

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

JULIO JOSE MOKARZEL BIFFI

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM MÉIS USANDO MICRO
EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA**

CAMPO MOURÃO

2021

JULIO JOSE MOKARZEL BIFFI

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM MÉIS USANDO MICRO
EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA**

**Identification of volatile compounds in honey using solid phase micro extraction and gas
chromatography**

Trabalho de conclusão de curso de Graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Prof. Dr. Evandro Bona

Coorientador(a): Profa. Dra. Ailey Aparecida Coelho Tanamati

CAMPO MOURÃO

2021

JULIO JOSE MOKARZEL BIFFI

**IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS EM MÉIS USANDO MICRO
EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
como requisito para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica
Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 12/agosto/2021

Evandro Bona
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Augusto Tanamati
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Paulo Henrique Março
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

CAMPO MOURÃO

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças mesmo eu sendo uma pessoa tão distante de qualquer religião. Em diversos momentos que cogitei desistir, por me dar perseverança e me proporcionar diversas dádivas ao longo da minha vida.

In memoriam a minha mãe, meu primeiro amor, Vera Helena Mokarzel por todo amor, carinho e suporte. Por nunca ter medido esforços em proporcionar a mim e minha irmã condições para estudar mesmo com tantas dificuldades ao longo dos últimos anos, mas dando forças para que eu sempre continuasse sonhando e conquistando meus objetivos, por ter me ensinado valores e princípios. Por tudo que fez em vida para que eu alcançasse esta realização, não há palavras para descrever minha gratidão e admiração por ti. É uma honra ser seu filho, você foi uma guerreira. Te amo minha coelha!

A minha irmã Giovanna Yasmin Mokarzel Biffi por ser mais que minha família, ser minha sócia na vida, na graduação e em tudo que o futuro espera para nós. Obrigado por sempre levantar meu astral, me amar, me ensinar a coisas únicas da vida, fazer eu dar risada nos meus momentos de tristeza e compartilhar das alegrias da vida. Você é meu maior presente Gii nunca se esqueça disso! Juntos somos melhores minha irmãzinha.

Agradeço a minha namorada e parceira, Bruna de Gaspari, por sempre me amar e incentivar minhas escolhas, mesmo eu sendo uma pessoa bem difícil de lidar. Sempre me dando apoio, suporte emocional, carinho e me colocando sempre para cima. Você foi crucial durante essa etapa da graduação que tiveram muitos altos e baixos, sou muito grato a ti e a sua grande família, em especial a minha sogra e meu sogro Laura Oliveira e Antônio Cesar de Gaspari por me acolherem como parte disso tudo.

Aos meus orientadores, eu fui privilegiado de ter 2. A Prof. Dr^a Ailey Aparecida Coelho Tanamati, uma segunda mãe e o Prof. Dr. Evandro Bona, “o cara”. Seres humanos e profissionais espetaculares que me acolheram e me ensinaram tanto ao longo da graduação. Ter trabalhado com vocês foi uma honra, sou eternamente grato por terem tido paciência comigo, acreditado no meu potencial, e tanto suporte que me deram ao longo desses anos em diversos trabalhos. Eu possuo uma admiração e gratidão imensurável por vocês.

Aos meus queridos professores: Adriana Droval, Adriana Oliveira, Ailey Tanamati, Angela Gozzo, Angela Mognon, Alberto Vitorio, Alexandre Azevedo, Aline Baptista Augusto Tanamati, Bogdan Demczuk, Eliane Sloboda Rigobello, Elis Fonseca, Evandro Bona, Fernanda Zimmer, Fernanda Leimann, Fernando Vieira, Fábio Scopel, Jeferson Rafael,

Josiane Sereia, Karla Silva, Leandro Lago, Rafael Ineu, Leila Marques, Marcelo Real Padro, Mirela Vanin, Márcia Perdoncini, Odinei Hess, Paulo Henrique Março, Paulo Rodrigues, Renata Fuchs, Roberta Leone, Robson Santiago, Rodrigo Tavares, Stéphanie Beneti, Wellington Corrêa e Wyrllen de Souza. Ao longo desses anos vocês foram cruciais sempre compartilhando comigo os seus conhecimentos e dicas da vida. Fiz questão de citar cada um de vocês que me deram aula e conselhos, pois todo o conhecimento e sede de saber que possuo tem uma fração em cada um desses nomes. Levo vocês não só pela formação, mas para a vida! Muitos se tornaram meus amigos e isso me faz uma pessoa melhor e mais feliz. Muito obrigado por tudo!

Aos meus amigos que eu considero minha família, sempre me deram atenção, afeto e suporte. Foram muitos ao longo dessa vida e graduação, de antemão peço perdão caso esqueça de alguém ou não cite seu nome, vocês são todos especiais e moram no meu coração. Amigos da vida que levo até hoje: Darci Lopes (Neto), Douglas Keith Ishibashi (Keitinho/Coréia), Eva Toledo, Fabricio Umezaki (Japa), Guilherme Zago Canesin e sua família extraordinária, João Dias (Joãozinho), Leonardo Pechnicki, Letycia Padro (Lê), Livia e Rodrigo Casela, Lucas Murilo Wojcik, Otavio Luiz (Mário), Renan Simões. Amigos que adquiri ao longo da faculdade: Beatriz Freitas, Brenda Dall Molin, Bruno Dall Molin, Carlos Shiraishi (Chilão), Carla Conforto, Danielle Castro, Davyllen Fernandes, Fábio Nakamura, Fepa, Gabriela Pontoli, Gustavo Galvão, Iara Melo, Jacqueline Carvalho, Jonathan Lauber, Lucas Canali, Paty Casarin, Pedro Silveira, Rafael Soratto e Sérgio Schubert. Amigos da minha turma 2016/1: Amanda Gardenal, Ana Clara Pereira, Ana Rita Zulim (Ritinha), Arthur Cunha Paula (Tuti), Camila Leme, Camila Venancio, Giovanni Veneziani Abbatepaulo (Gio), Hellen Fernanda Paulino, Jamal Harati (Habibi), João Guilherme Tsuchiya (Joãoponeis), Lucas Nespeca. Obrigado todos meus amigos por sempre me ouvirem, disporem de seu tempo comigo e estarem prontos para me ajudarem e festarem sempre que possível haha. Muito obrigado por acreditarem em mim e tornarem essa caminhada chamada vida sempre mais leve e fácil de encarar. Vocês são sensacionais!

Ao IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná – Londrina) por ter cedido as amostras de mel.

Enfim agradeço a Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-CM) e todos os profissionais que trabalham na mesma (servidores, professores, técnicos e estagiários), principalmente aos profissionais do NUAPE, pois sem o suporte financeiro do auxílio estudantil e ao sistema de cotas eu não teria conseguido chegar até aqui. Vocês mudaram a minha vida e da minha irmã, que esse programa continue ajudando mais pessoas a

terem oportunidade de estudar em uma universidade espetacular como a UTFPR. Agradeço também a Central Analítica Multiusuário do *Campus* Campo Mourão (CAMulti-CM) pelas análises realizadas para esse projeto.

*“Não importa quanto a vida possa ser ruim, sempre
existe algo que você pode fazer, e triunfar. Enquanto
há vida, há esperança.”*
(Stephen Hawking)

RESUMO

Os méis possuem aromas variados devido a presença de compostos orgânicos voláteis (COVs). Os COVs podem variar de acordo com a origem botânica e geográfica e têm sido usados como marcadores químicos florais. A identificação destes marcadores é importante para agregar valor de mercado ao produto e ser usada como impressão digital. No Brasil, a região de Ortigueira é reconhecida pela produção de mel de alta qualidade que está relacionada as floras da região. Este trabalho teve como objetivo verificar a possibilidade de identificação geográfica dos méis de Ortigueira usando os COVs através de micro extração em fase sólida (SPME) e cromatografia a gás com detector por ionização de chama (GC-FID). Em testes preliminares foram definidas como condições da SPME, 5 min para o tempo de equilíbrio, 30 min para o tempo de extração e temperatura de extração de 60 °C. Com base na revisão de trabalhos similares publicados, foram escolhidos 10 padrões para a caracterização do perfil volátil de cada amostra de mel. Os cromatogramas foram pré-tratados para a correção de linha base e usando o algoritmo *icoshift* os picos dos padrões foram alinhados. Na sequência, foi realizado o cálculo da área total de cada cromatograma que foi utilizada para a normalização das áreas dos padrões obtendo-se assim a porcentagem relativa de cada composto. Métodos estatísticos univariados (ANOVA) e multivariados (PCA) foram empregados para analisar os resultados usando o software MATLAB R2021a. O somatório da área relativa dos 10 padrões variou entre 28,90% e 87,17%, sendo o óxido de linalol (cis e trans) e linalol os compostos de maior área relativa. A ANOVA identificou diferenças significativas entre as amostras de Ortigueira (O) e outras cidades (E) para os compostos benzaldeído, óxido de cis-linalol, óxido de trans-linalol e linalol. A PCA confirmou os compostos benzaldeído, óxido de cis-linalol, óxido de trans-linalol e linalol como potenciais COVs para a discriminação dos méis de Ortigueira. Mesmo diante da elevada complexidade das amostras avaliadas (devido à variedade de flores e locais dos méis) foi possível identificar o linalol como o principal potencial marcador químico dos méis produzidos na região de Ortigueira usando SPME e GC-FID.

Palavras-chave: análise de componentes principais; quimiometria; denominação de origem.

ABSTRACT

Honey has various aromas due to the presence of volatile organic compounds (VOCs). VOCs can vary according to botanical and geographical origin and have been used as floral chemical markers. The identification of these markers is important to add market value to the product and to be used as a fingerprint. In Brazil, the Ortigueira region is recognized for the production of high-quality honey that is related to the floras of the region. This work aimed to verify the possibility of geographic identification of honey from Ortigueira using VOCs through micro solid-phase extraction (SPME) and gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). In preliminary tests, 5 min for equilibration time, 30 min for extraction time, and an extraction temperature of 60 °C were set as SPME conditions. Based on the review of similarly published works, 10 standards were chosen for the volatile profile characterization of each honey sample. The chromatograms were pretreated for baseline correction and using the icoshift algorithm the peaks of the standards were aligned. Then the total area of each chromatogram was calculated and used to normalize the areas of the standards to obtain the relative percentage of each compound. Univariate (ANOVA) and multivariate (PCA) statistical methods were employed to analyze the results using MATLAB R2021a software. The sum of the relative area of the 10 standards varied between 28.90% and 87.17%. Linalool oxide (cis and trans) and linalool being the compounds with the highest relative area. The ANOVA identified significant differences between the samples from Ortigueira (O) and other cities (E) for the compounds benzaldehyde, cis-linalool oxide, trans-linalool oxide and linalool. The PCA confirmed the compounds benzaldehyde, cis-linalool oxide, trans-linalool oxide, and linalool as potential VOCs for the discrimination of honey from Ortigueira. Even in the face of the high complexity of the samples evaluated (due to the variety of flowers and locations of the honey), it was possible to identify linalool as the main potential chemical marker of the honey produced in the Ortigueira region using SPME and GC-FID.

Keywords: principal component analysis; chemometrics; appellation of origin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem ilustrativa Esquema do funcionamento da técnica SPME	20
Figura 2 - Esquema de um cromatógrafo a gás	23
Figura 3 - Escala de polaridade, em função das constantes de McReynolds, para algumas fases estacionárias em colunas capilares comerciais e suas respectivas temperaturas máximas de operação.....	24
Figura 4 - Ilustração esquemática do SPME – Headspace	31
Figura 5 - Pico do cromatograma com zoom para destacar o deslocamento do tempo de retenção antes e após o tratamento usando o icoshift.....	34
Figura 6 - Cromatograma após correção de linha de base e alinhamento pelo algoritmo icoshift. Os picos correspondentes aos padrões disponíveis estão identificados ..	35
Figura 7 - Gráfico de pareto para as quatro primeiras componentes principais	40
Figura 8 - Distância de Mahalanobis	41
Figura 9 - Gráficos de escores das quatro primeiras componentes principais.....	41
Figura 10 - Gráfico de loadings para as quatro primeiras PCs	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de recobrimentos disponíveis no mercado mais empregadas para SPME	21
Tabela 2 - Localização e flora das amostras de mel	28
Tabela 3 - Identificação dos padrões dos compostos voláteis	29
Tabela 4 - Tempo de retenção dos padrões	30
Tabela 5 - Alinhamento dos picos pelo espectro médio	32
Tabela 6 - Porcentagem relativa dos compostos voláteis e coloração das amostras	36
Tabela 7 - Teste comparação de média para a porcentagem relativa dos compostos identificados nas amostras de mel	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COVs	Compostos orgânicos voláteis (<i>volatile organic compound</i>)
FID	Detector por ionização em chama (<i>flame ionisation detection</i>)
GC	Cromatografia gasosa (<i>gas chromatography</i>)
GC×GC	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (<i>comprehensive two-dimensional gas chromatography</i>)
GC-FID	Cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GC-O	Cromatografia gasosa-olfatométrica
HMF	Hidroximetilfurfural
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>high performance liquid</i>)
HS	<i>Headspace</i>
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná – Londrina
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PC	Componente principal
PCA	Análise de componentes principais (<i>principal componentes analysis</i>)
PDMS	polidimetilsiloxano
RPM	Rotação por minuto
SPL	Injetor split
SPME	Micro extração em fase sólida (<i>solid phase microextraction</i>)
TR	Tempo de retenção

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Objetivos.....	15
1.1.1	Objetivo geral	15
1.1.2	Objetivos específicos	15
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	16
2.1	Mel.....	16
2.2	Compostos Voláteis.....	18
2.3	Microextração em fase sólida	19
2.4	Cromatografia Gasosa.....	22
2.5	Quimiometrica	24
2.5.1	Análise de componentes principais	26
2.5.2	Pré tratamento de dados.....	26
3	METODOLOGIA.....	27
3.1	Amostragem	27
3.2	Preparação, separação e indentificação dos padrões	29
3.3	Preparo das amostras	30
3.4	HS-SPME e análise cromatográfica.....	31
3.5	Pré-tratamento dos cromatogramas	32
3.6	Aplicação das técnicas quimiométricas	33
3.6.1	Análise estatística univariada	33
3.6.2	PCA	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
5	CONCLUSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

O mel é um alimento de fonte natural que passa por poucos processos, e é caracterizado pela complexidade de sua composição que varia de acordo com a espécie de abelha, região geográfica, a flora do néctar utilizado e as suas condições de armazenamento (KARABAGIAS *et al.*, 2014).

Os componentes majoritários do mel são açúcares, mais especificamente frutose e glicose, já em menor concentração encontram-se as enzimas, proteínas, ácidos orgânicos, minerais, compostos voláteis, os quais compõe aromas e sabores, que dão as características únicas de cada tipo de mel. Dentre os compostos voláteis, poucos são naturalmente encontrados no néctar derivado do pólen, enquanto outros são inseridos pelas abelhas durante o processo de maturação do mel, determinando assim as diferenças de composição e propriedades funcionais de cada mel (SANT'ANA *et al.*, 2012; MANZANARES *et al.*, 2014).

No decorrer dos anos foram encontradas centenas de compostos diferentes na fração volátil, e isso deve-se aos diferentes tipos de floras. Considerando que a composição do aroma de alguns tipos de mel ainda não foi estudada, é provável que o número de voláteis de mel identificados aumente ainda mais. Esses compostos são especificados como marcadores florais do mel. Alguns compostos foram relatados como componentes característicos do mel de determinadas regiões geográficas, tais como o mel inglês, que possui 1-penten-3-ol como composto específico da sua região e bioma (VERZERA *et al.*, 2001; KASKONIENĚ; VENSKUTONIS; ČEKSTERYTĚ, 2008).

Segundo Bertelli *et al.* (2008), alguns tipos de mel podem ser diferenciados a partir de um composto correlacionado com seu bioma. Porém, o aroma da maioria dos méis depende do grupo de constituintes dele que são ácidos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas entre outros, os quais juntos formam os aromas característicos de cada “matriz” única de mel.

Existem diversas técnicas de isolamento de compostos voláteis que podem ser aplicadas ao mel. A concentração dos voláteis no mel em geral é muito baixa, portanto, antes do seu isolamento, é altamente recomendável remover açúcares, que são os principais componentes do mel. Vários métodos de isolamento foram desenvolvidos como extração por destilação, extração dinâmica, extração por ultrassom, extração por solvente e micro extração em fase sólida. Cada técnica de isolamento possui vantagens e desvantagens específicas, como tempo, perda de voláteis associada à utilização de solventes, aquecimento que pode

gerar compostos tóxicos e não presentes na matriz natural devido à degradação térmica dos açúcares. Com isso, a utilização mais eficaz até o momento é via micro extração em fase sólida (SPME), que não utiliza solventes, é uma técnica rápida e de baixo custo que pode ser acoplada a métodos instrumentais de separação e identificação de voláteis como a cromatografia gasosa (GC) (RADOVIC *et al.*, 2001; BIANCHI; CARERI; MUSCI, 2005; ALISSANDRAKIS *et al.*, 2005).

A cromatografia gasosa é uma técnica muito utilizada na análise de compostos voláteis ou volatilizáveis que apresenta uma vasta área de aplicação, variabilidade e extrema sensibilidade, associada a uma alta precisão e sensores que permitem baixos limites de detecção. Foi implementada no século XX, mais especificamente na década de 50, onde devido à grande versatilidade da técnica acarretou-se grande investimento para uma rápida e continua evolução de métodos e equipamentos (COLLINS; BRAGAS; BONATO, 2006).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo diferenciar amostras de mel provenientes de diferentes regiões (região Ortigueira, no Paraná, e arredores), utilizando-se cromatografia gasosa, fazendo-se extração pela técnica de SPME no *headspace* estático, avaliando-se os resultados a partir de métodos quimiométricos para relacionar os resultados dos compostos voláteis com a origem das amostras dos méis.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Diferenciar méis de acordo com suas origens a partir da composição em voláteis utilizando-se HS-SPME como forma de extração, GC-FID como técnica de medida e PCA para reconhecimento de padrões.

1.1.2 Objetivos específicos

- Estabelecer as melhores condições de análise por cromatografia gasosa para a separação e identificação dos padrões de compostos voláteis que podem existir nas amostras de mel;
- Aplicar a metodologia HS-SPME-GC-FID na análise de amostras de mel;
- Diferenciar as amostras de mel com base nos dados cromatográficos utilizando quimiometria e correlacionar os compostos voláteis com a origem geográfica das amostras.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Mel

Durante anos, o mel sempre foi considerado uma mercadoria especial e respeitada, utilizado pelo homem desde os tempos mais antigos. Evidências de seu uso pelo ser humano aparecem desde a Pré-história, com inúmeras referências em pinturas rupestres e em escrituras e pinturas do antigo Egito, Grécia e Roma. O aproveitamento do mel na nutrição humana não se limita apenas a sua característica adoçante, mas pelos seus fatores nutricionais e inúmeras substâncias benéficas ao equilíbrio dos processos biológicos do corpo humano (CAMARGO; PEREIRA; LOPES, 2002).

De acordo com a Instrução Normativa Nº 11 de 20 de outubro de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o mel é o “produto alimentício produzido pelas abelhas *Apis mellifera*, a partir do néctar das flores, das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas das mesmas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colmeia produtora” (BRASIL, 2000).

Segundo Baroni *et al.* (2006) o mel, no geral é uma solução supersaturada de açúcar, com mais de 95% de sua massa composta de açúcar e água, embora diferentes nutrientes valiosos, como vitaminas, minerais, enzimas, compostos orgânicos aromatizantes, aminoácidos livres e inúmeros compostos voláteis constituam componentes menores. No entanto, é essa fração menor da composição geral que é responsável pelas propriedades sensoriais e nutricionais únicas do mel.

O mel é considerado uma das mais variadas misturas de carboidratos produzida pela natureza, sendo um alimento energético muito relevante pelas suas propriedades nutritivas, aromas e sabores. Os diferentes sabores e aromas descobertos dependem em sua maioria da flora, condições climáticas e área geográfica de onde se localiza a colmeia produtora (BILUCA *et al.*, 2014; JANDRIĆ *et al.*, 2015).

No que diz respeito à sua origem, o mel pode ser classificado como floral quando é derivado do néctar das plantas com flores ou não floral quando é derivado de depósitos doces secretados por partes vivas das plantas ou excretados por sucção de seiva ou insetos sugadores como cochonilhas, que excretam um líquido adocicado na forma de gomas em plantas que se encontram em seu habitat. A abelha coleta esses líquidos e utiliza como matéria-prima para

produção de mel. Geralmente, as abelhas preferem coletar o néctar como fonte principal de matéria-prima, utilizando as demais em períodos de baixa disponibilidade de néctar (CASTRO-VÁZQUEZ *et al.*, 2006; MANYI-LOH; NDIP; CLARKE, 2011).

A origem do mel floral pode ser de uma única flora, sendo ele monofloral ou polifloral, onde múltiplas espécies vegetais contribuem diretamente no néctar. Cada tipo de flora, assim como espécie de abelha determina muitas características do mel como sensorial, físico-química e a nível celular, mudando seus aspectos em diversos sentidos de um mel para o outro. Sua origem está diretamente relacionada a flora e região geográfica, assim diferenciando também em sua qualidade (KASKONIENĖ; VENSKUTONIS; ČEKSTERYTĖ, 2008).

Os méis possuem aromas singulares devido à individualidade de seus constituintes voláteis, em sua maioria decorrentes do néctar de origem, condições climáticas e região, assim como as demais características. A elevada variedade de compostos voláteis encontrada nos méis faz com que a representação do seu aroma consiga ser utilizado como uma impressão digital do produto. É possível estabelecer a origem dos méis a partir de marcadores, que são determinados a partir da constituição de sua fração volátil (CUEVAS-GLORY *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2012; CASTRO-VÁZQUEZ *et al.*, 2014).

No Brasil, devido à grande extensão territorial, flora altamente diversificada, diversidade climática e grande quantidade de espécies de abelhas a produção de mel ocorre durante o ano todo. Esses fatores são únicos em correlação aos demais países onde, a produção de mel normalmente acontece apenas em um período específico do ano. Com isso há regiões como o semiárido nordestino que se destaca por possuir condições que favorecem a atividade apicultura devido ao clima, bioma natural, promovendo um fluxo constante de néctar e pólen durante todo o ano, com poucas taxas variáveis, assim contribui para a manutenção de abelhas e colônias sem afetar seu estado natural e não utilizar néctar artificial. (CAMARGO; PEREIRA; LOPES, 2002; SILVA *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2016).

Um grande problema encontrado no mel é a adulteração dele. A certificação do mel é de demasiada relevância, pois garante ao consumidor um produto de qualidade, onde atualmente é um requisito mínimo que o mercado precisa apresentar aos consumidores. Com isso são necessários métodos analíticos que garantem a veracidade da origem do mel definida no rótulo. (TAN *et al.*, 1988; MELO; DUARTE; MATA, 2003).

De acordo com Cajka *et al.*, (2009), os méis de maior valor agregado no mercado são os de origem monofloral e com localizações geográficas específicas, devido ao seu sabor e aroma que caracterizam um produto único de alto valor agregado.

Segundo Mel (2008), é notável a importância dos compostos voláteis do mel, pois a determinação deles que é pouco estudada e muito diversificada agregaria mais valor a um produto tão rico. Gerando as marcas que determinam suas impressões digitais “Fingerprints” devido a serem encontradas amostras com centenas de compostos devido as suas origens variáveis, podendo diminuir a falsificação e melhorando o sistema de certificação do produto que é muito consumido tanto no Brasil, como no mercado externo, devido a não possuir antibióticos em sua composição (MELO; DUARTE; MATA, 2003).

2.2 Compostos Voláteis

Os aromas e sabores dos alimentos está diretamente relacionado aos grupamentos orgânicos e complexibilidade dos diferentes compostos voláteis encontrados no alimento. Os compostos voláteis de baixas concentrações, influenciam na formação única de cada alimento. Em contrapartida certos compostos possuem um aroma característico que predomina o aroma do alimento, assim dando apenas aquele aspecto ao mesmo. Já os compostos voláteis são denominados de auxiliares, pois juntos formam o aroma único de cada respectivo alimento (GARRUTI, 2001).

De acordo com Bianchi *et al.* (2011), os diversos tipos de mel existente possuem aromas únicos devido aos compostos presentes em sua composição e isso deve-se a com base no tipo da fonte da flora que o mel foi metabolizado juntamente com a abelha, do manuseio durante a elaboração, armazenamento e tratamento do mel, ou intervenções do ecossistema. A complexibilidade dos compostos voláteis encontrada nos méis faz com que o seu perfil de aroma seja capaz de ser utilizado como uma peculiaridade única do produto, possibilitando assim que este seja usado para determinar sua origem em relação ao tipo de flora. A origem do mel, floral e ou geográfica, pode ser determinada conhecendo a composição de sua fração volátil, utilizando bibliotecas integradas (KARABAGIAS *et al.*, 2014).

Alguns compostos voláteis de ocorrência natural são característicos da origem botânica e podem ser considerados marcadores específicos, como o metantranilato de mel cítrico, 2- hidroxí-5-metil-hexan-3-ona e 3-hidroxí-5-metilhexan-2-ona para mel de eucalipto ou 2- aminoacetofenona para mel de castanha (BERTELLI *et al.*, 2008).

A origem floral do mel foi caracterizada por uma maior concentração ou ausência de determinados compostos (terpenos, norisoprenoides, compostos derivados de benzeno e outros). Mais de 600 compostos orgânicos foram identificados em diferentes sabores voláteis

do mel originados de várias vias biossintéticas. Aldeídos, cetonas, ésteres, álcoois, hidrocarbonetos, ácidos e compostos de enxofre são os grupos comuns de voláteis que foram detectados em todos os méis. Entre eles, a E- β -damascenona, fenilacetaldeído, linalol de 2-feniletanol, p-anisaldeído e benzaldeído foram relatados como importantes contribuintes para o sabor e aroma do mel (DE MARIA; MOREIRA, 2003; BARRA; PONCE-DÍAZ; VENEGAS-GALLEGOS, 2010; VERZERA *et al.*, 2014).

Segundo Manyi-loh; Ndip; Clarke (2011) os derivados de benzenos presentes nos méis podem ser utilizados na produção de produtos naturais e medicinais possuindo propriedades antivirais, antibacterianas, antifúngicas e efeitos de ajuda no organismo devido a sua interação com a resposta imunológica. Em contrapartida hidrocarbonetos aromáticos no mel podem auxiliar como registros de poluição ambiental. A caracterização do perfil volátil mostrou-se eficaz na avaliação da fonte botânica do mel. O perfil volátil representa uma impressão digital química de diferentes origens botânicas, uma vez que tanto a natureza quanto a quantidade de compostos voláteis dependem da fonte floral (BARONI *et al.*, 2006; CUEVAS-GLORY *et al.*, 2007; ALIFERIS *et al.*, 2010).

A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica útil para o estudo do mel, pois combina alta eficiência e sensibilidade de separação, além de fornecer dados qualitativos e quantitativos para esses compostos combinado a técnicas para análise da fração volátil como extração por solventes, extração-destilação, extração em fase sólida e *headspace* dinâmico (BIANCHI; CARERI; MUSCI, 2005; CUEVAS-GLORY *et al.*, 2007).

2.3 Microextração em fase sólida

Para evitar a geração de compostos derivados de furano e pirano e o consumo de solventes orgânicos caros e tóxicos, novos métodos de extração foram desenvolvidos recentemente. Esses métodos incluem os métodos de extração em fase sólida (SPE), *headspace* estático combinado com micro extração em fase sólida (HS-SPME). A principal vantagem da análise do HS-SPME é que ela é realizada em uma amostra não tratada e o perfil dos voláteis isolados está intimamente associado à percepção sensorial. SPE é uma técnica que elimina completamente o uso de solvente e remove substâncias interferentes, como açúcares e ácidos, apenas lavando com água, mas requer modificação extensiva do injetor cromatográfico a gás ou a adição de um módulo de dessorção. Consequentemente, o HS-SPME resolve a desvantagem associada à técnica anterior (PIASENZOTTO; GRACCO;

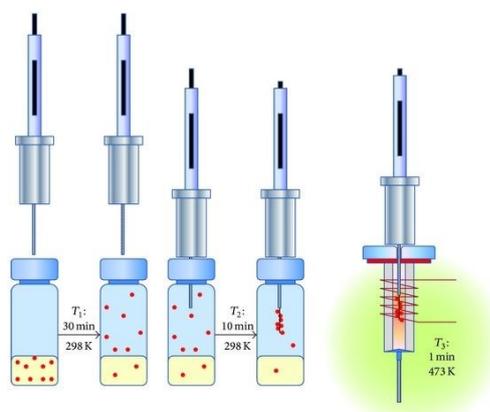
CONTE, 2003; CASTRO-VÁRQUEZ *et al.*, 2006; KASKONIENĖ; VENSKUTONIS; ČEKSTERYTĖ, 2008).

A micro extração em fase sólida é conhecida como uma técnica de extração de analitos muito utilizada em práticas de extração e pré-concentração de uma diversidade de aromas e eflúvios. Essa técnica vem sendo cada vez mais utilizada desde sua descoberta, frequentemente utilizada na área da química e bioquímica, com a intenção de melhorar e otimizar as análises de compostos voláteis a partir da fração volátil, também chamada de “*headspace*” (PAWLISZYN, 2000).

A técnica de SPME é um método que mostra claras vantagens, pois não utiliza nenhum tipo de solvente orgânico, que na maioria dos casos é tóxico, dando assim ênfase à química verde. Outras vantagens do uso da técnica é o preparo simples da amostra, reduzindo assim o tempo de análise. Além disso, permite a quantificação de muitos compostos, abrangendo ampla gama de técnicas de amostragem, como no local e no ar. A técnica também permite uma compatibilidade com instrumentos analíticos como por exemplo, GC-FID, GC-MS, HPLC, LC-MS e GC-O (CUEVAS-GLORY *et al.*, 2007; PONTES, MARQUES;CÂMARA, 2007).

São utilizadas fibras extratoras que consistem em um amostrador (uma seringa) com uma fibra de sílica fundida revestida com um fino filme de um polímero ou de um sólido adsorvente. O processo é resumido em três etapas (Figura 1): na primeira, as moléculas são extraídas de uma matriz para o *headspace* até que o equilíbrio seja atingido, na segunda os voláteis são adsorvidos pela fibra exposta no *headspace* e na terceira é feita a remoção da fibra do vial com as moléculas adsorvidas para que as mesmas sejam dessorvidas em um instrumento analítico (INDELICATO *et al.*, 2014).

Figura 1 - Imagem ilustrativa Esquema do funcionamento da técnica SPME



Fonte: INDELICATO *et al.*, (2014)

As características do analito e do recheio da fibra, a polaridade e volatilidade são fatores cruciais a serem considerados na utilização da técnica de SPME, ainda possuem variáveis que interferem diretamente na extração como a temperatura, agitação da amostra, tempo de adsorção, pH e força iônica para que a fibra atinja o equilíbrio dentro do *headspace*. Devido a complexibilidade de algumas matrizes, a escolha e otimização dos parâmetros relacionados à extração precisam ser feitos experimentalmente para determinar o melhor tempo necessário para que o equilíbrio seja atingido (CUEVAS-GLORY *et al.*, 2007; DA SILVA *et al.*, 2015).

De acordo com Biajoli (2008), além dos fatores citados anteriormente, a eficiência de uma extração depende justamente das constantes de distribuição dos analitos entre a amostra, o *headspace* que serve para extrações nessa metodologia e o tipo de recobrimento da fibra a ser utilizada. Sendo assim, a escolha adequada da fibra é um critério fundamental. Alguns dos tipos de recobrimentos de SPME disponíveis no mercado estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Tipos de recobrimentos disponíveis no mercado mais empregadas para SPME

Recobrimentos poliméricos puros: partição		
Sorvente	df / μm	Aplicações típicas
PDMS	70,30, 100	Apolares
Poliacrilato	85	semivoláteis, polares
Dispersões de sólidos porosos em matrizes poliméricas: adsorção		
PDMS / DVB	60, 65	voláteis, nitro / aminas
Carbowax / DVB	65, 70	polares, álcoois
Carbowax / TR ^a	50	Surfactantes
Carboxen / PDMS	75, 85	gases, compostos leves
Carbowax / PEG ^b	60	polares
Carbopack-Z	15	gases, compostos leves
DVB / Carboxen / PDMS	50, 30	compostos leves, polares

Legenda: ^a: templated resin; ^b: poli(etilenoglicol).

Fonte: BIAJOLI (2008)

Como mostra a Tabela 1, cada tipo de recobrimento possui características próprias, onde cada uma tem a indicação para uma determinada classe de analito (s). Com isso é visto que a afinidade da fibra em cada matriz para extração é relacionada a afinidade pelos compostos de polaridades distintas a serem analisadas, correlacionando a sensibilidade com a gama de compostos extraídos (BIAJOLI, 2008).

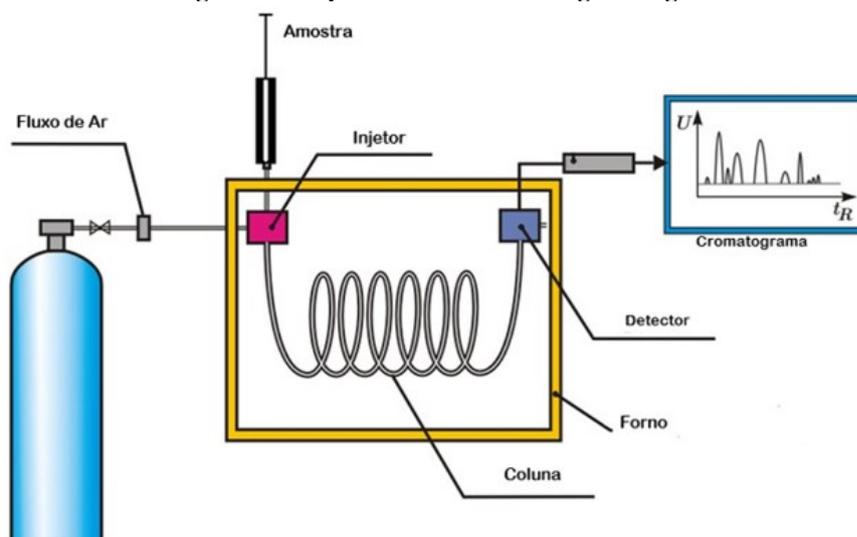
2.4 Cromatografia Gasosa

A cromatografia é um importante método físico-químico de separação desenvolvido no início do século XX e que possui várias técnicas de aplicação no ramo da ciência. Entre as técnicas existentes a cromatografia gasosa (GC) possui uma vasta aplicabilidade na separação de substâncias. Desde seu desenvolvimento, a técnica vem se aprimorando com constante evolução dos equipamentos, acessórios, colunas e fases estacionárias (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Segundo Herrero *et al.* (2009), a cromatografia gasosa vem sendo utilizada por muitos anos como uma ferramenta padrão de separação para analisar compostos de uma variedade de matrizes, incluindo análise de alimentos. É uma técnica utilizada para a separação e quantificação de compostos voláteis ou semivoláteis com características semelhantes em misturas complexas de uma matriz. Trata-se de uma separação de misturas por interação diferencial e unidimensional, ocorre na coluna, tendo duas fases envolvidas, uma fase estacionária que reside dentro da coluna e uma fase móvel (líquido ou gás), que se move sobre a coluna. A função da fase estacionária na coluna é separar componentes diferentes, causando a uma saída da coluna em um tempo diferente tempo de retenção (TR).

Os cromatógrafos (Figura 2) são compostos por um injetor, onde é inserida a amostra e deve estar com elevada temperatura para que ocorra a vaporização da amostra, logo abaixo a entrada do gás de arraste. Em seguida devem ser conectados a uma coluna, que realizará a separação das amostras em diferentes taxas, dependendo de várias propriedades físicas e químicas e suas interações com o recheio da coluna, por último é o detector por ionização em chama (FID), onde detecta a formação de íons pela combustão da amostra na presença de H₂ e O₂, origina uma corrente elétrica no coletor gerando um sinal. (PENTEADO; MAGALHÃES; MASINI, 2008).

Figura 2 - Esquema de um cromatógrafo a gás



Fonte: Google imagens, modificado (2019).

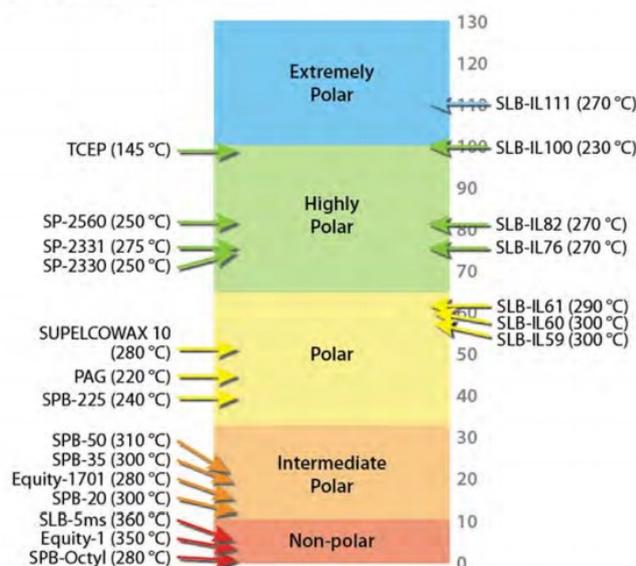
As colunas capilares de sílica fundida, que apresentam elevado número de pratos teóricos e com grande poder de resolução, possibilitam a separação de diversas classes de compostos químicos com largas faixas de polaridade, solubilidade e ponto de ebulição. São utilizadas em determinações por GC a temperaturas que excedem 400 °C para certos compostos, aplicações a altas temperaturas requerem fases estacionárias específicas juntamente a materiais resistentes que separam os compostos pelo seu tempo de retenção (SKOOG *et al.*, 2012).

O tempo de retenção, ou seja, o tempo que uma substância específica percorra pelo sistema, é uma das principais informações que se obtém em um cromatograma. Entretanto, ele sozinho não é capaz de definir se dois picos estão totalmente separados, já que não possui relação direta com o alargamento dos mesmos. A eficiência de uma coluna pode ser visualizada através da largura dos picos no cromatograma juntamente a características físico-químicas do composto e variáveis das fases estacionária e móvel, juntamente a polaridade do recheio da coluna (NETO; NUNES, 2003; COLLINS; BRAGAS; BONATO, 2006).

A polaridade da fase estacionária é uma das características mais relevantes que precisa ser considerada na escolha da coluna cromatográfica a ser trabalhada, levando em consideração que ela é diretamente relacionada à seletividade, ou seja, à capacidade da fase estacionária em separar os compostos. As constantes de McReynolds (1970) são baseadas nas interações entre as fases estacionárias e solutos específicos como interações dispersivas, dipolares, com capacidade de doar prótons e outras. Os índices de retenção dessas interações a

partir de compostos avaliam a similaridade entre as fases e a polaridade de da coluna de referência, assim ranqueando-as em relação às suas polaridades e auxiliando na previsão da ordem de eluição dos analitos a serem estudados. Quanto maior o valor da constante, maior a polaridade da fase estacionária (Figura 3) (ZELLNER *et al.*, 2008; POOLE e LENCA, 2014; SUPELCO, 2019).

Figura 3 - Escala de polaridade, em função das constantes de McReynolds, para algumas fases estacionárias em colunas capilares comerciais e suas respectivas temperaturas máximas de operação



Fonte: SULPECO (2019)

Existem acessórios que podem ser acoplados no sistema a gás, líquido ou fluido supercrítico para a análise de diversos compostos em diferentes matrizes de alimentos (mel, leite, queijo, óleo, vinho, etc.), consequentemente proporcionando uma análise multidimensional do analito em relação aos diversos compostos complexos presentes nos alimentos (HERRERO *et al.*, 2009).

2.5 Quimiometria

A quimiometria surgiu na década de 70, com o intuito de sanar a necessidade de tratar um grande volume de dados para a obtenção de informações úteis com o método adequado, onde a mesma é uma disciplina química que utiliza métodos matemáticos, estatísticos e computacionais para delinear ou definir experimentos de uma forma aperfeiçoada e para fornecer o maior número de informações químicas com a análise dos dados obtidos nas pesquisas, a fim de reconhecer padrões por meio de ferramentas (FERREIRA, 2015).

As técnicas têm se desenvolvido cada vez mais, viabilizando uma grande aplicação das mesmas, que atualmente estão mais difundidas dentro dos campos da química. Sendo totalmente admissível, visto que há uma alta demanda de análises da composição química, que no geral as matrizes são complexas, necessitando de preceitos simultâneos de espécies químicas em amostras complexas, possuindo métodos exploratórios que tem a intenção de extrair informações e detectar padrões nos dados, sendo eles supervisionados ou não supervisionados (FERREIRA *et al.*, 1999; CHAU *et al.*, 2004).

Dentro da técnica há diversas áreas e etapas para que as análises de dados sejam coerentes: 1ª Organização, visualização e pré-tratamento de dados, 2ª Análise exploratória dos dados, e dependendo do objetivo tem a construção de modelos de classificação que são métodos qualitativos ou modelos de regressão para métodos quantitativos. Com isso os dados se tornam variáveis que passam por pré-tratamentos, como o auto escalamento, por exemplo que tem o intuito de comprimir o desvio padrão das variáveis, assim mostrando maior significância de uma variável em comparação as demais, mostrando maior importância dentro de uma análise independente dos valores absolutos correspondentes aos dados antes deste procedimento (FERREIRA, 2015).

São as metodologias matemáticas embutidas antes do tratamento dos dados adquiridos experimentalmente, a fim de otimizar as futuras variáveis sem as interferências ocasionadas pelas possíveis falhas da parte experimental dos dados. Entretanto não é uma “correção” das falhas e sim um método vinculado a técnica a fim de minimizar ou remover matematicamente fontes de variação indesejáveis que não serão removidas naturalmente durante a análise dos dados (BRERETON, 2003; FERREIRA, 2015).

Segundo Ferreira (2015), as metodologias supervisionadas ou não supervisionadas permitem a interpretação multivariada de um agrupamento de dados complexos através de gráficos bi ou tridimensionais. As metodologias supervisionadas necessitam de alguma informação inicial sobre as amostras, a fim de classificá-las com o intuito de desenvolver um modelo interligado nas informações da própria amostra. Entretanto, as metodologias não supervisionadas como a análise de componentes principais (PCA), a separação de classes acontece sem essa necessidade de informações sobre a natureza da amostra, e tem como finalidade identificar os agrupamentos naturais entre as amostras (BRERETON, 2003).

2.5.1 Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (PCA) reduz a redundância de fatores por meio da representação do conjunto de dados em um novo sistema de eixos, sendo eles os componentes principais (PC), possibilitando uma melhor visualização dos dados em poucas dimensões. Dentro do espaço original, as amostras são localizadas em pontos dentro do espaço n-dimensional, onde n é equivalente ao número de variáveis. Devido a limitação das dimensões promovidas pela PCA, as amostras possuem localizações em espaços de dimensões reduzidas pelas PCs (BRERETON, 2003; FERREIRA, 2015; GRANATO *et al.*, 2015).

As PCs formadas em um novo espaço multivariado reduzido possuem atributos escores e pesos, onde mostram a contribuição de cada PC nos dados e a contribuição de cada variável na obtenção da PC, assim através da análise conjunta de escores e pesos é possível a verificação das variáveis que são responsáveis pelas diferenças entre as amostras estudadas pelo porcentual de variância (BRERETON, 2003; FERREIRA, 2015; GRANATO *et al.*, 2015).

2.5.2 Pré tratamento de dados

Para que se possa comparar cromatogramas, é necessário que se faça um alinhamento dos picos em comum que possam ter sido deslocados em virtude de desajustes de tempos de retenção. Neste caso, utilizou-se o algoritmo *icoshift* que tem como finalidade o alinhamento dos picos através do deslocamento otimizado de correlação de intervalo que utiliza uma função de correção linear por inserção e exclusão, e otimiza a relação cruzada em partes usando a Transformada rápida de Fourier para permitir a identificação de picos ou regiões que devem ser alinhadas (SAVORANI; TOMASI; ENGELSEN, 2010; GISKEODEGARD *et al.*, 2010).

3 METODOLOGIA

3.1 Amostragem

Primeiramente foram analisadas 49 amostras de mel doadas pelo IAPAR (Instituto Agrônômico do Paraná - Londrina), as quais foram coletadas de produtores da região Sul/Sudeste do Brasil. Na Tabela 2 encontram-se as descrições das amostras submetidas às análises.

Todas as amostras de mel deste estudo são provenientes da espécie *Apis mellifera*. As amostras foram adquiridas pelo IAPAR nos anos de 2010-2011 em fazendas na região de Ortigueira no Paraná, sendo (Ext1) na região sul de Ortigueira, (Ext2) na região norte de Ortigueira e (Ext3) em regiões Sul/Sudeste do Brasil. As amostras analisadas também fazem parte do conjunto das 79 amostras de um estudo do IAPAR relacionando identificação geográfica com as características físico-químicas, onde foram feitas análises como a coloração do mel que se utilizou a espectroscopia na região UV-Vis com a absorvância em 650 nm, e o resultado foi relacionado com a escala P_{fund} apresentada na Tabela 6, mostrando a diferença da coloração dos méis por região (SCHOLZ *et al.*, 2020).

As amostras permaneceram acondicionadas em frascos de polietileno e armazenadas a uma temperatura de aproximadamente -18 °C, até a realização das análises dos compostos voláteis.

Tabela 2 - Localização e flora das amostras de mel

Amostra	ID	Ano	Local	Flora	Amostra	ID	Ano	Local	Flora	Amostra	ID	Ano	Local	Flora
ORT_3	ORT-S	2010	Ortigueira	Silvestre	ORT_35	ORT-B	2010	Ortigueira	Barbanteiro	EXT1_81	EXT1-S/VE	2011	Faxinal	Silvestre-Vassoura Branca
ORT_4	ORT-EU	2010	Ortigueira	Eucaliptus	ORT_38	ORT-S	2010	Ortigueira	Silvestre	EXT1_83	EXT1-S	2011	Tamarana	Silvestre
ORT_6	ORT-S	2010	Ortigueira	Silvestre	ORT_40	ORT-AS	2010	Ortigueira	Assapeixe	EXT1_89	EXT1-S	2011	Reserva	Silvestre
ORT_9	ORT-AS	2010	Ortigueira	Assapeixe	ORT_45	ORT-EU	2010	Ortigueira	Eucaliptus	EXT1_90	EXT1-CA	2011	Reserva	Capixingui
ORT_12	ORT-S	2010	Ortigueira	Silvestre-Pontão	ORT_48	ORT-EU	2010	Ortigueira	Eucaliptus	EXT1_95	EXT1-CA	2011	S Jeronimo	Capixingui
ORT_13	ORT-AS	2010	Ortigueira	Assapeixe-Silvestre	ORT_49	ORT-S	2010	Ortigueira	Silvestre	EXT1_104	EXT1-CE	2010	Sapopema	Cipó Estribo
ORT_14	ORT-AS	2010	Ortigueira	Assapeixe	ORT_54	ORT-CA	2011	Ortigueira	Capixingui	EXT2_69	EXT2-S	2011	Cornélio Procópio	Silvestre
ORT_17	ORT-S	2010	Ortigueira	Silvestre	ORT_56	ORT-S	2011	Ortigueira	Silvestre	EXT2_72	EXT2-S	2011	Ventania	Silvestre
ORT_20	ORT-AS	2010	Ortigueira	Assapeixe	ORT_60	ORT-CA	2011	Ortigueira	Capixingui	EXT2_103	EXT2-S	2010	Jacarezinho	Silvestre
ORT_22	ORT-S	2010	Ortigueira	Silvestre	ORT_87	ORT-S	2011	Ortigueira	Silvestre-Capixingui	EXT2_107	EXT2-LA	2010	Abatiá	Laranjeira
ORT_23	ORT-S	2010	Ortigueira	Silvestre	ORT_162 1	ORT-AS	2011	Ortigueira	assa peixe	EXT2_108	EXT2-S	2010	Cambará	Silvestre
ORT_24	ORT-S	2010	Ortigueira	Silvestre	ORT_162 8	ORT-AS	2011	Ortigueira	assa peixe	EXT2_111	EXT2-S	2010	Cornélio Procópio	Silvestre
ORT_27	ORT-AS	2010	Ortigueira	Assapeixe	EXT1_71	EXT1-VE	2011	Imbau	Vassoura	EXT3_121	EXT3-BR	2011	Mafra	Bracatinga
ORT_29	ORT-S	2010	Ortigueira	Silvestre	EXT1_73	EXT1-S	2011	São Cristóvão	Silvestre	EXT3_123	EXT3-S	2011	Itaiópolis-SC	Silvestre
ORT_30	ORT-LA	2010	Ortigueira	Laranjeira	EXT1_74	EXT1-AS	2011	Sapopema	Assapeixe	EXT3_125	EXT3-S	2011	Ponta Grossa	Silvestre
ORT_31	ORT-AS	2010	Ortigueira	Assapeixe	EXT1_75	EXT1-S	2011	Tamarana	Silvestre	-	-	-	-	-
ORT_34	ORT-AS	2010	Ortigueira	Assapeixe-Jangada	EXT1_79	EXT1-AS	2011	Sapopema	Assapeixe	-	-	-	-	-

Fonte: Autoria própria (2020).

*A numeração das amostras corresponde a mesma fornecida pelo IAPAR

3.2 Preparação, separação e indentificação dos padrões

A Tabela 3 apresenta a lista dos padrões utilizados para a identificação dos compostos voláteis nas amostras de mel estudadas da marca Sigma-Aldrich.

Tabela 3 - Identificação dos padrões dos compostos voláteis

Item	Identificação do padrão
1	1-Nonanol
2	Ácido Benzoico
3	Ácido Isovalérico
4	Álcool Benzílico
5	Benzaldeído
6	Fenilacetaldéido
7	Heptaldeído
8	Hexanal
9	Hidroximetilfurfural (HMF)
10	Linalol
11	Metilpropionato
12	Nonanal
13	Octanal
14	Oxido de <i>cis/trans</i> -linalol
15	Vanilina

Fonte: Autoria própria (2020)

Foram preparadas soluções, separadamente, de cada padrão na concentração de 100 ppm (m/v) diluídos em metanol (Sigma-Aldrich). Para a identificação do tempo de retenção, foi injetada uma alíquota de 1 μ L de cada solução nas condições cromatográficas descritas na sequência.

A separação foi feita num cromatógrafo a gás Shimadzu GC-2010 Plus, equipado com uma coluna capilar RTX-1 (30 m, 0,53 mm ID, 0,50 μ m). As condições operacionais do GC otimizadas com relação a separação dos compostos foram: injetor (SPL) com divisão 1:100 e temperatura 225 °C e detector por ionização de chamas (FID) de 240 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 40 °C por 2 minutos, aquecendo até 80 °C à 5 °C por minuto, em seguida aquecendo até 120 °C numa razão de 3 °C por minuto e finalmente aquecida até 230 °C numa razão de 20 °C por minuto e permanecendo por 2 minutos, totalizando 31 minutos de análise (SILVA, 2006). O gás de arraste foi o hidrogênio de alto grau de pureza com fluxo de

1,24 mL.min⁻¹ e velocidade linear de 35,4 cm.s⁻¹. O gás auxiliar (*make-up*) foi o nitrogênio a 30,0 mL.min⁻¹. A chama do FID foi produzida com hidrogênio (30,0 mL.min⁻¹) e ar sintético (300,0 mL.min⁻¹), ambos com alto grau de pureza.

A identificação dos padrões foi feita a partir dos tempos de retenção dos picos dos compostos onde foi considerado seus pontos de ebulição e principalmente a afinidade da polaridade do composto com a coluna, em seguida foram integrados utilizando o software GCsolution versão 2.41 (Shimadzu), assim servindo de referência para às análises dos voláteis por SPME conforme a Tabela 4 dos padrões com seus tempos de retenção e ponto de ebulição.

Tabela 4 - Tempo de retenção dos padrões

nº	Composto	Tempo de retenção (min)
1	Metilpropionato	2,487
2	Hexanal	4,979
3	Ácido Isovalérico	6,564
4	Heptaldeído	7,646
5	Benzaldeído	9,111
6	Octanal	10,741
7	Álcool Benzílico	11,569
8	Fenilcetaldeído	11,614
9	Oxido de <i>cis</i> -linalol	13,331
10	Oxido de <i>trans</i> -linalol	13,858
11	Nonanal	14,291
12	Linalol	14,331
13	Ácido Benzoico	16,975
14	1-Nonanol	17,129
15	HMF	18,158
16	Vanilina	24,561

*identificados por GC

Fonte: Autoria própria (2020)

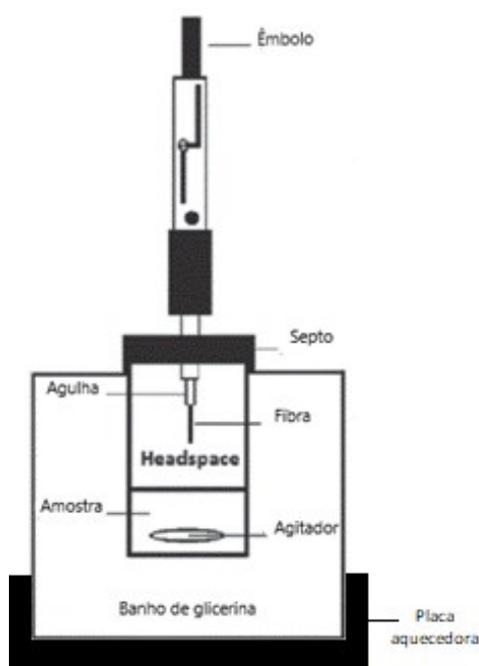
3.3 Preparo das amostras

As amostras de méis foram preparadas conforme (BRITO, 2012) modificando alguns parâmetros, utilizando-se a proporção 1:1, onde foi pesado 1,00 g da amostra em balança analítica (Bioscale) em frasco com capacidade para 40 mL (selado com septo de silicone) contendo 1 mL da solução concentrada a 36% m/m de NaCl (Synth) em água ultrapura filtrada pelo sistema Mili-Q, homogeneizadas sob de agitação num vortex ION VX-38 a 800 rpm e, em seguida submetidas ao *headspace*.

3.4 HS-SPME e análise cromatográfica

Cada amostra homogeneizada e acondicionada em frasco tipo vial foi acondicionada separadamente em banho de glicerina a 60 °C (MARQUES, 2011), sobre uma chapa aquecedora com agitação magnética da labstore IKA C-MAG HS 7 de 500 rpm por 5 min ao tempo de equilíbrio térmico. Em seguida, a fibra, Divinylbenzeno/Carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS – 50/30 µm (Supelco) foi exposta ao sistema em aquecimento, permanecendo por 30 min (Figura 4). Após o tempo de exposição, a fibra foi recolhida no *holder* (Supelco) e imediatamente inserida manualmente no injetor do cromatógrafo a gás, permanecendo por 10 min no injetor.

Figura 4 - Ilustração esquemática do SPME – Headspace



Fonte: Queiroz *et al.* (2001), modificado

A separação dos compostos voláteis foi realizada no GC conforme as especificações do item 3.2. A injeção da fibra foi feita de forma manual sem divisão de amostra (*splitless*). A identificação dos compostos voláteis foi realizada por comparação dos TR dos padrões com os cromatogramas das amostras. Os cromatogramas foram exportados em formato “txt” usando o software GCsolution versão 2.41 (*Shimadzu*) para posterior utilização no software MATLAB.

3.5 Pré-tratamento dos cromatogramas

O primeiro pré-tratamento aplicado foi a interpolação onde foi feita uma padronização dos tempos de retenção, os mesmos foram interpolados para todas as amostras apresentarem sinal a cada 0,001 minutos no intervalo de 0 até 30 minutos. Assim, cada cromatograma resultou em 30001 pontos. Observando-se intervalo de 0 até 1,6 minutos, foi detectada uma variação na linha base dos cromatogramas, assim foi realizada uma correção de linha base usando ajuste de função linear.

Anteriormente ao cálculo da área dos picos dos padrões, os cromatogramas foram alinhados utilizando o algoritmo *Icoshift* de acordo com a Tabela 5 e usando o espectro médio como referência (SAVORANI; TOMASI; ENGELSEN, 2010).

Tabela 5 - Alinhamento dos picos pelo espectro médio

Região	a (min)	b (min)	$ \bar{s} $ (s)	Min (s)	Max (s)
1	1,64	2,74	1,46	-2,52	4,02
2	8,84	9,54	3,73	-9,72	10,5
3	11,54	11,92	1,21	-1,14	7,86
4	13,25	13,53	1,4	-3	2,16
5	13,69	14,03	1,53	-9,96	1,8
6	14,24	14,72	2,81	-6,3	5,7
7	16,57	16,9	0,71	-4,14	2,16
8	16,93	17,04	0,19	-0,72	0,54
9	24,46	24,58	0,22	-0,6	0,84

*a: limite inferior do intervalo.

*b: limite superior do intervalo.

* $|\bar{s}|$: deslocamento absoluto médio

*Min: mínimo deslocamento observado, maior deslocamento para esquerda

*Max: máximo deslocamento observado, maior deslocamento para direita

Fonte: Autoria própria (2020)

Após os pré-tratamentos nos cromatogramas das amostras foi possível calcular a área total de cada cromatograma considerando todos os picos (identificados ou não). A área total foi utilizada para normalizar os cromatogramas para uma área unitária. Em seguida foi realizada a integral dos picos identificados usando os padrões disponíveis. Assim, foi obtida a porcentagem relativa de cada composto que foram dispostas em uma matriz (49 x 10), cujas linhas correspondiam às amostras, enquanto as colunas as porcentagens relativas dos compostos identificados.

3.6 Aplicação das técnicas quimiométricas

Para as análises quimiométricas foi utilizado um software MATLAB R2021a voltado para o cálculo numérico. Nele é possível fazer análise e simulação de modelos matemáticos, cálculo com matrizes, processamento de sinais e construção de gráficos com a intenção de obter possíveis perfis cromatográficos das amostras de mel e relacionar os mesmos com seus marcadores geográficos a partir do aplicativo GAMMA, que foi desenvolvido para análises quimiométricas (BONA, 2019).

No programa existem funções pré-definidas para análise exploratória de dados, requerida neste estudo, além da possibilidade de implementação de novas ferramentas. Neste trabalho utilizou-se o algoritmo de Análise de Componentes Principais (PCA).

3.6.1 Análise estatística univariada

O processamento de dados foi realizado aplicativo GAMMA. A comparação das médias foi alcançada por uma análise de variância unidimensional (ANOVA) com ($p < 0,05$) a fim de determinar se os compostos voláteis possuem valores de parâmetro que são significativos na diferenciação de mel de Ortigueira e Externos. As regiões foram tomadas como a variável independente enquanto os compostos voláteis foram selecionados como a variável dependente.

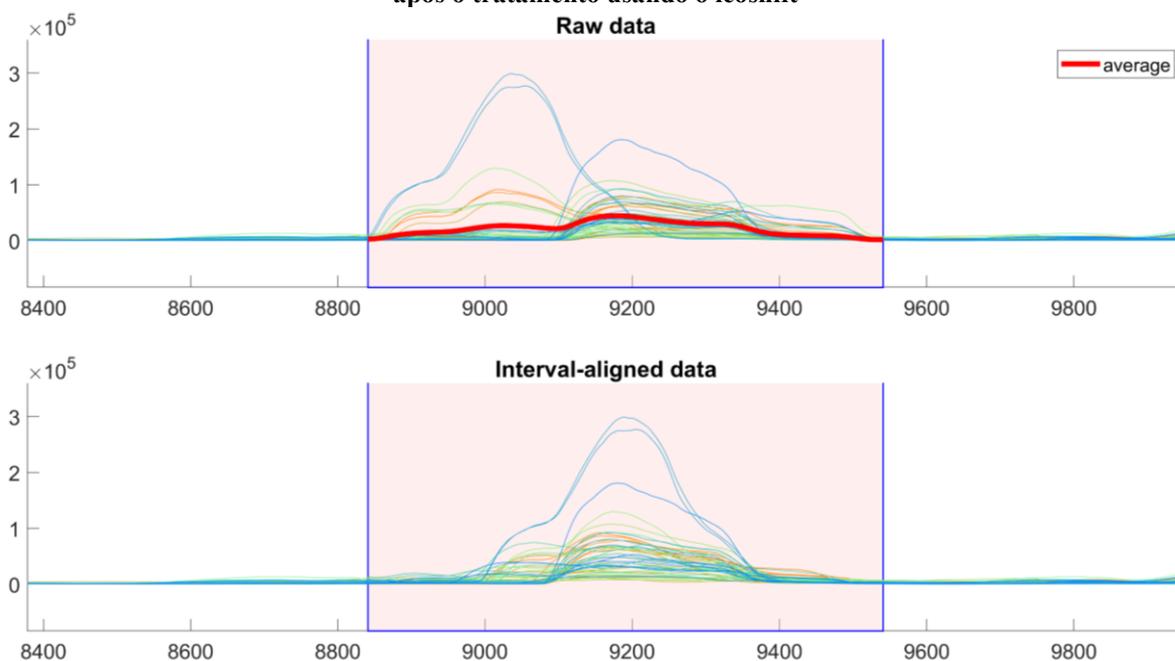
3.6.2 PCA

Foi utilizado o aplicativo GAMMA para realizar a PCA na matriz 49×10 centrada na média. Foram selecionadas as primeiras PCs que acumularam 95% de variância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 5 estão apresentados os cromatogramas do GC das amostras de mel pré-tratadas com destaque para um dos picos observados. Fica evidente o efeito do tratamento aplicado para a correção do deslocamento do tempo de retenção dos picos.

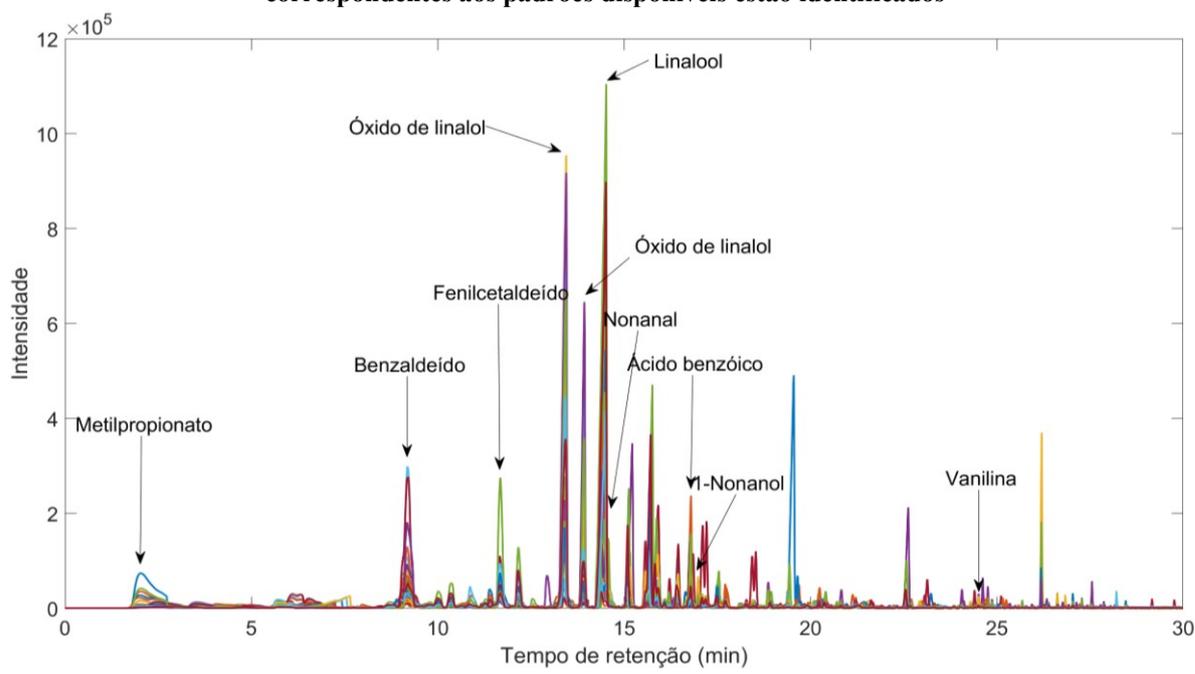
Figura 5 - Pico do cromatograma com zoom para destacar o deslocamento do tempo de retenção antes e após o tratamento usando o *icoshift*



Fonte: Autoria própria (2020)

Após a correção da linha de base e *icoshift* foi possível visualizar melhor a intensidade dos picos dos compostos com o mesmo tempo de retenção dos padrões nas amostras de mel, como demonstrado na Figura 6.

Figura 6 - Cromatograma após correção de linha de base e alinhamento pelo algoritmo icoshift. Os picos correspondentes aos padrões disponíveis estão identificados



Fonte: Autoria própria (2020)

A Tabela 6 ilustra a representação total dos dados dos cromatogramas adquiridos pelo GC, onde além dos compostos estudados possuem também diversos compostos não identificados como o hidroximetilfurfural (HMF), um componente conhecido no controle de qualidade do mel. O mesmo é gerado a partir da degradação térmica nas moléculas de glicose, sendo um dos possíveis picos não reconhecidos pelo GC, por sua vez o HMF é normalmente detectado em baixa concentração. A detecção do HMF é influenciada pela diluição ilegal de mel e o tempo e temperatura ao qual a amostra é exposta (TOSI, 2002).

Estes compostos em sua maioria não são detectados no GC convencional, isso ocorre devido a coeluição dos compostos nos picos cromatográficos, sendo necessária análises mais aprofundadas em GCxGC devido ao aumento da sensibilidade, poder de separação e biblioteca oferecida por ele.

Tabela 6 - Porcentagem relativa dos compostos voláteis e coloração das amostras

(continua)

Amostra/Local	Coloração	Metilpropionato	Benzaldeído	Fenilcetaldeído	Óxido de cis-linalol	Óxido de trans-linalol	Linalol	Nonanal	Ácido Benzóico	1-Nonanol	Vanilina	Soma das porcentagens dos voláteis identificados
EXT1-VE	Âmbar claro	3,922	18,649	8,832	10,785	3,535	5,082	0,773	1,757	0,317	0,490	54,142
EXT1-S	Âmbar	1,007	2,111	1,904	18,256	4,882	28,246	0,221	3,797	0,247	0,087	60,756
EXT1-AS	Âmbar claro	1,134	8,370	1,873	10,454	2,379	21,920	0,542	2,545	0,532	0,132	49,881
EXT1-S	Âmbar claro	8,022	16,644	1,311	15,056	4,417	4,664	0,600	0,605	0,254	0,270	51,844
EXT1-AS	Âmbar	0,890	8,605	1,422	33,394	7,748	19,658	5,263	0,422	0,217	0,154	77,772
EXT1-S/VE	Âmbar	0,955	0,937	1,013	16,560	4,176	36,871	0,211	0,931	0,113	0,036	61,804
EXT1-S	Âmbar claro	0,643	5,806	0,980	46,076	11,964	9,222	0,352	0,543	0,289	0,318	76,192
EXT1-S	Âmbar	2,290	0,911	0,641	21,009	6,857	14,517	0,410	1,930	0,704	0,204	49,473
EXT1-CA	Branco	2,624	1,460	2,002	34,151	12,735	9,635	0,397	1,422	0,367	0,174	64,967
EXT1-CA	Âmbar extra claro	0,449	6,041	1,228	42,741	20,046	10,181	4,742	1,454	0,200	0,091	87,173
EXT1-CE	Âmbar Claro	7,464	15,485	1,959	6,066	1,934	6,018	0,091	0,560	0,183	0,416	40,175
EXT2-S	Âmbar extra claro	0,959	3,601	4,530	13,423	3,053	12,712	0,076	1,844	0,252	0,225	40,676
EXT2-S	Âmbar claro	4,971	3,776	1,352	39,228	16,082	10,463	0,511	2,655	0,428	0,185	79,651
EXT2-S	Branco	0,746	1,512	6,390	2,741	2,232	6,361	0,203	8,233	0,375	0,106	28,900
EXT2-LA	Âmbar Extra Branco	3,438	14,071	5,409	15,667	4,377	14,078	0,103	0,661	0,634	0,221	58,659
EXT2-S	Âmbar	5,349	2,143	3,658	17,746	4,207	8,109	0,078	0,522	0,494	0,385	42,691

EXT2-S	Escuro	6,912	2,613	6,367	10,668	3,458	8,155	0,370	0,645	0,211	0,339	39,737
EXT3-BR	Âmbar extra claro	1,376	1,433	3,457	2,342	2,159	2,487	23,535	0,455	0,674	0,703	38,622
EXT3-S	Âmbar	1,547	6,927	16,805	7,210	2,664	20,251	1,541	1,178	0,241	0,212	58,576
EXT3-S	Âmbar extra claro	1,628	7,155	3,949	20,293	5,305	16,083	0,711	2,006	0,293	0,128	57,550
ORT-S	Âmbar Claro	2,699	1,197	2,382	12,784	3,832	19,061	10,050	1,007	0,145	0,142	53,299
ORT-EU	Âmbar Extra Branco	9,104	9,503	6,259	1,792	1,953	3,758	3,492	0,280	0,066	0,192	36,399
ORT-S	Branco	5,008	26,330	2,328	1,738	0,689	4,612	3,140	0,258	0,110	0,211	44,425
ORT-AS	Branco	3,311	4,634	5,465	8,713	1,585	14,940	9,643	0,413	0,154	0,252	49,111
ORT-S	Âmbar Claro	1,586	3,548	2,524	18,517	5,300	31,051	0,311	1,296	0,269	0,107	64,507
ORT-AS	Âmbar Claro	1,300	3,731	1,394	9,941	2,470	34,599	0,318	1,464	0,130	0,036	55,383
ORT-AS	Extra Branco	2,126	22,208	4,172	7,019	1,379	17,208	0,318	0,659	0,145	0,270	55,504
ORT-S	Âmbar	2,590	4,291	5,333	16,411	4,304	20,247	1,738	2,646	0,864	0,195	58,618
ORT-AS	Âmbar Claro	1,729	4,654	2,349	11,521	3,716		0,224	1,013	0,166	0,117	63,177
ORT-S	Âmbar Extra Branco	11,792	15,025	6,184	1,726	0,881	2,443	0,434	0,162	0,053	0,162	38,862
ORT-S	Escuro	4,352	3,251	2,984	26,245	8,940	18,594	0,625	1,322	0,303	0,116	66,733
ORT-S	Branco	2,282	10,681	5,721	11,323	2,298	23,642	1,121	0,849	0,139	0,221	58,277
ORT-AS	Extra Branco	0,890	8,527	2,394	11,382	1,730	33,905	0,260	0,975	0,121	0,116	60,299
ORT-S	Branco	5,862	11,516	5,424	5,965	1,485	15,805	0,453	0,942	0,182	0,365	47,999
ORT-LA	Âmbar Claro	2,896	6,990	2,892	10,522	1,795	27,069	0,933	1,146	0,148	0,191	54,581

ORT-AS	Âmbar Claro	2,601	6,607	2,683	10,962	1,914	29,332	0,918	1,401	0,157	0,094	56,669
ORT-AS	Branco	1,519	11,313	5,093	15,592	3,080	24,553	1,079	0,807	0,209	0,366	63,610
ORT-B	Branco	1,046	12,383	3,224	14,982	3,491	29,371	0,710	0,954	0,149	0,130	66,442
ORT-S	Branco	1,371	12,514	2,666	13,791	2,926	30,961	0,646	1,078	0,128	0,202	66,283
ORT-AS	Branco	1,213	9,633	3,991	13,749	3,066	44,979	4,599	0,486	0,123	0,173	82,012
ORT-EU	Âmbar Extra Branco	6,089	35,883	3,340	1,550	0,842	3,568	0,465	0,246	0,085	0,195	52,264
ORT-EU	Branco	5,655	36,113	4,417	1,448	0,796	2,955	0,356	0,257	0,079	0,178	52,255
ORT-S	Âmbar Extra Branco	1,985	7,659	6,116	15,622	4,155	18,227	0,458	0,840	0,382	0,516	55,960
ORT-CA	Âmbar extra claro	1,046	7,212	2,411	19,152	8,746	28,275	0,183	2,635	0,343	0,181	70,183
ORT-S	Âmbar claro	1,142	1,872	1,531	24,585	8,243	12,076	1,415	3,456	1,752	0,491	56,563
ORT-CA	Branco	0,330	11,273	1,727	32,426	16,360	10,584	0,115	3,004	0,373	0,111	76,304
ORT-S	Âmbar claro	6,430	3,660	2,210	25,568	10,736	10,207	0,651	4,153	0,610	0,177	64,401
ORT-AS	Branco	1,838	5,556	1,981	22,769	5,620	25,651	0,369	0,959	0,177	0,186	65,106
ORT-AS	Âmbar extra claro	0,903	4,905	1,545	13,854	3,295	37,239	0,187	1,280	0,114	0,084	63,407

Fonte: Aatoria própria (2020)

A Tabela 7 apresenta um teste comparação de médias entre as amostras classificadas como externas e da região de Ortigueira.

Tabela 7 - Teste comparação de média para a porcentagem relativa dos compostos identificados nas amostras de mel

COVs	Externas (N = 20)	Ortigueira (N = 29)	ANOVA (p- valor)
Metilpropionato	2,816 ±2,459	3,127 ±2,688	0,682
Benzaldeído	6,412 ±5,643	10,437 ±9,039	0,084
Fenilcetaldeído	3,754 ±3,805	3,474 ±1,584	0,724
Óxido de cis-linalol	19,193 ±13,122	13,160 ±8,049	0,052
Óxido de trans-linalol	6,210 ±5,064	3,987 ±3,561	0,077
Linalol	13,236 ±8,626	21,124 ±11,77	0,014
Nonanal	2,037 ±5,263	1,559 ±2,53	0,674
Ácido Benzóico	1,708 ±1,784	1,241 ±1,001	0,247
1-Nonanol	0,351 ±0,172	0,265 ±0,334	0,294
Vanilina	0,244 ±0,161	0,199 ±0,112	0,256
Soma das porcentagens dos voláteis	55,962 ±15,61	58,574 ±10,019	0,479

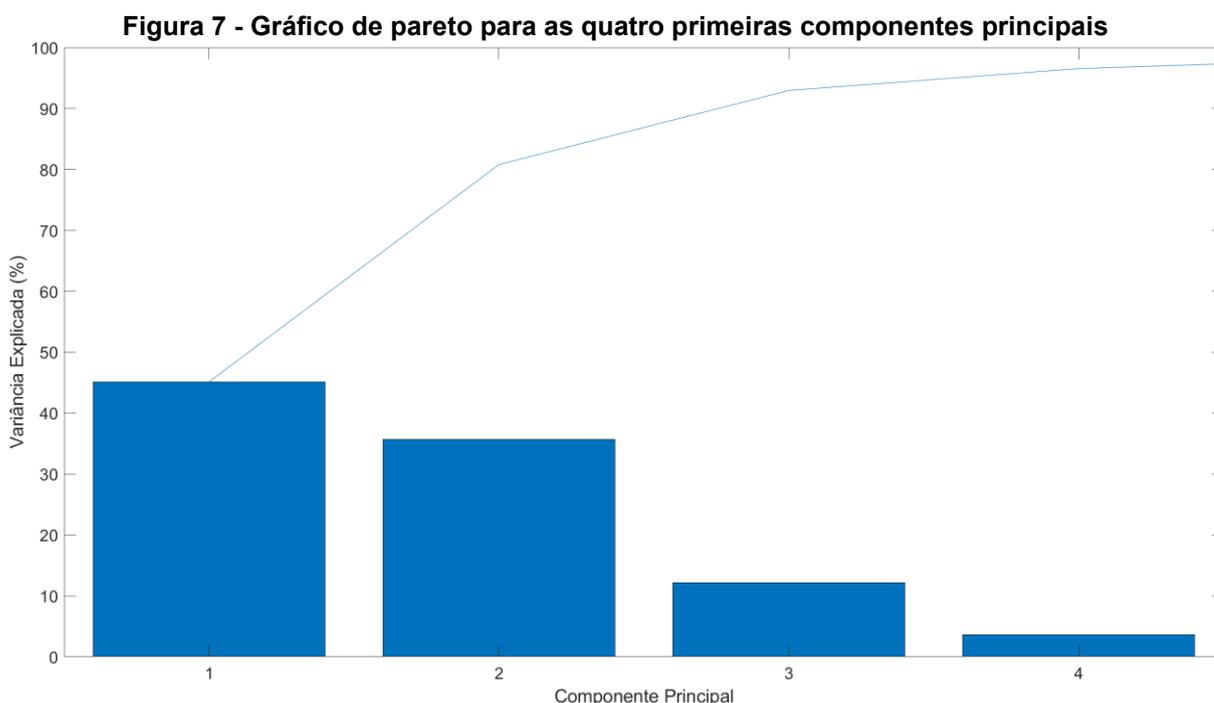
Fonte: Autoria própria (2020)

Foram identificados dez compostos voláteis nas amostras Externas e de Ortigueira, sendo a vanilina em menor percentual, com 0,244% e 0,199%, enquanto o de maior percentual foi o linalol com 21,124% e 13,236%, respectivamente. Os méis coletados em Ortigueira apresentaram maior percentual, com diferença significativa ao nível de 10%, de benzaldeído (10,437%) e linalol (21,124%), quando comparado aos externos, com 6,412% e 13,235%, respectivamente. Já as amostras externas apresentaram maior percentual dos óxidos de cis e trans-linalol, com 19,1935% e 6,210% quando comparados aos de Ortigueira, com 13,160% e 3,987% respectivamente.

O somatório da área relativa dos 10 padrões variou entre 28,90% e 87,17%. Sendo o óxido de linalol (cis e trans) e linalol os compostos de maior área relativa. Foi observada correlação relevante ($r = 0,91$) apenas entre os isômeros do óxido de linalol. A ANOVA identificou diferenças significativas entre as amostras de Ortigueira (O) e outras regiões/cidades (E) para os compostos benzaldeído ($p = 0,08$, O = 10,44%, E = 6,41%), óxido de cis-linalol ($p = 0,05$, O = 13,16%, E = 19,19%), óxido de trans-linalol ($p = 0,08$, O = 3,995, E = 6,21%) e linalol ($p = 0,01$, O = 21,12%, E = 13,24%).

Entre os compostos estudados o linalol é um potencial marcador (IG) das amostras de Ortigueira devido ao p-valor estar abaixo de 5% do nível de significância, entretanto além do linalol, o óxido de linalol e benzaldeído são os mais indicados para serem caracterizados como potenciais marcadores em relação a quantidade relativa de voláteis.

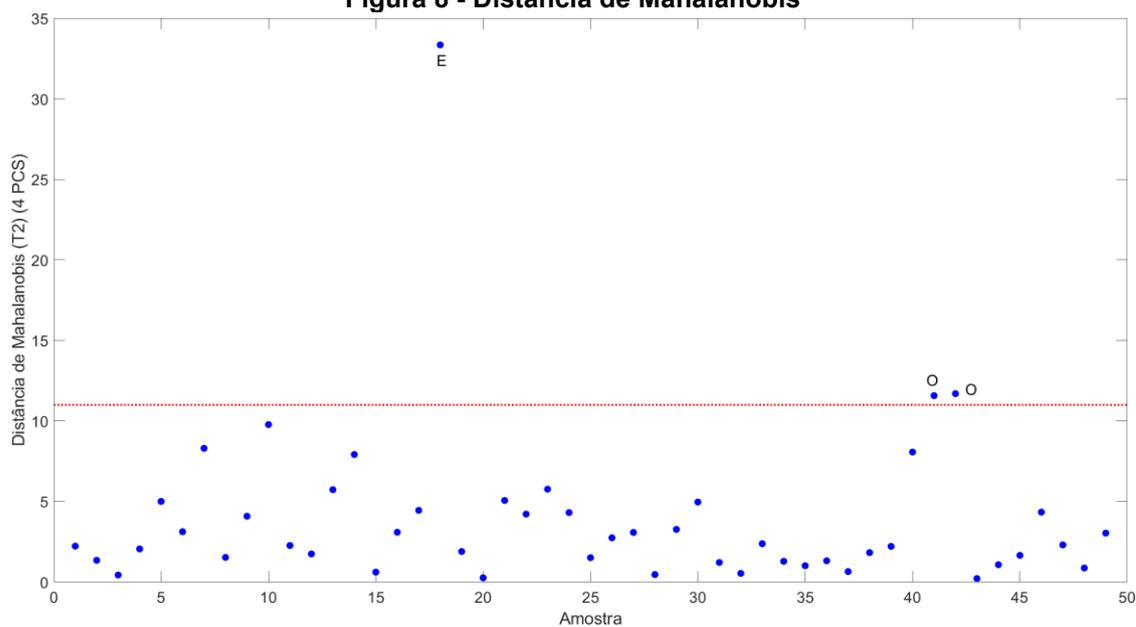
Para a PCA foram necessárias 4 PCs para uma variância acumulada de 96,55% conforme representado no gráfico de pareto da Figura 7. As PCs apresentaram, respectivamente, 45,12%, 35,67%, 12,18% e 3,58% de variância.



Fonte: Autoria própria (2020).

A Figura 8 apresenta a distância de Mahalanobis considerando-se as quatro primeiras PCs. É possível identificar apenas três amostras que diferiram do comportamento médio de todas as amostras analisadas, duas provenientes de Ortigueira e uma externa (EXT3), mais precisamente a EXT3-BR, proveniente de Mafra-SC. Porém, a grande maioria se enquadra dentro do comportamento médio com base nos 10 compostos estudados.

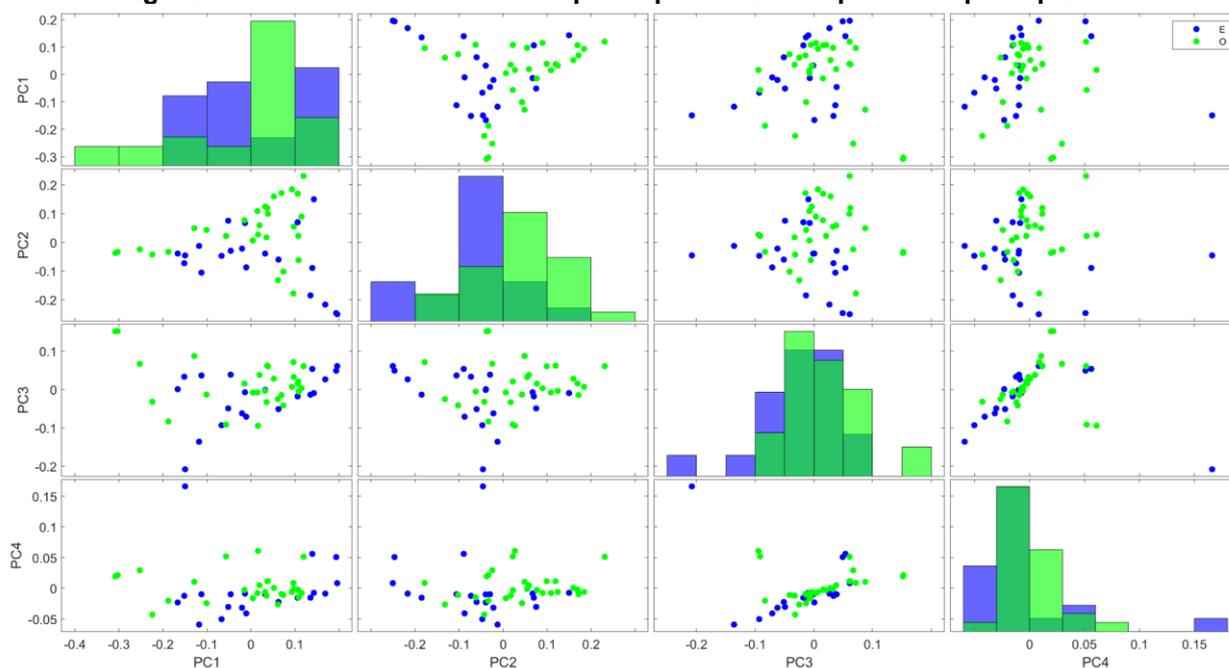
Figura 8 - Distância de Mahalanobis



Fonte: Autoria própria (2020)

Na Figura 9 estão representados os gráficos bidimensionais de escore das combinações das quatro primeiras componentes principais. Na diagonal estão os histogramas que representam a distribuição dos valores de escore para a classe Ortigueira (O) e externa (E).

Figura 9 - Gráficos de escores das quatro primeiras componentes principais



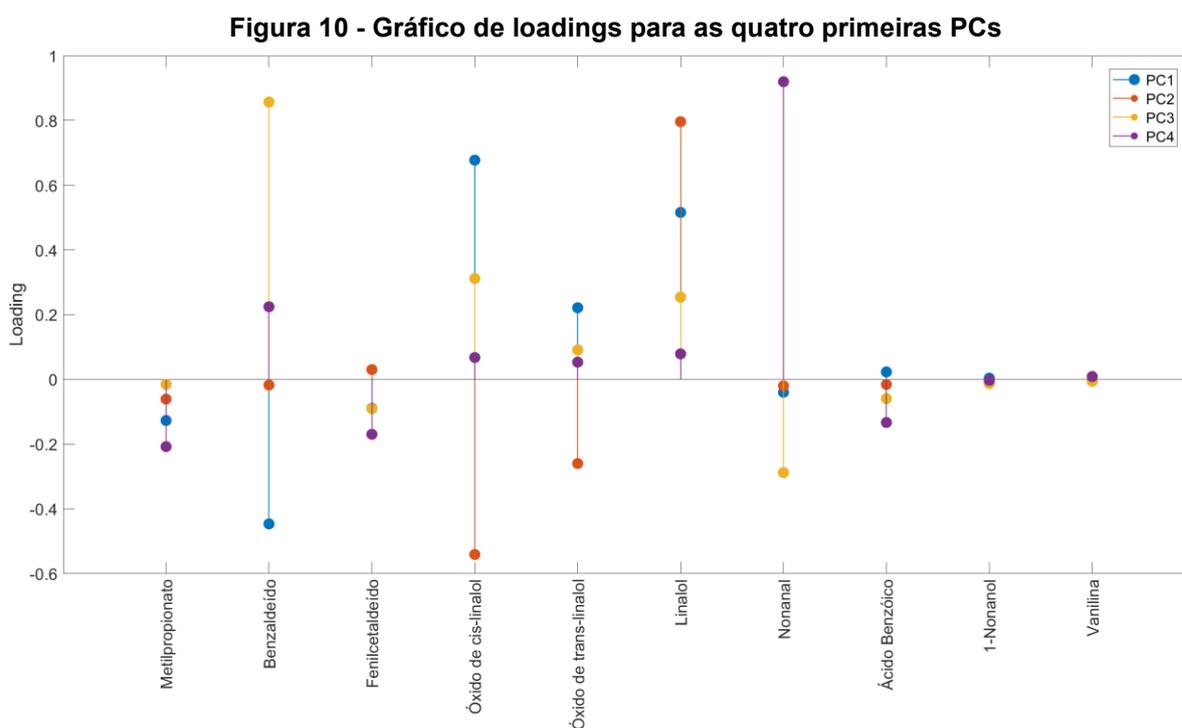
Fonte: Autoria própria (2020)

A PC1 apresenta a maioria das amostras provenientes da região de Ortigueira no quadrante positivo, como pode ser observado no histograma da PC1. Já na PC2, a maior parte

das amostras de Ortigueira está no quadrante positivo e as amostras externas, em sua maioria, estão no quadrante negativo. Ou seja, a PC2 apresentou uma maior capacidade de discriminação das amostras. No diagrama de dispersão que combina a PC1 e PC2 é possível observar uma separação das amostras com exceção para quatro amostras de Ortigueira e quatro amostras externas que acabaram se afastando de suas respectivas classes.

Já a PC3 e PC4 não apresentaram uma separação relevante das amostras, isso é explicado pelo percentual de variância nestas componentes principais. Entretanto, a PC4 apresenta a separação da amostra EXT3-BR das demais que apresentaram um comportamento médio.

Na Figura 10 estão apresentados os valores de *loadings* para as áreas relativas de cada composto identificado nas quatro primeiras componentes comuns.



Fonte: Autoria própria (2020)

A partir do gráfico de *loadings* nota-se os compostos que mais impactaram em cada PC. Na PC1 os compostos que mais influenciaram a separação das amostras foram o benzaldeído (-0,45), óxido de cis-linalol (+0,68) e linalol (+0,52). Já na PC2, óxido de trans-linalol (-0,26), óxido de cis-linalol (-0,54) e linalol (+0,80). A PC3 não apresentou separação relevante quanto aos compostos. E na PC4 o nonanal (0,92) que é o responsável pela diferença da amostra EXT3-BR das demais, a Tabela 6 confirma que o mesmo possui 23,535% em sua composição relativa de voláteis identificados.

Como já comentado, a PC2 apresentou uma maior discriminação das amostras e de acordo com os *loadings* da PC2 os compostos óxido de trans-linalol e óxido de cis-linalol estão mais presentes em maior quantidade nas amostras externas enquanto que o linalol destaca-se nas amostras de Ortigueira. Esse resultado é confirmado pelo teste comparação de média apresentado na Tabela 7. Os resultados indicam que as amostras se diferenciam e que provavelmente isso deve-se a diversidade de flores que utilizadas pelas abelhas para a produção do mel.

Sendo assim, a análise dos COVs mostra-se como uma ferramenta promissora para identificação geográfica. Foi identificado linalol como potencial COV para diferenciar as amostras de Ortigueira das demais.

5 CONCLUSÃO

A metodologia de extração por HS-SPME para voláteis de mel mostrou-se eficaz e em conjunto com a GC-FID. As análises univariadas e multivariadas empregadas apresentaram resultados similares indicando o linalol como potencial marcador floral e identificador geográfico de méis provenientes da origem de Ortigueira-PR.

Os resultados de classificação das amostras ainda não foram conclusivos porque foram avaliadas poucas amostras de mel com uma grande diversificação do tipo de floral. Entretanto, a combinação da HS-SPME com a cromatografia aliado aos recursos de identificação por quimiometria demonstrou ser capaz de fornecer informações químicas valiosas na classificação destas amostras.

Recomenda-se como etapa posterior a utilização da SMPE combinada com a cromatografia a gás acoplada com espectrometria de massas (GC-MS) para a identificação dos demais picos relevantes dos COVs nos cromatogramas das amostras analisadas.

REFERÊNCIAS

- ALIFERIS, K. A.; TARANTILIS, P. A.; HARIZANIS, P. C.; ALISSANDRAKIS, E. Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprint of headspace volatile compounds. **Food Chemistry**, v. 121, p. 856–862, 2010.
- ALISSANDRAKIS, E., TARANTILIS, P. A., HARIZANIS, P. C., & POLISSIOU, M. Evaluation of four isolation techniques for honey aroma compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 91–97, 2005.
- BARONI, M.V.; NORES, M.L.; DÍAZ, M.D.P.; CHIABRANDO, G.A.; FASSANO, J.P.; COSTA, C.; WUNDERLIN, D.A. Determination of volatile organic compound patterns characteristics of five unifloral honeys by solid- phase microextraction—Gas chromatography-mass spectrometry coupled to chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 7235–7241, 2006.
- BARRA, M. P. G., PONCE-DÍAZ, M. C., VENEGAS-GALLEGOS, C. Volatile compounds in honey produced in the Central Valley of Ñuble Province, Chile. **Journal of Agricultural Research**, v. 70, p. 75-84, 2010.
- BERTELLI, D.; PAPOTTI, G.; LOLLI, M.; SABATINI, A.G.; PLESSI, M. Development of an HS-SPME-GC method to determine the methyl anthranilate in Citrus honeys. **Food Chemistry**, v. 108, p. 297-303, 2008.
- BIAJOLI, A.F.P. **Fibras para SPME (microextração em fase sólida) recobertas com novos ormosil SOL -GEL**. 2008, 79f. Dissertação (mestrado de Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- 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 Chemistry**, v. 89, p. 527-532, 2005.
- BIANCHI, F.; MANGIA, A.; MATTAROZZI, M.; MUSCI, M. Characterization of the volatile profile of thistle honey using headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1030-1036, 2011.
- BILUCA, F. C.; BETTA, F. D.; OLIVEIRA, G. P.; PEREIRA, L. M.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. **Food Chemistry**, v. 159, p. 244-249, 2014.
- BONA, E. **GAMMA – Ferramentas de Análise Multivariada para Alimentos**. 2019.
- BRASIL (2000). **Instrução normativa N° 11, de 20 de outubro de 2000**. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento aprova o Regulamento técnico de identidade e qualidade

do mel. Diário oficial da união, p. 23, 2000.

BRERETON, R. G. **CHEMOMETRICS Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**, John Wiley & Sons, Inc., Chichester: Wiley, p. 489, 2003.

BRITO, G. **Tipificação de Méis do Estado de Sergipe através do Perfil Químico dos Compostos Voláteis obtidos por Headspace Dinâmico seguido por Cromatografia em fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG/EM)**. 2012, 72f. Dissertação (Mestrado de Química) Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2012.

CAJKA, T.; HAJŠLOVA, J.; PUDIL, F.; RIDDELLOVA, K. Traceability of honey origin based on volatiles pattern processing by artificial neural networks. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1458-1462, 2009.

CAMARGO, R.C.R; PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R. **Produção de mel**. Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, p.138, 2002.

CASTRO-VÁZQUEZ, L.; LEON-RUIZ, V.; ALAÑÓN, M. E.; PÉREZ-COELLO, M. S.; GONZÁLEZ-PORTO, A. V. Floral origin markers for authenticating Lavandin honey (*Lavandula angustifolia* x *latifolia*). Discrimination from Lavender honey (*Lavandula latifolia*). **Food Control**, v. 37, p. 362-370, 2014.

CASTRO-VÁZQUEZ, L.M.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; GUCHU, E.; PÉREZ-COELLO, M.S. Analysis of volatile compounds of eucalypt honey by solid phase extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 224, p. 27–31, 2006.

CHAU, F-T. ; LIANG, Y-Z. ; GAO, J. ; SHAO, X-G. **Chemometrics From Basics to Wavelet Transform**, John Wiley & Sons, Inc., v. 1075, New Jersey, p. 316, 2004.

COLLINS, C. H.; BRAGAS, G. L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. São Paulo: Ed. Unicamp, p. 456, 2006.

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

DA SILVA, G, C.; DA SILVA, A. A. S.; SILVA, L. S. N.; GODOY, R. L. O.; NOGUEIRA, L. C.; QUITÉRIO, S. L.; RAICES, S. L. Method development by GC-ECD and HS-SPME-GC-MS for beer volatile analysis. **Food Chemistry**, v. 167, p. 71-77, 2015.

DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. Volatile compounds in floral honeys. **Química Nova**, v. 26, p. 90-96, 2003.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas: Editora da Unicamp, p. 493, 2015.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, p. 724-731, 1999.

GARRUTI, D. S. **Composição de Voláteis e Qualidade de Aroma do Vinho de Caju**. 218 p. Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2001.

GRANATO, D.; KARNOPP, A. R.; VAN, S. M. R. Characterization and comparison of phenolic composition, antioxidant capacity and instrumental taste profile of juices from different botanical origins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 10, p. 1997-2006, 2015.

HERRERO, M.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A.; BERNAL, J. Multidimensional chromatography in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p. 7110-7129, 2009.

HOLLER, F.J.; SKOOG, D.A.; CROUCH, S.R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6^a ed. Porto Alegre: Bookman, sec. v, p.1056, 2009.

INDELICATO, S.; BONGIORNO, D.; INDELICATO, S.; CERAULO, L.; TRANCHINA, E.; AVELLONE, G.; ARCADIPANE, C.; GIAMBARTINO, F.; Halogenated anesthetics determination in urine by SPME/GC/MS and urine levels relationship evaluation with surgical theatres contamination. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2014, p.1-8, 2014.

JANDRIĆ, Z.; HAUGHEY, S. A.; FREW, R. D.; MCCOMB, K.; GALVIN-KING, P.; ELLIOTT, C. T.; CANNAVAN, A. Discrimination of honey of different floral origins by a combination of various chemical parameters. **Food Chemistry**, v. 15, p. 52–59, 2015.

KARABAGIAS, I. K.; BADEKA, A.; KONTAKOS, S.; KARABOURNIOTI, S.; KONTOMINAS, M. G. Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 146, p. 548–557, 2014.

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

MANYI-LOH, C. E.; NDIP, R. N.; CLARKE, A. M. Volatile compounds in honey: A review on their involvement in aroma, botanical origin determination and potential biomedical activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 9514–9532, 2011.

MANZANARES, A.B.; GARCÍA, Z.H.B.; GALDÓN, R.; RODRÍGUEZ, E.R.; ROMERO, D.; Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain. **LWT Food Science and Technology**, v. 55, p. 572-578, 2014.

MARQUES, S.R.R. **Microextração em fase sólida e cromatografia gasosa convencional e bidimensional para classificação de méis**. 2011, 148f. Tese (Doutorado de Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

MEL - O LADO DOCE DE SER ORGÂNICO. **Revista Rural**, out 2008, Disponível em: https://www.revistarural.com.br/Edicoes/2008/Artigos/rev128_mel.htm. Acesso em: 31 de out de 2019.

MELO, Z. F. N.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C. Estudo das alterações do hidroximetilfurfural e da atividade diastásica em méis de abelha em diferentes condições de armazenamento. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 5, n.1, p. 89-99, 2003.

NETO, F.R.A.; NUNES, D.S.S. **Cromatografia: Princípios Básicos e Técnicas Afins**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, p. 190, 2003.

PAWLISZYN, J. Theory of Solid-Phase Microextraction. **Journal of Chromatography A**, v.38, p. 270-278, 2000.

PENTEADO, J. C. P.; MAGALHAES, D.; MASINI, J. C. Experimento didático sobre cromatografia gasosa: uma abordagem analítica e ambiental. **Química Nova**, vol. 31, n. 8, p. 2190-2193, 2008.

PIASENZOTTO, L.; GRACCO, L.; CONTE, L. Solid phase micro extraction (SPME) applied to honey quality control. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 1037–1044, 2003.

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

POOLE, C.F.; LENCA, N. Gas chromatography on wall-coated open-tubular columns with ionic liquid stationary phases. **Journal of Chromatography A**. v. 1357, p.87-109, 2014.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n.1, 2001.

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

SANT'ANA L.D.; SOUSA, J.P.L.M.; SALGUEIRO, F.B.; LORENZON, M.C.A.; CASTRO, R.M. Characterization of monofloral honeys with multivariate analysis of their chemical profile and antioxidant activity. **Journal of Food Science**, v. 77, p. 135-140, 2012.

SAVORANI, F.; TOMASI, G.; ENGELSEN, S. B. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 202, n. 2, p. 190-202, 2010.

SCHOLZ, M.B.D.S.; QUINHONE JÚNIOR, A.; DELAMUTA, B.H.; NAKAMURA, J.M.; BAUDRAZ, M.C.; REIS, M.O.; KATO, T.; PEDRÃO, M.R.; DIAS, L.F.; DOS SANTOS, D.T.R.; KITZBERGER, C.S.G.; BIANCHINI, F.P.; Indication of geographical origin of honey using its physicochemical characteristics and multivariate analysis. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, p. 1896-1903, 2020.

SILVA, A.C.L. da **Tipificação de méis brasileiros por micro-extração em fase sólida combinada com cromatografia gasosa (SPME-CG)**. 2006, 131f. Tese (Doutorado de Química) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

SILVA, T. M. G., SILVA, P. R., CAMARA, C. A., SILVA, G. S., SANTOS, F. A. R.; SILVA, T. M. S. Chemical analysis and antioxidant potential of angico honey collected by stingless bee Jandaíra. **Journal of Chemistry**, v. 5, p. 1370-1379, 2014.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.; GRASSI, M. T. **Fundamentos de química analítica**. 8ª Ed. Thomson, São Paulo, p. 999, 2012.

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

SUPELCO. **Supelco Ionic Liquid GC Columns – Introduction to the Technology**. Versão de out. 2019. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/gas-chromatography/columns/ionic-liquid-literature.html>>. Acesso em: setembro de 2019.

TAN, S.-T.; HOLLAND P.T.; WILKINS, A. L.; MOLAN, P. C. Extractives from New Zealand honeys. 1. White clover, manuka and kanuka unifloral honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 36, p. 453-460, 1988.

TOSI, E.; CHIAPPINI, M. R. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. **Food Chemistry**, v.77, p. 71-74, 2002.

VERZERA A., CAMPISI S., ZAPPALA M., BONNACCORSI I. SPME-GC-MS analysis of honey volatile components for the characterization of different floral origin. **American Laboratory**. v. 7, p. 18 – 21, 2001.

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

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

ZELLNER, B.A.; BICCHI, C.; DUGO, P.; RUBIOLO, P. DUGO, G.; MONDELLO, L. Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 23, p. 297-314, 2008.