3,2	nd	nd
borneol	1165	2,2	nd	4,5	nd	nd	nd	nd	nd
α -terpineol	1189	1,8	nd	nd	nd	4,8	nd	nd	nd
compostos identificados ^d		62,4	84,6	71,7	61,8	57,3	59,0	83,4	67,3

Notas: a) n.i. = composto não identificado; b) A a H correspondem às amostras; c) valores de área relativa percentual; d) somatório das áreas relativas dos compostos identificados; RI = índice de retenção; nd = composto não detectado.

4.2.2 AMOSTRAS SEM INFORMAÇÕES DE ANÁLISE MELISSOPALINOLÓGICA

Foram avaliadas outras três amostras de méis de eucalipto, assim classificadas pelo produtor mas sem dados de análise melissopalínológica. Uma delas foi declarada com “eucalipto puro”, outra como heterofloral com presença predominante de eucalipto e a outra como uma mistura de eucalipto e amor-agarradinho (*Antigonon leptopus*). Os cromatogramas obtidos são apresentados na Figura 4.2. Observando esta figura é possível verificar que os perfis cromatográficos obtidos são similares para as amostras de “eucalipto puro” e heterofloral com presença predominante de eucalipto. A amostra que supostamente contém mistura do pólen da planta amor-agarradinho apresentou um perfil diferenciado, sendo alterado inclusive o pico do composto mais abundante. A Tabela 4.3 relaciona os compostos identificados para estas amostras.

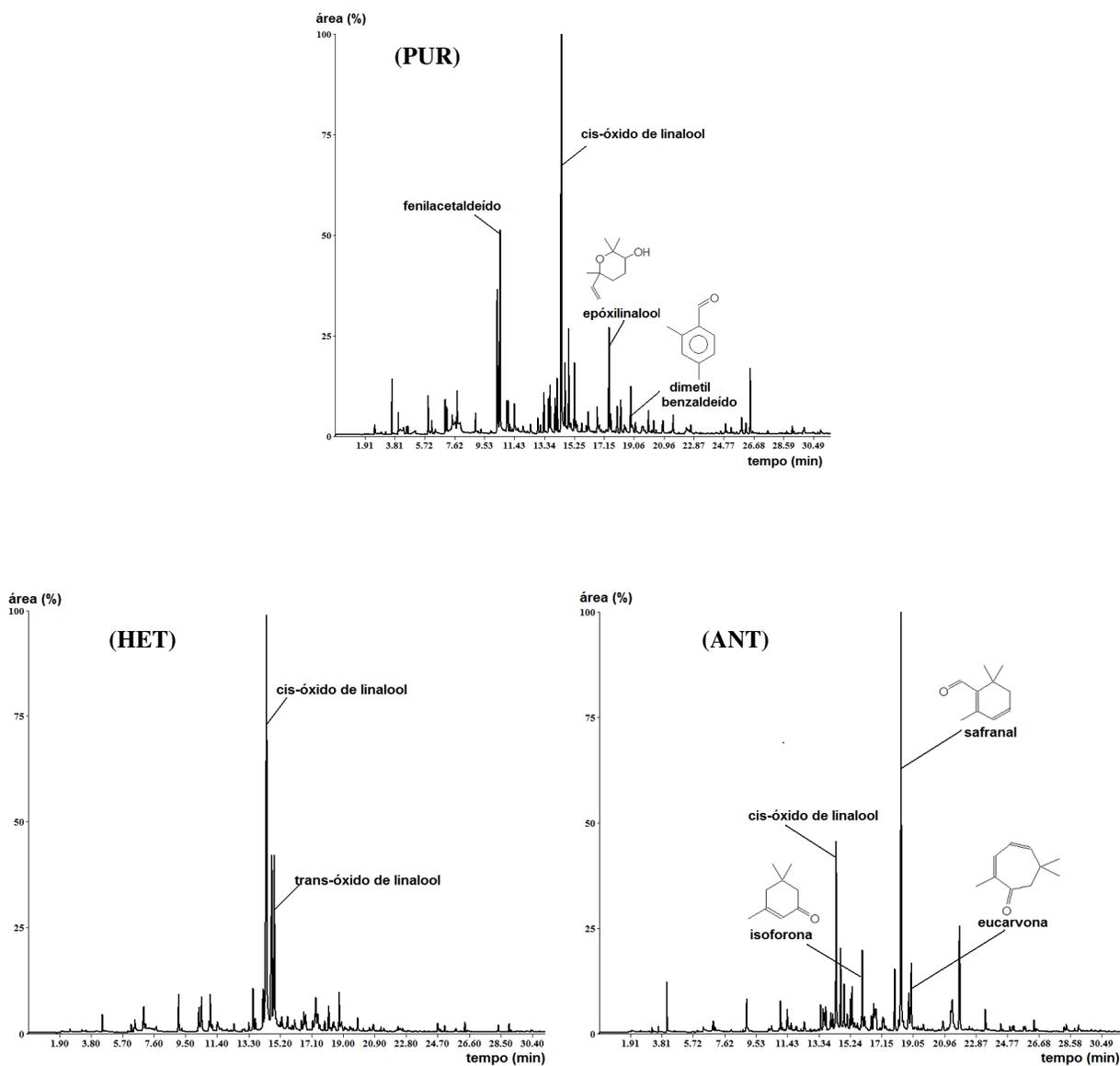


FIGURA 4.2 Cromatogramas de íons totais para mel de **(PUR)** eucalipto puro, **(HET)** heterofloral com predominância de eucalipto e **(ANT)** eucalipto com *Antigonon leptopus*.

Com base nos dados da Tabela 4.3, é possível verificar que os isômeros *cis* e *trans* do óxido de linalool estão presentes em todas as amostras, mas como componentes majoritários apenas para a amostra de mel heterofloral. Na amostra de mel de eucalipto

puro, apenas o isômero *cis* aparece em quantidade significativamente maior. O furfural foi identificado em todas as amostras, assim como dimetilbenzaldeído, o 2,4-bis(1,1-dimetiletil)fenol, e um composto não identificado com índice de retenção 1083 e massa molar 124 que apresentou menor porcentagem no mel puro, como observado para os méis com porcentagem de pólen de eucalipto superior a 80% (Tabela 4.2). Da mesma forma, como já havia sido observado para as amostras que continham mais de 80 % de pólen de eucalipto (Tabela 4.2), o benzaldeído não foi detectado no mel considerado puro. Linalool e α -terpineol não foram detectados na amostra heterofloral. O naftaleno foi encontrado apenas nestas três amostras, e apenas a amostra contendo *Antigonon leptopus*, apresentou safranal e eucarvona. Estes compostos foram identificados tentativamente apenas por comparação com os espectros de massa e não eram esperados em amostras de mel. Neste caso, pode-se afirmar que não são característicos de mel de eucalipto, sendo provavelmente provenientes do *Antigonon leptopus* ou de outras fontes florais visitadas pelas abelhas.

TABELA 4.3 Compostos identificados nas amostras de mel de eucalipto sem informações de Análise Melissopalínológica

Composto	RI	PUR ^b	HET	ANT
furfural	830	2,8 ^c	4,1	3,3
benzaldeído	961	nd	2,4	2,7
benzenoacetaldéido	1043	2,3	2,8	nd
<i>cis</i> -óxido de linalool	1074	22,1	49,0	13,5
n.i. ^a	1083	0,8	2,1	1,1
<i>trans</i> -óxido de linalool	1088	3,7	11,9	3,0
linalool	1096	2,5	nd	1,4
isoforona	1118	nd	nd	7,4
epóxilinalool	1153	3,6	1,1	nd
naftaleno	1179	1,9	1,1	4,1
α -terpineol	1189	1,2	nd	0,6
safranal	1197	nd	1,5	22,9
dimetilbenzaldeído	1201	2,2	1,9	2,1
eucarvona	1208	nd	nd	5,6
<i>p</i> -anisaldeído	1252	nd	3,0	nd
2,4-bis(1,1-dimetiletil)fenol	2201	1,1	0,4	1,1
dibutilftalato	3453	0,8	0,5	0,8
compostos identificados ^d		44,7	81,7	69,4

Notas: a) n.i. = composto não identificado; b) PUR = mel puro de eucalipto, HET = mel de eucalipto heterofloral e ANT = mel de eucalipto e *Antigonon*, apresentados na Figura 4.2; c) valores de área relativa percentual; d) somatório das áreas relativas dos compostos identificados; RI = índice de retenção; nd = composto não detectado.

Zini *et alii* [65] estudaram por SPME-CG compostos orgânicos voláteis emitidos por espécies de eucalipto *in situ*. Dentre os compostos encontrados para a espécie *E. dunnii*, temos os listados na Tabela 4.4 acrescidos de isopreno, hexenal, 3-hexen-1-ol e β -ocimeno. Para *E. citriodora*, tem-se a presença de isômeros oxido rosa, citronelal, citronelol e acetato de citronelila.

TABELA 4.4 Compostos detectados em folhas de eucalipto [65] e nos diferentes méis de eucalipto estudados.

Composto	RI	Folha	Mel^a
pineno	939	X	nd
canfeno	953	X	nd
felandreno	1005	X	nd
cimeno	1022	X	C, D
limoneno	1031	X	G, H
1,8-cineol	1033	X	nd
linalool	1096	X	PUR, ANT
fenchol	1112	X	D, E, F, G, H
l-pinocarveol	1139	X	A, B, C, D, E, F, G, H
pinocanfona	1160	X	E, G, H
borneol	1165	X	A, C
terpineol	1189	X	A, E, PUR, ANT
verbenona	1204	X	nd
carveol	1217	X	nd
<i>cis</i> -cariofileno	1409	X	nd
<i>trans</i> -cariofileno	1418	X	nd
aloaromandendreno	1461	X	nd
espatulenol	1576	X	nd
globulol	1583	X	nd

Notas: a) A-H = amostras descritas na Tabela 4.1, PUR = mel puro de eucalipto, ANT = mel de eucalipto e *A. leptopus* ; RI = índice de retenção; nd = composto não detectado,

A Tabela 4.4 apresenta os resultados obtidos, indicando, dos compostos detectados, aqueles encontrados nas folhas de eucalipto [65]. O l-pinocarveol foi o único composto encontrado tanto nas folhas como em oito amostras de mel de eucalipto (todas as que possuíam análise de pólen). Limoneno e pinocanfona foram encontrados apenas nas amostras com teor de pólen superior a 90 %. O fenchol foi detectado em amostras com teor de pólen maior ou igual a 58 %. O linalool foi encontrado apenas nas amostras de mel de eucalipto “puro” e com *A. leptopus*. O borneol foi detectado em amostras contendo até 55 % de pólen de eucalipto e o α -terpineol em amostras com composição de pólen variado.

4.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

L-pinocarveol, fenchol e pinocanfona, são compostos provenientes do eucalipto que se apresentam aparentemente, sem modificações químicas na grande maioria das amostras de mel de eucalipto estudadas. Estes compostos não foram detectados nas amostras de mel de outras origens florais estudadas neste trabalho. Assim, se mostram como um possíveis marcadores para méis de eucalipto. Outros compostos detectados, como limoneno, isômeros do óxido de linalool, benzaldeído e furfural, não devem ser empregados com esta finalidade, pois foram encontrados em méis de outras procedências.

CAPÍTULO 5

Caracterização de Méis de Laranjeira

O Brasil é o maior produtor mundial de frutas cítricas, sendo responsável por aproximadamente 27 % da produção mundial. O Estado de São Paulo responde por 80 % do total produzido no país, com 13,8 milhões de toneladas [99]. Isso favoreceu o desenvolvimento da atividade apícola em SP, com destaque para a produção do mel de laranjeira - um mel dourado, com aroma que remete às laranjeiras em flor, encorpado e com paladar específico, preferido por grande parte dos consumidores [100].

5.1 Materiais

5.1.1 Reagentes: os mesmos descritos no Capítulo 3 (p. 51).

5.1.2 MÉIS: foram empregadas três amostras de méis de laranjeira fornecidas por diferentes produtores. As amostras foram armazenadas em frascos fechados, em local seco e à temperatura ambiente.

5.1.3 OUTROS MATERIAIS: os mesmos descritos no Capítulo 3 (p. 51).

5.1.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: as mesmas descritas no Capítulo 3 (p. 52).

5.1.5 SOFTWARE: o mesmo descrito no Capítulo 3 (p. 52).

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS DE MÉIS DE LARANJEIRA

Méis de laranjeira apresentam normalmente uma representatividade de pólen abaixo do normal, sendo que um mel pode ser considerado desta procedência com uma porcentagem de pólen entre 5 e 15 % [101]. Por este motivo, segundo Anklan [9] a análise de pólen não é adequada para classificar este tipo de mel. Este fato poderia causar uma grande variação nos perfis cromatográficos deste tipo de amostra; entretanto, isso não foi verificado como pode ser observado na Figura 5.1. A classificação do mel destas amostras foi feita pelo produtor, que justificaram essa qualificação pela grande disponibilidade de pasto apícola cítrico na região de entorno da colméia.

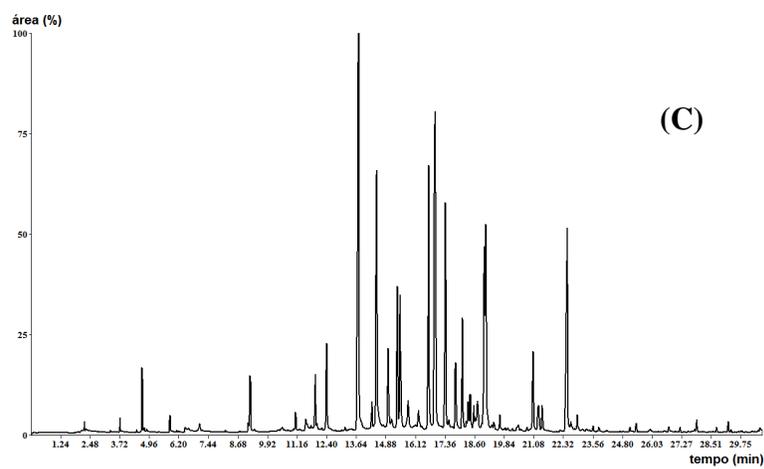
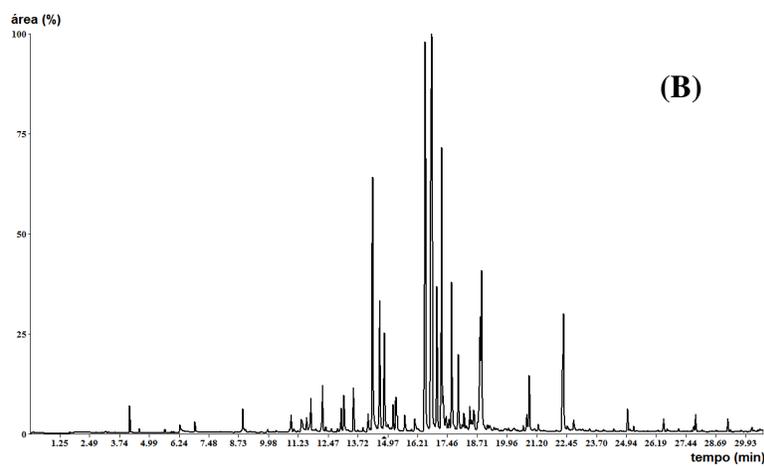
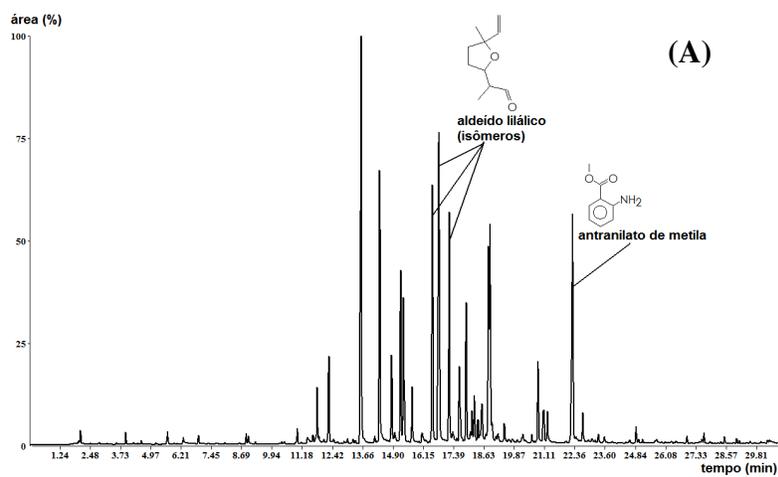


FIGURA 5.1 Cromatogramas de íons totais para mel de laranjeira: (A) amostra 1; (B) amostra 2; (C) amostra 3.

A Tabela 5.1 relaciona os compostos detectados e identificados nestas três amostras de méis de laranjeira. Cinco diferentes aldeídos, incluindo três isômeros do aldeído lilálico [102] foram os responsáveis por 45 % da área total do cromatograma.

TABELA 5.1 Compostos identificados nas amostras de mel de de laranjeira

Composto	RI	A^b	B	C
limoneno	1031	nd	2,0	nd
fenilacetaldéido	1043	2,4 ^c	2,0	1,1
<i>cis</i> - óxido de linalool	1074	26,7	2,3	7,6
n.i. ^a	1082	nd	7,5	nd
linalool	1098	9,1	6,3	nd
álcool feniletílico	1110	5,6	13,0	nd
isômero do aldeído lilálico	1131	8,4	11,5	5,3
isômero do aldeído lilálico	1143	15,7	18,3	9,7
mentona	1154	nd	4,6	nd
isômero do aldeído lilálico	1172	7,6	8,8	4,8
ment-1-en-9-al	1176	nd	5,4	nd
ment-1-en-9-ol	1291	nd	5,7	4,5
antranilato de metila	1337	4,9	6,4	5,2
dibutilftalato	3453	nd	5,3	nd
compostos identificados ^d		80,4	99,1	38,2

Notas: a) n.i. = composto não identificado; b) A, B e C correspondem aos cromatogramas da Figura 5.1; c) valores de área relativa percentual; d) somatório das áreas relativas dos compostos identificados; RI = índice de retenção; nd = composto não detectado.

A presença dos aldeídos lilálicos neste tipo de mel é relatada em outros trabalhos que avaliaram mel cítrico [11, 12, 27, 71], em mel de avelã (*Rhus succedanea*) e em mel de tomilho (*Thymus vulgaris*) por Piasenzotto *et alii* [12], que afirmam que o limonenodiol seria um marcador adequado para este mel. De acordo com Wilkins *et alii* [51] os aldeídos lilálicos são produzidos a partir do acetato de linalila, que pode sofrer oxidação, gerando (E)-2,6-dimetil-6-acetoxi-2,7-octadienal; este pode se isomerizar, resultando os aldeídos lilálicos - que podem ser reduzidos resultando os álcoois lilálicos correspondentes. Segundo Pérez *et alii* [71], a presença dos isômeros do aldeído lilálico,

responsáveis por um odor floral, parece ser uma característica dos méis de laranjeira. Extratos de flores de quatro espécies cítricas foram avaliados por Alissandrakis *et alii* [103], tendo sido demonstrado que compostos precursores do aroma do mel são encontrados em plantas de correspondente origem botânica.

O antranilato de metila foi encontrado neste trabalho apenas em amostras de mel de laranjeira. Este composto já havia sido detectado em méis de laranjeira espanhóis [27] e é considerado um marcador para este tipo de mel por Ferreres *et alii* [104] e White e Bryant [105], pois não é encontrado em outros méis de outras origens florais [43, 104, 105, 106]. Entretanto, em pelo menos um trabalho com mel de laranjeira [107] este composto não foi detectado.

Óxido de *cis*-linalool e met-1-en-9-al detectados nas amostras de mel de laranjeira foram anteriormente encontrados em outros méis de laranjeira brasileiros por Bastos *et alii* [76]. Nestas amostras, linalool não é o composto predominante – ao contrário do relatado por Alissandrakis *et alii* [103], que detectaram limoneno, eucaliptol e α -terpineol em méis de limão e relatam que 80 % da composição dos méis cítricos de procedência grega consiste em compostos derivados de linalool. Isto era esperado, já que análises realizadas nas flores mostraram que linalool é seu componente principal. Feger *et alii* [108] analisaram o óleo extraído da casca de laranja do tipo *murcote* e determinaram a presença de α -pineno, limoneno e linalool e ausência de outros compostos característicos nos óleos de laranja de outras espécies mais comuns, como é o caso do γ -terpineno, antranilato de metila e timol.

Segundo, Ferreres *et alii* [104], o mel de laranjeira apresenta os flavonóides hesperetina e apigenina, detectáveis por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo que a hesperetina é sugerida como marcador para mel cítrico espanhol, pois este composto não foi detectado em nenhum outro tipo de mel e seu derivado glicosado hesperidina é encontrado no néctar da laranja [9]. A apigenina foi detectada, utilizando CLAE, em pequena quantidade em amostras de méis de laranjeira brasileiros por Park *et alii* [109], onde foram encontrados pelo menos quatorze ésteres derivados de diferentes ácidos carboxílicos. O dibutilftalato, detectado nestas e em outras amostras de méis aqui avaliadas, também foi encontrado por Alissandrakis *et alii* [103] em méis espanhóis e provavelmente se origina da embalagens onde o mel foi acondicionado (dibutilftalato é um plastificante extensivamente usado).

5.2.2 RECLASSIFICAÇÃO DE UMA AMOSTRA DE OUTRA VARIEDADE DE MEL

Na Figura 5.2 são apresentados um cromatograma típico obtido para amostra C do mel de laranjeira, um para mel de marmeleiro (Figura 3.8, p.62) e o cromatograma obtido de uma amostra de mel proveniente da região de Amparo (SP), classificada pelo produtor como mel de marmeleiro. É notável a grande semelhança entre o perfil cromatográfico desta amostra (Figura 5.2B) e o perfil do mel de laranjeira (Figura 5.2A); por outro lado, o mesmo não ocorre quando esta amostra é comparada ao mel de marmeleiro (Figura 5.2C).

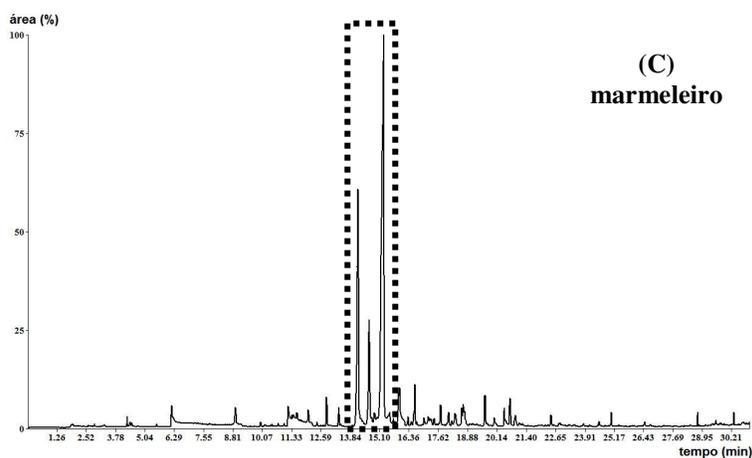
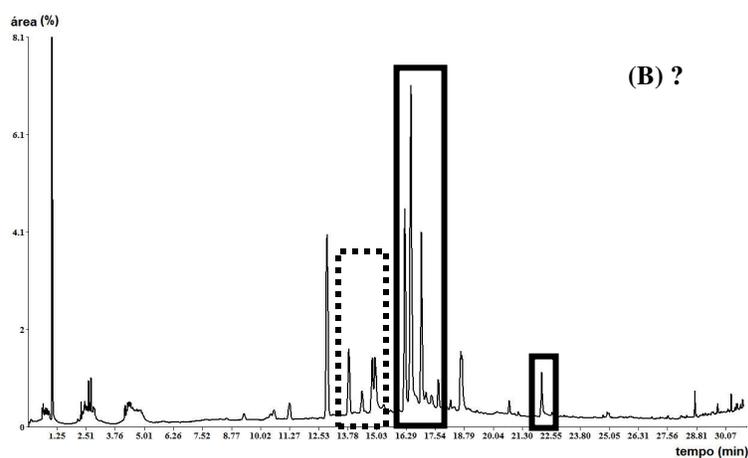
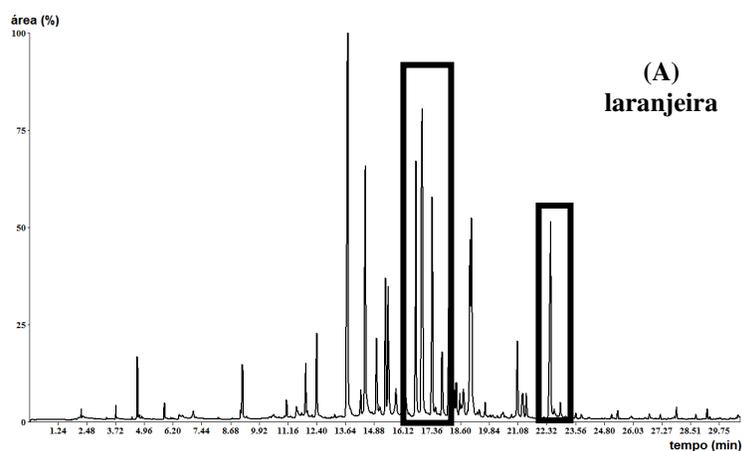


FIGURA 5.2 Cromatogramas de íons totais (A) mel de laranja (Figura 5.1C, p. 81), (B) suposto mel de marmeleiro, (C) mel de marmeleiro (Figura 3.8, p. 62). Destaque para os

grupos de compostos característicos do mel de laranjeira (linha contínua) e do mel de marmeleiro (linha pontilhada).

É possível notar que o do mel supostamente de marmeleiro apresenta um perfil cromatográfico mais complexo do que o esperado para esta variedade de mel. Além disso, apresenta um grupo de picos (destacados na Figura 5.2) característicos do mel de laranjeira, correspondentes aos isômeros do aldeído lilálico e ao antranilato de metila. Com base nestas informações é possível inferir que a amostra classificada pelo produtor como mel de marmeleiro (a única das amostras estudadas desta variedade proveniente do estado de São Paulo) apresenta compostos característicos do mel de laranjeira, sendo supostamente um mel heterofloral com características predominantemente cítricas. Esse fato não é difícil de ser explicado, se for levado em consideração que a região onde está localizada a colméia produtora desta amostra que apresenta grandes áreas agrícolas dedicadas a citricultura, o que facilitaria o acesso destas abelhas a este tipo de néctar.

5.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

O mel de laranjeira apresenta composição de voláteis e consequente perfil cromatográfico característico. Dentre os compostos identificados, os **isômeros do aldeído lilálico** podem, em conjunto com o **antranilato de metila**, ser usados como marcadores para este tipo de mel. Estes compostos também foram encontrados em uma amostra classificada pelo produtor, aparentemente de forma errônea, como de mel de marmeleiro. Isso possibilitou que esta amostra fosse reclassificada, como mel heterofloral com predominância de laranjeira.

CAPÍTULO 6

Caracterização de Outros Méis Brasileiros

Neste capítulo são apresentados os resultados para méis brasileiros dos quais apenas uma amostra foi disponibilizada. Ainda não foram relatadas informações sobre a composição de voláteis destas variedades de méis na literatura. Desta forma, apresenta-se um estudo inicial sem caráter conclusivo, que poderá ser ampliado em trabalhos posteriores.

6.1 Materiais

6.1.1 Reagentes: os mesmos descritos no Capítulo 3 (p. 51).

6.1.2 MÉIS: Foram empregadas amostras de méis de diferentes floradas (Tabela 6.1) fornecidas por diferentes produtores (apenas uma amostra por variedade de mel). As amostras foram armazenadas em frascos fechados, em local seco e à temperatura ambiente.

TABELA 6.1 Relação das amostras de méis brasileiros classificadas pela florada

Origem Floral
Camboatã (<i>Cupania oblongifolia</i>)
Canudo-de-pito (<i>Senna bicapsularis</i>)
Capixingui (<i>Croton floribundus</i>)
Cipó-cabeludo (<i>Mikania hirsutissima</i>)
Cipó-uva (<i>Serjanea sp.</i>)
Espinho (<i>Strychnos nigricans</i>)
Jitirana (<i>Ipomoea glabra</i>)
Palmeira (<i>Archontophoenix cunninghamiana</i>)
Tataré (<i>Chloroleucon tortum</i>)

6.1.3 OUTROS MATERIAIS: os mesmos descritos no Capítulo 3 (p. 51).

6.1.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS: as mesmas descritas no Capítulo 3 (p. 52).

6.1.5 SOFTWARE: o mesmo descrito no Capítulo 3 (p. 52).

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 MEL DE CAMBOATÃ OU CUPÂNIA (*CUPANIA OBLONGIFOLIA*)

Camboatã é uma árvore nativa do Brasil e ocorre nos estados de Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Minas Gerais e do Rio de Janeiro. É também conhecida pelo nome vulgar de **cajueiro-do-campo**. Floresce em junho com flores pequenas e esverdeadas dispostas em espigas pendentes que são atrativas para abelhas. A amostra deste mel estudada é proveniente de Dourados, Mato Grosso do Sul. A Figura 6.1 mostra o cromatograma obtido cujos compostos tentativamente identificados estão relacionados na Tabela 6.2.

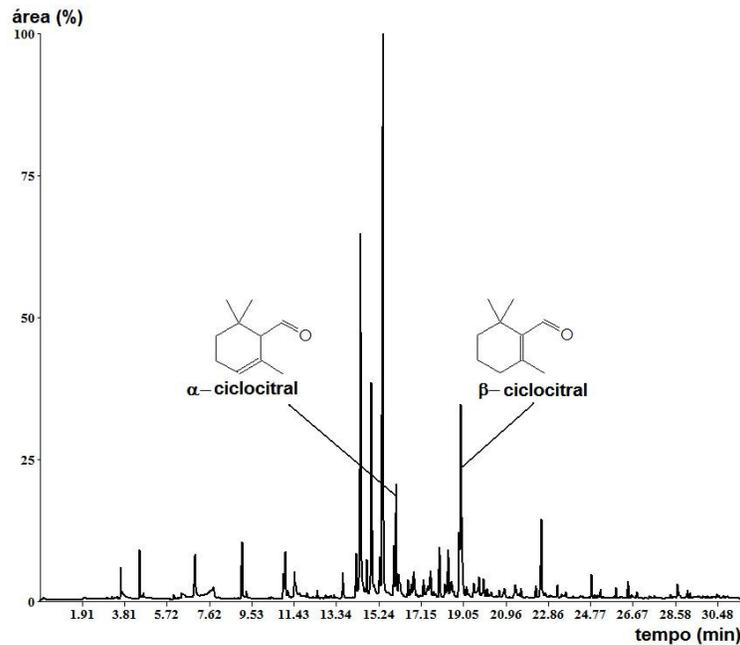


FIGURA 6.1 Cromatograma de íons totais para mel de camboatã.

TABELA 6.2 Compostos identificados na amostra de mel de camboatã

Composto	RI
2,2-dimetilhexano	720
furfural	830
5-metil-2-furfural	961
benzaldeído	962
<i>cis</i> -óxido de linalool	1074
orcinol	1081
n.i. ^a	1083
linalool	1098
terpenodiol I	1099
α -ciclocitral(isômero)	1103
α -isoforona	1118
aldeído lilálico (isômero)	1143
safranal	1197
dimetilbenzaldeído	1201
isômero de ciclocitral	1204
eugenol	1356

Notas: a) n.i. = composto não identificado; RI = índice de retenção.

O principal componente desta amostra de mel de camboatã é o terpenodiol I. Também foram detectados como compostos importantes para esta amostra, o *cis*-óxido de linalool, um composto não identificado com índice de retenção 1083 e dois isômeros do ciclocitral. Estes compostos foram encontrados em muitos dos méis brasileiros estudados, assim como componentes minoritários como o safranal (anteriormente encontrado no mel de eucalipto, cambará e assa-peixe), a isoforona e o eugenol (um carotenóide), detectados em méis de eucalipto e marmeleiro. Entretanto, os isômeros do ciclocitral foram encontrados apenas neste tipo de mel. Estes compostos são obtidos da combinação de geranial e neral (ambos aldeídos de isômeros do geraniol) e dependendo da sua concentração, podem ter odor relacionado com “grama fresca”, “amadeirado” ou “tabaco” [110]. O citral é encontrado como componente principal em frutas [111] e no óleo de melissa

[112]. Estes estudos preliminares indicam que o **ciclocitral** pode ser um potencial marcador para este tipo de mel.

6.2.2 MEL DE CANUDO-DE-PITO (*SENNA BICAPSULARIS*)

Canudo-de-pito é uma árvore de crescimento rápido, que atinge um porte de 3 metros de altura, para 2 metros de diâmetro da copa arredondada. Pode ser encontrada em diversos continentes ao redor do mundo. Sua floração no hemisfério sul decorre entre janeiro a junho e origina flores de cor amarela. O mel de canudo-de-pito faz parte dos méis produzidos em São Joaquim, SC, e apresentam uma produção média anual de 100 toneladas, sendo considerado um dos melhores do Brasil. A amostra deste mel avaliada é proveniente dessa cidade. A Figura 6.2 apresenta o cromatograma obtido para esta amostra e os compostos tentativamente identificados estão apresentados na Tabela 6.3.

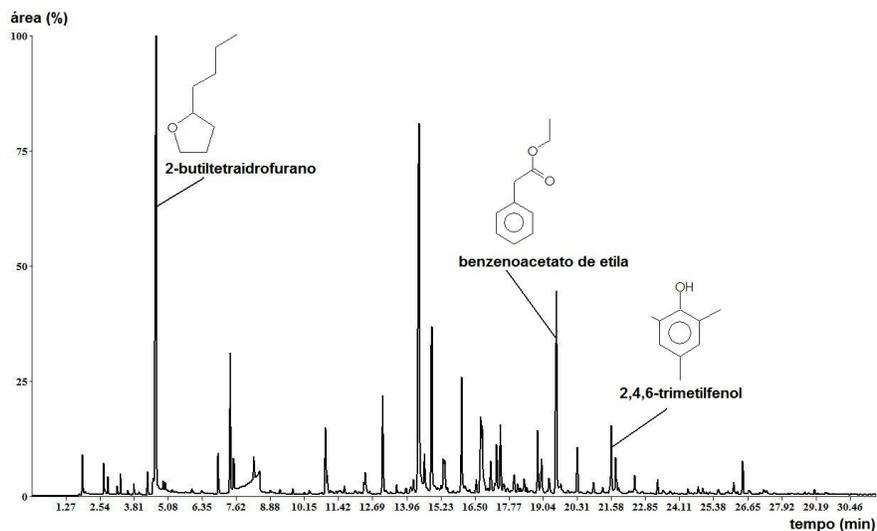


FIGURA 6.2 Cromatograma de íons totais para mel de canudo-de-pito.

TABELA 6.3 Compostos identificados na amostra de mel de canudo-de-pito

Compostos	IR
2-butiltetraidrofurano	760
furfural	830
2-metilbutanoato de etila	843
3-metilbutanoato de etila	851
2,2-dimetil-1-butanol	874
ácido 2-metilexanóico	880
5-metil-2-furfural	962
n.i. ^a	1060
5-metil-resorcinol	1067
<i>cis</i> -óxido de linalool	1074
terpenodiol I	1099
α -isoforona	1118
5,5-dimetil-3-oxo-1-cicloexeno-1-carboxaldeído	1140
2-hdroxi-3,5,5-trimetil-cicloex-2-enona	1141
aletrolona	1150
4,5-dietil-2,3-dihidro-2,3-dimetilfurano	1161
dimetilbenzaldeído	1201
eucarvona	1208
benzoacetato de etila	1244
α -etilidenobenzenacetaldeído	1258
2,4,6-trimetilfenol	1375
9-(3,3-dimetiloxiran-2-il)-2,7-dimetilnona-2,6-dien-1-ol	1388
2,4-bis(1,1-dimetiletil)-fenol	2201
dibutilftalato	3453

Notas: a) n.i. = composto não identificado; IR = índice de retenção.

O mel de canudo-de-pito apresentou quantidades similares de álcoois e furanos, sendo o pico mais intenso obtido atribuído ao 2-butiltetraidrofurano. A presença de derivados de furano em méis é normalmente atribuída a processos de aquecimento ou estocagem das amostras. Entretanto, esta amostra também apresentou estes compostos quando o processo de extração foi realizado a 30 °C. Isso permite que se conclua que este composto pode ser característico deste tipo de mel ou proveniente do processamento realizado, antes da análise, pelo apicultor. Este tipo de mel também apresentou, em quantidades significativas, cetonas, ésteres e aldeídos e foi o único onde se detectou o composto **2,4,6-trimetilfenol**, podendo este ser um possível marcador para o mel de canudo-de-pito.

6.2.3 MEL DE CAPIXINGUI (*CROTON FLORIBUNDUS*)

O capixingui é uma árvore que floresce nos meses de outubro a dezembro. Como árvore pioneira é tolerante à áreas abertas, de crescimento rápido, é útil para plantios em reflorestamentos de áreas degradadas de preservação permanentes. O mel produzido a partir do néctar de suas flores tem coloração âmbar claro, com sabor agradável e característico. A Figura 6.3 apresenta o cromatograma obtido para uma amostra deste mel proveniente de Caconde, SP. Os compostos tentativamente identificados estão apresentados na Tabela 6.4.

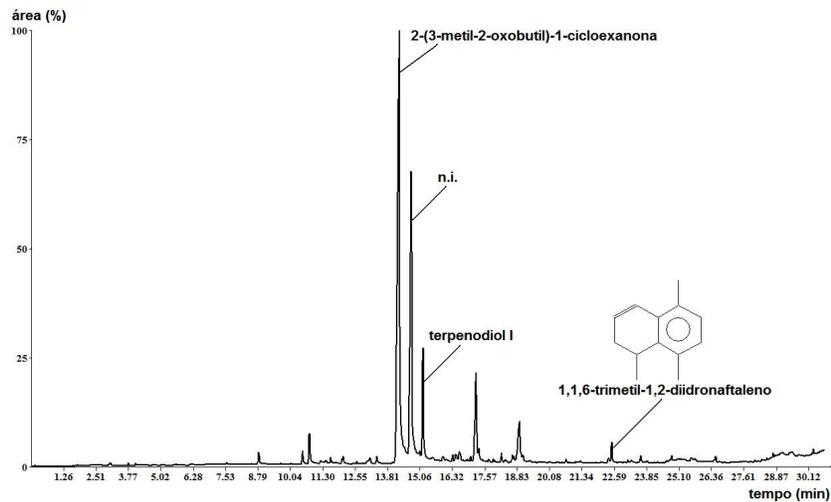


Figura 6.3 Cromatograma de íons totais para mel de capixingui.

TABELA 6.4 Compostos identificados na amostra de mel de capixingui

Composto	RI
1,3-ciclopentadiona	927
benzaldeído	961
8-hidroxi-linalool	986
fenilacetaldéido	1043
2-(3-metil-2-oxobutil)-1-ciclohexanona	1063
n.i. ^a	1083
terpenodiol I	1099
isômero do aldeído lilálico	1131
epoxilinalool	1153
hidroximetilfurfural	1195
1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftaleno	1286

Notas: a) n.i. = composto não identificado; RI = índice de retenção.

A amostra de mel de capixingui, apresentou como componente principal a 2-(3-metil-2-oxobutil)-1-ciclohexanona, seguida dos derivados do linalool, terpenodiol I, epoxilinalool e o composto não identificado com índice de retenção 1083. Esta cetona cíclica, 2-(3-metil-2-oxobutil)-1-ciclohexanona, foi identificada neste mel e também, como o principal componente, nas amostras de méis de palmeira, aroeira e marmeleiro. A principal diferença observada para este tipo de mel é a presença do **1,1,6-trimetil-1,2-diidro-naftaleno**, um composto detectado em aromas de vinhos [113, 114].

6.2.4 MEL DE CIPÓ-CABELUDO (*MIKANIA HIRSUTISSIMA*)

Cipó-cabeludo é um arbusto pequeno que produz pequenas flores brancas. Faz parte do gênero *Mikania* e é encontrado em várias partes do Brasil. O seu óleo essencial contém cumarina, sesquiterpenos, flavonóides, saponinas e derivados do ácido carenóico [115, 116]. A amostra de mel de cipó-cabeludo estudada era proveniente de Pirai, RJ. O cromatograma obtido é apresentado na Figura 6.4 e os compostos detectados e identificados estão relacionados na Tabela 6.5.

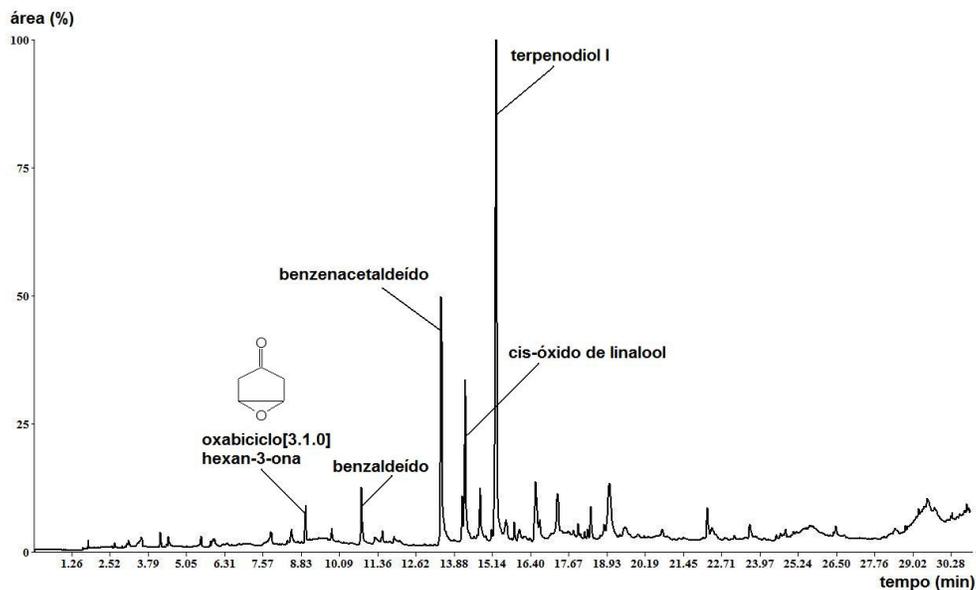


FIGURA 6.4 Cromatograma de íons totais para mel de cipó-cabeludo.

TABELA 6.5 Compostos identificados na amostra de mel de cipó-cabeludo

Composto	RI
oxabicyclo[3.1.0]hexan-3-ona	932
benzaldeído	961
fenilacetaldéido	1043
<i>cis</i> -óxido de linalool	1074
n.i. ^a	1083
terpenodiol I	1099
epoxilinalool	1153
hidroximetilfurfural	1195

Notas: a) n.i. = composto não identificado; RI = índice de retenção.

Esta amostra de mel de cipó-cabeludo foi, das amostras estudadas neste trabalho, a que apresentou um menor número de compostos voláteis detectados e identificados. Além disso foi a única em que foi detectada oxabicyclo[3.1.0]hexan-3-ona. O *cis*-óxido de linalool e o terpenodiol I foram detectados mais uma vez como componentes principais, seguidos pelo benzaldeído. Os resultados obtidos sugerem que a **oxabicyclo [3.1.0] hexan-3-ona** pode ser um possível marcador para este tipo de mel.

6.2.5 MEL DE CIPÓ-UVA (*SERJANIA SP.*)

O cipó-uva (diversas espécies, *Serjania sp.*) é uma das importantes plantas apícolas do cerrado brasileiro. A amostra de mel de cipó-uva avaliada é proveniente de Dourados – MS. O cromatograma obtido é apresentado na Figura 6.5 e a Tabela 6.6 relaciona os compostos identificados nesta amostra.

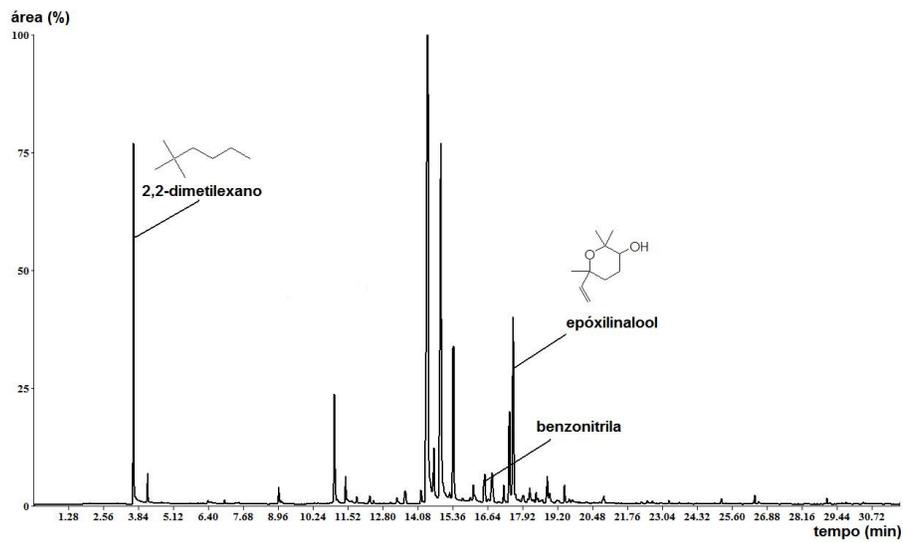


FIGURA 6.5 Cromatograma de íons totais para mel de cipó-uva.

TABELA 6.6 Compostos identificados na amostra de mel de cipó-uva

Composto	RI
2,2-dimetilexano	720
benzaldeído	961
salicilaldeído	1041
<i>cis</i> -óxido de linalool	1074
orcinol	1081
n.i. ^a	1083
terpenodiol I	1099
benzonitrila	1125
isômero do aldeído lilálico	1131
isômero do aldeído lilálico	1143
epoxilinalool	1153
isômero do aldeído lilálico	1172
3,5-dimetilbenzaldeído	1201
etilinalool	1311

Notas: a) n.i. = composto não identificado; RI = índice de retenção.

Esta amostra de mel de cipó-uva apresentou como componentes principais os *cis*-óxido de linalool, terpenodiol I, o composto não identificado com índice de retenção 1083 e epoxilinalool. Também foi encontrado o **2,2-dimetilexano** (primeiro pico no cromatograma – Figura 6.5) como um componente importante - detectado apenas no mel de camboatã em pequena concentração. Este composto pode portanto ser um potencial marcador para o mel de cipó-uva. Nesta amostra, foram detectados também os isômeros do aldeído lilálico, característicos do mel de laranjeira. Entretanto, não foi detectado o antranilato de metila. Sendo assim, a presença dos aldeídos não compromete a afirmação de que os isômeros do aldeído lilálico **em conjunto** com o antranilato de metila são marcadores para méis de laranjeira .

6.2.6 MEL DE ESPINHEIRO (*STRYCHNOS NIGRICANS*)

O espinheiro é uma planta comum no Nordeste brasileiro, sendo encontrada principalmente nos estados da Bahia, Paraíba e Rio Grande do Norte. A amostra de mel de espinheiro avaliada é proveniente do município de Sobradinho – BA. O cromatograma da amostra avaliada é apresentado na Figura 6.6 e os compostos identificados estão relacionados na Tabela 6.7.

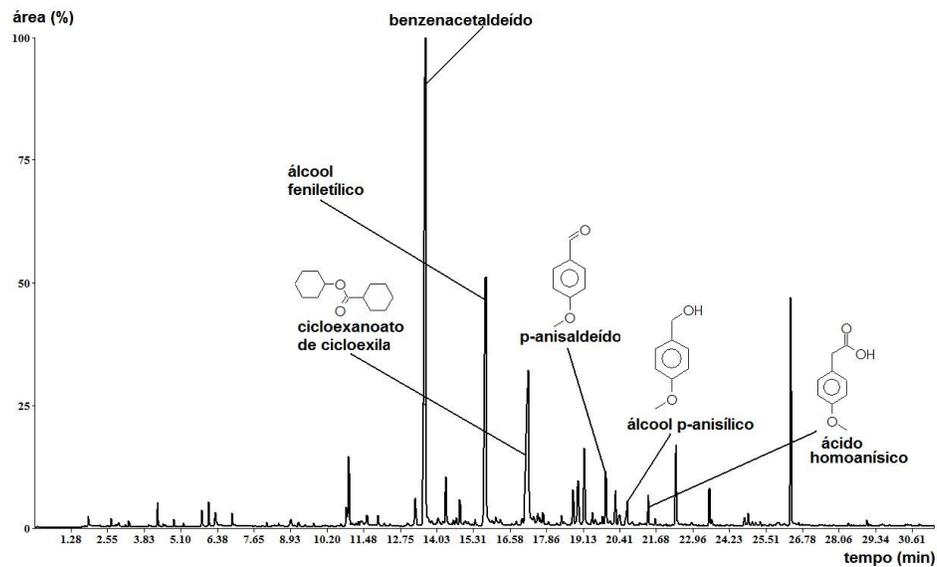


FIGURA 6.6 Cromatograma de íons totais para mel de espinheiro.

TABELA 6.7 Compostos identificados na amostra de mel de espinheiro

Composto	RI
benzaldeído	961
álcool benzílico	1032
fenilacetaldéido	1043
<i>cis</i> -óxido de linalool	1074
n.i. ^a	1083
álcool feniletílico	1110
cicloexanoato de cicloexila	1149
hidroximetilfurfural	1195
benzenopropanol	1234
<i>p</i> -anisaldeído	1252
α -etilenobenzenacetaldéido	1254
álcool <i>p</i> -anisílico	1279
ácido homoanísico	1290
2-feniletíl-1,3-dioxolano	1315
2,4-bis(1,1-dimetil) fenol	2201

Notas: a) n.i. = composto não identificado; RI = índice de retenção.

O fenilacetaldéido foi encontrado como composto predominante na amostra de mel de espinheiro avaliada. Outros compostos presentes em quantidades significativas são o álcool feniletílico e o cicloexanoato de cicloexila. Presentes em menores quantidades estão o anisaldeído e dois de seus derivados - o álcool *p*-anisílico e o ácido homoanísico - que não foram encontrados em nenhuma outra amostra de mel brasileiro avaliadas neste trabalho. Esta amostra também apresenta como diferencial a ausência do terpenodiol I, composto importante e presente em grande parte das amostras avaliadas. Desta forma, a **presença** do **álcool *p*-anisílico** e do **ácido homoanísico** e a **ausência** do **terpenodiol I** se mostram fatores importantes para a diferenciação do mel de espinheiro.

6.2.7 MEL DE JITIRANA (*IPOMOEA GLABRA*)

A jitirana é uma espécie abundante na região nordestina. Segundo Guim *et alii* [117] é uma espécie indesejável que dificulta o acesso dos animais à vegetação rasteira. Possui flores brancas e azuis, abundantes durante a época chuvosa nas encostas secas e pedregosas das serras. A amostra de mel de jitirana avaliada é proveniente do município de Barra da Corda, MA. A Figura 6.7 mostra o cromatograma obtido para esta amostra cujos compostos identificados estão apresentados na Tabela 6.8.

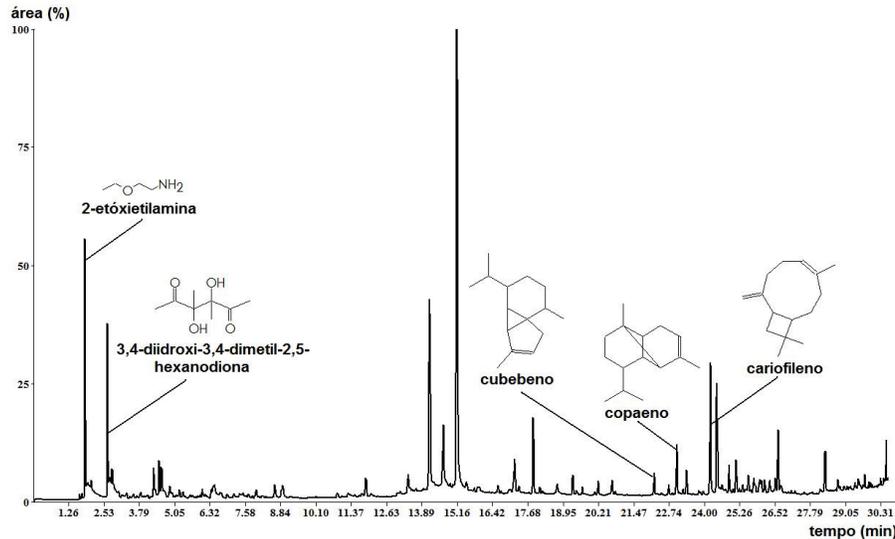


FIGURA 6.7 Cromatograma de íons totais para mel de jitirana.

TABELA 6.8 Compostos identificados na amostra de mel de jitirana

Composto	RI
2-etoxietilamina	815
3,4-diidroxi-3,4-dimetil-2,5-hexanodiona	843
2-metil-1-butanol	872
2,4,5-trimetil-1,3-dioxolano	879
3-metil-1-butanol	881
2-heptanol	969
<i>cis</i> -óxido de linalool	1074
n.i. ^a	1083
terpenodiol I	1099
acetato de octila	1124
acetato de benzila	1153
fenilbutanol	1156
<i>p</i> -etilguaiacol	1263
α -cubebeno	1351
α -copaeno	1376
α -cariofileno	1418
β -patchuleno	1456
β -guaieno	1500
acetato de dodecila	1611

Notas: a) n.i. = composto não identificado; RI = índice de retenção.

Esta amostra de mel de jitirana apresenta um perfil cromatográfico diferenciado das outras apresentadas, tendo sido identificados um grande número de compostos diferentes de outros méis. Vários destes foram espécies voláteis de massa molar baixa e apresentando tempo de retenção menores do que o *cis*-óxido de linalool. Foram identificados como componentes principais, a espécie não identificada com índice de retenção 1083, *cis*-óxido de linalool e 2-etoxietilamina. Além disso, foram encontrados diversos **sesquiterpenos**, como α -cubebeno, α -cariofileno e β -patchuleno que podem ser considerados como característicos deste tipo de mel.

6.2.8 MEL DE PALMEIRA (*ARCHONTOPHOENIX CUNNINGHAMIANA*)

A *Archontophoenix cunninghamiana* é uma espécie de palmeira exótica, natural da Austrália e que atinge de 8 a 10 m de altura e possui inflorescência arroxeadada, ramificada. O amostra de mel de palmeira avaliada é proveniente do Estado do Rio de Janeiro. O cromatograma de íons totais obtido para esta amostra é apresentado na Figura 6.8. Os compostos identificados estão relacionados na Tabela 6.9.

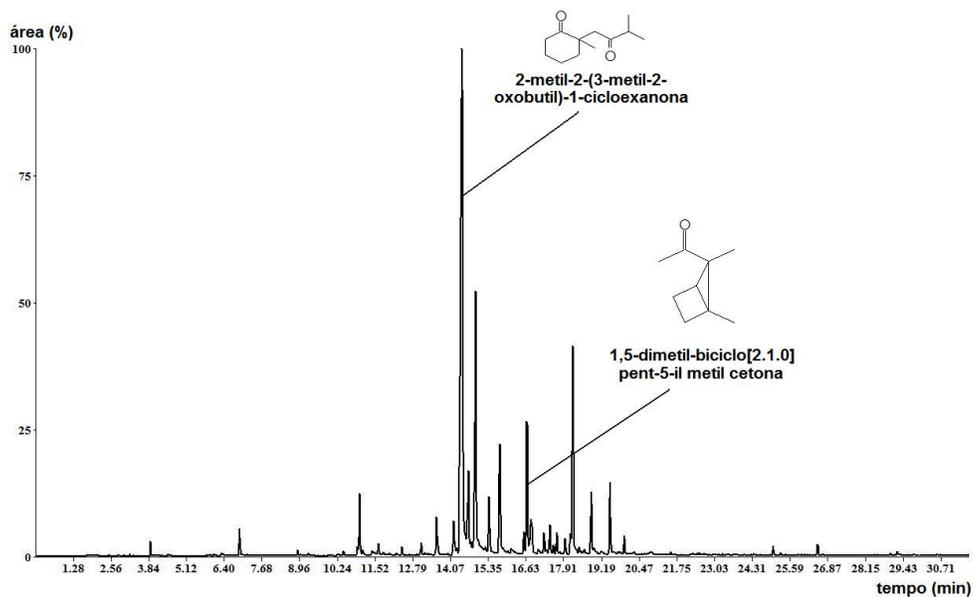


FIGURA 6.8 Cromatograma de íons totais para mel de palmeira.

TABELA 6.9 Compostos identificados na amostra de mel de palmeira

Composto	RI
furfural	830
benzaldeído	961
6-metil-5-hetpen-2-ona	985
limoneno	1031
fenilacetaldeído	1043
2-metil-2-(3-metil-2-oxobutil)-1-cicloexanona	1063
orcinol ou 5-metil-2-pirazimetanol	1082
n.i. ^a	1083
terpenodiol I	1099
2-feniletanol	1110
aldeído lilálico	1131
1,5-dimetil-biciclo[2.1.0]pent-5-il metil cetona	1137
aldeído lilálico	1143
epóxilinalool	1153
mentol	1165
naftaleno	1179
terpineol	1189
dimetilbenzaldeído	1201
<i>p</i> -anisaldeído	1252
etilinalool	1311

Notas: a) n.i. = composto não identificado; RI = índice de retenção.

Na amostra de mel de palmeira foram identificados como componentes principais duas cetonas, a **2-metil-2-(3-metil-2-oxobutil)-1-cicloexanona** (previamente identificada em outros tipos de méis apresentados neste trabalho) e a **1,5-dimetil-biciclo[2.1.0]pent-5-ilmetilcetona**. Estes compostos podem ser potenciais marcadores para este tipo de mel.

6.2.9 MEL DE TATARÉ (*CHLOROLEUCON TORTUM*)

O *Chloroleucon tortum* é uma árvore nativa brasileira bastante peculiar e por isso usada com frequência em paisagismo. Apresenta galhos retorcidos, com muitos espinhos, e um tronco esbranquiçado. É também conhecida com os nomes vulgares de **jacaré** e **jurema**. A amostra de mel de tataré avaliada é proveniente do Estado do Rio de Janeiro. A Figura 6.9 apresenta o cromatograma obtido para esta amostra. A Tabela 6.10, relaciona os compostos identificados.

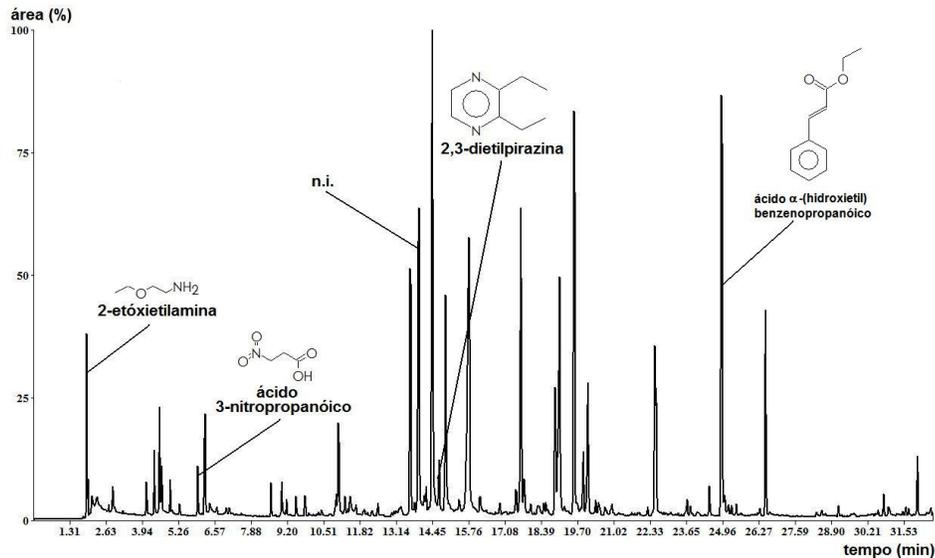


FIGURA 6.9 Cromatograma de íons totais para mel de tataré.

TABELA 6.10 Compostos identificados na amostra de mel de tataré

Composto	RI
2-etoxietilamina	815
2,2-dimetil-1-propanol	839
2,4,5-trimetil-1,3-dioxolano	879
4,5-dimetil-1-hexeno	883
ácido 3-nitropropanóico	915
benzaldeído	961
fenilacetaldeído	1043
n.i. ^a (nitrogenado)	1055
<i>cis</i> -óxido de linalool	1074
2,3-dietilpirazina	1082
<i>trans</i> -óxido de linalool	1088
2-feniletanol	1110
benzoato de etila	1153
acetato de fenila	1170
ácido α -(1-hidroxietil) benzenopropanóico	1427
2,4-bis(1,1-dimetiletil) fenol	2201

Notas: a) n.i. = composto não identificado; RI = índice de retenção.

A Figura 6.9 apresenta um perfil cromatográfico complexo, com grande quantidade de picos de intensidade significativa identificados na Tabela 6.10. Dentre os compostos identificados estão compostos nitrogenados como 2-etoxietilamina, ácido 3-nitropropanóico, 2,3-dietilpirazina. Apenas o primeiro destes – 2-etoxietilamina – foi identificado no mel de jiterana (item 6.2.7). Um composto não identificado com índice de retenção 1055 e cujo espectro de massas é apresentado na Figura 6.10, também parece ser um composto nitrogenado.

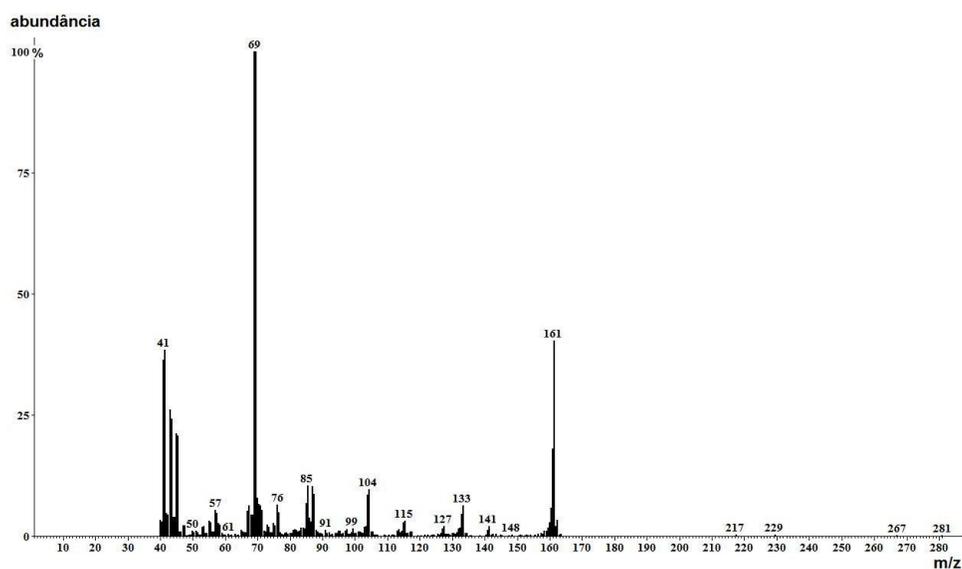


FIGURA 6.10 Espectro de massas para o composto não identificado (RI =1055).

O ácido α -(1-hidroxietil)benzenopropanóico não foi identificado em outros tipos de méis, sendo um dos principais componentes desta amostra. Desta forma, o mel de tataré pode ser tentativamente diferenciado dos outros méis estudados pela presença de desse composto.

6.3 Conclusões Parciais

Os estudos apresentados neste capítulo não tem caráter conclusivo, uma vez que foi avaliada apenas uma amostra para cada tipo de mel. Entretanto, são os primeiros dados relatados sobre a composição de voláteis destes méis exóticos brasileiros. Foi possível verificar perfis cromatográficos diferenciados para os méis estudados; alguns compostos ou grupos de compostos foram identificados em apenas um tipo de mel, sugerindo assim, sua importância como possível marcador de origem floral.

4. CONCLUSÕES

Foi possível desenvolver e otimizar uma metodologia para extração de compostos voláteis de méis através de HS-SPME. Os compostos extraídos puderam ser separados por cromatografia gasosa e identificados através da espectrometria de massas. Cada tipo de mel brasileiro estudado, de vinte origens florais diferentes e variadas procedências geográficas apresentou um perfil cromatográfico diferente. Foi constatado que alguns tipos de méis apresentam grande variação entre suas amostras. Este fato pode ser associado a origem geográfica do mel e a época em que foi produzido, pois dados da literatura comprovam que a composição do néctar das flores (matéria-prima do mel) varia de acordo com o período da florada.

Para os méis de eucalipto (*Eucalyptus sp*), laranja (*Citrus sp*), assa-peixe (*Vernonia polianthes*), cambará (*Lantana montevidensis*), morrão de candeia (*Croton sp*) e marmeleiro (*Cydonia vulgaris*) foram identificados potenciais marcadores, sendo eles **pinocarveol, fenchol e pinocanfona** para mel de eucalipto, os **isômeros do aldeído lilálico e antranilato de metila** para mel de laranjeira, **isoforona** para mel de assa-peixe, **benzonitrila** para mel de cambará e **orcinol** para mel de morrão de candeia. Para o mel de marmeleiro, foi detectado um composto não identificado, com índice de retenção

1108, que aparentemente é um marcador geográfico para esta variedade, pois não foi detectado nas amostras deste tipo de mel provenientes do Rio Grande do Norte.

Os isômeros cis e trans do óxido de linalool, um composto não identificado com índice de retenção 1083 e o terpenodiol I, foram identificados em praticamente todas as amostras avaliadas, podendo ser considerados compostos comuns para amostras de mel. Outros compostos comuns encontrados foram, benzaldeído, álcool feniletílico e fenilacetaldéido.

Onze amostras de méis eram unitárias e permitiram apenas estudos exploratórios, mas que apontaram para uma possível identificação de compostos marcadores o que permitiria a tipificação destas variedades. Não foram encontrados dados na literatura sobre a composição de voláteis para estes tipos de méis, o que torna interessante a continuação deste trabalho.

Enfim, os resultados obtidos mostraram que a metodologia empregando HS-SPME-GC-MS foi útil para uma análise inicial das amostras, e ainda será útil em situações onde houver interesse em identificar os principais componentes de novos tipos de méis possibilitando a identificação da origem de alguns tipos e podendo ser eventualmente empregada na sua certificação. Entretanto, após desenvolvida a metodologia e para fins de análises de rotina, existe a possibilidade da criação de um banco de dados que permita que compostos conhecidos sejam identificados apenas através de seus índices de retenção. Isso viabiliza a substituição do modo de detecção de espectrometria de massas (GC-MS) pela ionização em chama (GC-FID) uma técnica mais robusta e que exige menor investimento em termos de equipamentos e manutenção.

5. REFERÊNCIAS

- [1] MERCOSUL. XXXVI Grupo Mercado Comum - Montevideo. Resolução n° 89, de 18 de outubro/1999. Regulamento Técnico Mercosul “Identidade e Qualidade do Mel”. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/89_99.htm> Acesso em: 09 out 2005.
- [2] BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa n° 11, de 20 de outubro/2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/anexo>> Acesso em: 9 out 2005.
- [3] BARTH M. O., MAIORINO C., BENATTI A. P. T., BASTOS D. H. M., Determinação de Parâmetros Físico-Químicos e da Origem Botânica de Méis Indicados Monoflorais do Sudeste do Brasil, *Cienc. Tecnol. Aliment.* **25** (2005) 229-233.
- [4] SEBRAE. O Salto do Mel, *Agronegócios: Desafios da Apicultura Brasileira* **3** (2006) 10-11.
- [5] CORTOPASSI-LAURINO M., GELLI D. S., Brazilian Honey: Past and Present, *Bee World* **81** (2000) 72-79.
- [6] SEBRAE. Entrevista: Henrique Faraldo, Presidente da Associação Brasileira dos Exportadores de Mel (Abemel), *Agronegócios: Desafios da Apicultura Brasileira* **3** (2006) 8-9.
- [7] SEBRAE. Os Desafios da Apicultura, *Agronegócios: Desafios da Apicultura Brasileira* **3** (2006) 23.
- [8] FAPESP. Um Padrão Nacional para o Mel, *Pesquisa Fapesp* **59** (2000). Disponível em: < <http://www.revistapesquisa.fapesp.br/?art=1134&bd=1&pg=1&lg=> > Acesso em 10 set 2006.
- [9] ANKLAM E. A Review of the Analytical Methods to Determine the Geographical and Botanical Origin of Honey, *Food Chem.* **63** (1998) 549-562.
- [10] BOUSETA A., SCHEIRMAN V., COLLIN S., Flavor and Free Amino Acid Composition of Lavender and Eucalyptus Honeys, *J. Food. Sci.* **61** (1996) 683-688.

- [11] DE LA FUENTE E., MARTÍNEZ-CASTRO I., SANZ J., Characterization of Spanish Unifloral honeys by Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Sep. Sci.* **28** (2005) 1093-1100.
- [12] PIASENZOTTO L., GRACCO L., CONTE L., Solid Phase Microextraction (SPME) Applied to Honey Quality Control, *J. Sci. Food Agric.* **83** (2003) 1037-1044.
- [13] RAMALHO M., GUIBU L.S., GIANNINI T.C., KLEINERT-GIOVANNINI A., IMPERATRIZ-FONSECA V.L., Characterization of Some Southern Brazilian Honey and Bee Plants through Pollen Analysis, *J. Apic. Res.* **30** (1991) 81-86.
- [14] DÍEZ M.J., ANDRÉS C., TERRAB A., Physicochemical Parameters and Pollen Analysis of Moroccan Honeydew honeys, *Int. J. Food Sci. Technol.* **39** (2004) 167-176.
- [15] BIANCHI F., CARERI M., MUSCI M., Volatile Norisoprenoids as Markers of Botanical Origin of Sardinian Strawberry-Tree (*Arbustus unedo* L.) Honey: Characterization of Aroma Compounds by Dynamic Headspace Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Food Chem.* **89** (2005) 527-532.
- [16] BARONI M. V., NORES M. L., DÍAZ M. P., CHIABRANDO G. A., FASSANO J. P., COSTA C., WUNDERLIN D. A., Determination of Volatile Organic Compounds Patterns Characteristic of Five Unifloral honeys by Solid-Phase Microextraction - Gas Chromatography -Mass Spectrometry Coupled to Chemometrics, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 7235-7241.
- [17] RADOVIC B.S., CARERI M., MANGIA A., MUSCI M., GERBOLES M., ANKLAM E., Contribution of Dynamic Headspace GC-MS Analysis of Aroma Compounds to Authenticity Testing of Honey, *Food Chem.* **72** (2001) 511-520.
- [18] SORIA A.C., GONZÁLE M., DE LORENZO C., MARTÍNEZ-CASTRO I., SANZ J., Characterization of Artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the Basis of their Melissopalynological, Physicochemical and Volatile Composition Data, *Food Chem.* **85** (2000) 121-130.
- [19] MOREIRA R. F. A., DE MARIA C. A. B., Glicídios no Mel, *Quim. Nova* **24** (2001) 516-525.
- [20] GUYOT C., BOUSETA A., SCHEIRMAN V., COLLIN S., Floral Origin Markers of Chestnut and Lime Tree honeys, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 625-633.
- [21] TZOUROS N.E., ARVANITOYANNIS I. S., Agricultural Products: Synopsis of Employed Quality Control Methods for the Authentication of Foods and Application of Chemometrics for the Classification of Foods According to Their Variety or Geographical Origin, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **41** (2001) 287-319.

- [22] <<http://br.geocities.com/guipichonelli/abelhas.html>> Acesso em: 07 set 2006.
- [23] NAEF R., JAQUIER A., VELLUZ A., BACHOFEN B., From the Linden Flower to Linden Honey – Volatile Constituents of Linden Nectar, the Extract of Bee-Stomach and Ripe Honey, *Chem. Biodivers.* **1** (2004) 1870-1879.
- [24] <http://linkscampeoes.com.br/cur_animais/anatomia_abelha.shtml> Acesso em: 07 set 2006.
- [25] KERR W. em <<http://www.ufv.br/dbg/bee.introd.html>> Acesso em: 07 set 2006.
- [26] RODRÍGUEZ G.O., FERRER B.S., FERRER A., RODRÍGUEZ B., Characterization of Honey Produced in Venezuela, *Food Chem.* **84** (2004) 499
- [27] SORIA A. C., MARTÍNEZ-CASTRO I., SANZ J., Analysis of Volatile Composition of Honey by Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Sep. Sci.*, **26** (2003) 793-801.
- [28] DE ARRUDA C. M. F, MARCHINI L. C., MORETI A. C. C. C., OTSUK I. P., SODRÉ G. S., Características Físico-Químicas de Méis da Chapada do Araripe/Santana do Cariri-Ceará, *Act. Scient. Anim. Sci.* **27** (2005) 171-176.
- [29] EVANGELISTA-RODRIGUES A., DA SILVA M. A. F., DORNELLAS G. S., RODRIGUES M. L., Estudo de Plantas Visitadas por Abelhas *Melipona scutellaris* na microrregião do brejo no Estado da Paraíba, *Act. Scient. Anim. Sci.* **25** (2003) 229-234.
- [30] ROWLAND C. Y., BLACKMAN A.J., D'ARCY B. R., RINTOUL G. B., Comparison of Organic Extractives Found in Leatherwood (*Euchryphia lucida*) Honey and Leatherwood Flowers and Leaves, *J. Agric. Food Chem.* **43** (1995) 753-763.
- [31] ANKLAM E., RADOVIC B., Suitable Analytical Methods for Determining the Origin of European Honey, *Amer. Lab.* **July** (2001) 60-64.
- [32] ANUPAMA D., BHAT K. K., SAPNA V. K., Sensory and Physico-Chemical Properties of Commercial Samples of Honey, *Food Res. Int.* **36** (2003) 183-191.
- [33] QIU P. Y., DING H. B., TANG Y. K., XU R. J., Determination of Chemical Composition of Commercial Honey by Near Infrared Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* **47** (1999) 2760-2765.
- [34] TEWARI J., IRUDAYARAJ J., Quantification of Saccharides in Multiple Floral honeys Using Fourier Transform Infrared Microattenuated Total Reflectance Spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 3237-3243.

- [35] CASTRO R. M., ESCAMILLA M. J., REIG R. B., Evaluation of Color of some Spanish Unifloral Honey Types as a Characterization Parameter, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* **75** (1992) 537-542.
- [36] BONAGA G., GIUMANINI A. G., GLIOZZI G., Chemical Composition of Chestnut Honey: Analysis of the Hydrocarbon Fraction, *J. Agric. Food Chem.* **34** (1986) 319-326.
- [37] LÓPEZ B., LATORRE M. J., FERNÁNDEZ M.I., GARCÍA M. A., GARCÍA S., HERRERO C., Chemometric Classification of Honeys According to their Type Based on Quality Control Data, *Food Chem.* **55** (1996) 281-287.
- [38] CORDELLA C. B. Y., MILITÃO J. S. L. T., CLÉMENT M. C., CABROL-BASS D., Honey Characterization and Adulteration Detection by Pattern Recognition Applied on HPAEC-PAD Profiles. 1. Honey Floral Species Characterization, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 3234-3242.
- [39] BARTH O. M., Melissopalynology in Brazil: A Review of Pollen Analysis of Honeys, Propolis and Pollen Loads of Bees, *Sci. Agric.* **61** (2004) 342-350.
- [40] LOUVEAUX J., MAURIZIO A., VORWOHL G., Methods of Melissopalynology, *Bee World* **59** (1978) 139-157.
- [41] < <http://www.webbee.org.br/pesquisa/melissopalino.htm> > Acesso em: 18 jul 2006.
- [42] PIANA L., La Determinazione dell'Origine Geografica nel Miele e le Frodi Collegate, *Rivista di Apicoltura* **5** (1997). Disponível em: <<http://www.apicolturaonline.it/piana1.htm>> Acesso em: 18 jul 2006.
- [43] DE MARIA C. A. B., MOREIRA R. A. F., Compostos Voláteis em Méis Florais, *Quim. Nova* **26** (2003) 90-96.
- [44] BONVEHI J. S., COLL F. V., Flavour Index and Aroma Profiles of Fresh and Processed Honeys, *J. Sci. Food Agric.* **8** (2003) 275-282.
- [45] BENTIVEGA G., D'AURIA M., FEDELI P., MAURIELLO G., RACIOPPI R., SPME-GC-MS Analysis of Volatile Organic Compounds in Honey from Basilicata. Evidence for the Presence of Polluantes from Anthropogenic Activities, *Int. J. Food Sci. Technol.* **39** (2004) 1079-1086.
- [46] SERRA BONVEHI J., Determination of Methyl Antranilate in Citrus Honey (Citrus sp.) of Eastern Spain and its Influence on the Diastase Activity of the Honey, *Alimentaria* **197** (1988) 37-40.

- [47] FERRERES F., ANDRADE P., TOMAS-BARBERAN F., Natural Occurrence of Abscisic Acid in Heather Honey and Floral Nectar, *J. Agric. Food Chem.* **44** (1996) 2053-2056.
- [48] FERRERES F., GARCÍA-VIGUEIRA C., TOMAS-LORENTE F., TOMAS-BARBERAN F., Hesperitine: a Marker of the Floral Origin of Citrus Honey, *J. Sci. Food Agric.* **61** (1993) 121-123.
- [49] GUYOT-DELERCK C., RENSON S., BOUSETA A., COLLIN S., Floral Quality and Discrimination of *Lavandula stoechas*, *Lavandula angustifolia* and *Lavandula angustifolia* x *angustifolia* Honeys, *Food Chem.* **79** (2002) 453-459.
- [50] D'ARCY B. D., RINTOUL G. B., ROWLAND C. Y., BLACKMAN A. J., Composition of Australian Honey Extractives. 1. Norisoprenoids, Monoterpenes, and Other Natural Volatiles from Blue Gum (*Eucalyptus leucoxylon*) and Yellow Box (*Eucalyptus melliodora*) Honeys, *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997) 1834-1843.
- [51] WILKINS A. L., LU Y., TAN S. T., Extractives from New Zealand Honeys. 4. Linalol Derivatives and Other Components from Nodding Thistle, *J. Agric. Food Chem.* **41** (1993) 873-878.
- [52] TAN S. T., WILKINS A. L., HOLLAND P. T., MCGHIE T. K., Extractives from New Zealand Honeys. 3. Unifloral Thyme and Willow Honey Constituents, *J. Agric. Food Chem.* **38** (1990) 1833-1838.
- [53] BOUSETA A., COLLIN S., Optimized Likens-Nickerson Methodology for Quantifying Honey Flavors, *J. Agric. Food Chem.* **43** (1995) 1890-1897.
- [54] SHIMODA M., WU Y., OSAJIMA Y., Aroma Compounds from Aqueous Solution of Haze (*Rhus succedanea*) Honey Determined by Adsorptive Column Chromatography, *J. Agric. Food Chem.* **44** (1996) 3913-3918.
- [55] CASTO-VÁSQUEZ L., PÉREZ-COELHO M. S., CABEZUDO M. D., Analysis of Volatile Compounds of Rosemary Honey. Comparison of Different Extraction Techniques, *Chromatographia* **57** (2003) 227-233.
- [56] ARTHUR C. L., PAWLISZYN J., Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers, *Anal. Chem.* **62** (1990) 2145-2148.
- [57] PAWLISZYN J., Solid Phase Microextraction – Theory and Practice; Wiley-VHC, New York (1997).
- [58] ZHANG Z.Y., YANG M. J., PAWLISZYN J., Solid Phase Microextraction, *Anal. Chem.* **66** (1994) A844-A853.

- [59] PEÑA R. M., BARCIELA J., HERRERO C., GARCÍA-MARTÍN S., Solid Phase Microextraction Gas Chromatography-Mass Spectrometry Determination of Monoterpenes in Honey, *J. Sep. Sci.* **27** (2004) 1540-1544.
- [60] ZHANG Z., PAWLISZYN J., Headspace Solid-Phase Microextraction, *Anal. Chem.* **65** (1993) 1843-1852.
- [61] YANG X., PEPPARD T., Solid-Phase Microextraction for Flavor Analysis, *J Agric. Food Chem.* **42** (1994) 1925-1930.
- [62] AUGUSTO F., LOPES A. L., ZINI C. A., Sampling and Sample Preparation for Analysis of Aromas and Fragrances. *Trends Anal. Chem.* **22** (2003) 160-169.
- [63] AUGUSTO F., VALENTE A. L. P., TADA E. S., RIVELINO S. R., Screening of Brazilian Fruit Aromas Using Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A* **873** (2000) 117-127.
- [64] CARDEAL Z. D., GUIMARAES E. M., PARREIRA F.V., Analysis of Volatile Compounds in some Tropical Brazilian Fruits and Juices by SPME Method, *Food Addit. Contamin.* **22** (2005) 508-513.
- [65] ZINI C. A., AUGUSTO F., CHRISTENSEN E., CARAMÃO E. B., PAWLISZYN J., SPME Applied to the Study of Volatile Organic Compounds Emitted by Three Species of *Eucalyptus in Situ*, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 7199-7205.
- [66] AUGUSTO F., SARTORATO A., Application of Headspace Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography to the Screening of Volatile Compounds from some Brazilian Aromatic Plants, *Chromatographia* **57** (2003) 351-356.
- [67] BELLIARDO F., BICCHI C., CORDERO C., LIBERTO E., RUBIOLO P., SGORBINI B., Headspace-Solid-Phase Microextraction in the Analysis of the Volatile Fraction of Aromatic and Medicinal Plants, *J. Chromatogr. Sci.* **44** (2006) 416-429.
- [68] PELLATI F., BENVENUTI S., YOSHIZAKI F., BERTELLI D., ROSSI M. C., Headspace Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of the Volatile Compounds of Evodia Species Fruits, *J. Chromatogr. A* **1087** (2005) 265-273.
- [69] CARRILLO J. D., TENA M. T., Determination of Volatile Compounds in Antioxidant Rosemary Extracts by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography, *Anal. Lett.* **38** (2005) 1193-1212.
- [70] GUIDOTTI M., VITALI M., Identificazione di Composti Organici Volatili in Miele Mediante SPME e GC/MS, *Indust. Aliment.* **XXXVII** (1998) 351-356.

- [71] PÉREZ R. A., SÁNCHEZ-BRUNETE C., CALVO R. M., TADEO J. L., Analysis of Volatiles from Spanish honeys by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Agric. Food Chem.*, **50** (2002) 2633-2637.
- [72] AMPUERO S., BOGDANOV S., BOSSET J. O., Classification of unifloral honeys with an MS-based electronic nose using different sampling modes: SHS, SPME and INDEX, *Eur. Food Res. Technol.* **218** (2004) 198-207.
- [73] SORIA A. C., GONZÁLEZ M., DE LORENZO C., MARTÍNEZ-CASTRO I., SANZ J., Estimation of the Honeydew Ratio in Honey Samples from their Physicochemical Data and from their Volatile Composition Obtained by SPME and GC-MS, *J. Sci. Food Agric.* **85** (2005) 817-824.
- [74] KOMATSU S. S., MARCHINI L. C., MORETI A. C. C. C., Análises Físico-Químicas de Amostras de Méis de Flores Silvestres, de Eucalipto e de Laranjeira, Produzidos por *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera, Apidae) no Estado de São Paulo. 2. Conteúdo de Açúcares e Proteína, *Cienc. Tecnol. Aliment.* **22** (2002) 143-146.
- [75] COSTA L. S. M., ALBUQUERQUE M. L. S., TRUGO L. C., QUINTEIRO L. M. C., BARTH O. M., RIBEIRO M., DE MARIA C. A. B., Determination of Non-Volatile Compounds of Different Botanical Origin in Brazilian Honeys, *Food Chem.* **65** (1997) 347-352.
- [76] BASTOS D. H. M., FRANCO M. R. B., DA SILVA M. A. A. P., JANZANTTI N. S., MARQUES M. O. M., Composição de Voláteis e Perfil de Aroma e Sabor de Méis de Eucalipto e Laranja, *Cienc. Tecnol. Aliment.* **22** (2002) 122-129.
- [77] MOREIRA R. A. F., DE MARIA C. A. B., Investigation of the Aroma Compounds from Headspace and Aqueous Solution from the Cambará (*Gochnatia velutina*) Honey, *Flavour Fragr. J.* **20** (2005) 13-17.
- [78] MATOS L. M. C., MOREIRA R. F. A., TRUGO L. C., DE MARIA C. A. B., Aroma Compounds in Morrão de Candeia (*Croton* sp.) and Assa-Peixe (*Vernonia* sp.) Honeys, *Ital. J. Food Sci.* **14** (2002) 267-278.
- [79] MOREIRA R. F. A., TRUGO L. C., PIETROLUONGO M., DE MARIA C. A. B., Flavor Composition of Cashew (*Anacardium occidentale*) and Marmeleiro (*Croton* species) Honeys, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 7616-7621.
- [80] SILVA C. L., QUEIROZ A. J. M., DE FIGUEIRÊDO R. M. F., Caracterização Físico-Química de Méis Produzidos no Estado do Piauí para Diferentes Floradas, *Rev. Bras. Eng. Agric. Ambient.* **8** (2004) 260-265.
- [81] BUCHHOLZ K.D., PAWLISZYN J. Optimization of Solid Phase Microextraction Conditions for Determination of Phenols, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 160-167.

- [82] HAWTHORNE S. B., MILLER D. J., PAWLISZYN J., ARTHUR C. L., Solventless Determination of Caffeine in Beverages Using Solid-Phase Microextraction with Fused-Silica Fibers, *J. Chromatogr. A* **603** (1992) 185-191.
- [83] VERZERA A., CAMPISI S., ZAPPALA M., BONACCORSI I., SPME-GC-MS Analysis of Honey Volatile Components for the Characterization of Different Floral Origin, *Am. Lab. May* (2001) 18-21.
- [84] NETO B. B. N., SCARMINIO I. S., BRUNS R. E., Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria; Unicamp, Campinas (2002).
- [85] VISSER, F. R., ALLEN J. M., SHAW G. J., The Effect of Heat on the Volatile Flavor Fraction from a Unifloral Honey, *J. Apic. Res.* **27** (1988) 175-181.
- [86] VAN DEN DOOL H., KRATZ P. D., A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography, *J. Chromatog.* **11** (1963) 463-471.
- [87] ADAMS R. P., Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry; Allure, Carol Stream (1995).
- [88] EMBRAPA. Documentos 60: Pré-Diagnóstico da Cadeia de Produtos Apícolas de Mato Grosso do Sul. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/apicultura/DOC%2060.pdf>> Acesso em: 10 set 2006.
- [89] RAPP A., MacNAMARA K., HOFFMANN A., Determination of Wine Aroma Compounds from Simple Extracts using Automated Large Volume Injection with PTV Solvent Splitting, *Global Analytical Solutions, Applic. Note* **1** (1996).
- [90] GILLEY D. C., DeGRANDI-HOFFMAN G., HOOPER J. E., Volatile Compounds Emitted by Live European Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Queens, *J. Ins. Physiol.* **52** (2006) 520-527.
- [91] NACIONAL HONEY BOARD. Honey: A Reference Guide to Nature's Sweetener. 2005. National Honey Board. Disponível em: <<http://www.honey.com/downloads/refguide.pdf>> Acesso em: 20 fev 2006.
- [92] STEFANELLO M. E. A., CERVI A. C., JUNIOR A. W., SIMIONATTO E. L., Óleo Essencial de *Gochnatia polymorpha* (LESS) CABR. ssp *floccosa* CABR., *Quim. Nova* **29** (2006) 999-1002.
- [93] BEZERRA J. A., Da Cor do Mercado, *Rev. Globo Rural* **222** (2004). Disponível em <<http://www.revistagloborural.globo.com/globorural/0,6993,EGS586-1482,00-html>> Acesso em: 10 mar 2005.

- [94] FRAUENDORFER F., SCHIEBERLE P., Identification of the Key Aroma Compounds in Cocoa Powder Based on Molecular Sensory Correlations, *J. Agric. Food Chem.* **54** (2006) 5521-5529.
- [95] FELSNER, M. L., CANO, C. B., BRUNS, R. E., WATANABE, H. M., ALMEIDA MURADIAN, L. B., MATOS, J. R. Characterization of monofloral honeys by ash contents through a hierarchical design, *J. Food Composit. Anal.* **17** (2004) 737-747.
- [96] CATHARINO E. L. em < <http://www.cotianet.com.br/jornalatuante/mato27.html>> Acesso em: 07 set 2006.
- [97] BASTOS E. M. A. F., SILVEIRA V. M., SOARES A. E. E., Pollen Spectrum of Honey Produced in Cerrado Areas of Minas Gerais State (Brazil), *Braz. J. Biol.* **63** (2003) 599-615.
- [98] ALISSANDRAKIS E., KIBARIS A. C., TARANTILIS P. A., HARIZANIS P. C., POLISSIOU M., Flavour Compounds of Greek Cotton Honey, *J. Sci. Food Agric.* **85** (2005) 1444-1452.
- [99] DOMINGUES E. T., NETO A. T., SOBRINHO J. T., Variabilidade do Polen em Variedades de Laranja Doce, *Sci. Agric.* **56** (1999)
- [100] OLIVEIRA F., COSTA S. M. A. L., TASSITANO M. A. A., SANTANA A. L., Produção de Mel na Região Nordeste do Estado de São Paulo, *Informações Econômicas* **34** (2004). Disponível em: < <http://www.iea.sp.gov.br/out/publicacoes/ie.php> > Acesso em: 08 jan 2006.
- [101] TERRAB A., GONZÁLEZ A. G, DÍEZ M. J., HEREDIA F.J., Characterization of Moroccan Unifloral Honeys Using Multivariate Analysis, *Eur. Food Res. Technol.* **218** (2003) 88-95.
- [102] KRECK M., MOSANDL A., Synthesis, Structure Elucidation, and Olfatometric Analysis of Lilac Aldehydes and Lilac Alcohol Stereoisomers, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003) 2722-2726.
- [103] ALISSANDRAKIS E., DAFERERA D., TARANTILIS P. A., POLISSIOU M., HARIZANIS P. C., Ultrasound-assisted Extraction of Volatile Compounds from Citrus Flowers and Citrus Honey, *Food Chem.* **82** (2003) 575-582.
- [104] FERRERES F., GINER J. M., TOMÁS-BARBERRÁN A. A., A Comparative Study of Hesperetin and Methyl Antranilate as Markers of the Floral Origin of Citrus Honey, *J. Sci. Food Agric.* **65** (1994) 371-372.

- [105] WHITE J. W., BRYANT JR V. M., Assessing Citrus Honey Quality: Pollen and Methyl Antranilate Content, *J. Agric. Food Chem.* **44** (1996) 3423-3425.
- [106] WOOTON M., EDWARDS R. A., FARAJI-HAREMI R., Effect of Accelerated Storage Conditions on the Chemical Composition and Properties of Australian honeys. 2. Changes in Sugar and Free Amino Acid Contents, *J. Apic. Res.* **15** (1976) 29-34.
- [107] BOUSETA A., COLLIN S., DUFOUR J. P., Characteristic Aroma Profiles of Unifloral Honeys Obtained with a Dynamic Headspace GC-MS System, *J. Apic. Res.* **31** (1992) 96-109
- [108] FEGER W., BRANDAUER H., ZIEGLER H., Analytical Investigation of Murcott (Honey) Tangerine Peel Oil, *J. Essent. Oil Res.* **15** (2003) 143-147.
- [109] PARK Y. K., ALENCAR S. M., AGUIAR C. L., Estudo da Composição Fenólica de Méis e Própolis Oriundos de Mesma Colméia, *Mensagem Doce* **67** (2003). Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/67/artigo.htm>> Acesso em: 17 fev 2004.
- [110] YOUNG C. C., SUFFET I. H., CROZES G., BRUCHET A., Identification of a Woody-Hay Odor-Causing Compound in a Drinking Water Supply, *Water Sci. Technol.* **40** (1999) 273-278.
- [111] GUILLOT S., PEYTAVI L., BUREAU S., BOULANGER R., LEPOUTRE J. P., CROUZET J., SCHORR-GALINDO S., Aroma Characterization of Various Apricot Varieties Using Headspace-Solid Phase Microextraction Combined with Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Gas Chromatography-Olfactometry, *Food Chem.* **96** (2006) 147-155.
- [112] MICELI A., NEGRO C., TOMMASI L., Essential Oil of *Melissa romana* (Miller) Grown in Southern Apulia (Italy), *J. Essential Oil Res.*, **18** (2006) 473-475.
- [113] ALVES R. F., NASCIMENTO A. M. D., NOGUEIRA J. M. F., Characterization of the Aroma Profile of Madeira Wine by Sorptive Extraction Techniques, *Anal. Chim. Acta*, **546** (2005) 11-21.
- [114] FRANCIOLI S., GUERRA M., LOPEZ-TAMAMES E., GUADAYOI J. M., CAIXACH J., Aroma of Sparkling Wines by Headspace/Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry, *Am. J. Enol. Viticult.* **50** (1999) 404-408.
- [115] DUARTE M. C. T., FIGUEIRA G. M., SARTORATTO A., REHDER V. L. G., DELARMELINA C., Anti-Candida Activity of Brazilian Medicinal Plants, *J. Ethnopharm.* **97** (2005) 305-311.

[116] LIMBERGER R. P., ABOY A. L., BASSANI V. L., MORENO P. R. H., RITTER M. R., HENRIQUES A. T., Essential Oils from Four *Mikania* Species (Asteraceae), *J. Essent. Oil Res.* **13** (2001) 225-228.

[117] GUIM A., FILHO E. C. P., SOUSA F., SILVA M. M. C., Padrão de Fermentação e Composição Químico-Bromatológica de Silagens de Jitira Lisa (*Ipomors glabra* Choisy) e Jitirana Peluda (*Jacquemontia asarifolia* L. B. Smith) Frescas e Emurhecidas, *R. Bras. Zootec.* **33** (2004) 2214-2223.