



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ANA CAROLINY VIEIRA DA COSTA

COMPOSTOS VOLÁTEIS E PERFIL SENSORIAL DE MÉIS MONOFLORAIS
PRODUZIDOS POR ABELHAS SEM FERRÃO (*Melipona* spp.) DO SEMIÁRIDO
BRASILEIRO

JOÃO PESSOA – PB

2016



ANA CAROLINY VIEIRA DA COSTA

COMPOSTOS VOLÁTEIS E PERFIL SENSORIAL DE MÉIS MONOFLORAIS
PRODUZIDOS POR ABELHAS SEM FERRÃO (*Melipona* spp.) DO SEMIÁRIDO
BRASILEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências e Tecnologia de Alimento do Centro de
Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba como
requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência
e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^o. Dra. Marta Suely Madruga

JOÃO PESSOA – PB

2016

PC837c Costa, Ana Caroliny Vieira da.
Compostos voláteis e perfil sensorial de méis monoflorais produzidos por abelhas sem ferrão (*Melipona* spp.) do semiárido brasileiro.- João Pessoa, 2016.
142f. : il.
Orientadora: Marta Suely Madruga
Tese (Doutorado) - UFPB/CT
1. Tecnologia de alimentos. 2. Méis monoflorais.
3. CG-EM. 4. GG-olfatometria. 5. Jandaira. 6. Uruçu.

UFPB/BC

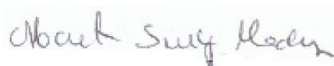
CDU: 664(043)

ANA CAROLINY VIEIRA DA COSTA

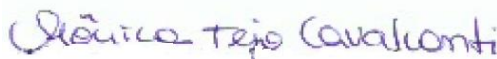
COMPOSTOS VOLÁTEIS E PERFIL SENSORIAL DE MÉIS MONOFLORAIS
PRODUZIDOS POR ABELHAS SEM FERRÃO (*Melipona* spp.) DO SEMIÁRIDO
BRASILEIRO

Tese aprovada em 25 / 08 / 2016

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a Dra. Marta Suely Madruga – PPGCTA/ UFPB
Coordenador da Banca Examinadora

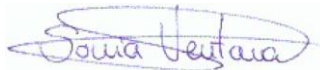


Prof.^a Dra. Monica Tejo Cavalcanti - PPGCTA/UFPB
Examinador Externo



Prof.^a Dra. Maria Manuela E. Pintado – ESB/UCP
Examinador Externo

Prof.^a Dr. Mario Estevez Garcia - DAPFS/UE
Examinador Externo



Prof.^a Dr. Sonia Ventanas - DAPFS/UE
Examinador Externo

À minha família por todo apoio e incentivo,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, por ter sempre me agraciado e acompanhado em todos os momentos;

Aos meus pais, Maria Suely Vieira Sá da Costa e Aluisio Belo da Costa Filho, irmãos Aluisio Neto e Patrícia Vieira e sobrinho João Miguel da Costa Alberto, cada um do seu modo e com a sua forma de expressão de amor. Obrigada pelas lições de vida, dedicação e por toda minha formação dada ao longo desses anos;

A minha orientadora Prof^a Dra. Marta Suely Madruga, pela dedicada e eficiente orientação, incentivo, confiança, exemplo de profissionalismo e conhecimentos transmitidos ao longo desses anos;

A Universidade Federal da Paraíba e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade e incentivo à pesquisa;

A Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), por todo o incentivo financeiro, por todo apoio a educação e ao desenvolvimento da ciência e tecnologia;

A Embrapa Agroindústria Tropical, na pessoa da Prof^a Deborah Garruti, pelas preciosas contribuições, atenção e disponibilização das instalações laboratoriais, proporcionando as condições necessárias à execução dos experimentos;

A Faculdade de Engenharia de Alimentos FEA/UNICAMP-Campinas-SP, na pessoa da Prof^a Gláucia Pastore, pela oportunidade de realizar parte desta pesquisa em suas instalações e pelo suporte oferecido na realização dos experimentos;

Ao Coordenador de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da UFPB, Prof^o. Flávio Honorato Silva, pelas valiosas contribuições ao trabalho, apoio e assistência constante durante o curso; e a secretária do PPGCTA, Lindalva, por toda sua competência, gentileza e auxílios prestados no decorrer do curso;

À Prof^a. Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva pela atenção, disponibilidade e engajamento na execução e análise de dados deste trabalho;

Aos professores, técnicos e funcionários do Programa de Pós-Graduação de Ciências e Tecnologia de Alimentos da UFPB, minha gratidão pelo pelas grandiosas informações e experiências adquiridas no decorrer do curso;

À Janaína Batista Sousa pela identificação e conceção das amostras de méis;

Aos meus provadores da Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) e da análise CG-olfatométrie pela disponibilidade e valiosíssima colaboração para a realização deste trabalho;

Aos companheiros de laboratório Taliana, Narciza, Angela, Íris, Ana Rita, Leila, Junne, Mércia, Darline e Sergio pela agradável convivência, espírito cooperativo, momentos de descontração, conversas e risadas mesmo durante os dias de trabalho intermináveis;

Aos colegas de turma do doutorado, pela amizade, incentivo, agradável convívio e troca de experiências;

A todos os meus amigos, muito obrigada pela amizade, incentivo, ajudas, atenção, preocupação, carinho, momentos de alegria e por estarem sempre ao meu lado;

E a todos que de alguma forma colaboraram para a realização desta tese e que não foram aqui explicitamente citados, mas a quem expresseo o meu mais profundo agradecimento.

RESUMO

As abelhas sem ferrão são produtoras de méis com características únicas e elevado valor comercial; no entanto, informações acerca do perfil volátil e sensorial dos méis produzidos por *Melipona* spp. são escassas. O presente estudo teve como objetivo caracterizar méis monoflorais produzidos a partir da flora/fauna da região semiárida nordestina, a fim de determinar potenciais marcadores químicos (compostos voláteis) e sensoriais que auxiliem na comprovação da autenticidade destes méis, o que consequentemente contribuirá para a valorização da atividade melicultora. As amostras, em um total de doze méis, foram produzidas pelas espécies jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) e uruçú (*Melipona scutellaris* Latrelle), tendo sido coletadas em quatro meliponários distintos, situados na região do Seridó do Estado do Rio Grande do Norte, e na região do Agreste do Estado da Paraíba. Através da análise melissopalínológica, as amostras coletadas foram classificadas como méis monoflorais de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.), velame branco (*Croton heliotropiifolius* Kunth), jurema branca (*Mimosa arenosa* Willd. Poir), chanana (*Turnera subulata* L.), malícia (*Mimosa quadrivalvis* L.), angico (*Anadenanthera colubrina*) e algaroba (*Prosopis juliflora* Sw). A pesquisa inicialmente envolveu o estudo das condições ótimas da técnica de Micro Extração em Fase Sólida (MEFS) para extração de compostos voláteis dos méis monoflorais. Posteriormente, os méis foram avaliados aplicando-se três técnicas analíticas: MEFS aplicada à análise de voláteis por CG-EM (HS-MEFS-CG-EM), Análise Quantitativa Descritiva (ADQ) e Cromatografia Gasosa Olfatometria (CG-O). Os estudos de otimização da técnica de MEFS/CG/EM indicaram as seguintes condições otimizadas: tempo de equilíbrio de 15 minutos, tempo de extração de 45 minutos e temperatura de extração de 45 °C. Um total de 161 compostos voláteis, pertencentes a 13 classes químicas, foi identificado nos doze méis avaliados. O perfil de compostos voláteis desempenhou um papel importante na determinação da origem floral do mel, uma vez que os resultados encontrados sugerem a existência de compostos diferenciadores e potenciais marcadores referentes às fontes botânicas avaliadas. Como exemplo, citam-se o linalol para méis de malícia, o D-silvestreno para méis de chanana, rose-óxido para mel de algaroba e o benzenoetanol para o mel de angico. Os méis elaborados a partir das floradas de juazeiro foram sensorialmente mais doces, apresentando aroma e sabor de caramelo mais intenso. Esses méis também apresentaram um aroma mais característico de mel, que pode estar associado aos compostos benzaldeído e benzenoacetaldéido. Os méis elaborados a partir das floradas de velame branco foram mais ácidos e menos doces, sendo os únicos que apresentaram em sua composição o volátil metil eugenol, considerado um *character impact compound*. Os méis de jurema branca apresentaram maior aroma de cera de abelha; além disso, os compostos hexanol, limoneno, α -farneseno e δ -cardineno podem ter contribuído para gerar os aromas herbáceos percebidos com maior intensidade nos méis produzidos nessa florada. Através da técnica olfatométrica, detectou-se que os compostos químicos - pentanoato de etila, metil eugenol, safranal e β -damascenona - foram os voláteis que tiveram maior impacto odorífero no mel de velame branco elaborado pela abelha uruçú. Enfatiza-se que, em relação ao perfil sensorial e ao de voláteis, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$) entre os méis produzidos por abelhas diferentes a partir da mesma origem botânica. Neste contexto, os resultados evidenciam a forte influência da florada no perfil volátil e sensorial dos méis monoflorais analisados, representando uma contribuição importante para o conhecimento relacionado à química de aroma e sabor desse tipo de mel. Ademais, estes são resultados inéditos, que poderão ser utilizados na avaliação da conformidade do mel, agregando valor ao produto e à região, além

de contribuir para definir estratégias de comercialização e preservação da cultura e da identidade locais.

Palavras-chave: aroma, CG-EM, CG-olfatometria, jandaíra, sensorial, urucu.

ABSTRACT

Stingless bees are producing honey with unique and high-value features; nonetheless, information about the volatile and sensorial profile of honeys produced by *Melipona* spp. are scarce. This study aimed to characterize Monofloral honeys produced from flora / fauna of the northeastern semiarid region in order to determine potential chemical and sensorial markers (volatile compounds) to assist in attesting the authenticity of these honeys, which consequently contribute to the enhancement of meliponiculture activity. The samples, a total of twelve honeys, were produced by Jandaíra species (*Melipona subnitida* Ducke) and urucu (*M. scutellaris* Latrelle) and were collected in four different meliponaries, located in the region of Seridó, state of Rio Grande do Norte, and in the Agreste region, in the state of Paraíba. Through melissopalinalogical analysis, the samples were classified as Monofloral honeys of Juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.), velame branco (*Croton heliotropiifolius* Kunth), jurema branca (*Mimosa arenosa* Willd. Poir), chanana (*Turnera subulata* L.), malícia (*Mimosa quadrivalvis* L.), angico (*Anadenanthera colubrina*) and algaroba (*Prosopis juliflora* Sw). The research initially involved the study of optimal conditions of Solid Phase Microextraction (SPME) technique for the extraction of volatile compounds of Monofloral honeys. Subsequently, honeys were evaluated by applying three analytical techniques: SPME applied to volatile analysis by GC-MS (HS-SPME-GC-MS), Quantitative Descriptive Analysis (QDA) and Gas Chromatography Olfactometry (GC-O). The optimization studies of SPME technique / GC / MS indicated the following optimized conditions: 15 minute equilibration time, 45 minutes extraction time and 45 ° C extraction temperature. A total of 161 volatile compounds, 13 belonging to chemical classes were identified in 12 samples evaluated. The profile of volatile compounds played an important role in determining floral source of honey, since the results suggest the existence of differentiators compounds and potential markers related to evaluated botanical sources. As an example, linalool to honeys from malícia, D-sylvestrene for honeys from chanana, rose-oxide for mesquite honey and benzeneethanol for angico honey. Honeys made from the blossoms from Juazeiro were sensorially sweeter, with aroma and flavor of more intense caramel. These honeys also showed a more characteristic flavor of honey, which can be associated with benzaldehyde compounds and benzene acetaldehyde. Honeys made from the velame branco flowerings were more acidic and less sweet, and were the only ones who showed volatile methyl eugenol in its composition, considered a character impact compound. Honeys from jurema branca showed higher aroma of beeswax; furthermore, compounds hexanol, limonene, α -farnesene and δ -cardinene may have contributed to generate the herbaceous aromas perceived with higher intensity in honeys produced in this bloom. Through olfactometry technique, it was found that chemical compounds pentanoate acetate, methyl eugenol, safranal and β -damascenone volatiles had a greater odor impact in white velame honey prepared by urucu bee. It is emphasized that, in relation to the sensorial profile and volatile profile, statistically significant differences were observed ($p \leq 0.05$) among honeys produced by different bees from the same botanical origin. In this context, the results show the strong influence of flowering in the volatile and sensory profile of monofloral honeys analyzed, representing an important contribution to knowledge related to aroma and flavor chemistry of this type of honey. Moreover, these are new results, which may be used in screening and evaluation of honey conformity, adding value to the product and the region, as well as help define marketing strategies and preservation of local culture and identity.

Keywords: aroma, sensory, GC-MS, GC-olfactometry, jandaíra, urucu.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição palinológica dos méis produzidos por abelhas sem ferrão em diferentes regiões do Semiárido	39
Tabela 2	Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental.....	45
Tabela 3	Matriz padrão para os experimentos conduzidos no planejamento fatorial completo 2 ⁴	45
 ARTIGO 1		
Table 1	Standard Matrix for experiments conducted in the 2 ⁴ full factorial design.....	79
Table 2	Models proposed and R ² of the final reduced models.....	80
Table 3	Predicted and experimental results obtained in optimum process conditions and with the addition of different NaCl concentrations...	81
Table 4	Volatiles of monofloral honeys produced by diferente stingless bees (jandaíra and urucu) in the semiarid region of northeastern brazil from diferente floral sources	82
 ARTIGO 2		
Table 1	F and pF ANOVA values of the sources of variation in the “blossom”, “bee species” and “blossom*bee” interaction for each descriptor of “Melipona” honey from the Brazilian semiarid region.....	108
Table 2	Blossom effects on the mean intensity ^{1,2} of the aroma, flavor and taste scores of “Melipona” honey from the Brazilian semiarid region.....	109
Table 3	Mean intensity of the aroma and flavor/taste descriptors of honeys produced by two “Melipona” species from three blossoms of the Brazilian semiarid region.....	110
Table 4	Volatile compositions of the velame, elegant mimosa and jua blossom honeys produced by the true urucu and jandaira species.....	111

Table 5	F and pF ANOVA values of the sources of variation for the “blossom”, “bee” and “blossom*bee” interaction.....	114
----------------	---	-----

ARTIGO 3

Table 1	Volatile composition of ‘velame branco’ with its respective LRIs and percentages of area, as well as the odour quality described by the sensory team for the volatile odoriferous components present in the honey headspace, odour intensity, area and percentage of peak area relative to the total area of the aromagram.....	126
----------------	---	-----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Abelha jandaíra (<i>Melipona subnitida</i> Duke)	20
Figura 2	Abelha urucu (<i>Melipona scutellaris</i> Latrelle)	21
Figura 3	(A) Angico, (B) Juazeiro, Malícia (C), Jurema branca (D), Algaroba (E), Velame branco (F), Chanana (G).....	26
Figura 4	Extração no modo direto e dessorção por MEFS. (1) perfuração do septo com a agulha; (2) exposição da fibra de MESF diretamente na amostra líquida; (3) após um determinado tempo de extração; (4) recolhe-se a fibra e remove-se do frasco de amostra; (5) agulha introduzida no injetor aquecido do GC; (6) fibra exposta ao injetor (analitos dessorvidos termicamente) e (7) fibra recolhida e agulha retirada do injetor (analitos arrastados para a coluna)	30
Figura 5	Regiões onde estão localizados os meliponários, abelhas sem ferrão produtoras e floradas predominantes das dozes amostras de méis utilizadas na pesquisa.....	
Figura 6	Ilustração do sistema de Olfatometria	47
Figura 7	Análise olfatométrica através da técnica de Osme	47
 ARTIGO 1		
Figure 1	Response surface obtained by optimizing variables extraction time and temperature through CCRD for responses.....	86
Figure 2	Profiles of desirability and predicted values for variables: Equilibrium time (X1), extraction time (X2) and extraction temperature (X3).	87
Figure 3	Distribution of chemical classes of volatiles of monofloral honeys produced by different stingless bees (jandaíra and urucu) in the semiarid region of Northeastern Brazil from different floral sources.....	88
Figure 4	Principal Component Analysis (PCA) of the chemical classes of volatiles and potential markers for the botanical of monofloral honeys produced by different stingless bees (jandaíra and urucu) in the semiarid region of Northeastern Brazil from different floral source.....	89

ARTIGO 2

Figure 1	Effects of bee and blossom species on descriptors with significant blossom*bee interactions.....	115
Figure 2	Principal component analysis of the aroma, flavor and taste descriptors of the elegant mimosa, jua and velame blossom honeys produced by the jandaira and true urucu stingless bees.....	116
Figure 3	Principal component analysis of the chemical classes of the aroma components of the elegant mimosa, jua and velame blossom honeys produced by the jandaira and true urucu stingless bees. (A) Sample variation regarding principal components I and II and (B) sample variation regarding principal components I and III.....	117

ARTIGO 3

Figure 1	(A) Chromatogram and (B) Aromagram.....	128
-----------------	---	-----

ABREVIACES

ADQ	Análise Descritiva Quantitativa
AEDA	Aroma Extract Dilution Analysis
ANOVA	Análise de Variância
APC	Análise de Componentes Principais
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CG-DIC	Cromatografia Gasosa – Detector de Ionizao em Chamas
CG-EM	Cromatografia Gasosa – Espectometria de Massas
CG-O	Cromatografia Gasosa – Olfatometria
CHARM	Combined Hedonic Response Measurement
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DVB/CAR/PDMS	Divinilbenzeno/Carboxen/Polidimetilsiloxano
ESALQ	Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
FD	Fator de Diluio
HS-MEFS	Headspace - Micro Extrao em Fase Slida
IRL	ndices de Reteno Linear
MEFS	Micro Extrao em Fase Slida
NIF/SNIF	Nasal Impact Frequency/Surface of Nasal Impact Frequency
OSME	Oregon State Method
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno
SAS	Statistical Analysis System
SCDTI	Sistema de Coleta de Dados Tempo-Intensidade
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC	Universidade Federal do Ceará
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS	
2.1 Objetivo geral	19
2.1 Objetivos específicos	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
3.1 Abelhas nativas sem ferrão	20
3.2 O mel dos meliponíneos	23
3.3 Compostos voláteis	27
3.4 Microextração em fase sólida	30
3.5 Análise sensorial em mel	33
3.6 Técnicas de CG-O.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	
4.1 Aquisição das amostras.....	37
4.2 Análise melissopalínológica	38
4.3 Análise sensorial	41
4.4 Análise de voláteis em méis de abelha nativas sem ferrão	43
4.4.1 Otimização da extração, separação e identificação de voláteis por HS-MEFS-CG-EM	43
4.5 CG-Olfatometria.....	47
4.6 Análises estatísticas	50
REFERÊNCIAS	48
5 RESULTADOS	
5.1 Artigo 1	60
5.2 Artigo 2	90
5.2 Artigo 3.....	118
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	131
ANEXO	132
APÊNDICES	134

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta destacável potencial apícola, devido à sua flora diversificada, ampla extensão territorial e variabilidade climática, que possibilitam a produção de mel durante todo o ano. Estes aspectos são um diferencial em relação aos demais países onde, normalmente, a produção de mel ocorre apenas em determinado período do ano. Neste cenário, o Semiárido nordestino se destaca por possuir condições ambientais que favorecem a atividade melicultora devido à existência de intensa floração natural. Nesse bioma ocorre uma vegetação característica da época chuvosa e outra da estiagem, que promovem um fluxo de néctar e pólen durante todo o ano, contribuindo para a manutenção das colônias de abelhas e para a diminuição da necessidade do uso de alimentação artificial (SANTOS, 2009; SILVA et al., 2014; SOUSA et al., 2016).

Quando se fala em abelhas produtoras de mel, a espécie mais conhecida é a *Apis mellifera*, no entanto, no Brasil existe uma fauna diversificada de abelhas sociais, conhecidas por abelhas nativas brasileiras, abelhas sem ferrão, abelhas indígenas, abelhas nativas, ou ainda, simplesmente por “meliponíneos” ou “meliponas”. Essas abelhas são produtoras de mel cujo relato de consumo data desde períodos pré-colombianos no continente americano, ao qual são atribuídas propriedades medicinais (BILUCA et al., 2014; CHUTTONG et al., 2016).

As abelhas nativas sem ferrão são habitantes dos trópicos, existindo no Brasil aproximadamente 192 espécies, algumas destas muito populares, cuja criação recebe destaque na região Nordeste. As espécies domesticadas são criadas em meliponários de forma empírica por pequenos produtores, oferecendo benefícios ecológicos que incluem a preservação da espécie e das plantas nativas pela polinização. Embora produzam mel em menor quantidade, as abelhas nativas sem ferrão fornecem um produto diferenciado do mel de *A. mellifera*, principalmente na doçura, sabor e aroma (CARVALHO, 2005; SILVA et al., 2014).

Apesar desta importância, apenas escassos estudos visando à caracterização do mel das abelhas nativas sem ferrão têm sido realizados com o objetivo de determinar sua “identidade”, definir parâmetros de qualidade e inibir a propagação de produtos falsificados no mercado, garantindo ao consumidor um produto de qualidade. Enfatiza-se que estes estudos além de agregarem valor ao produto, contribuiriam para definir estratégias de comercialização, com consequência direta sobre o manejo, desenvolvimento da criação e

valorização da região pela promoção e preservação da cultura e da identidade locais (VERZERA et al., 2014; SPÁNIK et al., 2014; KARABAGIAS et al., 2014).

Comumente, a determinação da origem botânica do mel é feita através de análises baseadas na identificação do pólen pelo exame microscópico (melissopalinologia). Estas análises são demoradas e requerem um analista experiente para interpretação dos dados e, em algumas situações, os resultados não permitem uma identificação confiável da origem botânica. Consequentemente, devido às dificuldades nas análises de pólen, a identificação de marcadores químicos específicos para determinar a origem botânica do mel tornou-se relevante para pesquisas relacionadas à este tipo de produto (BIANCHI, 2011; CASTRO-VAZQUEZ et al., 2014).

A composição da fração volátil dos méis está diretamente relacionada com sua origem floral, com os habitats de coleta e a fisiologia das abelhas, além do processamento pós-coleta e condições de armazenamento do produto. Assim, a análise da fração volátil do mel através da caracterização dos compostos voláteis é uma das alternativas para sua tipificação (caracterização da origem floral), os quais podem ser usados como marcadores químicos específicos, fornecendo uma origem botânica (CASTRO-VAZQUEZ et al., 2007; DE LA FUENTE et al., 2007; CASTRO-VAZQUEZ et al., 2009; GUYOT et al., 1999; JERKOVIC et al., 2009; CASTRO-VAZQUEZ et al., 2014; KARABAGIAS et al., 2014; VERZERA et al., 2014; SEISONE et al., 2015). Atualmente, mais de 600 compostos foram identificados e descritos como voláteis em méis de diferentes tipos florais. Contudo, um número cada vez maior de novos compostos voláteis surge em virtude de existirem muitos tipos de méis ainda não estudados (MANYI-LOH et al., 2011; SEISONEN et al., 2015).

A avaliação sensorial do mel é outra ferramenta existente que permite distinguir a origem botânica do mesmo, identificar e quantificar certos defeitos. Essa análise também desempenha um papel importante na definição das normas do produto e sobre denominações botânicas. Em particular, a avaliação sensorial é importante na verificação da conformidade dos méis monoflorais, uma vez que pode revelar a presença de componentes botânicos que não são detectados por outros métodos analíticos, mas que podem alterar as características sensoriais típicas, de tal forma que o mel não pode ser comercializado como monofloral (PIANA et al., 2004; CASTRO-VAZQUES et al., 2012; TAHIR et al., 2016).

O mel produzido por abelhas sem ferrão na região do Semiárido nordestino vem sendo pouco explorado cientificamente, apesar do potencial da flora apícola desta região, da valorização deste produto com fins alimentares/medicinais e da popularização das meliponas,

em especial as espécies jandaíra (*Melipona subnitida* Duke.) e uruçú (*M. scutellaris* L.). Neste contexto, a presente pesquisa, que constitui um dos primeiros estudos exploradores dos aspectos da qualidade aromática (perfil de voláteis e perfil sensorial) de méis monoflorais de juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Mart.), velame branco (*Croton heliotropiifolius* Kunth), jurema branca (*Mimosa arenosa* Willd Poir), chanana (*Turnera ulmifolia* L.), malícia (*Mimosa quadrivalvis* L.), angico (*Anadenanthera colubrina*) e algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC) produzidos por abelhas sem ferrão, teve como finalidade a utilização destes instrumentos analíticos para a autenticação, discriminação e valorização de méis produzidos a partir da flora/fauna da região semiárida nordestina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Caracterizar méis monoflorais produzidos a partir da flora/fauna da região semiárida nordestina, a fim de determinar potenciais marcadores químicos e sensoriais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

a) Desenvolver e otimizar a metodologia de Micro Extração em Fase Sólida (MEFS) para extração de compostos voláteis de méis monoflorais de abelha sem ferrão;

b) Caracterizar o perfil de compostos voláteis dos méis monoflorais de *Ziziphus joazeiro* Mart. (juazeiro), *Croton heliotropiifolius* Kunth (velame branco), *Mimosa arenosa* Willd Poir (jurema branca), *Turnera ulmifolia* L. (chanana), *Mimosa quadrivalvis* L. (malícia), *Anadenanthera colubrina* (angico) e *Prosopis juliflora* (Sw.) DC (algaroba) produzidos pelas abelhas sem ferrão *Melipona subnitida* Ducke (jandaíra) e *M. scutellaris* Latrelle (uruçu);

c) Determinar o perfil sensorial dos méis de juazeiro, velame branco e jurema branca, produzidos pelas abelhas jandaíra e uruçu através do método de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ);

d) Determinar a importância odorífera dos compostos voláteis presentes no mel velame branco produzido pela abelha uruçu através da técnica olfatométrica OSME;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ABELHAS SEM FERRÃO

As abelhas nativas brasileiras, conhecidas popularmente como abelhas sem ferrão, abelhas indígenas, abelhas nativas, ou ainda, simplesmente por “meliponíneos” ou “meliponas”, possuem ferrão atrofiado e pertencem à superfamília Apoidea, que é subdividida em 8 famílias: Colletidae, Andrenidae, Oxaeidae, Halictidae, Melittidae, Megachilidae, Anthophoridae e Apidae. A Apidae é subdividida em quatro subfamílias: Apinae, Meliponinae, Bombinae e Euglossinae. A subfamília meliponinae se divide em duas tribos: *Meliponini* e *Trigonini*. A tribo *Meliponini* possui um único gênero, *Melipona* com aproximadamente 20 espécies, enquanto a tribo *Trigonini* possui, dez gêneros, num total aproximado em 120 espécies (KERR; CARVALHO; NASCIMENTO, 1996).

A prática de criar abelhas melíponas (tribo *Meliponini* e tribo *Trigonini*) é chamada de meliponicultura, sendo o nome dado ao criador destas abelhas de meliponicultor (AQUINO, 2006). Os índios foram os meliponicultores pioneiros desta prática, mas com o passar do tempo, cada vez mais tem se despertado o interesse de pequenos e médios produtores, assim como agricultores de base familiar, em desenvolvê-la. Diferentemente da apicultura (criação racional de abelhas com ferrão), a meliponicultura é de fácil manejo e necessita de pouco investimento para a sua produção. Pode ser integrada aos plantios florestais, de fruteiras e de culturas de ciclo curto, podendo contribuir, através da polinização, com o aumento da produção agrícola e regeneração da vegetação natural (VENTURIERI; PEREIRA, 2003; SILVA; PAZ, 2012). A criação destas abelhas vai além dos lucros financeiros procedentes de seus produtos, contribui para o meio ambiente na preservação da vida vegetal e, também, na manutenção da variabilidade genética das espécies vegetais além de proporcionar lazer e satisfação ao criador (DA SILVA et al., 2013).

As espécies da subtribo Meliponina ocupam grande parte das regiões tropicais do planeta, especialmente a América do Sul, por se adaptarem às condições ecológicas locais (SOUZA et al., 2009; CHUTTONG et al., 2016). Essa adaptação está relacionada com a capacidade que essas abelhas têm de contrabalançar até certo ponto, nas regiões onde são nativas, os efeitos desfavoráveis da endogamia (SILVA; PAZ, 2012).

É estimado que no Brasil existam aproximadamente 192 espécies de abelhas, algumas destas populares e criadas especialmente para produção de mel, com destaque para a região Nordeste (SILVEIRA et al., 2002). Nesta região, é possível encontrar aproximadamente 23% das espécies de abelha do gênero *Melipona* Illiger, 1806 (ZANELLA, 2000; ALVES, 2005), que inclui as espécies mais produtivas de mel, a citar, *Melipona subnitida* Duke (jandaíra) e *Melipona scutellaris* Latrelle (uruçu do Nordeste).

A abelha jandaíra (Figura 1) é um meliponíneo típico do sertão, que costuma se alojar em troncos de árvores típicas da caatinga, como a imburana, catingueira, favela e umbuzeiro. Seu ninho possui forma de disco composto por potes de cerume onde o mel é armazenado, atingindo entre 3 a 5 cm de diâmetro conforme o estado da colônia. Por ser o meliponíneo mais popular na região Nordeste, e se adaptar as condições adversas do meio, sua criação para fins de produção de mel é considerada viável (AQUINO, 2006).



Figura 1 – Abelha jandaíra (*Melipona subnitida* Duke)
Fonte: www.meliponariojandaira.blogspot.com.br (2015)

A abelha uruçú (Figura 2) é caracterizada pelo tamanho semelhante à *Apis*, bem como pela destacável produção de mel entre os meliponíneos, alcançando a produção de até 10 litros por colméia por ano, a depender da disponibilidade da flora apícola. O mel de uruçú,

além de seu uso como alimento pelo homem, é utilizado na medicina popular no tratamento de gripes, tosses, bronquites e pneumonias (AQUINO, 2006).



Figura 2 – Abelha urucu (*Melipona scutellaris* Latrelle)
Fonte: www.abelhasdobrasil.com.br (2015)

Atualmente, a criação de meliponíneos tem alcançado um importante desenvolvimento, tanto em nível de espaço, quanto em tecnologia inovadora e investimentos para uma criação racional mais produtiva. Além do mel, também cresceu o interesse comercial pela produção e caracterização de outros derivados meliponícolas, tais como, a própolis, o geoprópolis e o pólen (SEBRAE, 2006). A popularização e a difusão do conhecimento e das técnicas meliponícolas têm sido alcançadas com a distribuição e a publicação de algumas iniciativas, através de cartilhas e demais publicações (CARVALHO et al., 2003; BLOCHTEIN et al., 2008; VENTURIERI et al. 2012; VILLAS-BÔAS, 2012).

No entanto, apesar do desenvolvimento e do crescimento desta atividade, a meliponicultura no Brasil ainda é carente de outras práticas tecnológicas que aprimorem o processo de extração e caracterização dos produtos, tornando-os mais valorativos (COLETTTO-SILVA, 2005). Diferentemente do que ocorre no caso da apicultura, com a criação de *Apis mellifera* e abelhas africanizadas, a meliponicultura sofre de um vazio legal, o que dificulta a ampliação do mercado desse produto, especialmente no que se refere á exportação e comercialização (LOPES et al., 2005; BILUCA et al., 2014).

3.2 O MEL DOS MELIPONÍNEOS

O mel é uma das mais complexas misturas de carboidratos produzida pela natureza, sendo um alimento energético muito importante pelas suas propriedades nutritivas, pelo seu aroma e sabor. Os diferentes sabores e aromas encontrados dependem fortemente das plantas, flores e condições climáticas presentes na região geográfica onde está localizada a colméia (BILUCA et al., 2014; JANDRIC et al., 2015).

Após serem coletadas pelas abelhas, o material passa pela faringe e o esôfago até chegar à vesícula melífera. Na colmeia as abelhas regurgitam esse material na boca das receptoras ou em um alvéolo vazio. No processo de entrada e saída da vesícula melífera o material transportado sofre adições de enzimas como invertase e glicose oxidase, dentre outras. A invertase converte a sacarose em glicose e frutose, e pode continuar atuando após o envasamento de méis não aquecidos. A glicose oxidase oxida a glicose no mel não maturado, quando ele ainda possui um alto teor de água. Para maturar o mel as abelhas produzem uma corrente de ar dentro da colmeia, fazendo com que o material coletado perca água até que a concentração dos açúcares esteja em torno de 75% e 87%. Neste ponto, o mel é operculado nos favos, processo que marca o amadurecimento do mel (COUTO; COUTO, 2006; MENDES et al., 2009; SILVA et al., 2016).

O mel dos meliponíneos tem sido utilizado no Brasil há séculos, de modo que antes da colonização foi única fonte de açúcar disponível para os indígenas brasileiros, sendo utilizado também como remédio e conservante de alimentos (CARVALHO et al. 2005). Atualmente, devido a maior disponibilidade comercial do mel de abelhas com ferrão, o consumo do mel de abelhas sem ferrão é inferior ao de outros méis, porém o interesse pela produção deste tipo de mel, em particular, tem se mantido ao longo dos tempos, tomando como justificativa suas características sensoriais diferenciadas, suas propriedades terapêuticas, bem como os benefícios de caráter ecológico no que diz respeito à polinização das flores oferecido pelas abelhas durante a sua produção (BILUCA et al., 2014; CHUTTONG et al., 2016).

Segundo Bezerra e Souza (2002), de modo geral, o mel produzido pelas abelhas sem ferrão apresenta diferenças em alguns parâmetros físico-químicos quando comparados ao mel produzido por *A. mellifera*, principalmente com relação à umidade, que é bastante elevada em mel de meliponíneos, tornando-o menos denso que o mel das abelhas africanizadas. Sua cor varia do quase transparente ao âmbar, e o gosto e níveis de açúcares dependem da espécie, da época, da região e, principalmente, da florada.

O mel pode ser classificado em função da matéria prima usada pelas abelhas na sua elaboração, como: mel floral ou de flores, quando obtido dos néctares das flores; ou mel de melato, quando formado a partir de secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas. Ainda, pode ser classificado de acordo com o procedimento de extração do favo em: mel escorrido, mel prensado ou mel centrifugado; bem como quanto à sua apresentação comercial em: mel líquido, cristalizado ou semi-cristalizado, mel em favos, mel com pedaços de favo e mel filtrado (BRASIL, 2000).

Os méis florais classificados como unifloral ou monofloral, devem apresentar no mínimo 45% de pólen das flores de uma mesma espécie, possuindo características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias, podendo, ainda, ser tipificado com o nome da planta ou da região em seu rótulo (BARTH, 2005). A identificação da origem botânica e geográfica do mel pode contribuir de forma significativa para o conhecimento da sua qualidade nutricional e sensorial, considerando que as características físicas, químicas e sensoriais do produto estão relacionadas à origem da matéria-prima utilizada pelas abelhas durante a sua produção (CASTRO-VAZQUES et al., 2012; VERZERA et al., 2014; TAHIR et al., 2016).

Os méis possuem aromas altamente específicos devido à presença de constituintes voláteis, na sua maioria derivados do néctar de origem e das condições climáticas presentes na região geográfica onde está localizada a colmeia. O grande número de compostos voláteis presentes em méis faz com que o perfil de seu aroma possa ser usado como uma impressão digital do produto, possibilitando que este seja usado para determinar sua origem floral. Certos compostos específicos são característicos de méis com origem floral e/ou geográfica determinada e o uso destes chamados marcadores é uma possibilidade para a determinação de origem a partir da determinação da composição de sua fração volátil (CUEVAS-GLORY et al., 2007; YANG et al., 2012; CASTRO-VÁZQUEZ et al., 2014).

A delimitação da origem botânica do mel é um dos objetivos prioritários da indústria apícola 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. Dessa forma, a valorização de méis através da fixação de um padrão diferenciado de qualidade e de sua certificação é, no contexto atual, uma alternativa estratégica capaz de assegurar a plena expressão do potencial dessa atividade no Semiárido e, ao mesmo tempo, de preservar os recursos ecológicos e promover o bem estar das populações que nela vivem e dela dependem. Entre os maiores benefícios da certificação de indicação geográfica está a melhoria acentuada do produto, estabelecendo sua diferenciação em relação

a produtos similares. Além disso, a certificação agrega valor ao mesmo, facilita a inserção do produtor no mercado, protege o produto, fortalece as organizações dos produtores e, sobretudo, valoriza a região pela promoção e preservação da cultura e da identidade locais (VERZERA et al., 2014; SPÁNIK et al., 2014; KARABAGIAS et al., 2014)

No Brasil, devido à sua flora diversificada, ampla extensão territorial e variabilidade climática a produção de mel ocorre durante todo o ano. Estes aspectos são um diferencial em relação aos demais países onde, normalmente, a produção de mel ocorre apenas em determinado período do ano. Neste cenário, o Semiárido nordestino se destaca por possuir condições ambientais que favorecem a atividade melicultora devido à existência de intensa floração natural. Nesse bioma ocorre uma vegetação característica da época chuvosa e outra da estiagem, que promovem um fluxo de néctar e pólen durante todo o ano, contribuindo para a manutenção das colônias de abelhas e para a diminuição da necessidade do uso de alimentação artificial (SANTOS, 2009; SILVA et al., 2014; SOUSA et al., 2016).

Através do conhecimento da flora apícola local, o meliponicultor pode colher méis com diferentes características (cor, aroma, sabor e composição) durante todo o ano em função da origem floral e espécie de abelha produtora (SOUSA, 2006; SOUSA et al., 2016). Na flora apícola da região nordestina, destaca-se o velame branco (*Croton heliotropiifolius* Kunth), jurema branca (*Mimosa arenosa* Willd. Poir), malícia (*Mimosa quadrivalvis* L.) e algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC), cuja floração ocorre no período chuvoso; angico (*Anadenanthera colubrina*), e o juazeiro (*Ziziphus joazeiro*) que tem floração no período de seca; e chanana (*Turnera ulmifolia* L.) que pode apresentar floração durante todo o ano, dependendo da regularidade das chuvas (SILVA, 2012).

A floração do angico corre em massa e sua copa tem uma beleza exuberante durante a estação seca. Suas inflorescências são formadas por flores pequenas, brancas e com odor agradável. Durante a estação seca, período com poucos recursos florais na caatinga, as flores do angico fornecem pólen e néctar para muitas espécies de abelhas sem ferrão. O angico possui crescimento rápido podendo ser utilizado para fortalecer a criação de abelhas em áreas de reflorestamento e também em áreas urbanas (SILVA, 2012; SANTOS et al., 2015).

A jurema branca é uma árvore de porte médio que ocorre em solos arenosos e em locais abertos. Suas inflorescências são reunidas em espigas, compostas por flores muito pequenas, brancas e suavemente perfumadas. Por ser uma espécie adaptada a locais abertos e de crescimento rápido, a jurema branca é ideal para reflorestamentos de áreas degradadas (SILVA, 2012).

O juazeiro é uma árvore de porte médio, possui ramos tortuosos com espinhos e copa verde durante o ano inteiro. Suas flores fornecem principalmente néctar para a manutenção das abelhas durante a estação seca. Por manter sua folhagem verde durante o ano inteiro, o juazeiro é muito utilizado em projetos de arborização visando o sombreamento (BRITO et al., 2015).

A malícia é uma espécie herbácea ou subarbustiva que ocorre principalmente em áreas abertas. Possui ramos e frutos cobertos por acúleos (SILVA, 2012). O pólen e néctar de suas flores atraem muitos visitantes (abelhas e vespas) florais e, principalmente, as abelhas nativas sem ferrão (MAIA-SILVA et al., 2012). A espécie Chanana é perene e ocorre principalmente em áreas abertas. Suas flores possuem pétalas com coloração creme e base de cor roxa escura. A chanana é ornamental e pode ser utilizada em jardins de flora melífera com a finalidade de fornecer néctar e pólen para as abelhas nativas (QUEIROZ, 2009).

O velame branco é uma espécie endêmica do nordeste do Brasil, e é encontrada frequentemente em vegetação de caatinga, possui cerca de 1m de altura e inflorescências alongadas na ponta dos ramos, trazem as flores masculinas acima e femininas abaixo, que produzem os frutos. Possui folhas grossas, ásperas e, quando maceradas, exalam um cheiro agradável devido ao óleo essencial presente. O néctar oferecido às abelhas proporciona a produção de mel claro e aromático. Na região do Semiárido do nordeste, esta planta é também utilizada no tratamento da tosse e gripe e contra infecções na pele, úlceras e sífilis (CASTRO, 2011).

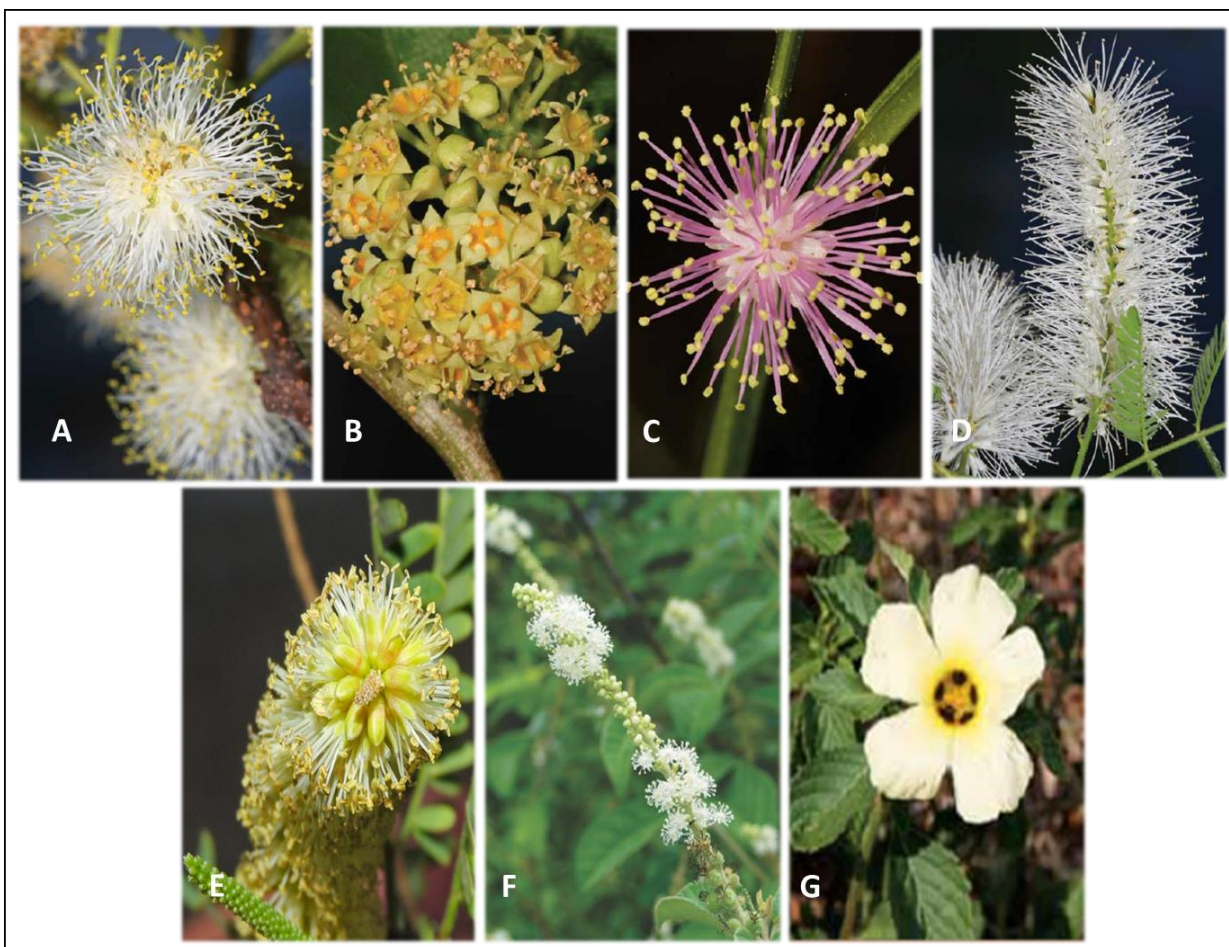


Figura 3 – (A) Angico, (B) Juazeiro, (C) Malícia, (D) Jurema branca, (E) Algaroba, (F) Velame branco, (G) Chanana.

Fonte: Silva, (2015) e www.plantasdobrasil.com.br (2015)

3.3 COMPOSTOS VOLÁTEIS

A aceitação dos alimentos está diretamente relacionada ao seu sabor. O sabor é formado principalmente pelas sensações que o aroma e o gosto provocam, os quais são atribuídos aos compostos voláteis e não voláteis presentes nos alimentos, respectivamente. Os compostos não voláteis contribuem para a sensação proveniente do gosto que pode ser doce, azedo, salgado, amargo e umami. Já os compostos voláteis, responsáveis pelo aroma, são de diferentes classes químicas, termolábeis e presentes em quantidades extremamente diminutas nos alimentos (FRANCO, 2004).

O aroma característico dos alimentos é geralmente o resultado de dezenas ou centenas de compostos voláteis, encontrados em nível de traços. Mesmo os compostos voláteis presentes em concentrações muito baixas, em nanograma ou picograma, influenciam na

formação do aroma característico do alimento. Porém, em alguns alimentos, existem os compostos voláteis considerados de impacto, que sozinhos são capazes de “lembrar” o aroma do alimento, enquanto os demais compostos voláteis são denominados contribuintes, que juntos formam o aroma pleno do alimento (GARRUTI, 2001).

Os méis possuem aromas altamente específicos devido à presença de constituintes voláteis derivados a partir da fonte da planta ou néctar, a partir da transformação de compostos da planta pelo metabolismo de abelha, de aquecimento ou de manuseio durante o processamento e armazenamento de mel, ou de contaminação microbiana ou ambiental. (BIANCHE et al., 2011). 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, possibilitando que este seja usado para determinar sua origem floral (ALIFERES, 2010; VERZERA et al., 2014). Certos compostos específicos são característicos de méis com origem floral e/ou geográfica determinada e o uso destes chamados “marcadores” é uma possibilidade para a determinação de origem a partir da determinação da composição de sua fração volátil (BONVEHI; COLL, 2003; KARABAGIAS et al., 2014). As classes químicas em que os compostos voláteis do mel pertencem incluem: hidrocarboneto, aldeído, álcool, cetona, ácido, éster, benzeno e seus derivados, furano e pirano, norisoprenoides, terpenos e seus derivados, e compostos cíclicos (BARRA et al., 2010). No entanto, apenas os compostos derivados da planta e seus metabólitos (terpenos, norisoprenoides, benzenos e seus derivados) devem ser utilizados para discriminar a origem floral do mel (MANYI-LOH et al., 2011).

Além dos compostos voláteis no mel serem uma ferramenta útil para a caracterização da sua origem botânica (OVERTON; MANURA, 1994; ANKLAM et al., 1998; RADOVIC et al., 2001; RADOVIC et al., 2001; CASTRO-VAZQUEZ et al., 2014; KARABAGIAS et al., 2014; SEISONEN et al., 2015), é possível que sejam responsáveis por uma parte considerável da ação terapêutica do mel. Derivados benzenos, por exemplo, são compostos heterocíclicos que servem como precursores essenciais para a síntese de produtos naturais e fármacos dotados com ação antiviral, antibacteriana, antifúngica, antitumorais e efeitos de modulação da resposta imunológica. Já compostos hidrocarbonetos aromáticos presentes no mel podem servir como marcadores de poluição ambiental (MANYI-LOH et al., 2011).

Vários autores têm usado o perfil de compostos voláteis para tipificar a origem floral ou mesmo apontar os odorantes potentes de cada mel (CASTRO-VAZQUEZ et al., 2009, CASTRO-VAZQUEZ et al., 2007, DE LA FUENTE et al., 2007, GUYOT et al., 1999, GUYOT et al., 2002, JERKOVIĆ et al., 2009, PIASENZOTTO et al., 2003, SEISONEN et

al., 2015). Alissandrakis et al. (2005) identificaram 15 compostos como marcadores potentes para o mel de algodão, entre os quais: cinamaldeído (0,44 %), álcool cinâmico (1,79 %), ácido cinâmico (1,13 %) e ácido (Z)-p-metoxi-cinâmico (0,48 %), benzenopropanol (0,5 %), álcool homovanílico (0,6 %), coniferaldeído (0,47 %), ácido p-cumárico (1,77 %), ácido ferúlico (0,51 %).

Em um extrato analisado de mel de citrus proveniente da Grécia, *lilac* aldeídos foram detectados como os compostos voláteis predominantes. Além disso, dihidroxi óxidos de linalol, *lavender* lactona, *dill* éter, os quatro isômeros do 1-p-menthen-9-al, antranilato de metila e nerolidol também foram detectados. Os quatro isômeros de 1-p-menten-9-al, antranilato de metila e nerolidol poderiam ajudar na discriminação botânica. Entre os compostos identificados, cinco foram relatados como componentes de mel pela primeira vez: isômeros do hidróxi óxidos de linalol, 1,8-mentadien-4-ol, limonen-1-ole metilantranilato metila (ALISSANDRAKIS et al, 2007). Em méis de cardo da Itália, a sua impressão digital foi atribuída a 16 compostos: nonanal, furfural, decanal, 3,6-dimetil-hexahidrobenzofurano, benzaldeído, linalol, lilac aldeído (isômero IV), hotrienol, fenilacetaldéido, 4-oxoisoforona, álcool benzílico, 2-feniletanol, ácidos octanóico e nonanóico e antranilato de metila (BIACHI et al., 2011).

A análise da composição volátil de méis europeus da região de Córsega mostrou que o ácido quinurênico é um biomarcador do mel de castanha doce. Já os compostos alfa-isoforona e o ácido 2,5-dihidroxifenil-acético foram confirmados como marcadores do mel de morango (DONASRSKI et al., 2010). Spánik et al., 2013 observaram que o mel de framboesa é caracterizado pela presença de 2-etenil-2-butenal, 3-metil-hexano, 3-methylnonane, 3-piridinometanol, β -mirceno, ciclopentanometanol, norbornano, e undecanal.

Segundo Anklan (1998), 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. Mais de 600 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 (BARRA et al., 2010; SEISONEN et al., 2015).

Embora o mel seja uma matriz, aparentemente, pouco complexa, existem dificuldades para o isolamento de compostos voláteis responsáveis pelo aroma do mel. A mais comum é a grande quantidade de monossacarídeos que favorece as reações de escurecimento não enzimático. Portanto, o isolamento e o enriquecimento da fração volátil não deve ser realizado com aquecimento, sob risco de se obter compostos que não estão presentes no aroma original do mel (ALIFERIS et al., 2010).

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 (BIANCHIN et al., 2014; CHENG et al., 2015).

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, extração-destilação simultâneas em aparato de Likens-Nickerson, extração em fase sólida e *headspace* dinâmico (BIANCHI, et al., 2005; ALIFERES et al., 2010; BIANCHIN et al., 2014). No entanto, todas essas 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 (CUERVAS-GLORY et al., 2007), o que implica em maior risco ocupacional para os analistas e necessidade de tratamento dos resíduos gerados.

3.4 MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A microextração em fase sólida (MEFS) é uma técnica de extração de analitos que tem sido extensivamente aplicada em procedimentos de extração e pré-concentração de espécies voláteis associadas a aromas e fragrâncias. Desde a invenção dessa técnica, a sua aplicação tem sido intensificada em diversos campos da química e da biotecnologia, sendo seu uso na caracterização de fragrâncias e aromas intensificado a partir do final da década 90, no sentido de melhorar as análises da fração volátil ou “*headspace*” (PAWLISZYN, 2000).

A microextração em fase sólida apresenta uma série de vantagens, em relação aos outros métodos de extração de voláteis: não requer instrumentação analítica sofisticada, não utiliza solvente orgânico ou pequena quantidade de solvente orgânico, rápido processo operacional, permite automação das análises, a reutilização das fibras extratoras, e integra em um único sistema a extração, concentração e introdução da amostra no cromatógrafo. Consiste de um amostrador (uma espécie de seringa) com uma fibra de sílica fundida revestida com um fino filme de um polímero ou de um sólido adsorvente (fase extratora) (BIANCHIN et al., 2014; DA SILVA et al., 2015).

O processo de MEFS pode ser resumido em três fases: na primeira, os analitos alvos são extraídos de uma matriz para o headspace até formar o equilíbrio, na segunda os voláteis são capturados pela fibra exposta e na terceira fase a fibra é removida da amostra e os analitos retidos são dessorvidos em um instrumento analítico para serem separados e quantificados. As etapas para o procedimento de extração e dessorção podem ser observadas mais detalhadamente na Figura 4. Com a fibra retraída na agulha, o septo do frasco de amostra é perfurado e a fibra é exposta à amostra. Terminando o tempo de extração, a fibra é novamente retraída, a agulha é retirada do septo e levada para inserção no CG. Com a fibra retraída, o septo do injetor é perfurado, a fibra é exposta para dessorção térmica e, terminado esse processo, é retraída e retirada do injetor (VALENTE et al, 2000; PLUTOWASKA et al., 2010; DA SILVA et al., 2015).

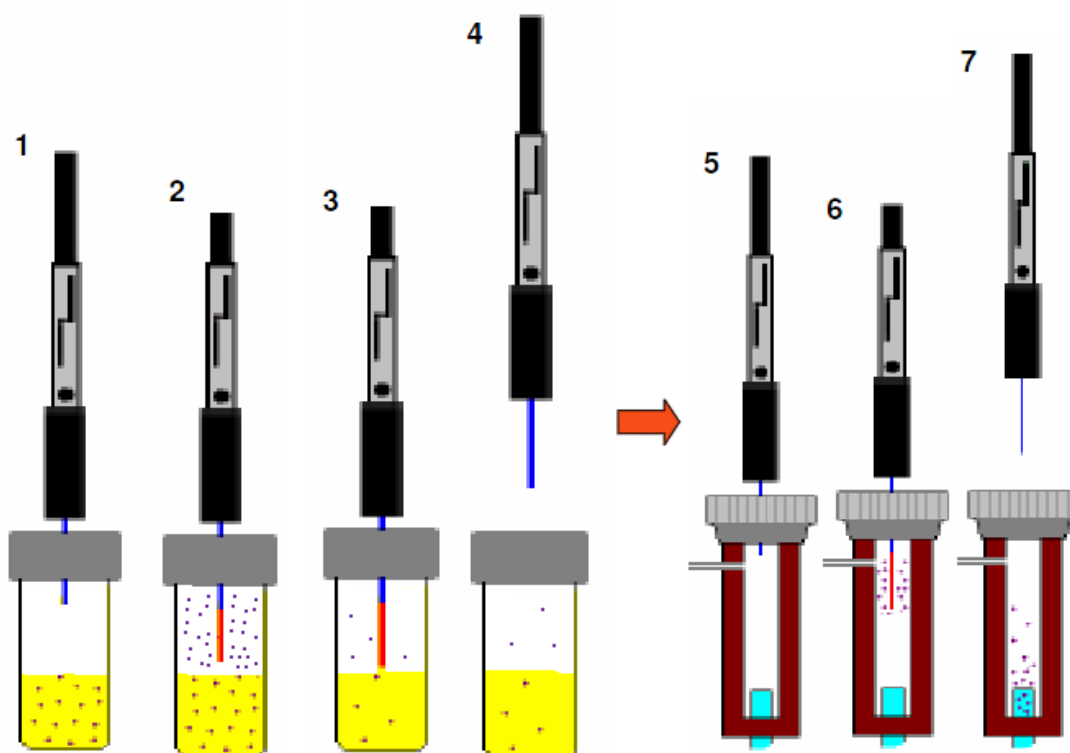


Figura 4: Extração no modo direto e dessorção por MEFS. (1) perfuração do septo com a agulha; (2) exposição da fibra de MESF diretamente na amostra líquida; (3) após um determinado tempo de extração; (4) recolhe-se a fibra e remove-se do frasco de amostra; (5) agulha introduzida no injetor aquecido do GC; (6) fibra exposta ao injetor (analitos dessorvidos termicamente) e (7) fibra recolhida e agulha retirada do injetor (analitos arrastados para a coluna) (AUGUSTO, 2007).

Na extração por MEFS, as moléculas do analito têm que se deslocarem da matriz e penetrarem no recobrimento e, para isto, resistências a transferências de massa devem ser vencidas, até que se estabeleça um equilíbrio entre a fibra e meio que a envolve. Na

microextração em fase sólida não ocorre extração exaustiva, mas sim, equilíbrio entre a fase aquosa e a fase orgânica estacionária (VALENTE et al., 2000; BURIN et al., 2013).

A natureza da matriz e da cobertura da fibra, a volatilidade e a polaridade dos analitos

são os principais fatores a serem considerados nessa técnica de extração. Devido a complexidade de algumas matrizes, a escolha do recobrimento da fibra e a otimização dos parâmetros relacionados à extração devem ser feitos experimentalmente. Um passo fundamental no desenvolvimento do método MEFS é a determinação do melhor tempo necessário para atingir o equilíbrio dos analitos entre fibra, a amostra e o “headspace”. O tempo de equilíbrio depende de diversos fatores: afinidade entre o analito e a fibra; espessura do recobrimento da fibra (o equilíbrio é atingido mais rapidamente quanto menor for a espessura); condições de agitação da amostra (maior agitação diminui o tempo). O desenvolvimento do método analítico MEFS envolve também a determinação de diversas outras condições operacionais como ajuste do pH e da força iônica; volume e quantidade da amostra; temperatura da extração; tempo e temperatura de dessorção (CUEVAS-GLORY et al., 2007; MA et al., 2013; DA SILVA et al., 2015).

O pH da amostra é importante para a extração de analitos que possuem grupos dissociáveis, dependentes do pH do meio. Somente as formas não-dissociadas dos analitos são extraídas pelos revestimentos MEFS. A agitação da amostra diminui o tempo necessário para atingir o equilíbrio, porque ele aumenta a difusão dos analitos em direção às fibras, contudo, deve ser mantida constante na solução da amostra, para que se reproduza o experimento (BURIN et al., 2013).

A associação adequada do tempo e temperatura de dessorção da fibra do injetor e a programação de temperatura da coluna, é de vital importância para análise em MEFS, uma vez que esta associação pode encaminhar os analitos através de uma condição adequada ao

detector para obtenção de um melhor sinal (OLIVARES, 2006). Uma dessorção eficiente e rápida transferência dos analitos para o injetor e coluna, requerem alta velocidade de fluxo linear do gás carreador ao redor do recobrimento (MA et al., 2013).

3.5 ANÁLISE SENSORIAL EM MEL

A avaliação sensorial dos alimentos é uma função primária do homem, através da qual ele aceita ou rejeita alimentos e bebidas de acordo com a sensação que experimenta ao analisá-los. De acordo com a literatura, a sequência de avaliação de um alimento pelo ser humano ocorre da seguinte forma: em primeiro lugar a aparência, depois o aroma, o sabor e a textura. Apesar disso, no processo global de percepção, os atributos se sobrepõem uma vez que todas as impressões surgem quase que simultaneamente e só o treinamento tornará as pessoas capacitadas a avaliá-los de forma isolada (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2006).

A Análise Sensorial é definida como a ciência usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição. A avaliação sensorial enfatiza a base comportamental da percepção humana, incluindo a fisiologia, a psicologia, a estatística na análise dos resultados e o conhecimento da ciência e tecnologia dos alimentos (STONE; SIDEL, 2004).

A análise descritiva é uma metodologia sensorial que fornece informações qualitativas e quantitativas de produtos, baseada na percepção de um grupo de indivíduos qualificados, considerando-se todas as sensações que são produzidas: visuais, olfativas, gustativas, táteis e auditivas (MURRAY et al., 2001; STONE e SIDEL, 2004). Os resultados da análise descritiva fornecem uma descrição completa das similaridades e diferenças das propriedades sensoriais de um conjunto de produtos, bem como permitem identificar quais são os atributos importantes e que dirigem a aceitação do produto pelo consumidor, se associados a testes afetivos (MURRAY et al., 2001; MEILGAARD; CIVILLE e CARR, 2006;).

Em méis produzidos a partir de abelhas a análise sensorial tem demonstrado ser uma importante ferramenta para avaliar sua qualidade por vários motivos. Pode ser usada como um guia para o processamento, a fim de conservar o sabor e aroma de mel fresco, para classificar mel monofloral de acordo com a origem botânica e para identificar a adulteração desse mesmo mel (FERREIRA et al., 2009; CASTRO-VAZQUEZ et al., 2009; CASTRO-VAZQUEZ et al., 2010). Sua produção, propriedades físicas, composição química, utilidade e aplicações têm sido discutidas comumente, uma vez que suas características sensoriais são muito importantes para a sua aceitação (PIANA et al., 2004).

Na extração e manejo de méis deve-se ter muito cuidado para que ele não sofra contaminação por parte de resíduos, fuligens de fumaça ou armazenamento em recipientes e locais inapropriados, pois tudo isso influenciará nas suas características sensoriais (ARNAUD et al., 2008). O uso do controle de qualidade sensorial considera atributos como cor, aroma, consistência e sabor. Estes atributos estão sempre interligados e dependem de substâncias voláteis que se relacionam à fragrância original das flores onde o néctar foi coletado. O aroma e sabor estão relacionados diretamente com a cor do mel e dependem majoritariamente de sua origem floral. Contudo, o envelhecimento, armazenamento e temperatura são fatores que alteram todos os atributos sensoriais (ALVES; DELLA MODESTA; SOUZA, 2005; SOUZA et al., 2016; SILVA et al., 2016).

A avaliação sensorial do mel permite distinguir a origem botânica do mesmo e identificar e quantificar certos defeitos (fermentação, impurezas, odores e sabores diferentes). Essa análise também desempenha um papel importante na definição das normas do produto e sobre denominações botânicas ou outros rótulos específicos. Além disso, é uma parte essencial dos estudos de preferência/aversão do consumidor. Em particular, a avaliação sensorial é importante na verificação da conformidade dos méis uniflorais, uma vez que pode revelar a presença de componentes botânicos que não são detectados por outros métodos analíticos, mas que podem alterar as características sensoriais típicas, de tal forma que o mel não pode ser comercializado como unifloral (PIANA et al., 2004).

As características físico-químicas constantes tais como consistência, cor, odor, sabor e aromas, ocorrem somente em méis chamados monoflorais ou uniflorais, como, por exemplo, mel de laranjeiras, mel de eucalipto, entre outros. Estes méis são cada vez mais procurados pelo consumidor. De outro lado, estão os méis multiflorais ou pluriflorais ou heteroflorais, também chamados de silvestres, cuja composição e cujas características variam de acordo com as floradas, não sendo constantes as suas características, sendo menos apreciados pelos

consumidores (BARTH, 2005; TENORE et al., 2012; ÖZCAN; ÖLMEZ, 2014; SOUZA et al., 2016).

3.6 TECNICAS DE CROMATOGRAFIA GASOSA OLFATOMÉTRICA (CG-O)

Um conjunto de técnicas que podem ser utilizadas para determinar a importância individual de cada odor num sistema aromático, que combina análise sensorial com cromatografia gasosa, é chamado de cromatografia gasosa – olfatometria (CG-O). Nesse tipo de análise o nariz humano é usado como um detector, uma vez que os indivíduos cheiram os efluentes cromatográficos que emergem da coluna, e registram a impressão sensorial que tiveram de cada composto eluído (VAN RUTH; O'CONNOR, 2001; SAMPAIO et al., 2013).

A CG-O, é uma técnica analítica que associa o poder de resolução do CG-capilar com a seletividade e sensibilidade do nariz humano e quantifica o impacto de compostos odorantes. O nariz humano é, geralmente, mais sensível do que qualquer detector instrumental e a olfatometria é considerada uma ferramenta poderosa para a medida de compostos odoríferos (POLLIEN et al., 1999; SAMPAIO et al., 2015).

Os métodos de CG-O podem ser classificados em três categorias: métodos de diluição, métodos de intensidade e métodos de frequência de detecção.

As técnicas de diluição, CHARM (*Combined Hedonic Response Measurement*) (ACREE et al., 1984) e AEDA (*Aroma extract dilution Analysis*) (SCHIEBERLE; GROSCH, 1987; ULRICH; GROSCH, 1987) são baseadas em medidas de limiar para estimar a percepção de intensidade do odor. A técnica CHARM (ACREE et al., 1984) é realizada com uma série de diluições do extrato da amostra, apresentadas em diferentes sessões, até que o odor não seja mais percebido pelo julgador. Durante a análise, o provador deverá registrar o início e o final da detecção sensorial de cada composto eluído da coluna. A análise AEDA é similar á análise CHARM e é também baseada na avaliação sensorial do efluente da coluna cromatográfica de extratos diluídos, que determinam um novo parâmetro, o fator de diluição FD. Compostos com altos valores de FD são os que possuem maior intensidade de aroma. Os resultados são expressos em fatores de diluição plotados contra os índices de retenção de Kovats (ULRICH; GROSCH, 1987).

A diferença entre CHARM e AEDA é que enquanto AEDA simplesmente determina a máxima diluição em que um composto ainda pode ser detectado no efluente cromatográfico,

CHARM mede adicionalmente, o impacto de várias diluições sobre o tempo com que o composto pode ser percebido no efluente cromatográfico. Ambas utilizam diluições sucessivas do isolado original, fundamentando-se assim, no conceito de *threshold* para estimar o poder odorífero de cada volátil nele presente.

A técnica OSME (*Oregon State Method*), baseia-se nos modernos conceitos de psicofísica. Consiste numa avaliação sensorial de tempo–intensidade, em que o indivíduo avalia sensorialmente os efluentes da coluna cromatográfica, descrevendo a qualidade do odor, o tempo durante o qual o odor de cada volátil é percebido no efluente cromatográfico e a intensidade do odor de cada composto volátil, através de uma escala de 9 a 15 cm, estruturada ou não. Essa técnica fornece um aromagrama onde os picos mais altos e/ou com maior área sugerem compostos de maior importância odorífera, que pode ser diretamente correlacionado com o cromatograma, facilitando a avaliação da importância dos compostos odoríferos (DA SILVA et al., 1993; GARRUTI et al, 2003; SAMPAIO et al., 2013).

A técnica de frequência de detecção do odor NIF/SNIF (*Nasal Impact Frequency/Surface of Nasal Impact Frequency*) proposta por Pollien et al. (1997) fornece a medida da intensidade baseada no número de julgadores que detectam um mesmo odor simultaneamente (frequência de detecção), ou seja, há uma soma dos aromagramas individuais gerando um aromagrama normalizado em formato de cromatograma, onde a altura normalizada ou superfície dos picos é chamada de NIF/SNIF. Essa técnica necessita um número mínimo de 8-10 julgadores diferentes não-treinados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

As doze amostras de mel de abelhas nativas sem ferrão, utilizados neste estudo, foram produzidos pelas espécies jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) e uruçú (*Melipona scutellaris* Latrelle) em quatro meliponários distintos situados na região do Semiárido nordestino. Dois meliponários localizados na região do Seridó do Estado do Rio Grande do Norte (-06°46'14''S, -36°44'00''W), e dois na região do Agreste do Estado da Paraíba (7°10'15''S, 35°51'14''W). A colheita das amostras em cada meliponário foi realizada ao final de duas estações climáticas distintas. A primeira colheita foi realizada ao final da estação de estiagem (dezembro de 2013) e a segunda ao final do período chuvoso (agosto de 2014). O mel foi coletado diretamente das colméias, por sucção com auxílio de seringas descartáveis (uma para cada colônia) e em seguida foram armazenados à temperatura de aproximadamente 7 °C, em potes de vidro esterilizados e devidamente identificados até o momento das análises.

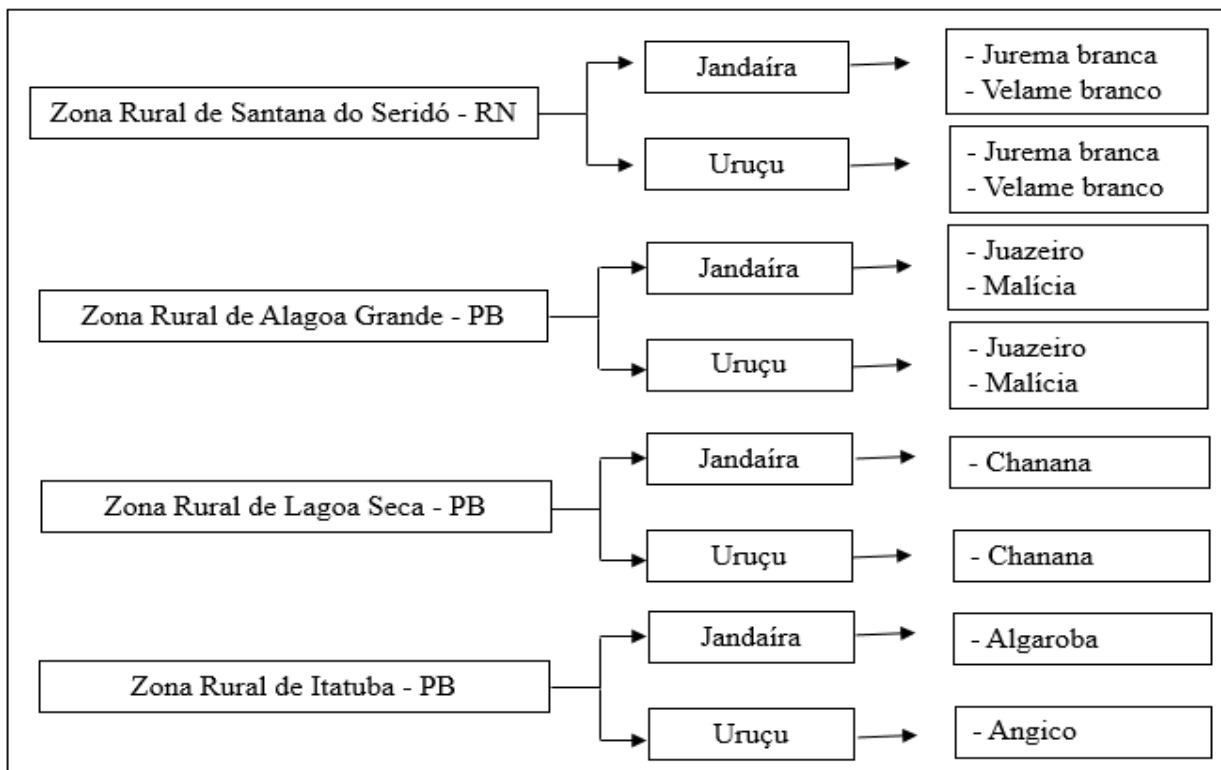


Figura 5 – Regiões onde estão localizados os meliponários, abelhas sem ferrão produtoras e floradas predominante das dozes amostras de méis utilizadas na pesquisa.

4.2 ANÁLISE MELISSOPALINOLÓGICA

A análise melissopalínológica foi realizada para confirmação da classificação e origem monofloral das amostras de mel, conforme método descrito por Barth (1989). Alíquotas de 10g de cada amostra foram dissolvidas em 20 mL de água destilada e centrifugadas a 4000 rpm durante 20 min. Após 1h de repouso o sobrenadante foi separado e os sedimentos concretados em glicerina e envelopados entre lâminas seladas por parafina. A caracterização polínica foi determinada pela contagem e identificação mínima de 500 grãos de pólen em 4 campos distintos da lâmina, utilizando Microscópio Óptico (Nikon Optiphot II, 400x e 1000x) em comparação a imagens de referências de pólen de plantas apícolas disponibilizadas pelo Laboratório de Insetos Úteis/Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Universidade de São Paulo ESALQ/USP. Foram classificadas, como méis monoflorais, as amostras com uma representação polínica de mesma origem superior a 45 % conforme Barth (1989). Todas as análises foram realizadas em triplicata para três amostras distintas de cada um dos doze méis analisados.

Tabela 1: Composição palinológica, estação climática e análises realizadas nos méis produzidos por abelhas sem ferrão em diferentes regiões do Semiárido brasileiro.

Abelha	Composição palinológica do mel Nome comum – Nome científico – Percentual de Pólen	Estação Climática	Análises realizadas
Uruçu	Velame branco (<i>Croton heliotropiifolius</i>) = 65 % Jurema Branca (<i>Mimosa arenosa</i>) = 22% Vassourinha de botão (<i>Polygala violacea</i>) = 5,30% Chanana (<i>Turnera subulata</i>) = 7,4%	Chuvosa	CG-EM ADQ CG-Olfatometria
Jandaíra	Velame branco (<i>Croton heliotropiifolius</i>) = 69% Jurema Branca (<i>Mimosa arenosa</i>) = 21% Marmeleiro (<i>Croton sonderianus</i>) 4,3% Vassourinha de botão (<i>Polygala violacea</i>) = 5,0% Outros = 3,7%	Chuvosa	CG-EM ADQ
Uruçu	Jurema Branca (<i>Mimosa arenosa</i>) = 67,5% Amargosa (<i>Pavania Cancellata</i>) = 24,46% Velame (<i>Croton heliotropiifolius</i> Kunth) = 8%	Chuvosa	CG-EM ADQ
Jandaíra	Jurema Branca (<i>Mimosa arenosa</i>) = 72,34% Marmeleiro (<i>Croton sonderianus</i>) = 20% Velame (<i>Croton heliotropiifolius</i>) = 7,6%	Chuvosa	CG-EM ADQ
Uruçu	Juazeiro (<i>Ziziphus juazeiro</i> Mart.) = 69,% Vassourinha de botão (<i>Polygala violacea</i>) = 21,3% Sabiá (<i>Mimosa caesalpinifolia</i>) = 9,6%	Estiagem	CG-EM ADQ
Jandaíra	Juazeiro (<i>Ziziphus juazeiro</i> Mart) = 71% Cajá (<i>Spondias mombin</i> L.) = 26,7% Sabiá (<i>Mimosa caesalpinifolia</i>) = 2,3%	Estiagem	CG-EM ADQ

Jandaíra	Malícia (<i>Mimosa quadrivalvis</i> L.) = 67,45% Jurema Branca (<i>Mimosa arenosa</i>) = 22,9% Algaroba (<i>Prosopis juliflora</i> _ Sw) = 6,5 Outros = 3,1%	Chuvosa	CG-EM
Uruçu	Malícia (<i>Mimosa quadrivalvis</i> L.) = 81,04% Jurema Branca (<i>Mimosa arenosa</i>) = 17,3% Outros = 1,6%	Chuvosa	CG-EM
Jandaíra	Chanana (<i>Turnera subulata</i>) = 76,6% Marmeleiro (<i>Croton sonderianus</i>) = 6,2% Sabiá (<i>Mimosa caesalpinifolia</i>) = 4% Outros = 13,2%	Chuvosa	CG-EM
Uruçu	Chanana (<i>Turnera subulata</i>) = 73,6% Velame branco (<i>Croton heliotropiifolius</i>) = 7,9% Marmeleiro (<i>Croton sonderianus</i>) = 6,2% Outros = 12%	Chuvosa	CG-EM
Jandaíra	Algaroba (<i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC) = 68% Juazeiro (<i>Ziziphus juazeiro</i> Mart.) = 13,4% Angico (<i>Anadenanthera colubrina</i>) = 11% Outros = 7,6%	Chuvosa	CG-EM
Uruçu	Angico (<i>Anadenanthera colubrina</i>) = 75,3% Juazeiro (<i>Ziziphus juazeiro</i> Mart.) = 9% Chanana (<i>Turnera subulata</i>) = 5,5% Outros = 10,2%	Estiagem	CG-EM

4.3 ANÁLISE SENSORIAL

O perfil sensorial das amostras de mel foi determinado através do método de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), desenvolvido por Stone et al. (1974). O trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa do CCS – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba junto à plataforma Brasil, onde foi emitida certidão para execução das atividades CAAE: 06371012.8.0000.5188 (Anexo 1).

a) Pré-Seleção e Seleção

Inicialmente foram recrutados alunos e funcionários da Universidade Federal da Paraíba, entre 22 e 38 anos, que foram pré-seccionados com base no interesse e disponibilidade para participar dos testes sensoriais, familiaridade e habilidade em utilizar escalas de intensidade (Apêndice 1).

Cada candidato interessado em participar da equipe treinada respondeu a um questionário (Apêndice 2) contendo questões sobre o consumo de mel, seu estado de saúde, disponibilidades de horário, dentre outras. Juntamente às questões, também foi apresentado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice 3), que foi assinado pelo candidato concordando em participar voluntariamente dos testes, conforme exigido pela Resolução n.466 de 12/12/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

Na sequência, os voluntários foram submetidos a uma série de três testes triangulares (ASTM, 2004), realizados afim de avaliar a capacidade dos indivíduos em discriminar, através do aroma, amostras de mel apresentando diferenças moderadas entre si. O teste foi realizado utilizando mel de abelha sem ferrão e mel de abelha *Apis mellífera*, sendo aprovados os candidatos que tiveram 100% de acerto. O modelo da ficha utilizada é apresentado no Apêndice 4.

Em seguida, os candidatos selecionados realizaram o teste de reconhecimento de odores (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2006) (Apêndice 5) utilizando-se as seguintes substâncias aromáticas sugeridas por Bruneal et al. (2000) na Roda de Aroma de Mel: mel, caramelo, açúcar queimado, lambedor, mel de engenho, cravo, canela, malva, eucalipto, menta, gengibre, boldo, chá preto, hortelã, fumaça, limão, abacaxi, morango, uva, maracujá, solvente, vinagre, cachaça e floral. As substâncias aromáticas foram colocadas em frascos pretos recobertos com papel alumínio perfurado e vidro

relógio, e codificadas com números aleatórios de três dígitos. Foram selecionados os candidatos que atingiram pelo menos 80% de acerto.

Os 20 julgadores selecionados pelos testes já descritos participaram do levantamento da terminologia descritiva das amostras de mel, realizado através do Método de Rede descrito em Moskowitz (1983). Todas as amostras foram servidas em copos descartáveis, codificadas com números aleatórios de três dígitos, a 25 °C, e oferecidas aos julgadores para que indicassem termos que melhor descreviam as similaridades e diferenças entre elas, com relação aos atributos de aroma e sabor. Em seguida, os julgadores reunidos em grupo, sob a supervisão de um moderador, reportaram os termos gerados individualmente, sendo escolhidos de forma consensual os termos que melhor descreviam as similaridades e diferenças entre as amostras. Cada termo foi definido por escrito e associado a referências posteriormente utilizadas no treinamento da equipe (Apendice 6). Foi também elaborada uma ficha de avaliação onde os descritores gerados em consenso pela equipe sensorial foram associados a escalas não-estruturadas de 9 cm, ancoradas nas extremidades com termos de intensidade (fraco/forte) (Apêndice 7).

b) Treinamento e Seleção

Foram conduzidas várias sessões de treinamento, utilizando-se amostras de méis de abelha sem ferrão. Nas sessões de treinamento, inicialmente era solicitado aos julgadores a leitura das definições de cada descritor, seguido da avaliação e memorização das referências. Na sequência o julgador era solicitado a avaliar três amostras de mel, utilizando a ficha descritiva anteriormente desenvolvida. Ao final de cada sessão os resultados de cada julgador eram discutidos pela equipe sensorial e serviam de base para alterações nas referências e suas definições.

Para avaliar se a equipe encontrava-se adequadamente treinada, todos os julgadores foram solicitados a avaliar, com a ficha consensualmente desenvolvida, seis amostras de mel em três repetições. Foram realizadas duas sessões, sendo três amostras avaliadas em cada. Essas amostras apresentavam diferenças moderadas entre si com relação a quase todos os descritores julgados.

Os dados gerados por cada julgador foram avaliados através da Análise de Variância (ANOVA) de dois fatores (amostra e repetição) por julgador, para cada descritor avaliado. Para compor a equipe descritiva final, foram selecionados aqueles

juízes que apresentavam bom poder discriminativo (pF amostras $< 0,1$), boa reprodutibilidade nos julgamentos (pF repetições $> 0,05$) e consenso com a equipe em no mínimo 80% dos descritores (ASTM, 2004).

c) Avaliação das amostras de mel

A equipe de juízes para a avaliação final do perfil sensorial dos méis foi composta de oito indivíduos, sendo seis do sexo feminino e dois do sexo masculino, com idades variando entre 22 e 38 anos. Os juízes avaliaram as amostras utilizando a Ficha de Avaliação desenvolvida na etapa anterior. Nessa etapa foi disponibilizado aos juízes as referências e definições dos termos previamente geradas pela equipe sensorial. Os juízes avaliaram em triplicata, seis amostras de mel em seis sessões distintas de teste. Em cada sessão três amostras foram avaliadas.

Os dados sensoriais foram avaliados por ANOVA tendo como fontes de variação: abelha, florada e a interação entre elas (abelha*florada). Um teste de Tukey foi utilizado para comparação das médias. Foi aplicada também a Análise de Componentes Principais (ACP) usando o programa Statistical Analysis System (SAS®, 2015).

4.4 ANÁLISE DE VOLÁTEIS DO MEL DE ABELHA NATIVA SEM FERRÃO

4.4.1 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO, SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE VOLÁTEIS POR HS-MEFS-CG-EM

Para a otimização da técnica de HS-MEFS foi utilizada uma amostra de mel de abelha sem ferrão. Como a técnica de MEFS é baseada no equilíbrio dos analitos entre três fases (revestimento de fibra, *headspace* e amostra), a ferramenta de planejamento experimental e análise de superfície de resposta foram utilizadas para investigar a influência das variáveis, a forma de interação entre estas variáveis, bem como o valor das variáveis que maximizem os resultados esperados no processo de extração de voláteis. As etapas para a otimização do processo de extração envolveram os seguintes passos:

a) Escolha do revestimento da fibra

Antes da otimização das condições de MEFS para a análise de componentes voláteis foi realizada uma triagem para escolha da fibra. As fibras foram adquiridas da Supelco (Bellofonte, PA, EUA). Quatro fibras de MEFS foram testadas e comparadas: divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), 50/30 μm ; polidimetilsiloxano (PDMS) 100 μm ; Poliacrilato (PA) 65 μm e polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), 65 μm . Preliminarmente às extrações, cada fibra extratora foi condicionada de acordo com a prescrição do fornecedor.

b) Delineamento experimental

Para a otimização da extração por HS-MEFS foi utilizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), no qual três variáveis independentes foram analisadas: Tempo de equilíbrio (X_1), Tempo de extração (X_2) e Temperatura de extração (X_3) (Tabela 2). O delineamento 2^3 incluiu dezessete ensaios sendo: oito pontos fatoriais, seis pontos axiais e três repetições do ponto central para que se conheça o erro experimental associado às medidas. A Tabela 3 ilustra a matriz do planejamento utilizado nesse trabalho. O modelo de superfície de resposta foi elaborado usando a seguinte equação (1):

$$Y = \sum \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{Eq. 1})$$

onde Y é o valor de resposta previsto pelo modelo; β_0 é uma constante, e β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes lineares, quadráticos e de interação, respectivamente. Neste modelo, X_1 , X_2 e X_3 são as variáveis independentes. O modelo determinado foi testado para falta de ajuste fazendo teste F através da Análise de Variância (ANOVA), coeficiente de determinação (R^2) e teste t dos coeficientes relativos aos seus erros padrões. As respostas ou variáveis dependentes utilizadas foram área total (Y1), número de picos (Y2), hotrienol (Y3) safranal (Y4) e acetato de etila (Y5). Para confirmar as previsões do modelo matemático para o perfil de voláteis, foram realizados experimentos utilizando os parâmetros otimizados via MSR. O delineamento experimental e análise

de dados foram realizadas utilizando o programa Statistica v. 7 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA)

Tabela 2- Fatores e níveis utilizados no planejamento experimental

Fatores	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Tempo de equilíbrio (X_1)	7 min	10 min	15 min	20 min	23 min
Tempo de extração (X_2)	5 min	15 min	30 min	45 min	55 min
Temperatura de extração(X_3)	20 °C	30 °C	45 °C	60 °C	70 °C

$\alpha = 1,68$

Tabela 3 - Matriz padrão para os experimentos conduzidos no planejamento fatorial completo 2³

ENSAIOS	Codificado			Real		
	X_1	X_2	X_3	$T_{eq}(\text{min})$	$T_{ex}(\text{min})$	$T_{ex}(^{\circ}\text{C})$
1	-	-	-	10	15	30
2	+	-	-	20	15	30
3	-	+	-	10	45	30
4	+	+	-	20	45	30
5	-	-	+	10	15	60
6	+	-	+	20	15	60
7	-	+	+	10	45	60
8	+	+	+	20	45	60
9	0	0	0	15	30	45
10	0	0	0	15	30	45
11	0	0	0	15	30	45
12	$-\alpha$	0	0	7	30	45
13	$+\alpha$	0	0	23	30	45
14	0	$-\alpha$	0	15	5	45
15	0	$+\alpha$	0	15	55	45
16	0	0	$-\alpha$	15	30	20
17	0	0	$+\alpha$	15	30	70

c) Extração dos compostos voláteis por HS-MEFS

As amostras foram preparadas misturando 10 g de mel monofloral a 10 ml de Milli-Q, em frascos de 60 ml hermeticamente fechados com septo de silicone de politetrafluoretileno (PTFE) (Supelco, Bellenfont, PA, EUA). O sistema foi submetido a aquecimento de T_{ex} (30 – 60 °C) em banho-maria por t_{eq} (10 – 20 minutos) antes da exposição da fibra. Preliminarmente às extrações, a fibra extratora foi condicionada no injetor do cromatógrafo a gás na temperatura de 250 °C por 30 min. Após o período de aquecimento, a fibra de MEFS foi exposta ao *headspace*, fase gasosa acima da amostra

de mel, por t_{ext} (15 – 45 minutos) sob agitação magnética de 700 rpm. Em seguida, a fibra foi retraída para dentro da agulha e transferida para o injetor do cromatógrafo a gás, onde os analitos foram dessorvidos.

d) Separação e Identificação dos compostos voláteis

Os compostos voláteis extraídos nos ensaios da otimização da técnica de HS-MEFS-CG-EM foram separados por um cromatógrafo a gás Agilent 7890A acoplado a um detector de massas Agilent 5975C e uma coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm x 0,5 μm). A programação da temperatura do forno do cromatógrafo gasoso foi iniciado a 40 °C por 2 min, seguida de rampa de 2 °C/min até atingir 60 °C, 3 °C/min até 90 °C e 4 °C/min até atingir 240 °C, mantendo-se nesta temperatura por 10 minutos. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C e o detector a 250 °C. Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 1.0 mL/min. O espectrômetro de massa foi operado por impacto de elétrons com uma temperatura da fonte de 200 °C, e com energia de ionização de 70V, variação de scan de m/z 29 a m/z 400 a 3.33 scans/s.

Os compostos foram identificados por: (1) comparação de seus espectros de massa obtidos experimentalmente com espectros de compostos fornecidos pela biblioteca NIST (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database, version 2.0, 2008), (2) comparação dos índices de retenção linear (IRL), obtidos utilizando o tempo de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos C_8 - C_{25} analisada nas mesmas condições anteriormente descritas, com aqueles reportados na literatura para colunas de mesma polaridade (ADAMS, 2008; RIVELLINO et al., 2013; KARABAGIAS et al., 2014; JERKOVIC et al., 2014) e (3) comparação dos espectros de massas com espectros de padrões puros, analisados no mesmo equipamento e sob as mesmas condições metodológicas.

Os compostos foram considerados positivamente identificados, quanto apresentaram espectros de massas e índices de retenção linear compatíveis aos dos padrões puros injetados e analisados nas mesmas condições do isolado. Foram considerados como compostos identificados, aqueles que apresentaram espectros de massas compatíveis com os fornecidos pela biblioteca do equipamento e índices de retenção linear similares aos encontrados na literatura. Foram considerados como compostos tentativamente identificados, aqueles cujos índices de retenção linear não foram encontrados em literatura, sendo a identificação baseada somente nas informações geradas pelo

espectrômetro de massas. Os compostos voláteis foram agrupados em classes químicas, sendo as abundâncias médias calculadas para cada pico presente no cromatograma, e o percentual de área calculado para cada classe química. Cada amostra foi injetada em triplicata.

Após a otimização das variáveis potencialmente relevantes para a extração por HS-MEFS, as condições consideradas adequadas foram adotadas para o estudo dos perfis voláteis das amostras de méis produzidos por abelhas nativas sem ferrão. Nesta fase, para a separação e identificação dos compostos extraídos dos méis foi utilizado um cromatógrafo a gás Varian Saturn 3800 acoplado a um detector de massas Varian Saturn 2000R e uma coluna VF-5MS (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) operando nas mesmas condições utilizadas na etapa de otimização por HS-MEFS.

4.5 CG - OLFATOMETRIA

a) Seleção e treinamento dos julgadores

Para compor a equipe sensorial foram selecionados 20 alunos voluntários de graduação e pós graduação da Universidade Federal do Ceará – UFC. A avaliação da sensibilidade dos julgadores foi realizada através do teste triangular utilizando soluções padrão de linalol como amostra estímulo e água como amostra referência. As amostras foram apresentadas aos julgadores nas 6 possíveis combinações (AAB; BAA; ABA; BBA; BAB; ABB).

Os cinco julgadores selecionados participaram de duas sessões de 23 minutos de treinamento, em que foram familiarizados com a amostra, com a análise tempo intensidade, com a utilização da escala visualizada na tela do computador e a gerarem termos descritores relacionados a qualidade dos odores percebidos no efluente cromatográfico.

b) OSME

A técnica utilizada para determinação da importância odorífera dos compostos voláteis do mel foi a OSME (McDANIEL et al., 1900; DA SILVA et al., 1992; GARRUTI et al., 2003; SAMPAIO et al., 2013). A técnica de MEFS, descrita no item

4.4.1, foi utilizada para extrair os compostos voláteis do *headspace* do mel. A fibra com os analitos foi dessorvida em um cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu, modelo 2010, adaptado com um sistema para olfatometria. O sistema de cromatografia gasosa - olfatometria utilizado está esquematizado na Figura 5. O cromatógrafo operou nas mesmas condições empregadas para análise de voláteis em mel citadas no item 4.4.1, porém a coluna cromatográfica estava conectada a um divisor de fluxo, que direciona o efluente da coluna simultaneamente para o Detector de Ionização em Chamas (DIC) e para o julgador detector olfatório. O sistema ODP, marca Gerstel, foi o responsável por direcionar o efluente da coluna até o nariz do julgador, além de umidificar e aquecer o tubo por onde passava a coluna desativada. Os compostos eluídos da coluna eram carreados pelo fluxo de ar até as narinas do julgador, os quais responderam ao estímulo utilizando uma escala tempo-intensidade de 10 pontos com o uso do *mouse*, ao mesmo tempo em que descreveram a qualidade do odor percebido. Os julgadores foram instruídos a respirar normalmente, enquanto estivessem inalando os efluentes cromatográficos, e uma analista registrava a qualidade dos odores descritos verbalmente pelo julgador.

Os cinco julgadores previamente selecionados avaliaram o efluente do CG em três repetições. Foi utilizado o programa SCDTI (Sistema de Coleta de Dados Tempo-Intensidade), desenvolvido pelas Faculdades de Engenharia de Alimentos e Engenharia Elétrica e Computação, da UNICAMP, que registra diretamente no computador o tempo de duração, a intensidade de cada odor e integra os dados, originando uma representação gráfica chamada Aromagrama. Os dados fornecidos pelo programa SCDTI compreendem: pico do odor, tempo de duração do odor percebido (tempo inicial e final), intensidade máxima desse odor, tempo correspondente a intensidade máxima e área sob o pico. O tempo final da corrida foi definido como o tempo máximo onde os julgadores ainda percebiam odor no efluente cromatográfico, o qual constituiu-se a 46 minutos. Para não provocar fadiga sensorial nos julgadores, o tempo total de avaliação foi dividido em duas partes de 23 minutos realizadas em dias diferentes.

Com os dados olfatométricos gerados por cada julgador, em cada uma das triplicatas realizadas, foi construído um aromagrama médio de cada indivíduo. Nesses aromagramas médios de cada indivíduo, foram incluídos apenas os picos reportados pelo menos em duas repetições. Da mesma forma, um aromagrama representativo da equipe sensorial foi gerado a partir dos odores reportados no mínimo duas vezes por, pelo menos, três julgadores. Por fim, comparando-se os aromagramas com os

cromatogramas obtidos por CG-DIC, juntamente com a identificação dos voláteis feita no CG-EM, foi possível determinar a importância odorífera de cada composto volátil presente no mel monofloral.

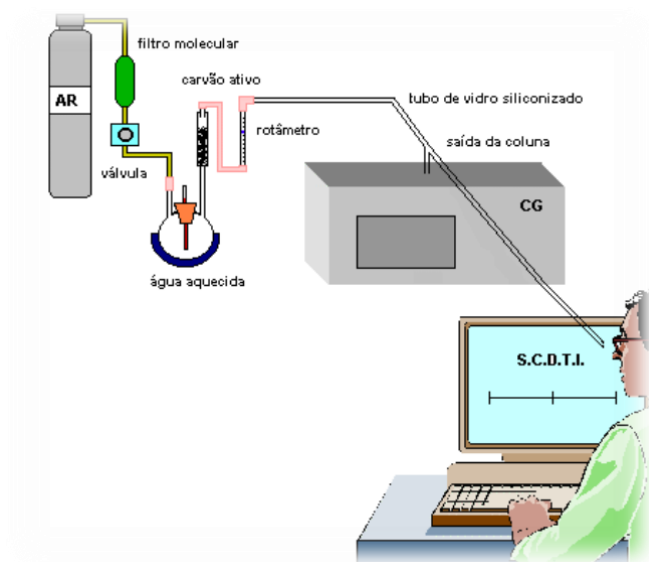


Figura 6 – Ilustração do sistema de Olfatometria (GARRUTE, 2001)



Figura 7 - Análise olfatométrica através da técnica de Osme

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da análise descritiva quantitativa e dos compostos voláteis foram avaliados através de ANOVA, teste de Tukey para comparação das médias e Análise de Componentes Principais (ACP), utilizando Statistical Analysis System (SAS®, 2015).

REFERÊNCIAS

ACREE, T. E.; BARNARD, J.; CUNNINGHAM, D. G.; A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. **Food Chemistry**, v.14, p. 273-286, 1984

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: USA, 2008.

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.

ALISSANDRAKIS, E.; TARANTILIS, P. A.; HARIZANIS, P. C.; POLISSIOU, M. Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic–mass spectrometric analysis. **Food Chemistry**, v. 100, p. 396–404, 2007.

ALVES, M.A.M.; DELLA MODESTA, R.C.; SOUZA E SILVA, A.L. **Desenvolvimento do Perfil Sensorial de Méis Silvestres (*Apis mellifera*) de Vários Municípios do Estado de Alagoas**. Comunicado Técnico. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Rio de Janeiro, 2005.

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

AQUINO, I. S. **Abelhas Nativas da Paraíba**. 1 ed., Universitária /UFPB, 2006.

ARNAUD, A.F.; DA SILVA, R.A.; ARAÚJO, L.L.S.; JÚNIOR, R.J.S.; JÚNIOR, D.A.O. Perfil Sensorial de Méis de *Apis mellifera* L., 1758 (*Hymenoptera*, *Apidae*) Produzidos na Microrregião de Catolé do Rocha – PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.3, p. 73-85, 2008.

ASTM. “Standard test method E1885-04” in **Standard Test Method for Sensory Analysis - Triangle Test**. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2004.

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, **Journal Chromatography**. v. 873, p.117-127, 2007.

BARRA, M. P.G.; PONCE-DÍAZ, M. C.; VENEGAS-GALLEGOS, C. Volatile compounds in honey produced in the Central Valley of Ñuble Province, Chile. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 70, p. 75-84, 2010.

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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 229-233, 2005.

BARTH, O. M. **O Pólen no Mel Brasileiro**. Rio de Janeiro: Luxor, 1989.

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. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, p. 229-233, 2005.

BEZERRA, J. A.; SOUZA, E. A rainha do sertão. **Revista Globo Rural**, v. 17, p.62-69. 2002

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.

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

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.

BLOCHTEIN B, FERREIRA NR, TEIXEIRA JG, FERREIRA JUNIOR NT, WITTER S, CASTRO D. **Manual de boas práticas para a criação e manejo racional de abelhas sem ferrão no RS: guaraipo, manduri e tubuna**. 1 ed., EdiPUCRS, 2008.

BONVEHI J. S.; COLL F. V., Flavour Index and Aroma Profiles of Fresh and Processed Honeys. **Journal Science Food Agricultural**, v. 8, p. 275-282, 2003

BRASIL Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa 11, e 20 de outubro de 2000, Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. Brasília, 2000.

BRUNEAU, E., BARBIER, E., GALLEZ, L.M., & GUYOT-DECLERCK, C. La roue des arômes des miels. **Abeilles & Cie**, v. 77, p. 16–23, 2000.

BURIN, V. M.; MARCHAND, S.; REVEL, G.; BORDIGNON-LUIZ, M. T. Development and validation of method for heterocyclic compounds in wine: Optimization of HS-SPME conditions applying a response surface methodology. **Talanta**, v. 117, p. 87-93, 2013.

BRITO, S. M. O.; COUTINHO, H. D. M.; TALVANI, A., BARBOSA, A. G. R.; MENEZES, I. R. A. Analysis of bioactivities and chemical composition of *Ziziphus joazeiro* Mart. using HPLC–DAD. **Food Chemistry**, v. 186, p. 185–191, 2015.

CARVALHO, C.A.L.; ALVES, R.M.O.; SOUZA, B.A. **Criação de abelhas sem ferrão: aspectos práticos**. SEAGRI-BA, 2003.

CARVALHO, C.A.L.; SOUZA, B.A.; SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C.; ALVES, R.M.O. **Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para caracterização físico-química**. Cruz das Almas: UFBA, 2005.

CASTRO-VÁZQUEZ L, DÍAZ-MAROTO MC, PÉREZ-COELLO M. S. Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. **Food Chemistry**, v. 103, p. 601–6, 2007.

CASTRO-VÁZQUEZ L, DÍAZ-MAROTO MC, GONZÁLEZ-VIÑAS MA, PÉREZ-COELLO MS. Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. **Food Chemistry**, v. 112, p. 22–30, 2009.

CASTRO-VAZQUEZ, L.; DIAZ-MAROTO, M. C.; TORRES, C.; PEREZ-COELLO, M. S. Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys. **Food Research International**, v. 43, p. 2335–2340, 2010.

CASTRO-VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; PÉREZ-COELLO, M. S. Changes in the volatile fractions and sensory properties of Heather honey during storage under different temperatures. **European Food Research Technology**, v. 235, p. 185–193, 2012.

CASTRO-VÁZQUEZ, L.; LEON-RUIZ, V.; ALAÑON, 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.

CHENG, H.; CHEN, J.; LI, X.; PAN, J.; XUE, S. J.; LIU, D.; YE, X. Differentiation of the volatile profiles of Chinese bayberry cultivars during storage by HS-SPME–GC/MS combined with principal component analysis. **Postharvest Biology and Technology**, v. 100, p. 59-72, 2015.

CHUTTONH, B.; CHANBANG, Y.; SRINGARM, K.; BURGET, M. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). **Food Chemistry**, v. 192, p. 149–155, 2016.

COLETTTO-SILVA, A. **Implicações na implantação da meliponicultura e etnobiologia de abelhas sem ferrão em três comunidades indígenas no estado do Amazonas.** Tese de Doutorado. Curso de Pós-Graduação em Entomologia, Manaus, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 2005.

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. **Apicultura:** manejo e produtos. 3 ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006.

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

DA SILVA, M. A. A. P.; LUNDAHL, D. S.; MCDANIEL, M. R. The capability and psychophysics of Osme: a new GC-olfactometry technique. In: MAARSE, H.; VAN DERHEIJ, D.G. (eds) Trends in flavour research: : proceedings of the 7th Weurman Flavour Research Symposium Amsterdam: Elsevier, p. 191-209, 1993.

DA SILVA, I. A. A.; DA SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; QUEIROZ, N.; MAGNANI, M.; NOVAIS, J. S. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3552–3558, 2013.

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 LA FUENTE, E.; SANZ, M. L.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; SANZ, J.; RUIZ-MATUTE, A. I. Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. **Food Chemistry**, v. 105, p. 84–93, 2007.

DONARSKI, J. A.; STEPHEN, A. J.; HARRISON, M.; MALCOLM, D.; CHARLTON, A. J. Identification of botanical biomarkers found in Corsican honey. **Food Chemistry**, v. 118, p. 987–994, 2010.

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

FRANCO, M. R. B. **Aroma e Sabor de Alimentos: Temas Atuais.** São Paulo: Editora Varela, 2004.

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.

GARRUTI, D. S.; FRANCO, M. R. B.; DA SILVA, M. A. A. P.; JANZANTTI, N. S.; ALVES, G.A. Evaluation of volatile flavour compounds from cashew apple (*Anacardium occidentale* L) juice by Osme gas chromatography/olfactometry technique. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 83, p. 1455-1462, 2003.

GUYOT, C.; SCHEIRMAN, V.; COLLIN S. Floral origin markers of heather honeys: *Calluna vulgaris* and *Erica arborea*. **Food Chemistry**, v. 64, p. 3–11, 1999.

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 Chemistry**, v. 79, p. 453-459, 2002.

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.

JERKOVIC', I.; TUBEROSO, C. I. G.; MARIJANOVIC, Z.; JELIC, M.; KASUM, A. Headspace, volatile and semi-volatile patterns of *Paliurus spina-christi* unifloral honey as markers of botanical origin. **Food Chemistry**, v. 112, p. 239–245, 2009.

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.

KERR, W. E.; CARVALHO, G. A.; NASCIMENTO, V. A. **Abelha uruçu: biologia, manejo e conservação**. Acangaú, 1996.

LOPES M, FERREIRA JB, SANTOS G. Abelhas sem-ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, v. 2, p. 7-9, 2005.

MA, Q. L.; HAMID, N.; BEKHIT, A. E. D.; ROBERTSON, J.; LAW, T. F. Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) analysis of aroma compounds in cooked beef using response surface methodology. **Microchemical Journal**, v. 111, p. 16–24, 2013.

MAIA-SILVA, C.; SILVA, C. I.; HRNCIR, M.; QUEIROZ, T. Q.; FONSECA, V. L. I. **Guia de plantas visitadas por abelhas na caatinga**. Fortaleza, CE: Fundação Brasil Cidadão, 192p. 2012.

MANYI-LOH, C. E.; NDIP, R.; 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, p. 9514-9532, 2011.

MCDANIEL, M.R.; MIRANDA-LOPEZ, R.; WATSON, B.T.; MICHEALS, N.J.; LIBBEY, L.M. Pinot Noir aroma: a sensory/gas chromatographic approach. In: CHARALAMBOUS, G., Ed. **Flavors and off-flavors**, Amsterdam: Elsevier, 1990.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 4 ed., Boca Raton: CRC Press, 2006.

MENDES, C. G.; SILVA, J. B. A. MESQUITA, L. X.; MARACAJÁ, P. B. As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**, v.22, p.07-14, 2009.

MOSKOWITZ, H. R. **Product testing and sensory evaluation of foods: marketing and R & D approacher**. Westport: Food and Nutrition Press, 1983.

MURRAY, J. M.; DELAHUNTY, C. M.; BAXTER, I. A. Descriptive sensory analysis, odorant quantitation using gas chromatography-olfactometry. **Analytical Chemistry**, v.71, p.5391-5397, 2001.

OLIVARES, I. R. B. **Desenvolvimento, otimização e validação da técnica HSSPME – GC/MS para análise de amostras obtidas do Rio Atibaia através da aplicação de uma sistemática “ISO” para diagnóstico ambiental de áreas contaminadas**. 2006. 190 f.. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade de São Paulo, Instituto de Química, 2006.

OVERTON, S.V.; MANURA, J.J. Flavor and aroma in commercial bee honey a purge and trap thermal desorption technique for identification and quantification of volatiles and semivolatiles in honey. **American Laboratory**, v. 26, p. 45-53, 1994.

ÖZCAN, M. M.; ÖLMEZ C. Some qualitative properties of different monofloral honeys **Food Chemistry**, v. 163, p. 212-218, 2014.

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

PIANA, M.L.; PERSANO ODDO, L.; BENTABOL, A.; BRUNEAU, E.; BOGDANOV, S.; DECLERCK, C.G. Sensory Analysis Applied to Honey: state of the art. **Apidologie**, v.35, p. 26-37, 2004.

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

PLUTOWASKA, B.; CHMIEL, T.; DYMERSKI, T.; WARDENCKI, W. A headspace solid-phase microextraction method development and its application in the determination of volatiles in honeys by gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1288-1298, 2010.

POLLIEN, P.; FAY, L. B.; BAUMGARTNER, M.; CHAINTREAU, A. First attempt of odorant quantitation using gas chromatography-olfactometry. **Analytical Chemistry**, v. 71, p. 5391-5397, 1997.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 2009.

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

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

SAMPAIO KL, BIASOTO ACT, MARQUES EJA, BATISTA EAC AND DA SILVAMAAP. Dynamics of the recovery of aroma volatile compounds during the concentration of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.). **Food Research International**, v. 51, p. 335–343, 2013.

SAMPAIO, A.; KARINA, L.; ALINE, C. T.; BIASOTOA, B.; SILVA, M. A. P. Comparison of techniques for the isolation of volatiles from cashew apple juice. **Journal Science Food Agriculture**, v. 95, p. 299–312, 2015.

SANTOS, C. S.; RIBEIRO, A. S. Apicultura uma alternativa na busca do desenvolvimento sustentável. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 4, p. 01-06, 2009.

SANTOS, A.; MOREIRA, R. F. A.; DE MARIA, C. A. B. Study of the principal constituents of tropical angico (*Anadenanthera* sp.) honey from the atlantic forest. **Food Chemistry**, v. 171, p. 421-425, 2015.

SCHIERBERLE, P.; GROSCH, W. Evolution of the flavor of Wheat and Bread by Aroma Extract Dilution Analysis. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 182, p. 111-113, 1987.

SEBRAE . **Informações de mercado sobre mel e derivados da colméia: relatório completo**. Brasília: Série Mercado, 2006.

SEISONEN, S.; KIVIMA, E.; VENE, K. Characterisation of the aroma profiles of different honeys and corresponding flowers using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry. **Food chemistry**, v. 169, p. 34-40, 2015.

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.

SILVA, W. P.; PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza on line**, v. 10, p. 146-152, 2012.

SILVA, P. M.; GAUCHE, C.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 309–323, 2016.

SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A.B. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. Belo Horizonte: Fundação Araucária, 2002.

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.

SOUZA, B. DE A.; CARVALHO, C. A. L. DE; ALVES, R. M. DE O.; DIAS, C. DE S.; CLARTON, L. Munduri (*Melipona asilvai*): a abelha sestrosa. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, **Série Meliponicultura** Nº 7, 2009.

SOUZA, B.; ROUBIK, D.; BARTH, O. M.; HEARD, T.; ENRIQUEZ, E.; ARVALHO, C.; VILLAS-BOAS, J.; MARCHINI, L. C.; LOCATELLI, J.; PERSANO-ODDO, L.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; BOGDANOV, S.; VIT, P. SOUZA, R. C. de S.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L. Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. **Interciencia**, v. 31, p. 867-875, 2006.

ŠPÁNIK, I.; PAŽITNÁ, A.; ŠIŠKA, P.; SZOLCSÁNYI, P. The determination of botanical origin of honeys based on enantiomer distribution of chiral volatile organic compounds. **Food Chemistry**, v. 158, p. 497-504, 2014.

STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory Evaluation Practices**. 3 ed., Academic Press, 2004.

STONE, H. et al. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technology: Chicago**, v. 28, p. 24-34. 1974

TAHIR, H. E.; XIAOBO, Z.; XIAOWEI, H.; JIYONG, S.; MARIOD, A. A. Discrimination of honeys using colorimetric sensor arrays, sensory analysis and gas chromatography techniques. **Food Chemistry**, v. 206, p. 37–43, 2016.

TENORE, G. C.; RITIENI, A.; CAMPIGLIA, P.; NOVELLINO, E. Nutraceutical potential of monofloral honeys produced by the Sicilian black honeybees (*Apis mellifera* ssp. *sicula*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1955-1961, 2012.

ULLRICH, F.; GROSCH, W. Identification of the most intense volatile flavor compounds formed during autoxydation of linoleic acid. **Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, v. 184, p.277-282, 1987

VALENTE, A.L.P. et al. Microextração por Fase Sólida. **Química Nova**, v. 23, p. 523-530, 2000.

VAN RUTH, S.M.; O'CONNOR, C. H. Influence of assessors qualities and analytical conditions on gás chromatography-olfactometry analysis. **European Food Research and Technology**, v. 213, p.77-82, 2001.

VENTURIERI GC, ALVES DA, VILLAS-BOAS, JK, CARVALHO CAL, MENEZES C, VOLLET NETO A, CONTRERA FAL, CORTOPASSI-LAURINO M, NOGUEIRA-NETO P, IMPERATRIZ-FONSECA VL. Meliponicultura no Brasil: situação atual e perspectivas futuras. In: Imperatriz-Fonseca VL, Canhos D, Alves DA, Saraiva AM (org) **Polinizadores no Brasil: contribuição e perspectivas para biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo, EDUSP, p. 213-236, 2012.

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

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.

VILLAS-BÔAS J, **Manual tecnológico: mel de abelhas sem ferrão**. Série Manual Tecnológico. Instituto Sociedade, População e Natureza, 2012.

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.

ZANELLA, F.C.V. The bees of the Caatinga (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes): a species list and comparative notes regarding their distribution. **Apidologie**, v. 31, p. 579-592, 2000.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

ARTIGO 1:

VOLATILE PROFILE OF MONOFLORAL HONEYS PRODUCED BY STINGLESS BEES FROM THE BRAZILIAN SEMIARID REGION

ABSTRACT

The aim of this work was to characterize the volatile profile of monofloral honeys produced by *Melipona subnitida* (jandaíra) and *Melipona scutellaris* (uruçu), from native floral sources that are typically found in the Brazilian semiarid region. The work also involves the optimization of SPME technique for volatile extraction using the response surface methodology. Through the results obtained, it was observed that the botanical source had a strong influence on the volatile profile of monofloral honeys produced by two stingless bees from the semiarid region of Northeastern Brazil. The results obtained suggest the existence of differentiator compounds and potential markers for the botanical sources evaluated, such as linalool for malícia honey, D-sylvestrene for chanana honey, rose oxide for algaroba honey and benzenethanol for angico honey. The optimal condition for the extraction of volatile compounds was: equilibration time of 15 minutes, extraction time of 45 min and extraction temperature of 45°C.

Keywords: Aroma; Honey; Stingless bees; Solid Phase Microextraction; Semiarid; Volatiles

1 INTRODUCTION

Honey is a complex mixture of carbohydrates produced by nature and is considered a very important energetic food due to its nutritional properties as well as its aroma and flavour, all of which strongly depend on the types of plants, flowers and climatic conditions present in the region where the beehive is found (Seisonen, Kivima & Vene, 2015).

Traditionally, the botanical origin of honey can be determined through a series of techniques known as melissopalinalogy. However, this type of analysis is expensive, requires a large amount of time and depends a great deal on the qualification and judgment of the analyzer. Therefore, there is a tendency to replace pollinic analysis with analytic markers through the discrimination of volatile compounds and of other physicochemical parameters of honey (Manyi-Loh, Ndip & Clarke, 2011). Thus, research has been conducted giving priority to the study of volatile honey profile having been identified to date more than 600 volatile compounds of different chemical families, arising from various biosynthetic pathways (Verzera, Tripodi, Condurso, Dima & Marra, 2014 and Cacho, Campillo, Viñas & Hernández-Córdoba, 2015).

The volatile compounds of bee honey can be derived from a variety of sources: from the plant or nectar; from the transformation of plant compounds by bee metabolism; from the heating or handling during processing and storage of honey, or even from microbial or environmental contamination. The volatile compounds found in honey belong to various classes, including hydrocarbons, aldehydes, alcohols, ketones, acids, esters, benzene and its derivatives, furan and pyran, norisoprenoids, terpenes and its derivatives, and cyclic compounds (Barra, Ponce-Díaz & Venegas-Gallegos, 2010). However, only compounds derived from plants and its metabolites (terpenes, norisoprenoids, benzenes and its derivatives) should be used to identify the floral origin of honey (Manyi-Loh, Ndip & Clarke, 2011).

Although this matrix is apparently little complex, there are difficulties in the isolation of volatile compounds responsible for the honey aroma. The most common is the large amount of monosaccharides that favour non-enzymatic browning reactions (Aliferis, Tarantilis, Harizanis & Alissandrakis, 2012 and Bianchin, Nardini, Merib, Dias Martendal & Carasek, 2014). Therefore, the results of the analysis of the aroma compounds of honey depend heavily on the isolation and detection techniques.

A well-accepted methodology for sample preparation and isolation of volatile compounds is the Solid Phase Micro Extraction (SPME). It has been used when there is need to create a link between the sample matrix and the analytical tool, i.e., the SPME technique does not require steps for sample preparation for introduction into the analytical instrument, since it extracts volatiles directly from the sample. SPME is a sample preparation technique that requires no use of organic solvents and has few steps in its procedure (Bianchin et al., 2014 and Soria, Martínez-Castro & Sanz, 2008).

Brazil possesses the greatest vegetal genetic diversity in the world, which, combined with its vast territory and climatic variability, enables the production of honey throughout the year (Silva et al., 2013). The Brazilian semiarid region stands out for having a type of vegetation which is adapted to the typical climatic conditions of the rainy season and the dry season, thus providing a continuous flux of nectar and pollen during the whole year and favouring the production of different types of honey with singular properties (Sousa et al., 2016).

This region is home to endemic species of stingless bees, also known as meliponas or Meliponini. Among these, two stand out: *Melipona subnitida* Ducke (jandaíra) and *M. scutellaris* Latrelle (uruçu). These bees produce honey which has been consumed since before the arrival of European colonizers in the American continent. Furthermore, some medicinal properties have also been accredited to this type of honey (Enríquez, Yurrita, Aldana, Ocheita, Jáuregui & Chau, 2005 and Biluca et al., 2014). However, information about the use of SPME and the volatile profile of honeys produced by stingless bees are still missing.

In this context, this study aimed to characterize the volatile profile of monofloral honeys produced by stingless bees - jandaíra (*Melipona subnitida* Ducke) and uruçu (*Melipona scutellaris* Latrelle), from native floral sources that are typically found in the Brazilian semiarid region. The work also involves the optimization of SPME technique for volatile extraction using the response surface methodology (RSM). This type of information will shed more light on the chemistry of these natural resources, which are still relatively unknown, and will also help with the characterization of the floral and geographical identities of the honeys which are produced exclusively in this region.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Sample Acquisition

The samples of honey obtained from stingless bees *M. subnitida* Ducke (jandaíra) were produced by the floral sources of chanana (*Turnera ulmifolia* L.), malícia (*Mimosa quadrivalvis* L.) e algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC). Meanwhile, the samples of honey produced by stingless bees urucu (*Melipona scutellaris* Latrelle) used the floral sources of chanana (*Turnera ulmifolia* L.), malícia (*Mimosa quadrivalvis* L.) and angico (*Anadenanthera colubrina*). The honey was obtained directly from meliponary located in the semiarid region of Northeastern Brazil (Seridó region, state of Rio Grande do Norte (-06°46'14''S, -36°44'00''W) and Agreste region of state of Paraíba (7°10'15''S, 35°51'14''W). The honey was collected directly from beehives by suction with the aid of disposable syringes. After collection, the honey was stored for a period not exceeding 30 days in sterilized glass jars at 4°C until analysis.

2.2 Melissopalynological Analysis

For this analyses, 10 g of each honey sample were diluted in 20 mL of distilled water and then centrifuged at 4000 g for 20 min. The sediment was dried at 40 °C and then mounted with Entellan Rapid (Merck, 1.07961). The honeydew elements and pollen grains (n ¼ 500) were counted and identified in 20 distinct optical areas using an optical microscope (Nikon Optiphot II microscopio; 400 and 1000) (Barth, 1989). The pollen grains were compared to reference images of the University of São Paulo, São Paulo, Brazil. All samples contained more than 65% pollen grains of the same botanical origin.

2.3 Selection of fibre coating and reagents

Prior to the optimization of SPME conditions for the analysis of volatile components, screening was performed to select the fibre. Fibres were purchased from Supelco (Bellofonte, PA, USA). Four fibres were tested and compared: divinyl benzene / Carboxen / Polydimethylsiloxane (DVB / CAR / PDMS) 50/30 µm; polydimethylsiloxane (PDMS) 100 µm; Polyacrylate (PA) 85 µm and polydimethylsiloxane / divinylbenzene (PDMS / DVB), 65 µm. Prior to extractions, each extraction fibre was conditioned according to manufacturer's prescription. To test the ionic strength of the extraction medium, which was performed under optimized and

validated conditions, sodium chloride (NaCl) (Ecibra, Brazil) was used at concentrations of 1, 5, 10 and 20%.

2.4 Experimental design

To optimize the extraction by HS-SPME, a central composite rotational design (CCRD) was used, in which three independent variables were analyzed: equilibrium time (X_1), extraction time (X_2) and extraction temperature (X_3): The design included seventeen trials which comprised eight factorial points, six axial points and three replicates of the central point for knowing the experimental error associated with measurements. Table 1 illustrates the planning matrix used in this study. The response surface model was elaborated using the following equation:

$$Y = \sum \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

where Y is the response value predicted by the model; β_0 is the mean coefficient and β_i , β_{ii} and β_{ij} are the linear, quadratic and interaction coefficients, respectively. In this model, x_1 , x_2 and x_3 are the independent variables. The model was tested for lack of fit using the F test through the Analysis of Variance (ANOVA), determination coefficient (R^2) and t test of coefficients relating to their standard errors. Responses or dependent variables used were total area (Y1), number of peaks (Y2), hotrienol (Y3) safranal (Y4) and ethyl acetate (Y5). To confirm the predictions of the mathematical model for the profile of volatile compounds, experiments were performed in quadruplicate using the optimized parameters via MSR. The experimental design and data analysis were performed using Statistic software v. 7 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

2.5 Extraction of volatile compounds by HS-SPME

Samples were prepared by mixing 10 g of honey in 10 ml of Milli-Q in 60 ml vials sealed with polytetrafluoroethylene silicone septum (Supelco, Bellenfont, PA, USA). The system was submitted to heating of T_{ex} (30-60°C) in water bath for t_{eq} (10-20 minutes) before fibre exposure. Prior to extractions, the extraction fibre was conditioned to the gas chromatograph injector at temperature of 250°C for 30 min. After the heating period, the SPME fibre was exposed to the headspace, gas phase above the honey sample, t_{ext} (15 - 45 minutes) under magnetic stirring at 700 rpm. Then, the fibre

was retracted into the needle and transferred to a gas chromatograph injector where analytes were desorbed.

2.6 Gas Chromatography Mass Spectrometry

For separation and identification of compounds extracted from honeys, Agilent 7890A gas chromatograph coupled to Agilent 5975C mass detector and HP-5 column (30m x 0.25 mm x 0.5 μ m) was used. The temperature programming of the gas chromatograph oven started at 40°C for 2 min, followed by a 2°C / min ramp up to 60°C, 3°C / min up to 90°C and 4°C / min up to 240°C, maintaining this temperature for 10 minutes. The injector temperature was maintained at 250°C and detector temperature at 250°C. Helium was used as carrier gas at constant flow rate of 1.0 mL / min gas. Mass spectrometer was operated by electron impact at source temperature of 200°C and ionization energy of 70V and scan range from m/z 29 to m/z 400 at 3.33 scan/s. The identification of volatile compounds was based on the comparison of their mass spectra with spectra of compounds previously analyzed, with NIST / EPA / NIH Mass Spectral Database (Version 2008), or spectra published in journals. To confirm the identity of each component, the linear retention index (LRI) was calculated using the retention times of a homologous series of *n*-alkanes C₈ - C₂₅ (Fluka, Sigma-Aldrich, Switzerland) and also by comparing the LRI of authentic compounds analyzed under similar conditions (Adams, 2008, Rivellino, Hantao, Risticevic, Carasek, Pawliszyn & Augusto, 2013, Karabagias, Badeka, Kontakos, Karabournioti & Kontominas, 2014 and Jerkovic & Kus, 2014).

2.7 Statistical Analysis

The statistical analysis of the volatile data was performed using an analysis of variance (ANOVA), the Tukey test was used to compare variation among the means using the Statistical Analysis System (SAS®, 2015). Principal component analysis (PCA) was used in order to visualise the variation between the analyzed compounds and samples, using the Multi-Variate Statistical Package (MVSP v.3.13).

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 The SPME fibre choice

Four SPME fibres were tested: PDMS, PDMS/DVB, DVB/CAR/PDME and PA. The PDMS/DVB fibre was selected considering the significant amount of extracted volatile compounds, since fifty-seven compounds were extracted, eluted and identified in this fibre, compared to only seventeen compounds in PDMS fibre, thirty-two compounds in PA fibre and thirty-nine in DVB/CAR/PDMS fibre.

The PDMS/DVB fibre was also desorbed at different times (1 min, 5 min, 10 min) in the injector at 250°C in order to determine the best desorption time through the comparison of the peak areas of some compounds, performing a blank after each analysis to verify the presence of some residual analyte in the GC-MS system. A desorption time of 5 minutes is enough to completely remove all volatiles from the fibre.

3.2 Optimization of SPME parameters using response surface

The HS-SPME technique is based on the equilibrium of analytes between the three phases (fibre coating, headspace and sample), greatly influenced by the vapour pressure of the sample in the vial (Ma, Hamid, Bekhit, Robertson & Law, 2013). The main factors that influence the vapour pressure and equilibrium of volatile compounds are: extraction temperature, equilibrium time and extraction time (Zhang, Gao, Zhang, Shi & Xu, 2009). Thus, these three factors were chosen and optimized based on the total area, number of peaks, and area of some important volatile compounds.

The regression coefficients and R^2 estimated for the response variables as well as the proposed models are shown in Table 2. Each response (Y) was evaluated for the main, quadratic and interaction effects of equilibration time (X_1), extraction time (X_2) and extraction temperature (X_3).

For the number of peaks (Y_1) and total area (Y_2), the results showed that the linear terms of variables extraction time and extraction temperature were statistically significant at significance level of 5% ($p < 0.05$). ANOVA showed significance ($p < 0.05$) for the regression models obtained and the lack of fit was not significant, showing that the models are predictive. The determination coefficients (R^2) obtained indicate that the model can explain up to 89% of the variability of responses of the two

dependent variables, suggesting that the empirical model fits the actual data satisfactorily, defining the actual behaviour of the system.

For response variables Hotrienol (Y_3), Safranal (Y_4) and Ethyl Acetate (Y_5), the analysis of variance indicated that the proposed model were significant and the determination coefficients (R^2) obtained for the responses were 0.94, 0.92 and 0.93, respectively, indicating a good fit of data to regression models. Interactions between variables were not observed.

With respect to the equilibrium time (X_1), the results showed that in the domain studied (7-23 min), this independent variable showed no significant change at significance level of 5% ($p < 0.05$) in the analytical signal generated, that is, area of chromatographic peaks and number of peaks. Apparently, sample volatilization and the analyte equilibrium between phases (liquid sample and headspace) occurred quickly, but the enrichment in the headspace is slow and the concentration differential of this enrichment in the gas phase is small, not significantly contributing to increase the total area of the chromatogram. So, for this factor, the level of the centre point (15 min) was adopted for the construction of response surfaces. This time is sufficient to ensure that the sample reaches the operating temperature and to ensure the equilibrium of the analyte between the liquid and gas phases of the sample prior to exposure of the fibre to the sample headspace.

On the other hand, the extraction time (X_2) showed significant linear effects for most responses studied, except for ethyl acetate. According to results, the extraction time is shown a variable with positive effect, i.e., responses increase when the variable goes from the lowest level to the highest level. However, for Ethyl Acetate, within the domain studied, there was no significant change in the analytical signal generated.

The extraction temperature (X_3) was the most significant parameter ($p < 0.05$) with a strong positive influence on the linear terms, on the total area of the chromatogram and number of peaks. The extraction temperature was an important parameter that influences the desorption of analytes from the matrix to the headspace, especially in the case of heavier / semi-volatile compounds, and also influences the diffusion of analytes through the fibre coating.

As can be seen through the response surfaces (Figure 1), the different compounds present in the sample showed different behaviour with respect to temperature. For the most volatile compound, ethyl acetate, only the extraction temperature showed significant effect at 95% confidence level ($p < 0.05$), and the best

responses were obtained using lower temperatures. For hotrienol and safranal, the linear and quadratic effects were significant. These compounds are more difficult to be released from the sample matrix, thus requiring higher temperature and longer extraction time to be efficiently extracted. It is well known that heating provides energy for analyte molecules to overcome the barriers that bind it to the matrix, improving the mass transfer process by increasing the vapor pressure of analytes and favoring their release into the headspace. However, as the absorption of analytes by the fibre coating is an exothermic process, the partition coefficient decreases with increasing temperature, adversely affecting the absorption of analytes (Ma et al., 2013).

Lower extraction temperatures favour the capture of more volatile compounds by SPME fibre and higher temperatures lead to an increase in the concentration of semi-volatile compounds in the headspace (Bianchin et al., 2014). Thus, an intermediate temperature is usually adopted as the best condition, even with a consequent reduction in the amount extracted for both groups of volatile and semi-volatile compounds.

The estimation of the optimal conditions for the extraction of volatiles in honey from stingless bees using the HS-SPME technique was performed based on the proposed statistical models and with the aid of the simultaneous optimization technique called "desirability function". According to Figure 2, the point determined by the desirability function to obtain the maximum value of responses was: extraction temperature of 45°C, extraction time of 45 min and equilibration time of 15 minutes. The vertical dashed lines, as can be seen in the last row of graphs, indicate the best conditions for maximum overall desirability, which reached 0.529.

3.3 Model validation and effect of the ionic strength

From the determination of the optimum conditions for extraction of volatiles by HS-SPME for the matrix under study, the optimal points were reproduced in quadruplicate, and the predicted results and those observed by experimental validation trials are shown in Table 3. For variables Y_1 , Y_2 , Y_4 and Y_5 , the experimental results are similar to predicted results. However, for variable Y_3 , greater imprecision of the model in predicting the experimental data was observed. This prediction error is mainly due to the simplicity of the statistical model that had extraction temperature factor (X_3) as only significant term. Despite the existence of deviations between experimental and predicted results, it could be considered that the results obtained in the validation test were satisfactory.

Results regarding the effect of the ionic strength on the extraction efficiency of volatiles showed that salt had no expected effect in the salting-out, i.e., to saturate the sample and decrease the solubility of hydrophobic compounds in the aqueous phase, favoring the extraction of analytes (Table 3). Thus, it was decided not to include NaCl in the HS-SPME process. The addition of salt is only advantageous in the determination of some individual analytes, in particular alcohols and acids, especially if they occur as trace amounts (Plutowaska, Chmiel, Dymerski & Wardencki, 2011).

3.4 Profile of volatile compounds

The use of gas chromatography associated with mass spectrometry (GC-MS) allowed the detection of 114 compounds in the headspace of honey from stingless bees. Terpenes were the main class of volatile compounds found in honey – a total of 48 were detected. The terpenes were accompanied by the following compounds: 14 esters, 11 norisoprenoids, 11 benzene compounds, 7 furans, 5 ketones, 4 hydrocarbons, 4 alcohols, 4 aromatic aldehydes, 3 aldehydes, 2 acids and 1 sulfur compound. There were terpenes in all of the honeys evaluated, while the acids and the sulfur compound were only found in the honey obtained from algaroba (Figure 3).

Among the 114 identified volatile compounds, only the monoterpenes hotrienol and cis-linalool oxide, both derivatives from linalool, were found in all honey samples. The hotrienol may occur in a natural manner in the honey; however, due to the beehives conditions, such as temperature, pH and enzymatic action, its concentration may increase very significantly during the honey production by oxidative degradation of linalool or even by the cleavage of glycosidic linkages. Hotrienol can also be derived from 2,6-dimethyl-3,7-octadien-2,6-diol, from the allylic rearrangement of 3,7-dimethyl-1,7-octadien-3,6-diol or the dehydration of (E)- and (Z)-8-hidroxilinalol (Alissandrakis, Tarantilis, Harizanis & Polissiou, 2007 and Jerković & Marijanović, 2010). The cis-linalool oxide is formed from the 6,7-linalool via epoxilinalol. This transformation requires the action of an enzyme secreted by bees, probably a hydroxylase. Some linalool derivatives, as the linalool oxide, can also be produced during the storage of honey (Alissandrakis, Mantziaras, Tarantilis, Harizanis & Polissiou, 2010 and Gašić et al., 2015).

In the sample of honey produced by urucu bees from malícia, a total of 33 compounds were identified. The volatile chemical profile of this samples is characterized primarily by the presence of terpenes (90.9 % of the total chromatogram

area), followed by norisoprenoids (2.8 %), alcohols (2.2 %) and other minority compounds. Meanwhile, in the sample of honey produced by jandaíra bees, also from malícia sources, 35 compounds were identified. Once more, the predominant class of compounds were terpenes (85.5 % of the total area). The two different honeys produced using malícia (by jandaíra bees and by urucu bees) had a total of 21 compounds in common.

As for the analysis of the honeys produced using chanana as the floral source, 41 compounds were detected in the honey produced by jandaíra bees, while the honey generated by urucu presented 55 compounds in total. Those two honeys had 36 compounds in common. It can be observed that terpenes were once again predominant, occupying 54.5 % and 70.3 % of the total chromatogram area, in the urucu and jandaíra honeys, respectively. The chemical profile of these samples was also characterized by the class of norisoprenoids, which represented 17.8 % of the total area in urucu-made honey, and 7.5 % in jandaíra-made honey.

In the analysis of the honey sample produced by jandaíra bees from algaroba sources, 32 compounds were detected. Terpenes accounted for 42% of the total chromatogram, while norisoprenoids and alcohols occupied 16 % and 11 % respectively.

In the honey generated by urucu bees from angico plants, 15 compounds were identified. They belonged to the following classes: benzene derivatives (41.4 %), terpenes (22.3 %), furans (18.9 %) and aromatic aldehydes (17.4 %).

The chemical classes present in the aroma of the honey samples analyzed were submitted to principal component analysis (PCA) (Figure 4). The principal components (PC) I e II accumulated 71% of the variation which took place between the samples. In this figure, the chemical classes are represented by vectors whose size is associated with the importance of that class to the segmentation of samples. The direction of the vectors indicates in which samples that chemical class displays a greater influence (Biasoto, Netto, Marques & Silva, 2014). The samples are represented by black circles.

Figure 4 reveals the separation of honeys with different botanical origins. The honey produced by urucu bees using angico, located in the negative axis of PC I, distanced itself from the other samples and was characterized by a higher concentration of furans and aromatic aldehydes. The sample of honey produced by jandaíra bees using algaroba as a floral source also distanced itself from the other honeys, being mostly

influenced by the class of sulfur compounds and being located in the negative axis of PC I and II.

The honeys produced by the different bee species using chanana plants were located in the positive axis of PC I and II, drawing closer due to the influence of terpenes, norisoprenoids, esters, alcohols and hydrocarbons. However, the fact that the urucu-made sample occupies the farthestmost region to the right of axis 1 in Figure 4 indicates that this sample displayed a higher concentration of the aforementioned compounds, when compared to the jandaíra-made honey.

The honeys obtained from malícia plants displayed very similar profiles to one another, which were distinct from the profiles of honeys produced using other botanical sources. The malícia honeys were characterized by the high influence exerted by the ketone class.

The volatile compounds found in honey belong to various classes, including hydrocarbons, aldehydes, alcohols, ketones, acids, esters, benzene and its derivatives, furan and pyran, norisoprenoids, terpenes and its derivatives, and cyclic compounds (Barra et al., 2010). However, only compounds derived from plants and its metabolites (terpenes, norisoprenoids, benzenes and its derivatives) should be used to identify the floral origin of honey (Manyi-Loh et al., 2011).

The honeys generated from malícia plants were marked by a number of different compounds; for urucu-made honey, the most abundant compounds were linalool (53.1 %), cis-Linalool oxide (23.7 %) and hotrienol (4.3 %). Meanwhile, in the jandaíra-made honey, the most plentiful compounds were linalool (47.6 %), cis-Linalool oxide (16.4 %), nerol oxide (8.2 %) and hotrienol (5.2 %). These compounds have been frequently reported in studies as being the main constituents of the volatile profile of honey, regardless of the geographical origin (Castro-Vázquez, Pérez-Coelho & Cabezudo, 2003, Soria, Martinez-Castro & Sanz, 2003 and Špánik, Pažitná, Šiška & Szolcsányi, 2014). Cis-linalool oxide (furanoid) detected in honeys from cashew and quince trees native to Northeastern Brazil (Moreira, Trugo, Pietroluongo & Maria, 2003). Linalool and its derivatives, such as hotrienol, cis-linalool and trans-linalool oxides (piranoid), and lilac aldehydes were all mentioned as volatile compounds which can mark the floral origin of citric honeys collected in Greece (Alissandrakis et al., 2007). In a similar study, Castro-Vazquez, Díaz-Maroto and Pérez-Coelho (2007) characterized 10 Spanish citric honeys based on their volatile profile, and suggested compounds such as linalool, linalool oxide, μ -terpineol, lilac aldehyde and lilac alcohol isomers, methyl anthranilate

be considered floral markers for citric honeys. High levels of linalool oxides, linalool, hotrienol, epoxylinalool, and 2,6-dimethyl-3,7-octadiene-2,6-diol, whose concentrations exceed their detection threshold, are responsible for sweet and floral notes in honey (Castro-Vazquez, Díaz-Maroto, Torres & Pérez-Coelho, 2010).

The monoterpene D-Sylvestrene was the main compound in the two different honeys produced from chanana. Even though this floral origin monoterpene is not commonly found in honeys, its presence may not be a differentiator for honeys made from chanana because this terpene was also found in the honeys produced using the botanical source malícia. Possibly a study with a larger number of samples from various crops, could validate the results of this study, considering that the concentrations could be as significant as found here. The compounds 4-methyl-1-methoxybenzene and formamidobenzene are benzene derivatives not described in the Brazilian honeys, they were compounds only detected in honeys obtained in flowering chanana. Terpenes such as eucarvona, α -copaene, β -elemene, β -eudesmeno, δ -selinene, globulol and humulano-1,6-dien-3-ol were also found only in chanana honeys produced by two species of bees.

Rose oxide (22.9 % of the total chromatogram) was the most abundant compound found in algaroba honey. This monoterpene is found in flowers, fruit and in essential oils from *Eucalyptus citriodora*, *Dracocephalum heterophyllum*, Damask rose, geranium, *Laggera* spp., and tropical fruit (Babu, Sing, Joshi & Sing, 2002, Taneja, Sethi, Andotra, Koul & Qazi, 2005 and Nonato et al., 2012). It contributes to the fruit and floral notes found in fruit such as lychee and grapes, and has also been synthesized from citronellol for industrial purposes, due to its characteristic rose aroma (Alsters, Jary, Nardello-Rataj & Aubry, 2010). Cis-rose oxide has been proposed as a marker for honey from *Tilia cordata* (Santos, Moreira & de Maria, 2015). This is the first time that rose oxide has been reported in Brazilian honey. Even though in literature no data were found regarding the volatile composition of algaroba honey, rose oxide can be considered a differentiator for this particular honey, since it is not commonly found in other honeys (being absent in the other samples analyzed) and it also comes from a botanical source and appears in high concentrations.

Cinnamaldehyde, isobutyl isothiocyanate, 4-oxoisoforone, β -ionone epoxide, 1-adamantanol and verbenone were detected only in the algaroba honey and may be indicated as possible markers. Floral compounds such as α -terpinene, ocimene, 1,1,6-trimethyl-1,2-diidronaftaleno and ethyl linalool were also only detected in alagaroba

honey mesquite, however they are not considered markers for the algaroba honey, since they have been detected in other honey varieties.

The main compound in the honey made from angico was benzenethanol, which reached 40% of the total chromatogram area. While studying tropical honeys produced by *Apis mellifera* bees using angico plants native to the Atlantic Forest, Santos, Moreira and de Maria (2015) detected benzenethanol as the second most abundant compound, contributing to floral and spicy notes. Benzenethanol has been considered an important odorant for the aroma of tília honey (*Tilia* sp.) and haze honey (*Corylus* sp.), both from Europe (Blank, Fischer & Grosch, 1989), it also contributes to the aroma of honeys made from cashew trees found in the Caating biome (Moreira et al., 2003) and to the aroma of honey made using morrão de cadeia (Atlantic Forest biome) and assa-peixe (Cerrado biome) (Matos, Moreira, Maria & Trugo, 2002).

The compounds 5-hydroxymethylfurfural, 2,5-dimethyl furan, furfural, 2-furanmetanol and furaneol were only present in the angico and/or algaroba honeys. These compounds are considered a negative indicator of the honey's quality, possibly having been generated by the excessive heating of the sample. However, some authors state that HMF can naturally occur in honey, especially in regions with a hot climate (Castro-Vázquez, Díaz-Maroto & Pérez-Coello, 2012).

4. CONCLUSION

Through the results obtained, it was observed that the botanical source had a strong influence on the volatile profile of monofloral honeys produced by two stingless bees (jandaíra and uruçú) from the semiarid region of Northeastern Brazil. The chemical profiles were marked primarily by the classes of terpenes, norisoprenoids and benzene derivatives. Furthermore, the results obtained suggest the existence of differentiator compounds and potential markers for the botanical sources evaluated, such as linalool for malícia honey, D-sylvestrene for chanana honey, rose oxide for algaroba honey and benzenethanol for angico honey. These reports represent a valuable contribution to certifying the authenticity of those honeys and provides for the first time, information intended for the construction of chemical knowledge of the aroma and flavor that characterize these honeys produced in Brazil. In addition, we recommended as the optimum conditions for the extraction of volatiles using SPME in honey from native

stingless bees were: fibre coating PDMS / DVB; equilibrium time of 15 minutes; extraction time of 45 min and extraction temperature of 45°C.

REFERENCES

- Adams, R. P. (2008). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. (4th ed.). Illinois: Allured Publ., Carol Stream.
- Aliferis, K. A., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., & Alissandrakis E. (2012). Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprint of headspace volatile compounds. *Food Chemistry*, 121, 856–862.
- Alissandrakis, E., Mantziaras, E., Tarantilis, P.A., Harizanis, P.C., & Polissiou, M. (2010). Generation of linalool derivatives in an artificial honey produced from bees fed with linalool-enriched sugar syrup. *European Food Research and Technology*, 231, 21–25.
- Alissandrakis, E., Tarantilis, P. A., Harizanis, P. C., & Polissiou, M., (2007). Aroma investigation of unifloral Greek citrus honey using solid-phase microextraction coupled to gas chromatographic–mass spectrometric analysis. *Food Chemistry*, 100, 396–404.
- Alsters, P. L., Jary, W., Nardello-rataj, V. R., & Aubry, J. M. (2010). “Dark” singlet oxygenation of β -citronellol: a key step in the manufacture of rose oxide. *Organic Process Research & Development*, 14, 259–262.
- Babu, K.G.D., Singh, B., Joshi, V.P.V., & Singh, V. (2002). Essential oil composition of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) distilled under different pressures and temperatures. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 136–140.
- Barra, M. P. G., Ponce-díaz, M. C., & Venegas-gallegos, C. (2010). Volatile compounds in honey produced in the Central Valley of Ñuble Province, Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 70, 75–84.
- Barth, O. M. (1989). *Pollen in Honey Brazilian*, (1st ed.). Rio de Janeiro: Gráfica Luxor.
- Bianchin, J. N., Nardini, G., Merib, J., Dias, A. N., Martendal, E., & Carasek, E. (2014). Screening of volatile compounds in honey using a new sampling strategy combining multiple extraction temperatures in a single assay by HS-SPME–GC–MS. *Food Chemistry*, 145, 1061–1065.
- Biasoto, A. C. T., Netto, F. M., Marques, E. J. N., & Silva, M. A. A. P. (2014). Acceptability and preference drivers of red wines produced from *Vitis labrusca* and hybrid grapes. *Food Research International*, 62, 456–466.
- Biluca, F. C., Betta, F. D., Oliveira, G. P., Pereira, L. M., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2014). 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. *Food Chemistry*, 159, 244–249.
- Blank, K. H., Fischer, W., & Grosch, Z. (1989). Intensive neutral odorants of linden honey. Differences from honeys of other botanical origin. *Lebensm Unters Forsch*, 189, 426–428.

- Cacho, J. I., Campillo, N., Viñas, P., & Hernández-Córdoba, M. (2015). Evaluation of three headspace sorptive extraction coatings for the determination of volatile terpenes in honey using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1399, 18–24.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., & Pérez-Coello, M. S. (2012). Changes in the volatile fractions and sensory properties of Heather honey during storage under different temperatures. *European Food Research and Technology*, 235, 185–193.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., & Pérez-Coello, M. S. (2007). Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. *Food Chemistry*, 103, 601–6.
- Castro-vazquez, L., Diaz-maroto, M.C., Torres, C., & Perez-coello, M.S. (2010). Effect of geographical origin on the chemical and sensory characteristics of chestnut honeys. *Food Research International*, 43, 2335–2340.
- Casto-vásquez, L., Pérez-coelho, M. S., & Cabezudo, M. D. (2003). Analysis of Volatile Compounds of Rosemary Honey: Comparison of Different Extraction Techniques. *Chromatographia*, 57, 227–233.
- Enríquez, E., Yurrita, C., Aldana, C., Ocheita, J., Jáuregui, R., & Chau, P. (2005). Conocimiento tradicional acerca de la biología y manejo de abejas nativas sin aguijón em Chiquimula. *Agricultura*, 8, 27–30.
- Gašić, U.M., Natić, M.M., Mišić, D.M. Lušić, D.V., Milojković-Opsenica, D.M., Tešić, Ž.L., & Lušić, D. (2015). Chemical markers for the authentication of unifloral *Salvia officinalis* L. honey. *Journal Food Composition and Analysis*, 231, 128–138.
- Jerkovic, I., & Kus, P. M. (2014). Terpenes in honey: occurrence, origin a- their role as chemical biomarkers. *The Royal Society of Chemistry*, 4, 31710–31728.
- Jerković, I., & Marijanović, Z. (2010). Volatile composition screening of *Salix* spp. Nectar honey. Benzenecarboxylic acids, norisoprenoids, terpenes and others. *Chemistry & Biodiversity*, 7, 2309–2325.
- Karabagias, I. K., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S., & Kontominas, M. G. (2014). Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chemistry*, 146, 548–557.
- Ma, Q. L., Hamid, N., Bekhit, A. E. D., Robertson, J., & Law, T. F. (2013). Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass spectrometry (GC–MS) analysis of aroma compounds in cooked beef using response surface methodology. *Microchemical Journal*, 111, 16–24.
- Manyi-loh, C. E., Ndip, R., & Clarke, A. M. (2011). Volatile Compounds in Honey: A Review on Their Involvement in Aroma. Botanical Origin Determination and Potential Biomedical Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 9514–9532.
- Matos, L. M. C., Moreira, R.F.A, Maria, C.A.B, & Trugo, L.C. (2002). Aroma compounds in morrão de candeia (*Croton* sp.) and assa-peixe (*Vernonia* sp.) honey. *Italian Journal of Food Science*, 14, 267–278.

- Mendes, Goncalves, B., & Camara, J. J. (2012). Effectiveness of high-throughput miniaturized sorbent- and solid phase microextraction techniques combined with gas chromatography-mass spectrometry analysis for a rapid screening of volatile and semi-volatile composition of wines a comparative study. *Talanta*, 88, 79–94.
- Moreira, R. F. A., Trugo, L. C., Pietroluongo, M., & Maria, C. A. (2003). Flavor composition of cashew (*Anacardium occidentale*) and Marmeleiro (*Croton* Species) honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7616–7621.
- Nonato, F. R., Santana, D. G., Melo, F. M., Santos, G. G. L., Brustolim, D., Camargo, E. A., Sousa, D. P., Soares, M. B. P., & Villarreal, C. F. (2012). Anti-inflammatory properties of rose oxide. *International Immunopharmacology*, 14, 779–784.
- Plutowaska, B., Chmiel, T., Dymerski, T., & Wardencki, W. (2011). A headspace solid-phase microextraction method development and its application in the determination of volatiles in honeys by gas chromatography. *Food Chemistry*, 126, 1288–1298.
- Rivellino, S. R., Hantao, L.W., Risticvic, S., Carasek, E., Pawliszyn, J., & Augusto F. (2013). Detection of extraction artifacts in the analysis of honey volatiles using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Food Chemistry*, 141, 1828–1833.
- Santos, A., Moreira, R. F. A., & De Maria, C. A. B. (2015). Study of the principal constituents of tropical angico (*Anadenanthera* sp.) honey from the atlantic forest. *Food Chemistry*, 171, 421–425.
- Seisonen, S., Kivima, E., & Vene, K. (2015). Characterisation of the aroma profiles of different honeys and corresponding flowers using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry. *Food Chemistry*, 169, 34–40.
- Silva, T. M. S., Santos, F. P., Evangelista-Rodrigues, A., Silva, E. M. S., Silva, G. S., Novais, J. S., Santos, F. D. A. R., & Camara, C. (2013). A. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29, 10–18.
- Soria, A. C., Martinez-castro, I., & Sanz, J. (2003). Analysis of volatile composition of honey by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 26, 793–801.
- Špánik, I., Pažitná, A., Šiška, P., & Szolcsányi, P. (2014). The determination of botanical origin of honeys based on enantiomer distribution of chiral volatile organic compounds. *Food Chemistry*, 158, 497–504.
- Soria, A. C., Martínez-Castro, I., & Sanz, J. (2008). Some aspects of dynamic headspace analysis of volatile components\Q1Q' in honey. *Food Research International*, 41, 838–848.
- Sousa, J. M. B., Souza, E. L., Marques, G., Benassi, M. T., Gullón, B., Pintado, M. M., & Magnani, M. (2016). Sugar profile. physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 645–651.
- Taneja, S. C., Sethi, V. K., Andotra, S. S., Koul, S., & Qazi, G. N. (2005). Rose oxides: a facile chemo and chemo-enzymatic approach. *Synthetic Communications*, 35, 2297–2303.

Verzera, A., Tripodi, G., Condurso, C., Dima, G., & Marra, A. (2014). Chiral volatile compounds for the determination of orange honey authenticity. *Food Control*, 39, 237-243.

Zhang, Y., Gao, B., Zhang, M., Shi, J., & Xu, Y. (2009). Headspace solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry analysis of the volatile components of longan (*Dimocarpus longan* Lour.). *European Food Research and Technology*, 229, 457–465.

Table 1 - Standard Matrix for experiments conducted in the 2⁴ full factorial design

Experiments	Coded			Uncoded		
	T _{eq} (min)	T _{ex} (min)	T _{ex} (°C)	T _{eq} (min)	T _{ex} (min)	T _{ex} (°C)
1	-	-	-	10	15	30
2	+	-	-	20	15	30
3	-	+	-	10	45	30
4	+	+	-	20	45	30
5	-	-	+	10	15	60
6	+	-	+	20	15	60
7	-	+	+	10	45	60
8	+	+	+	20	45	60
9	0	0	0	15	30	45
10	0	0	0	15	30	45
11	0	0	0	15	30	45
12	- α	0	0	7	30	45
13	+ α	0	0	23	30	45
14	0	- α	0	15	5	45
15	0	+ α	0	15	55	45
16	0	0	- α	15	30	20
17	0	0	+ α	15	30	70

Table 2 - Models proposed and R² of the final reduced models

Variables	Regression Equation	R ²
Number of Peaks (Y ₁)	$44,64 + 11,03x_2 + 12,02x_3$	0,89
Total Area (Y ₂)	$1,72E9+6,38E+8x_2+ 7,70E+8x_3$	0,89
Hotrienol (Y ₃)	$1,54E8+4,40E+7x_2+5,14E+7x_3-2,31E+7x_3^2$	0,94
Safranal (Y ₄)	$1,95E+8+5,71E+7x_2+3,67E+7x_3-3,68E+7x_3^2$	0,92
Ethyl Acetate (Y ₅)	$1,51E+8-7,36E+7x_3$	0,93

Table 3 - Predicted and experimental results obtained in optimum process conditions and with the addition of different NaCl concentrations

Response Variable	Predicted Result (*)			Validation	Experimental Results			
	-95%		+95%		NaCl 1%	NaCl 5%	NaCl 10%	NaCl 20%
Number of Peaks (Y1)	45,93	59	72,15	60	57	60	58	63
Total Area (Y2)	1,54E+9	2,50E+9	3,32E+9	2,12E+9	2,12E+9	2,10E+8	3,06E+9	3,01E+9
Ethyl Acetate (Y3)	1,05E+8	1,51E+8	1,97E+8	8,82E+7	7,82E+7	9,08E+7	1,11E+8	4,00E+7
Hotrienol (Y4)	1,68E+8	2,11E+8	2,52E+8	1,82E+8	1,69E+8	2,29E+8	2,52E+8	2,42E+8
Safranal (Y5)	2,2 E+8	2,75E+8	3,29E+8	2,57E+8	2,45E+8	3,00E+8	3,06E+8	3,13E+8

(*) Reparametrized models constructed only from statistically significant parameters.

Table 4 – Volatiles of monofloral honeys produced by diferente stingless bees (jandaíra and urucu) in the semiarid region of northeastern brazil from diferente floral sources

Compounds	LRI ²	“Peak Area Count x 10 ^{6”} ¹						p-Values
		Uruçu			Jandaíra			
		Angico	Malícia	Chanana	Algaroba	Malícia	Chanana	
ACIDS								
Ethanoic acid ³	<800	-	-	-	0,29	-	-	0,0001
Decanoic acid ⁴	1375	-	-	-	0,61	-	-	
Total		0	0	0	0,90^a	0	0	
<i>% of the chromatogram</i>		<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>4,45</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	
ALCOHOLS								
2-Heptanol ⁴	906	-	-	-	0,40	-	-	0,0001
Octanol	1050	-	4,45	4,07	-	1,10	3,94	
Nonanol ⁴	1162	-	-	6,26	1,57	-	1,52	
2-Hexadecanol ⁴	1388	-	-	-	0,35	-	-	
Total		0	4,45^{b,c}	10,3^a	2,31^{c,d}	1,10^d	5,46^b	
<i>% of the chromatogram</i>		<i>0</i>	<i>2,20</i>	<i>3,53</i>	<i>11,52</i>	<i>0,56</i>	<i>2,63</i>	
ALDEHYDES								
2-Hexenal ⁴	847	-	-	-	0,22	-	-	0,0001
Nonanal ⁴	1098	-	-	-	1,52	-	0,839	
Decanal ⁴	1192	-	-	1,02	-	-	0,763	
Total		0	0	1,02^{a,b}	1,74^a	0	1,60^a	
<i>% of the chromatogram</i>		<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0,35</i>	<i>8,67</i>	<i>0</i>	<i>0,77</i>	
AROMATIC ALDEHYDES								
Benzaldehyde ⁴	961	1,37	-	-	-	-	-	0,0001
Benzeneacetaldehyde ⁴	1031	-	-	1,08	-	-	3,44	
Lilial ⁴	1522	14,8	-	-	-	-	-	
Cumaldehyde ⁴	1232	-	-	-	0,21	-	-	
Total		16,2^a	0	1,08^b	2,05^b	0	3,44^b	
<i>% of the chromatogram</i>		<i>17,36</i>	<i>0</i>	<i>0,37</i>	<i>1,02</i>	<i>0</i>	<i>1,65</i>	
BENZENOID COMPOUOS								
Styrene ⁴	875	-	-	0,54	-	-	-	0,0059
4-Methyl-1-methoxybenzene ⁴	1007	-	-	4,44	-	-	4,51	
1-(1-methylethyl)-4-methylbenzene ⁴	1010	-	0,83	-	-	0,95	-	
1-Methyl-3-isopropylbenzene ⁴	1014	-	0,02	-	-	-	-	
o-Xylene ⁴	1089	-	0,78	-	-	-	-	
Durol ⁴	1110	-	0,69	-	-	1,14	-	
Benzeneethanol ⁴	1118	37,3	-	-	-	-	-	
Naphthalene ⁴	1174	1,3	-	-	-	-	-	
Formamidobenzene ⁴	1200	-	-	26,40	-	-	9,54	
Ethyl Guaiacol ⁴	1285	-	0,86	0,64	-	0,28	-	
2,3-Dihydro-1,1,5,6-tetramethyl-1H-indene ⁴	1305	-	-	-	-	0,91	-	
Total		38,6^a	3,19^b	32,0^{a,b}	0	3,28^b	14,0^{a,b}	
<i>% of the chromatogram</i>		<i>41,39</i>	<i>1,58</i>	<i>10,94</i>	<i>0</i>	<i>1,65</i>	<i>6,67</i>	

ESTERS								
Ethyl acetate ³	<800	-	-	1,40	0,14	4,04	0,684	
Ethyl Benzoate ⁴	1158	-	-	12,70	-	-	-	
Ethyl Octanoate ⁴	1186	-	1,68	-	0,44	2,35	-	
Ethyl 2-phenylethanoate ⁴	1233	-	0,08	8,35	-	-	-	
Phenylethyl Acetate ⁴	1236	-	0,20	-	-	-	-	
Ethyl Nanoate ⁴	1280	-	0,07	1,64	-	-	2,08	
Nonanyl Acetate ⁴	1296	-	-	2,98	-	-	-	
Methyl anthranilate ⁴	1325	-	-	0,54	-	-	3,15	
Ethyl Decanoate ⁴	1396	-	-	3,67	-	0,62	0,989	
Ethyl 3-phenyl-2-propenoate ⁴	1447	-	-	1,03	-	-	1,38	
Ethyl Dodecanoate ⁴	1595	-	-	-	-	0,46	2,88	
Ethyl Tetradecanoate ⁴	1782	-	-	0,67	-	0,36	1,55	
Ethyl Hexadecanoate ⁴	1994	-	-	0,65	-	0,72	2,81	
Ethyl Octadecanoate ⁴	2190	-	-	-	-	-	1,1	
Total		0	2,04^d	33,7^a	0,58^d	8,55^c	16,6^b	0,0001
<i>% of the chromatogram</i>		<i>0,00</i>	<i>1,01</i>	<i>11,52</i>	<i>2,90</i>	<i>4,31</i>	<i>8,00</i>	
FURANS								
Furan, 2,5-dimethyl ³	<800	-	-	-	0,07	-	-	
Furfural ⁴	836	8,26	-	-	-	-	-	
2-Furanmethanol ⁴	860	0,386	-	-	-	-	-	
Furan, 2-pentyl ⁴	998	-	-	-	0,17	-	-	
Furaneol ⁴	1052	2,28	-	-	0,12	-	-	
5-Hydroxymethylfurfural ⁴	1234	6,71	-	-	-	-	-	
6-Methyl-6-(5-methylfuran-2-yl)heptan-2-one ⁴	1432	-	-	-	0,71	-	-	
Total		17,6^a	0	0	1,07^b	0	0	0,0031
<i>% of the chromatogram</i>		<i>18,90</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>5,34</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	
HYDROCARBONS								
Hexane ³	<800	-	-	-	0,20	-	-	
Octane ⁴	800	-	-	-	0,12	-	-	
Hexadecane ⁴	1598	-	1,97	2,07	-	1,76	4,98	
Heptadecane ⁴	1693	-	-	0,89	-	-	-	
Total		0	1,97^{b,c}	2,96^{a,b}	0,32^{b,c}	1,76^b	4,98^a	0,0005
<i>% of the chromatogram</i>		<i>0</i>	<i>0,98</i>	<i>1,01</i>	<i>1,60</i>	<i>0,89</i>	<i>2,39</i>	
KETONES								
3-Buten-2-one, 3-methyl ³	<800	-	-	-	0,82	-	-	
2 Heptanone ⁴	881	-	1,13	-	-	0,07	-	
2 U0ecanone ⁴	1280	-	-	-	-	0,92	-	
2 Tridecanone ⁴	1492	-	-	-	-	0,59	-	
2 Pentadecanone ⁴	1688	-	-	-	-	0,74	-	
Total		0	1,13^b	0	0,81^b	2,32^a	0	0,0001
<i>% of the chromatogram</i>		<i>0</i>	<i>0,56</i>	<i>0</i>	<i>4,06</i>	<i>1,17</i>	<i>0</i>	
SULFUR HETEROCYCLES								
Isobutyl isothiocyanate ⁴	925	-	-	-	0,21	-	-	

Total		0	0	0	0,21^a	0	0	0,0001
<i>% of the chromatogram</i>		<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>1,06</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	
NORISOPRENOIDS								
α -Isophorone ⁴	1123	-	-	0,90	-	-	-	
4-Oxoisophorone ⁴	1137	-	-	-	0,43	-	-	
Safranal ⁴	1184	-	-	46,10	1,24	-	9,5	
β -Cyclocitral ⁴	1208	-	0,10	1,39	-	1,99	3,41	
Edulan II ⁴	1247	-	1,47	-	0,67	1,03	-	
β -Ionene ⁴	1268	-	2,33	2,14	-	6,08	1,14	
1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene ⁴	1336	-	-	-	0,23	-	-	
β -Damascenone ⁴	1368	-	0,66	1,37	-	1,57	1,45	
β -Ionone epoxide ⁴	1458	-	-	-	0,74	-	-	
Megastigmatrienone ⁴	1440	-	-	-	-	0,45	-	
Megastigma-4,6(E),8(E)-triene ⁴	1582	-	1,08	-	-	0,55	-	
Total		0	5,64^c	51,9^a	3,32^{c,d}	11,7^b	15,5^b	0,0001
<i>% of the chromatogram</i>		<i>0</i>	<i>2,79</i>	<i>17,75</i>	<i>16,51</i>	<i>5,89</i>	<i>7,46</i>	
TERPENOIDS								
3-Carene ⁴	1004	2,38	-	-	-	-	-	
α -Terpinene ⁴	1006	-	-	-	1,30	-	-	
D-Sylvestrene ⁴	1024	-	6,49	58,90	-	7,13	46,8	
Limonene ⁴	1028	1,77	-	-	-	-	-	
Ocimene ⁴	1035	-	-	-	0,23	-	-	
γ -Terpinene ⁴	1045	-	1,85	12,90	-	1,56	32,4	
1,2-Epoxylinool ⁴	1050	-	-	-	-	-	3,21	
Terpinolene ⁴	1073	-	-	4,87	-	1,86	-	
Cis-Linalool oxide ⁴	1076	10,6	47,90	5,00	0,53	32,50	1,72	
Limonene oxide ⁴	1083	-	-	1,53	-	-	-	
Linalyl anthranilate ⁴	1088	-	0,99	1,29	-	-	-	
Trans-Linalool oxide ⁴	1090	1,33	-	-	0,65	-	-	
Linalool ⁴	1091	-	107,00	-	-	94,30	-	
Hotrienol ⁴	1092	1,45	8,76	3,71	0,27	10,40	12,1	
Cosmene ⁴	1134	-	0,02	-	-	1,61	-	
Rose oxide ⁴	1116	-	-	-	4,60	-	-	
Lilac aldehyde A ⁴	1135	2,44	-	-	-	-	-	
Nerol oxide ⁴	1143	-	7,32	1,58	-	16,30	2,55	
Eucarvone ⁴	1151	-	-	12,30	-	-	2,29	
1-Adamantanol ⁴	1159	-	-	-	0,17	-	-	
p-Menth-8-en-2-ol ⁴	1164	0,881	-	-	0,16	-	-	
Ethyl linalool ⁴	1169	-	-	-	0,51	-	-	
α -Terpineol ⁴	1196	-	0,45	-	-	1,08	-	
Verbenone ⁴	1205	-	-	-	0,21	-	-	
Eugenol ⁴	1341	-	-	0,54	-	-	0,213	
α -Copaene ⁴	1357	-	-	1,24	-	-	3,07	
β -Elemene ⁴	1373	-	-	2,12	-	-	0,998	

trans-Geranic acid ⁴	1380	-	-	7,75	-	-	-	
Isoledene ⁴	1389	-	-	1,05	-	-	1,67	
Cedrene ⁴	1393	-	-	1,16	-	-	1,65	
cis-Caryophyllene ⁴	1399	-	-	15,40	-	-	8,38	
p-Menth-1(7)-en-9-ol ⁴	1403	-	-	0,95	-	1,12	-	
α -Caryophyllene ⁴	1418	-	-	10,90	-	0,68	12,2	
α -Gurjunene ⁴	1421	-	-	1,29	-	-	-	
Cyclosativene ⁴	1424	-	-	1,40	-	-	-	
Geranyl acetone ⁴	1435	-	0,39		-	-	-	
β -Farnesene ⁴	1438	-	0,51	0,78	-	-	-	
α -Muurokene ⁴	1461	-	-	1,13	-	-	-	
α -Curcumene ⁴	1463	-	0,52		-	-	-	
β -Eudesmene ⁴	1466	-	-	3,68	-	-	2,19	
δ -Selinene ⁴	1472	-	-	0,86	-	-	0,726	
γ -Muurokene ⁴	1493	-	-	0,66	-	-	-	
α -Farnesene ⁴	1498	-	0,41		-	-	3,18	
δ -Cardinene ⁴	1503	-	-	2,93	-	0,397	1,35	
cis- α -Bisabolene ⁴	1526	-	0,71	0,66	-	0,651	-	
Globulol ⁴	1573	-	-	0,27	-	-	8,96	
Humulane-1,6-dien-3-ol ⁴	1611	-	-	0,62	-	-	0,566	
α -Eudesmol ⁴	1647	-	-	1,80	-	-	-	
Total		20,9^b	184,0^a	159,0^a	8,61	170,0^a	146,0^a	0,0001
<i>% of the chromatogram</i>		<i>22,34</i>	<i>90,88</i>	<i>54,52</i>	<i>42,87</i>	<i>85,53</i>	<i>70,34</i>	

¹ Valour of peak area count x 10⁶, average data from triplicate injections

² LRI: Linear retention index

³ Compounds tentatively identified by MS

⁴ Compounds identified by MS and LRI

-: not detected

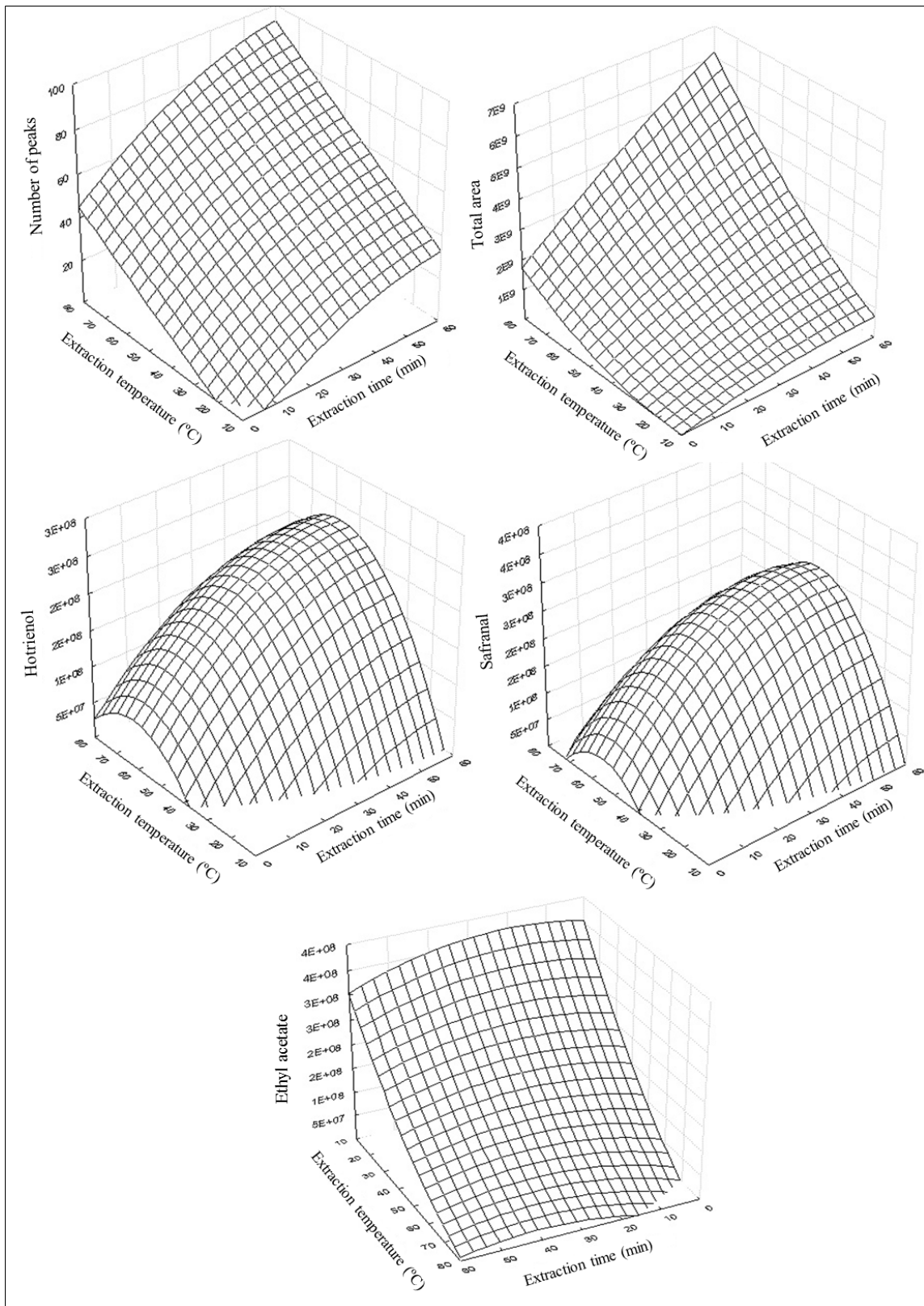


Figure 1 – Response surface obtained by optimizing variables extraction time and temperature through CCRD for responses

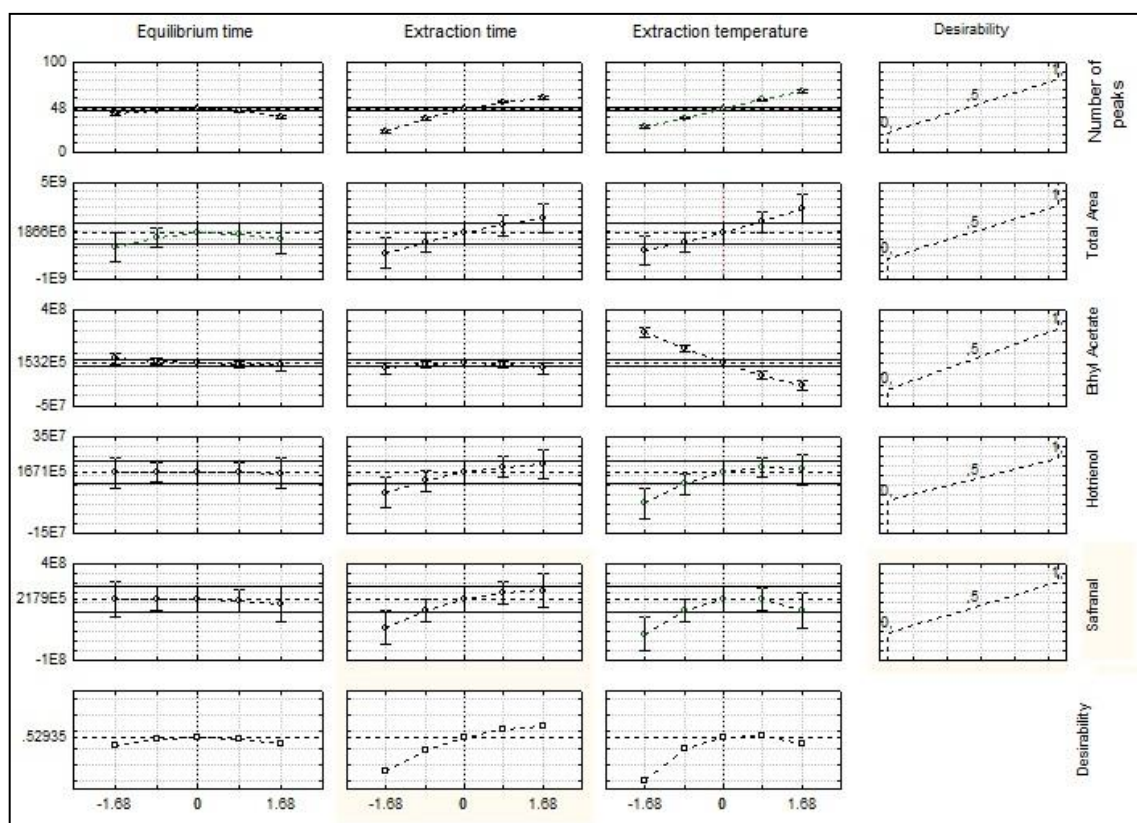


Figure 2 – Profiles of desirability and predicted values for variables: Equilibrium time (X1), extraction time (X2) and extraction temperature (X3).

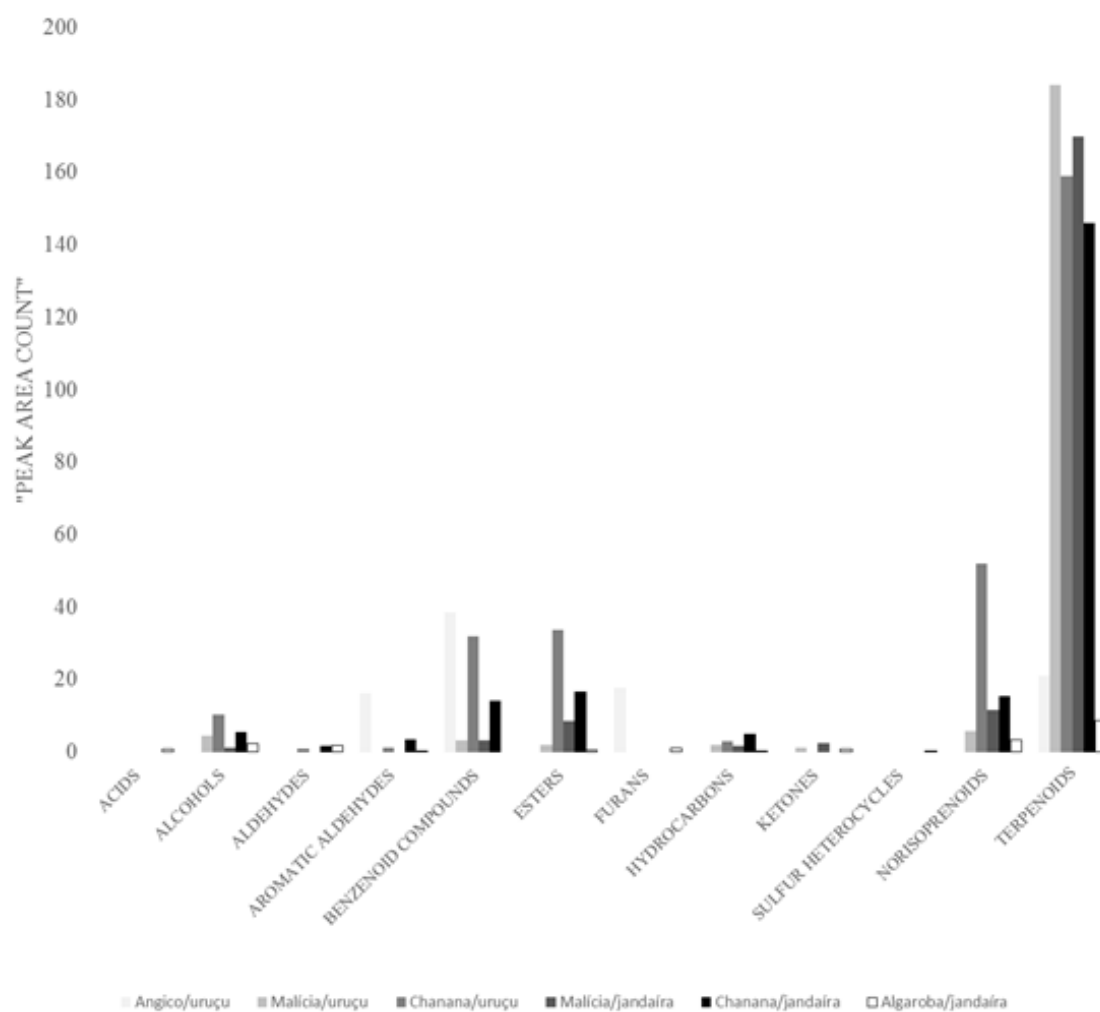


Figure 3 – Distribution of chemical classes of volatiles of monofloral honeys produced by different stingless bees (jandaíra and uruçú) in the semiarid region of Northeastern Brazil from different floral sources.

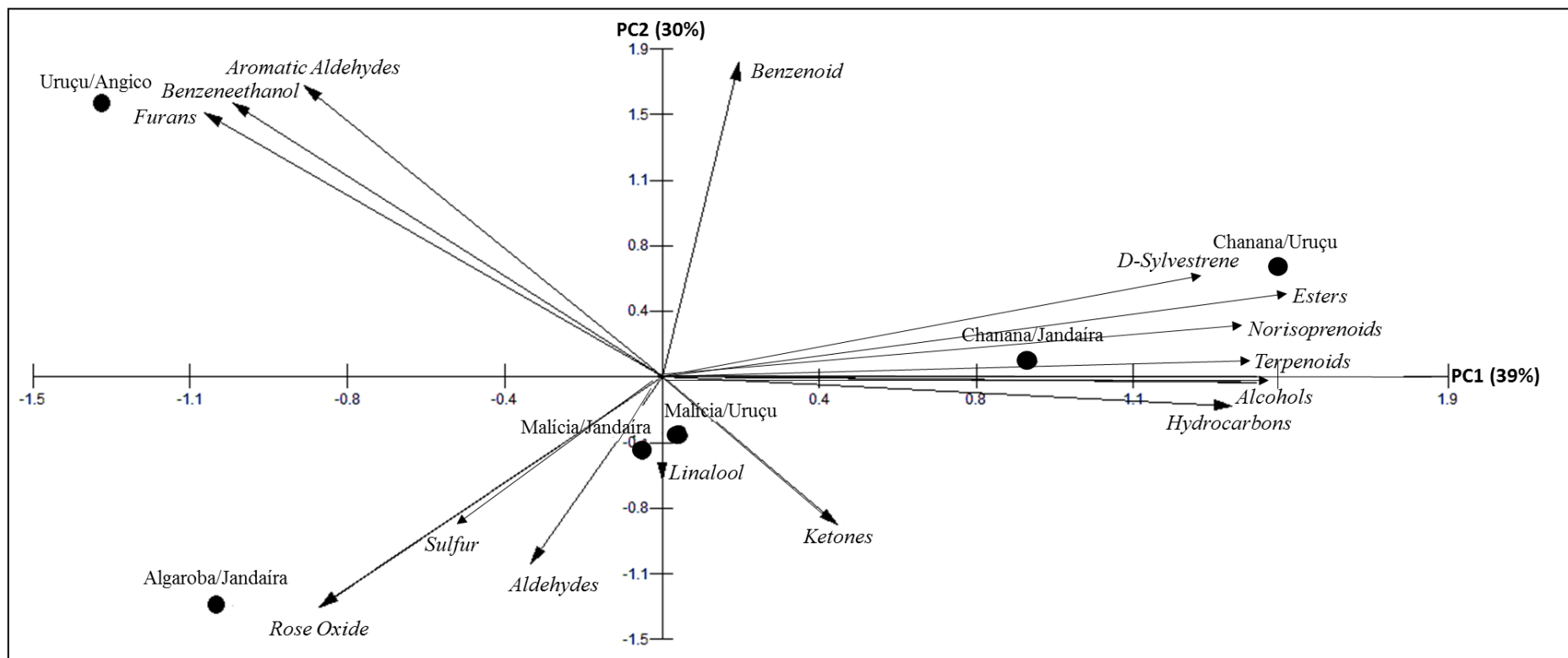


Figure 4 - Principal Component Analysis (PCA) of the chemical classes of volatiles and potential markers for the botanical of monofloral honeys produced by different stingless bees (jandaíra and uruçú) in the semiarid region of Northeastern Brazil from different floral source.

ARTIGO 2

SENSORY AND VOLATILE PROFILES OF MONOFLORAL HONEYS PRODUCED BY NATIVE STINGLESS BEES OF THE BRAZILIAN SEMIARID REGION

ABSTRACT

Monofloral honeys produced by stingless bees *M. subnitida* Ducke and *M. scutellaris* Latrelle in typical flowering of the Brazilian semi-arid *Ziziphus juazeiro* Mart (Juazeiro), *Croton heliotropiifolius* Kunth (velame branco) and *Mimosa arenosa* Willd Poir (jurema branca) were characterized in relation to volatile and sensorial profile. It identified 11 sensory descriptors and 96 volatile compounds. It was noticed a strong effect of flowering in sensorial profile and volatile of honeys. Juazeiro honey stood out with a higher characteristic aroma, taste sweet, caramel flavor and levels of aromatic aldehydes; jurema honey has been described with herb and beeswax aroma and the presence of sulfur compounds and ketones; volatile acids associated with acid taste, medicinal taste and clove aroma characterized the velame branco honey. These results demonstrate that the knowledge of the sensory and aroma profile of these honeys can contribute to characterization of its floral and geographical identity.

Keywords: Aroma; Honey; Stingless bees; QDA; Semiarid; Volatiles

1 INTRODUCTION

Brazil has a diverse fauna of social bees known as Brazilian native bees, stingless bees, indigenous bees, or simply “meliponini” or “Meliponinae” bees. Approximately 192 species of stingless bees are found in Brazil, including *Melipona subnitida* Ducke (jandaira) and *M. scutellaris* Latrelle (uruçu), which are species endemic to the Brazilian semiarid region. In addition to producing honeys with excellent sensory qualities that are highly appreciated for their distinctive flavors, these bees also offer ecological benefits, including the conservation of native plants through pollination (Silva, et al., 2013, Biluca et al., 2014, Sousa, et al., 2016 and Chuttong, Chanbang, Sringarm & Burget, 2016).

The Brazilian semiarid region is noted for environmental conditions that favor meliponiculture. The region has intense and diverse natural flowering, a vast land area and climate variability that enable honey production throughout the year. Its biome has distinct typical vegetation in both the rainy and dry seasons; together, they promote nectar and pollen flow and enable bee colony maintenance throughout the year (Silva, Silva, Camara, Silva, Santos & Silva, 2014 and Sousa et al., 2016). These aspects differentiate the region because honey production is restricted to specific seasons in other Brazilian regions and countries.

The climate variability and extremely rich flora of the Brazilian semiarid region have enabled the production of a wide variety of honeys from stingless bees with unique sensory qualities. However, studies characterizing these honeys are relatively recent and are insufficient to establish their “identities” and quality standards. The lack of data has undermined the competitiveness of the honeys in national and international markets.

Honey composition is closely associated with the botanical origin and geographic area of production because the soil and climate determine the bee flora (Verzera, Tripodi, Co-Urso, Dima & Marra, 2014 and Silva et al., 2016). Monofloral honeys differ from one another in their volatile fraction compositions, which in turn greatly affect the individual sensory characteristics of each type of honey, among other characteristics. Volatile compounds, which primarily account for food aroma and flavor, are present in honey at very low concentrations as complex mixtures of different chemical classes, including monoterpenes, norisoprenoids, sesquiterpenes, benzenoids, alcohols, esters, ketones and aldehydes (Manyi-Loh, Anip & Clarke, 2011 and Silva et al., 2016).

The volatile compounds present in honey usually come from flower nectar and may be considered markers of bee-visited plants. Thus, characterization of the volatile compound profile of monofloral honeys has been used for product classification (floral origin characterization), and some volatile compounds may be used as specific chemical markers for the botanical origin of the honey (Castro-Vazquez, Díaz-Maroto & Pérez-Coello, 2007, Fuente, Sanz, Martínez-Castro & Stashenko, 2007, Castro-Vazquez, Díaz-Maroto, González-Viñas & Pérez-Coello, 2009, Jerkovic & Kus, 2009, Castro-Vazquez, Leon-Ruiz, Alañon, Pérez-Coello & González-Porto, 2014, Karabagias, Badeka, Kontakos, Karabournioti & Kontominas, 2014, Verzera, Tripodi, Co-Urso, Dima & Marra, 2014 and Seisonen, Kivima & Vene, 2015).

The honey sensory profile is another tool that enables the identification of the honey's botanical origin. This approach has been used to complement the results from chemical and physical analyses of honey and to assess the compliance of monofloral honeys because it may detect botanical components untraceable by analytical methods that change the characteristic sensory traits of the products (Piana, Persano, Bentabol, Bruneal, Bogdanov & Declerck, 2004, Castro-Vazquez, Díaz-Maroto & Pérez-Coello, 2012 and Tahir, Xiaobo, Xiaowei, Jiyong & Mariod, 2016).

Thus, the progress of knowledge on the sensory and chemical aspects of the aroma and taste of monofloral honeys from the Brazilian semiarid region has made key contributions to the establishment of the floral and geographical identities of these honeys and the improvement of their trade competitiveness. Accordingly, the present study aimed to characterize the volatile and sensory profiles of honeys produced by *Jandaira* and *uruçu meliponini* in *Ziziphus joazeiro* Mart. (juazeiro), *Croton heliotropiifolius* Kunth (velame branco) and *Mimosa arenosa* Willd Poir (jurema branca) blossoms, which stand out among the typical Brazilian semiarid region vegetation.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Samples

Six honey samples from native stingless bees produced by the jandaira (*Melipona subnitida* Ducke) and urucu species (*Melipona scutellaris* Latrelle) from three different blossoms *Ziziphus juazeiro* Mart (juazeiro), *Croton heliotropiifolius* Kunth (velame branco) and *Mimosa arenosa* Willd Poir (jurema branca)] juazeiro (*Ziziphus juazeiro* Mart), velame branco (*Croton heliotropiifolius* Kunth) and jurema branca (*Mimosa arenosa* Willd Poir)] were analyzed in a complete block design to assess “bee species” and “blossom type” effects. Samples were collected from meliponaries located in the Seridó region of Rio Grande do Norte state (-06°46'14''S, -36°44'00''W) and the Agreste region of Paraíba state (7°10'15''S, 35°51'14''W), both in the Brazilian semiarid region. Honeys were directly collected from the hives by suction using syringes (one per colony) and then stored at a temperature of approximately 7 °C in sterile and properly labeled glass jars prior to the tests. All samples were produced in 2014 in the seasons specific for each blossom; thus, juazeiro blossom honey was collected in the dry season of 2014, and the other blossom honeys were collected in the rainy season of the same year.

2.2 Melissopalynological analysis

The melissopalynological analysis was performed to confirm the classification and monofloral origin of the honey samples. For this purpose, 10 g of each sample was dissolved in 20 ml of distilled water and centrifuged at 4000 rpm for 20 min. The sediment was dried at 40 °C and then mounted on a slide with Entellan (Merck, 1.07961.0500). Pollen characterization was determined by the 500-pollen grain count and identification in at least 4 different fields of the slide using an optical microscope (Nikon Optiphot II microscope; 400x and 1000x). The pollen grains were compared with reference images from the University of São Paulo (Universidade de São Paulo - USP), São Paulo (SP), Brazil. All samples contained more than 65% pollen grains derived from the same botanical origin.

2.3 Extraction and volatile compound analysis

Volatile compounds were extracted by Head Space Solid Phase Micro-Extraction (HS-SPME) using polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB) fibers (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The samples were prepared by mixing 10 g of honey with 10 ml of Milli-Q water in 60-ml headspace vials sealed airtight with polytetrafluoroethylene silicone septa (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The system was subjected to heating at 45 °C in a water bath for 15 minutes. After cooling, the fiber was exposed to the sample headspace for 45 minutes under 700 rpm magnetic stirring and then transferred to the gas chromatograph injector wherein the analytes were desorbed for 5 minutes.

A Varian Saturn 3800 gas chromatograph coupled to a Varian Saturn 2000R mass detector and a VF-5MS capillary column (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm) was used to separate and identify the honey volatile compounds. The gas chromatograph oven temperature was set to and maintained at 40 °C for 2 min, followed by a 2 °C/min ramp to 60 °C, a 3 °C/min ramp to 90 °C and 4 °C/min ramp to 240 °C; this temperature was maintained for 10 minutes. The temperature was maintained at 250 °C in the injector and detector. Helium was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1.0 ml/min. The mass spectrometer was operated in electron impact with a 200 °C ion source temperature and 70 V ionization energy with a scan-to-scan variation from 29 m/z to 400 m/z at 3.33 scans/s.

The compounds were identified using the following methods: (1) comparing their experimental mass spectra with the spectra of compounds supplied by the National Institute of Standards and Technology/Environmental Protection Agency/National Institutes of Health virtual library (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database, version 2.0, 2008), (2) comparing the linear retention indices (LRI) assessed using the retention time of a homologous series of *n*-alkanes (C₈ - C₂₅) analyzed under conditions previously described in the literature for columns with the same polarity (Adams, 2008, Rivellino, Hantao, Risticvic, Carasek, Pawliszyn & Augusto, 2013, Karabagias, Badeka, Kontakos, Karabournioti & Kontominas, 2014 and Jerkovic & Kus, 2014) and (3) comparing the mass spectra with the spectra of pure standards analyzed in the same device under the same methodological conditions.

Compounds with mass spectra and linear retention indices compatible with the injected pure standards analyzed under the same conditions as the isolate were

considered positively identified. Compounds with mass spectra compatible with the spectra provided by the device library and linear retention indices similar to those found in the literature were considered identified compounds. Compounds with no linear retention index available in the literature whose identification was based on the data generated by the mass spectrometer alone were considered tentatively identified compounds. The volatile compounds were grouped into chemical classes by calculating the average abundances for each peak present in the chromatogram and the area percentage for each chemical class. Each sample was injected in triplicate.

2.4 Sensory profile

The aroma and flavor profile of each honey sample was developed according to the fundamentals of the Quantitative Descriptive Analysis (QDA[®]) proposed by Stone, Sidel, Oliver, Woosley & Singleton (1974). The study was previously submitted to the Research Ethics Committee of the Federal University of Paraíba (Universidade Federal da Paraíba – UFPB) and approved under Certificate of Presentation for Ethical Consideration (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética – CAAE) number 06371012.8.0000.5188.

2.4.1. *Recruitment of judges and development of descriptive terminology*

Students and staff of the Federal University of Paraíba (Universidade Federal da Paraíba) were initially recruited. We selected 20 volunteers who showed the highest interest and willingness to participate in the sensory tests, product familiarity, ability to use intensity scales, memory of 25 aromas from the honey Aroma Wheel suggested by Bruneau, Barbier, Gallez & Guyot-Declerck, (2000), and ability to differentiate the aroma of honey samples of different origins produced by stingless and stinging bees using a series of triangle tests (ASTM, 2004 and Meilgaard, Civille & Carr, 2006).

The 20 judges selected using the previously described tests developed the descriptive terminology for honey samples using the Repertory Grid Keily's Method reported in Moskowitz (1983). All samples were served in disposable cups coded with random three-digit numbers at 25 °C. The samples were offered to the judges to allow them to indicate the terms that best described the similarities and differences in the aroma and flavor traits between samples. Then, the judges met in groups under the supervision of a moderator and consensually defined the terms describing the samples.

This process generated 7 aroma descriptors, 2 flavor descriptors and 2 taste descriptors and a list with the definitions of each term and references. A sample descriptive assessment form was also prepared wherein the descriptors consensually generated by the sensory panel were associated with 9-cm non-structured scales anchored with the intensity terms “none/weak” and “strong” on the left and right ends of the scale.

2.4.2 Training and selection

Several judge training sessions were conducted using the references generated in the previous step, the descriptor definitions, stingless bee honey samples and a fact sheet. All judges were asked to evaluate six honey samples in four replicates at the end of the training step using the fact sheet. The samples were evaluated in different sessions, with only three samples served in each session.

The data generated by each judge in each trait were evaluated by a two-factor (sample and replicate) analysis of variance (ANOVA). Judges with suitable discriminative powers (pF samples < 0.1), good reproducibility in trials (pF replicates > 0.05) and a consensus with the team in at least 80% of the descriptors were selected to form the final descriptive team (ASTM, 2004).

2.4.3 Sample evaluation

The 8 judges selected and trained as described in the previous steps evaluated the honey samples of interest in the present study in 3 replicates using the descriptive evaluation form developed in the previous step. Only 3 samples were evaluated in each session, which balanced the order of presentation between judges and sessions.

2.5 Statistical analysis

The sensory data were evaluated by ANOVA with the following sources of variation: bee, blossom and interaction between the bee*blossom effects. Tukey's test was used to compare the means. Principal component analysis (PCA) was applied to the chemical and sensory data using the statistical software Statistical Analysis System (SAS[®], 2015).

3 RESULTS

3.1 Sensory profiles of “Melipona” honey

Table 1 outlines the F and pF values of each sensory descriptor of honey regarding the “blossom”, “bee species” and “blossom*bee” interaction effects. The “blossom” variable had a significant ($p < 0.0001$) effect on all aroma and flavor sensory descriptors, whereas the “bee” variable only had a significant effect on the following descriptors: characteristic ($p = 0.0016$), floral ($p < 0.0001$), medicinal ($p = 0.0042$), clove ($p < 0.0001$) and herbaceous aroma ($p = 0.0001$).

Table 1 indicated that the caramel aroma and beeswax, acid and sweet tastes, and caramel flavor scores were only affected by the blossom because both p_{Fbee} and $p_{Fblossom*bee}$ were higher than 0.05 for these descriptors. The blossom effect on each descriptor is shown in Table 2. The juazeiro blossom honeys were significantly ($p \leq 0.05$) sweeter and had stronger aromas and caramel flavors than the other blossom honeys. In contrast, the velame blossom honeys were more acidic and less sweet ($p \leq 0.05$).

The aforementioned results corroborate the results reported by Sousa et al. (2016), who examined monofloral honeys produced by jandaira and urucu bees in juazeiro, sensitive plant, velame branco and jurema branca blossoms from all Brazilian semiarid regions and verified that the bee species had no significant ($p \leq 0.05$) effect on the sweet taste, characteristic honey flavor, and aroma and acid taste intensity of honeys of the same floral origin. These researchers also observed that the juazeiro honeys had a stronger honey aroma and sweeter taste than the other honeys, whereas the sensitive plant and velame branco blossom honeys had stronger aromas and acid tastes in both bee species (jandaira and urucu).

Table 1 indicates the occurrence of a significant interaction between the blossoms and bee species regarding the following descriptors: characteristic ($p = 0.0014$), floral ($p < 0.0001$), medicinal ($p = 0.0003$), clove ($p < 0.0001$) and herbaceous aroma ($p = 0.0279$), and medicinal flavor ($p = 0.0099$). This finding indicated that the blossom had a different effect on each bee species for these sensory descriptors, as shown in Figure 1.

Figure 1 clearly shows that the blossom had a much stronger effect on the honey aroma and flavor scores, even for scores significantly ($p \leq 0.05$) affected by the bee species. The only exception was the floral aroma, which was stronger in the velame

blossom honey produced by the jandaira bees than in the honey produced by the uruçu bees.

Table 3 outlines the average intensity of each descriptor for each sample evaluated by the sensory panel. Table 3 and Figure 1 show that the juazeiro blossom honeys had a significantly ($p \leq 0.05$) stronger characteristic aroma, caramel aroma, sweet taste and caramel flavor than the jurema branca and velame branco blossom honeys regardless of the bee species. The jurema branca blossom honeys had a significantly ($p \leq 0.05$) stronger beeswax and herbaceous aroma, whereas the velame blossom honeys had significantly ($p \leq 0.05$) higher medicinal aroma, medicinal flavor and acid taste scores than the honeys produced from the other blossoms, regardless of the bee species. The herbaceous aroma of the jurema branca blossom honey produced by the uruçu bees was significantly ($p \leq 0.05$) stronger than the herbaceous aroma of the honey produced by the jandaira bees.

Figure 2 shows the results from the principal component analysis (PCA) of the sensory data, which accounts for 93.5% of the total sensory profile variation between samples. In this figure, sensory descriptors are represented by vectors, which indicate their importance for sample segmentation and the direction of the increase in descriptor intensity when decomposed in each axis. The samples are represented by triangles whose vertices correspond to each replicate performed by the sensory panel. Similar samples occupy nearby regions, whereas samples with different sensory profiles occupy regions farther apart from one another. The sample position in relation to the axis and vectors indicates descriptors with higher or lower scores in each sample compared with the other samples (Biasoto, Netto, Marques & Silva, 2014).

The analysis in Figure 2 shows a visible separation between the honeys of three botanical origins. The honeys produced by the same blossom occupy regions close to one another regardless of the bee species. The juazeiro blossom honeys had sensory profiles that were quite similar to one another and were different from the samples associated with the other blossoms, as shown in Figure 2. Their positions in Figure 2 suggest that they typically have a stronger characteristic and caramel aroma, sweet taste and caramel flavor. These differences from the other samples were significant at $p \leq 0.05$, as shown in Table 3.

Figure 2 also suggests that the jurema branca blossom honeys had sensory profiles that were very similar to one another and were different from the profiles of the

other blossoms regardless of the bee species; these honeys showed higher herbaceous aroma and beeswax scores. The significant differences at $p \leq 0.05$ are outlined in Table 3.

The velame branco blossom honey samples also occupied regions close to one another in Figure 2, which indicated that they had sensory profiles that were similar to one another and different from the other samples. Figure 2 suggests that these honeys typically have a significantly ($p \leq 0.05$) stronger clove aroma, medicinal aroma and flavor and acid taste than the other samples, as outlined in Table 3. However, the distance between the velame blossom honey produced by jandaira bees and the honey produced by urucu bees suggested that the bee species had a significant effect on the honey sensory profile, as shown in Figure 2. The sample produced by the jandaira bees occupied the rightmost position in axis 1 of Figure 2, which indicated that this sample had a stronger floral and clove aroma, medicinal aroma and flavor, and acidity than the honey produced by the urucu bees. All differences are significant at $p \leq 0.05$ with the exception of the acid taste, as shown in Table 3.

3.2 Volatile profile of “Melipona” honey

A total of 96 different volatile compounds belonging to the following chemical classes were identified in the six samples of stingless bee honey tested: terpenes (28 compounds), esters (17), norisoprenoids (9), acids (9), alcohols (6) hydrocarbons (5), benzene compounds (5), furans (5), sulfur compounds (5), ketones (4) and aldehydes (3; Table 4). Only two of the 96 compounds (hotrienol monoterpene and safranal norisoprene) were present in all of the tested honey samples.

A total of 44 compounds were detected in the honey samples from the jurema branca blossoms produced by the urucu species, whereas 33 compounds were detected in the honey produced by the jandaira bees; thirty-two of the compounds were detected in both honeys as shown in Table 4. All of the compounds detected in the honey produced by the jandaira bees were also present in the urucu honey with the exception of the α -pinene monoterpene. A total of 38 and 29 compounds were detected in the velame blossom honey samples produced by the urucu and jandaira bees, respectively, including 21 compounds detected in both honeys. A total of 26 and 28 compounds were detected in the blossom juazeiro honey samples produced by the urucu and jandaira bees, respectively, including 19 compounds detected in both honeys.

The volatile compound profiles mostly varied from sample to sample (Table 4); the qualitative diversity was clearer in honeys of different botanical origins than in honeys produced by different bee species from the same blossom. However, these profiles were not uniform for samples from the same blossom produced by different bee species, possibly because by definition honey could be considered monofloral when it contained 45% pollen from the same plant. Thus, the honey can maintain the same melissopalinalological classification even if 55% of the pollen composition varies, which will result in different compositional profiles (Jerkovic & Kus, 2014).

The sources of variation for the “blossom”, “bee” and “blossom*bee” interaction effects on the sample volatile compound profiles are outlined in Table 5. The analysis of the table showed that the “bee*blossom” interaction had a significant ($p \leq 0.05$) effect on nearly all of the chemical classes identified in the honeys, including acids ($p = 0.0027$), alcohols ($p = 0.0306$), aldehydes ($p = 0.0109$), esters ($p \leq 0.0001$), hydrocarbons ($p \leq 0.0001$), norisoprenoids ($p \leq 0.0001$), terpenes ($p \leq 0.0001$) and sulfur compounds ($p \leq 0.0001$). This result indicates that the effect of the blossom on the chemical classes in the honey volatile profile is uneven and varies according to the bee species and vice-versa for almost all chemical classes (Table 5).

The ketone and furan classes were affected by the bee species and blossoms, albeit without the bee*blossom interaction. In this case, the “bee” and “blossom” variables were independent [i.e., the effect of one variable on the honey volatile profile (e.g., the bee species) was not affected by variation in the other variable (e.g., the blossom type)]. Indeed, Table 4 shows that the honeys produced by urucu bees had a higher ketone content than the honeys produced by jandaira bees in all botanical origins.

Most compounds belonging to the furan class (particularly furfural and 5-hydroxymethylfurfural) have been used as classic indicators of heating, inadequate storage and honey adulteration with inverted sugar because these compounds are found at very low quantities in fresh honeys (Risner, Kisser & Dube, 2006, Amri & Ladjama, 2013 and Karabagias et al., 2014). However, tropical honeys may be naturally rich in these compounds without honey overheating or adulteration. This effect results from the unique climatic characteristics of the tropics region (Marchini, Moreti & Otsuk, 2005), where the ambient temperatures reach up to 40 °C. In honey, the formation of furans (particularly the aforementioned furans) depends on the type of sugar, pH, water activity and beehive conditions (Rizelio, Gonzaga, Borges, Micke, Fett & Costa, 2012). Castro-Vazquez et al. (2012) found a significant increase in the furaneol and 2-furanmethanol

concentrations in honeys stored at 40 °C when studying volatile profile changes in honeys stored at different temperatures.

The chemical class of benzene compounds was unaffected by the bee species ($p=0.1171$) or “blossom” type ($p=0.3222$).

The juazeiro blossom honey produced by jandaira bees had higher alcohol, aldehyde, hydrocarbon and norisoprenoid contents than the other samples (Table 4). According to Moreira, De Maria, Pietroluongo, Luiz & Trugo, (2010), the hydrocarbons present in honey may derive from flower nectar, insect exudates collected by the bees and transformed into honey, or even beeswax. The aldehyde chemical class was only found in juazeiro blossom honeys and was present at higher concentrations in the samples produced by jandaira bees. Benzaldehyde and benzeneacetaldehyde, which are present in both samples, reportedly have a pleasant “honey” aroma according to several studies. Benzeneacetaldehyde is a volatile compound with a strong odorous power and low threshold (4 ppb) (Blank, Fischer & Grosch, 1989, Castro-Vazquez et al., 2007 and Karabagias et al., 2014). The occurrence is relevant because the juazeiro blossom honeys had a stronger “characteristic aroma” according to the trained sensory panel, suggesting a relationship between these aromatic aldehydes and the perception of the characteristic honey aroma in the present study.

The honey produced by the urucu species in jurema branca blossoms had a higher concentration of sulfur compounds, which differentiated this honey from the other samples. The 2-propyl thiazole and 2-butyl thiazole compounds present in the honey produced by the urucu species and the presence of safranal, hexanol, limonene, α -farnesene and δ -cardinene may have contributed to the herbaceous aromas perceived by the sensory panel in the honeys produced in the jurema branca blossoms. These compounds reportedly have an “herbaceous”, “green”, or “grass” aroma (www.odour.org.uk).

Velame blossom honeys typically have higher concentrations of acids than other honeys (Table 4), which may explain why these honeys have a stronger acidic taste than other honeys (Table 3). In honeys, acids have different aromas that range from spicy to rancid depending on the length of the molecule’s carbon chain. Short-chain acids, including acetic acid, have spicy flavors and aromas, whereas long-chain acids are associated with a rancid aroma (Barra, Ponce-Díaz & Vengas-Gallegos, 2010 and Manyi-Loh et al., 2011). Honey acidity derives from two sources: organic acids of different nectar origins and D-glucose oxidase enzymatic activity, which catalyzes the

conversion of D-glucose into gluconic acid (Abadio Finco, Moura & Silva, 2010 and Belay, Solomon, Bultossa, Adgaba & Melaku, 2013). Honey acidity may also be caused by bacterial activity during the product maturation stage and its mineral content (Alqarni, Owayss & Mahmoud, 2012 and Pasini, Gardini, Marcazzam & Carboni, 2013).

The sensory analysis of the velame honeys showed that they typically had a stronger clove aroma than the other samples in addition to a stronger acidic taste (Table 3). The volatile profile outlined in Table 4 showed that the velame honeys were the only honey with methyl eugenol in their compositions. This volatile compound is considered a characteristic impact compound that accounts for the “clove”, “spicy” and “hot” aromas of several products (www.odour.org.uk). Although the data on the chemical composition of flower extracts or essential oils of the *Croton heliotropiifolius* (velame) species are scarce, several species of the same genus, including *Croton adamantinus*, *Croton zehntneri*, and *Croton malambo*, have shown that this phenyl terpenoid is one of the main chemical constituents of essential oils (Colorado, Duarte, Munoz & Stashenko, 2010, Ximenes et al., 2013 and Cabral, Campos, Fonteles, Santos, Cardoso & Nascimento, 2014).

Figures 3A and 3B show the results from the principal component analysis that was applied to the abundance data on the chemical classes of the volatile compounds of the honey samples in the present study. Together, both figures account for 76% of the variation between samples. Figure 3A shows the position of the velame blossom honey produced by jandaira bees and suggests that this honey stands out among the other honeys due to its higher concentration of esters, as shown in Table 4. In turn, the honey produced by jandaira bees from juazeiro blossoms differed from the other honeys because it had a higher concentration of aliphatic hydrocarbons, norisoprenoids, aldehydes and alcohols, as shown in Table 4. The differences between the sensory profiles of both honeys produced by jandaira bees highlight the blossom effect on the product's volatile composition.

Figure 3B shows the variation of samples based on principal component III (PC III) of the PCA. In the present study, PC III is strongly associated with the sample's acid, ketone and sulfur compound concentrations. Figure 3B shows that the more positive PC III values are indicative of higher sample acid and ketone concentrations. Thus, the results shown in Figure 3B indicate that the velame and juazeiro samples produced by the urucu bees have higher acid and ketone concentrations, as shown in

Table 4. Similarly, Figure 3B also suggests that the Jurema blossom honey produced by the urucu bees has a higher sulfur compound concentration, as shown in Table 4.

The maintenance of the same volatile compound profiles in honeys from the same floral origin was previously reported by Bicchi, Belliardo & Frattini, (1983), who observed the same chromatographic profile of volatile compounds of honeys from the Piedmont region in different harvest years. However, the accumulation of phytochemicals and the precursors of volatile components, including carbohydrates, phenols and volatile organic compounds, depends on the climatic conditions and soil characteristics. Thus, differences between honeys with the same botanical origin produced by different species in different regions are presumably associated with different nectar or pollen compositions, which have the strongest effects on the chemical composition of the honey (Castro-Vazquez, Leon-Ruiz, Alañon, Pérez-Coello & González-Porto, 2014 and Jerkovic & Kus, 2014).

Few studies have correlated the chemical constituents of flower extracts or nectar with their compositions in honeys. Generally, only partial similarities between the volatile constituents of nectar, flower extracts, and honeys have been found. Differences between honey and flower extracts are expected because the honey aroma compounds are constituents of various flower and plant parts. Partial qualitative similarities were also found in studies evaluating the nectar and essential oil compositions in honey (Jerkovic & Kus, 2014).

4 CONCLUSION

In the present study, the blossom botanical origin had a stronger effect on the aroma and flavor profile of the honeys than the producing bee species. The juazeiro blossom honeys had a higher sweetness and stronger caramel aroma and flavor. These honeys also had a more characteristic honey aroma, which might be associated with the benzaldehyde and benzeneacetaldehyde compounds that were only present in the honeys produced in this blossom. Future studies should corroborate that both volatile compounds may be markers of this blossom and desirable compounds in honey.

The velame blossom honeys typically showed a strong medicinal taste, clove aroma and higher acid concentration than the other honeys. The velame blossom honeys were the only honeys that had the volatile compound methyl eugenol in their

composition regardless of the bee species (jandaira or urucu). This volatile compound is considered a characteristic impact compound that accounts for the “clove” aroma of several products and is considered a candidate chemical marker of velame blossom honeys; this finding needs to be confirmed in future studies.

Finally, the compounds hexanol, limonene, α -farnesene and δ -cardinene, which are usually reported to have a “green” and “grass” aroma, may have contributed to the generation of the herbaceous aromas perceived with higher intensity by the sensory panel in the jurema branca blossom honeys. Future studies should assess whether these compounds are chemical markers of that blossom.

REFERENCES

- Abadio, F. D. B., Moura, L. L., & Silva, I. G. (2010). Physical and chemical properties of *Apis mellifera* L. honey. *Food Science and Technology*, 30, 706-712.
- Adams, R. P. (2008). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. (4 th ed). Illinois, USA.
- Alqarni, A. S., Owayss, A. A., & Mahmoud, A. A. (2012). Physicochemical characteristics, total phenols and pigments of national and international honeys in Saudi Arabia. *Arabian Journal of Chemistry*, 9, 114-120.
- Amri, A., & Ladjama, A. (2013). Physicochemical characterization of some multifloral honeys from honeybees *Apis mellifera* collected in the Algerian northeast. *African Journal of Food Science*, 7, 168-173.
- ASTM. (2004). "Standard test method E1885-04" in *Standard Test Method for Sensory Analysis - Triangle Test*. West Conshohocken, PA: ASTM International.
- Barra, M. P. G., Ponce,-Díaz, M. C., & Venegas-Gallegos, C. (2010). Volatile compou-s in honey produced in the Central Valley of Ñuble Province, Chile. *Journal of Agricultural Research*, 70, 75-84.
- Belay, A., Solomon, W. K., Bultossa, G., Adgaba, N., & Melaku, S. Physicochemical properties of the Harennna forest honey, Bale, Ethiopia. *Food Chemistry*, v. 141, p. 3386–3392, 2013.
- Biasoto, A. C. T., Netto, F. M., Marques, E. J. N., & Silva, M. A. A. P. (2014). Acceptability and preference drivers of red wines produced from *Vitis labrusca* and hybrid grapes. *Food Research International*, 62, 456-466.
- Bicchi, C., Belliardo, F., & Frattini, C. (1983). Identification of the volatile components of some Piedmontese honeys. *Journal of Apicultural Research*, 22, 130–136.
- Biluca, F. C., Betta, F. D., Oliveira, G. P., Pereira, L. M., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2014). 5-HMF and carbohydrates content in stingless bee honey by CE before and after thermal treatment. *Food Chemistry*, 159, 244-249.
- Blank, K. H., Fischer, W., & Grosch, Z. (1989). Intensive neutral odorants of li-en honey. Differences from honeys of other botanical origin. *Lebensm Unters Forsch*, 189, 426-428.
- Bruneau, E., Barbier, E., Gallez, L.M., & Guyot-Declerck, C. (2000). La roue des arômes des miels. *Abeilles & Cie*, 77, 16–23.
- Cabral, P. H. B., Campos, R. M., Fonteles, M. C., Santos, F. S., Cardoso, J. H. L., & Nascimento, N. R. F. (2014). Effects of the essential oil of *Croton zehntneri* and its major components, anethole and estragole, on the rat corporaavernosa. *Life Sciences*, 112, 74-81.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., González-Viñas, M. A., & Pérez-Coelho, M. S. (2009). Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. *Food Chemistry*, 112, 22–30.
- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., & Pérez-Coello, M. S. (2007). Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. *Food Chemistry*, 103, 601–6.

- Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M.C., & Pérez-Coello, M. S. (2012). Changes in the volatile fractions and sensory properties of Heather honey during storage under different temperatures. *European Food Research Technology*, 235, 185–193, 2012.
- Castro-Vázquez, L., Leon-Ruiz, V., Alañon, M. E., Pérez-Coello, M. S., & González-Porto, A. V. (2014). Floral origin markers for authenticating Lava-in honey (*Lava-ula angustifolia* x *latifolia*). Discrimination from Lavender honey (*Lava-ula latifolia*). *Food Control*, 37, 362–370.
- Chutthong, B., Chanbang, Y., Srirangarm, K., & Burget, M. (2016). Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from South East Asia (Thailand). *Food Chemistry*, 192, 149–155.
- Colorado, B. E. J., Duarte, E., Munoz, K., & Stashenko, E. (2010). Volatile chemical composition of essential oil from Colombian Croton malambo H. Karst. And determination of its antioxidant activity. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15, 133-142.
- Fuente, E. M. L., Sanz, I., Martínez-Castro, J., & Sanz, A. I. (2007). Volatile and carbohydrate composition of rare unifloral honeys from Spain. *Food Chemistry*, 105, 84-93.
- Karabagias, I. K., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S., & Kontominas, M. G. (2014). Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chemistry*, 146, 548–557.
- Jerkovic, I., Tuberoso, C. I. G., Marijanovic, Z., Jelic, M., & Kasum, A. (2009). Headspace, volatile a- semi-volatile patterns of *Paliurus spina-christi* unifloral honey as markers of botanical origin. *Food Chemistry*, 112, 239–245.
- Jerkovic, I., & Kus, P. M. (2014). Terpenes in honey: occurrence, origin a- their role as chemical biomarkers. *The Royal Society of Chemistry*, 4, 31710-31728.
- Manyi-Loh, C. E.; Anip, R., & Clarke, A. M. (2011). Volatile Compounds in Honey: A Review on Their Involvement in Aroma, Botanical Origin Determination and Potential Biomedical Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 9514-9532.
- Marchini, L. C., Moreti, A. C. C. C., & Otsuk, I. P. (2005). Cluster analysis, with basis in physico-chemical composition, of samples of honey produced by *Apis mellifera* L. in São Paulo State. *Food Science and Technology*, 25, 8-17.
- Meilgaard, M., Civille, G. V., & Carr, B. T. (2006). *Sensory evaluation techniques*. (4th ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Moreira, R. F. A., De Maria, C. A. B., Pietroluongo, M., Luiz, C., & Trugo, L. C. (2010). Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chemistry*, 121, 697–704.
- Moskowitz, H. R. (1983). *Product testing and sensory evaluation of foods: marketing and R & D approacher*. Westport: Food and Nutrition Press.
- Pasini, F., Gardini, S., Marcazzan, G. L., & Carboni, M. F. (2013). Buckwheat honeys: Screening of composition and properties. *Food Chemistry*, 141, 2802–2811.
- Piana, M. L., Persano, O. L., Bentabol, A., Bruneau, E., Bogdanov, S., & Declerck, C. G. (2004). Sensory Analysis Applied to Honey: state of the art. *Apidologie*, 35, 26-37.

- Risner, C. H., Kiser, M. J., & Dube, M. F. (2006). An Aqueous High-Performance Liquid Chromatographic Procedure for the Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Honey and Other Sugar-containing Materials. *Journal of Food Science*, 71, 179-184.
- Rivellino, S. R., Hantao, L.W., Risticvic, S., Carasek, E., Pawliszyn, J., & Augusto F. (2013). Detection of extraction artifacts in the analysis of honey volatiles using comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Food Chemistry*, 141, 1828–1833.
- Rizelio, V. M., Gonzaga, L. V., Borges, G. S. C., Micke, G. A., Fett, R., & Costa, A. C. O. (2012). Development of a fast MECK method for determination of 5-HMF in honey samples. *Food Chemistry*, 133, 1640–1645.
- Seisonen, S., Kivima, E., & Vene, K. (2015). Characterisation of the aroma profiles of different honeys and corresponding flowers using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry. *Food Chemistry*, 169, 34-40.
- Silva, T. M. S., Santos, F. P., Evangelista-Rodrigues, A., Silva, E. M. S., Silva, G. S., Novais, J. S., Santos, F. D. A. R., & Camara, C. A. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29, 10-18.
- Silva, T. M. G., Silva, P. R., Camara, C. A., Silva, G. S., Santos, F. A. R. & Silva, T. M. S. (2014). Chemical analysis a- antioxidant potential of angico honey collected by stingless bee Jandaíra. *Journal of Chemistry*, 5, 1370-1379.
- Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196, 309–323.
- Sousa, J. M. B., Souza, E. L., Marques, G., Benassi, M. T., Gullón, B., Pintado, M. M., & Magnani, M. (2016). Sugar profile, physicochemical a- sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. *LWT-Food Science Technology*, 65, 645–651.
- Stone, H. S., Sidel, J. L., Oliver, S., Woosley, A., & Singleton, R.C. (1974). Sensory Evaluation by Quantitative Descriptive Analysis. *Food Technology*, 28, 24-34.
- Tahir, H. E., Xiaobo, Z., Xiaowei, H., Jiyong, S., & Mariod, A. A. (2016). Discrimination of honeys using colorimetric sensor arrays, sensory analysis and gas chromatography techniques. *Food Chemistry*, 206, 37–43.
- Verzera, A., Tripodi, G., Co-Urso, C., Dima, G., & Marra, A. (2014). Chiral volatile compounds for the determination of orange honey authenticity. *Food Control*, 39, 237-243.
- Ximenes, R. M., Morais, N. L., Cassu-é, N. M. R., Jorge, R. J. B., Santos, S. M., Magalhães, L. P. M., Silva, M. R., Barros Viana, G. S., Araújo, R. M., Sena, K. X. D. F. R., Alburquerque, J. F. C., & Martins, R. D. (2013). Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. Essential oil. *Journal of Natural Medicines*, v. 67, 758-764.

Table 1 - F and pF ANOVA values of the sources of variation in the “blossom”, “bee species” and “blossom*bee” interaction for each descriptor of “Melipona” honey from the Brazilian semiarid region

Sensory descriptors	Blossom		Bee species		Blossom*Bee	
	F	p	F	p	F	p
<u>AROMA</u>						
Characteristic	324.10	<.0001	10.31	0.0016	6.82	0.0014
Caramel	315.86	<.0001	0.41	0.5239	1.55	0.2154
Beeswax	615.43	<.0001	0.06	0.8092	0.62	0.5381
Clove	282.89	<.0001	138.33	<.0001	121.20	<.0001
Floral	152.12	<.0001	110.54	<.0001	118.02	<.0001
Herbaceous	272.05	<.0001	15.60	0.0001	3.65	0.0279
Medicinal	494.41	<.0001	8.40	0.0042	8.35	0.0003
<u>FLAVOR/TASTE</u>						
Acid	225.00	<.0001	0.23	0.6319	1.27	0.2836
Caramel	423.31	<.0001	1.19	0.2765	0.43	0.6524
Sweet	703.12	<.0001	0.30	0.5819	0.21	0.8104
Medicinal	621.56	<.0001	0.04	0.848	4.73	0.0099

Table 2 - Blossom effects on the mean intensity^{1,2} of the aroma, flavor and taste scores of “Melipona” honey from the Brazilian semiarid region

Blossom	Aroma		Flavor/Taste		
	Caramel	Beeswax	Acid	Caramel	Sweet
Velame branco	1.471 c	0.946 b	6.837 a	0.437 c	5.131 c
Juazeiro	4.384 a	0.865 b	1.420 c	4.332 a	8.814 a
Jurema branca	2.943 b	4.920 a	3.465 b	2.078 b	6.462 b

¹Means with the same letters in the same column are not different from one another at $p < 0.05$.

²For the beeswax trait: 0 = none and 9 = strong. For the caramel aroma, acid taste, sweet taste, and caramel flavor traits: 0 = weak and 9 = strong.

Table 3 - Mean intensity of the aroma and flavor/taste descriptors of honeys produced by two “Melipona” species from three blossoms of the Brazilian semiarid region

Sensory descriptors		Velame branco		Juazeiro		Jurema branca	
		Uruçu	Jandaíra	Uruçu	Jandaíra	Uruçu	Jandaíra
Aroma ¹	Characteristic ³	3.9 c	3.1 d	6.6 a	6.6 a	4.9 b	4.9 b
	Caramel ³	1.6 c	1.3 c	4.4 a	4.3 a	2.9 b	3.0 b
	Beeswax ²	0.9 b	1.0 b	0.9 b	0.8 b	4.9 a	5.0 a
	Clove ²	1.2 b	3.9 a	0.4 c	0.5 c	0.5 c	0.5 c
	Floral ³	2.4 c	4.9 a	3.1 b	3.0 b	2.0 d	2.1 d
	Herbaceous ²	1.7 c	0.8 d	0.7 d	0.6 d	4.3 a	3.8 b
	Medicinal ³	4.3 b	5.3 a	0.9 c	1.0 c	1.1 c	1.1 c
Flavor/Taste ¹	Acid ³	7.1 a	6.6 b	1.3 d	1.5 d	3.5 c	3.4 c
	Caramel ³	0.5 c	0.3 c	4.4 a	4.2 a	2.1 b	2.1 b
	Sweet ³	5.1 c	5.1 c	8.8 a	8.8 a	6.4 b	6.5 b
	Medicinal ³	3.9 b	4.3 a	1.3 c	1.0 c	0.7 d	0.6 d

¹Means with the same letters in the same row are not different from one another at $p < 0.05$,

²For the beeswax, clove and herbaceous trait: 0 = none and 9 = strong,

³For the caramel aroma, floral aroma, medicinal aroma, acid taste, sweet taste, and caramel flavor traits: 0 = weak and 9 = strong.

Table 4 – Volatile compositions of the velame, elegant mimosa and jua blossom honeys produced by the true uruçu and jandaíra species.

Compound	LRI ²	“Peak Area Count x 10 ⁶ ” ¹					
		Velame branco		Juazeiro		Jurema branca	
		Uruçu	Jandaíra	Uruçu	Jandaíra	Uruçu	Jandaíra
ACIDS							
Ethanoic acid ^c	<800	11.20	6.72	-	1.56	2.26	0.63
Propanoic acid ^c	<800	-	1.11	-	-	-	-
Octanoic acid ^b	1186	-	-	-	-	0.30	-
Decanoic acid ^b	1375	0.22	-	-	-	-	-
Dodecanoic acid ^b	1530	0.45	-	-	-	-	-
Tetradecanoic acid ^b	1764	2.02	0.80	-	-	-	-
Pentadecanoic acid ^b	1862	0.17	-	-	-	-	-
Hexadecanoic acid ^b	1967	6.88	5.91	-	-	-	-
Octadecanoic acid ^b	2167	1.36	-	-	-	-	-
<i>Total area</i>		22.3	14.54	-	1.56	2.56	0.63
<i>% area</i>		35.40	12.13	-	0.70	3.82	3.20
<i>Number of compounds</i>		n= 7	n= 4	n= 0	n= 1	n= 2	n= 1
ALCOHOLS							
2-Methyl-1-Butanol ^c	<800	0.70	-	-	-	0.32	-
Pentanol ^c	<800	0.65	-	-	-	0.65	0.35
2,3-Butanediol ^b	807	-	-	0.89	9.39	0.33	-
Hexanol ^b	850	-	-	-	-	3.91	0.27
Octanol ^b	1075	1.25	0.47	-	-	1.71	0.46
Nonanol ^b	1162	0.72	-	-	26.3	1.55	0.50
<i>Total area</i>		3.32	0.47	0.89	35.69	8.47	1.5
<i>% area</i>		5.27	0.39	1.87	15.91	12.62	8.04
<i>Number of compounds</i>		n= 4	n= 1	n= 1	n= 2	n= 6	n= 4
ALDEHYDES							
Benzaldehyde ^a	961	-	-	0.14	0.84	-	-
Benzeneacetaldehyde ^b	1031	-	-	0.29	2.53	-	-
Lilial ^b	1522	-	-	-	1.69	-	-
<i>Total area</i>		-	-	0.43	5.06	-	-
<i>% area</i>		-	-	0.90	2.26	-	-
<i>Number of compounds</i>		n= 0	n= 0	n= 2	n= 3	n=0	n= 0
BENZENOID COMPOUNDS							
Toluene ^c	<800	0.36	-	-	-	-	-
p-Xileno ^b	850	0.15	-	-	-	-	-
Styrene ^b	875	-	-	-	-	0.54	0.73
4-Methyl-1-methoxybenzene ^b	1007	1.62	15.40	-	-	-	-
2,5-dimethy-phenol ^b	1020	-	-	0.81	8.64	-	-
<i>Total area</i>		2.13	15.40	0.81	8.64	0.54	0.73
<i>% area</i>		3.38	12.85	1.70	3.85	0.80	3.71
<i>Number of compounds</i>		n= 3	n= 1	n= 1	n= 1	n=1	n=1
KETONES							
2-Heptanone ^b	881	-	-	-	0.49	-	-
4-Undecanone ^b	1202	-	-	-	-	0.24	0.07
2-Tridecanone ^b	1492	0.94	-	1.35	-	-	-
2-Pentadecanone ^b	1688	0.58	0.31	-	-	-	-
<i>Total area</i>		1.52	0.31	1.35	0.49	0.24	0.07
<i>% area</i>		2.42	0.26	2.84	0.22	0.36	0.36

<i>Number of compounds</i>		<i>n= 2</i>	<i>n= 1</i>	<i>n= 1</i>	<i>n= 1</i>	<i>n=1</i>	<i>n=1</i>
ESTERS							
Methyl Etanoate ^c	<800	1.42	-	-	-	-	-
Ethyl acetate ^c	<800	-	-	0.31	-	-	-
Ethyl Propanoate ^c	<800	0.19	7.25	-	-	0.36	0.46
Propyl Acetate ^c	<800	0.88	8.75	-	-	-	-
Ethyl Butanoate ^b	802	-	-	-	-	0.28	0.08
Ethyl Pentanoate ^b	891	0.41	0.63	-	-	0.34	0.38
Ethyl Benzoate ^b	1158	-	-	-	-	2.61	0.53
Ethyl Octanoate ^b	1186	-	-	-	-	0.73	0.80
Ethyl 2-phenylethanoate ^b	1223	0.15	0.19	-	-	1.36	1.02
Phenylethyl Acetate ^b	1236	-	-	-	-	2.03	0.82
Ethyl Nanoate ^b	1280	-	-	-	-	0.58	-
Nonanyl Acetate ^b	1296	-	-	-	-	2.30	1.29
Ethyl Decanoate ^b	1396	0.23	5.95	-	-	-	-
Ethyl 4-methoxybenzoate ^b	1420	-	-	-	-	0.68	-
Ethyl Dodecanoate ^b	1595	0.18	4.89	-	-	2.19	0.76
Ethyl Tetradecanoate ^b	1782	-	-	-	-	0.32	-
Ethyl Hexadecanoate ^b	1994	0.34	-	-	-	0.47	0.33
<i>Total area</i>		3.8	27.66	0.31	-	14.25	6.47
<i>% area</i>		6.03	23.08	0.65		21.24	32.91
<i>Number of compounds</i>		<i>n= 8</i>	<i>n= 6</i>	<i>n= 1</i>	<i>n= 0</i>	<i>n=13</i>	<i>n=10</i>
FURANS							
Furfural ^b	836	-	8.18	-	-	-	-
2-Furanmethanol ^b	860	-	5.01	2.50	5.18	-	-
Isomaltol ^b	989	-	-	-	1.09	-	-
Furaneol ^b	1052	0.68	3.39	2.57	4.34	-	-
5-Hydroxymethylfurfural ^b	1234	-	2.50	-	-	-	-
<i>Total area</i>		0.68	19.08	5.07	10.61	-	-
<i>% area</i>		1.08	15.92	10.66	4.73	-	-
<i>Number of compounds</i>		<i>n= 1</i>	<i>n=4</i>	<i>n= 2</i>	<i>n=3</i>	<i>n=0</i>	<i>n=0</i>
HYDROCARBONS							
Pentane ^b	<800	-	-	-	2.58	0.23	-
Heptane ^b	<800	-	0.49	-	-	-	-
Octane ^b	800	0.54	-	0.09	2.11	0.12	0.06
Hexadecane ^a	1598	-	-	-	1.61	-	-
Tricosane ^b	2398	0.28	-	-	-	-	-
<i>Total area</i>		0.82	0.49	0.09	6.3	0.35	0.06
<i>% area</i>		1.30	0.41	0.19	2.81	0.52	0.31
<i>Number of compounds</i>		<i>n= 2</i>	<i>n=1</i>	<i>n=1</i>	<i>n=3</i>	<i>n=2</i>	<i>n=1</i>
NORISOPRENOIDS							
α -Isophorone ^b	1123	4.32	2.58	-	-	-	-
Safranal ^b	1184	4.75	6.31	7.04	33	3.87	1.24
Edulan II ^b	1247	-	-	0.78	6.5	-	-
Edulan I dihydro ^b	1267	-	-	-	10.2	-	-
α -Ionene ^b	1274	-	-	2.42	25.1	-	-
1,1,6-Trimethyl-1,2-dihydronaphthalene ^b	1336	-	-	1.44	-	0.57	0.53
β -Damascenone ^b	1368	-	-	4.80	25.2	-	-
β -Ionone epoxide ^b	1458	-	-	2.00	5.27	-	-
β -Ionone ^b	1477	1.01	-	-	-	-	-
<i>Total area</i>		10.08	8.89	18.48	105.27	4.44	1.77
<i>% area</i>		16.00	7.42	38.86	46.93	6.62	9.00

<i>Number of compounds</i>		<i>n= 3</i>	<i>n=2</i>	<i>n=6</i>	<i>n=6</i>	<i>n=2</i>	<i>n=2</i>
SULFUR							
Thioacetic S-acid ^c	<800	-	-	8.32	2.47	-	-
Methanethiol ^c	<800	1.55	-	-	-	-	-
Thiazolidine ^b	902	-	-	-	-	6.33	-
2-Propylthiazole ^b	980	-	-	-	-	5.07	-
2-Butylthiazole ^c	1040	-	-	-	-	7.60	-
<i>Total area</i>		1.55	-	8.32	2.47	19	-
<i>% area</i>		2.46	-	17.49	1.10	28.32	-
<i>Number of compounds</i>		<i>n= 1</i>	<i>n=0</i>	<i>n=1</i>	<i>n=1</i>	<i>n=3</i>	<i>n=0</i>
TERPENOIDS							
α -Pinene ^b	926	-	-	-	-	-	0.17
α -Terpinene ^a	1004	-	-	1.25	-	-	-
D-Sylvestrene ^b	1024	-	-	-	5.53	-	-
Limonene ^a	1028	-	-	-	-	3.57	2.61
Ocimene ^b	1035	-	0.31	-	-	-	-
γ -Terpinene ^b	1045	-	-	0.21	5.98	-	-
Cis-Linalool oxide ^b	1076	0.14	-	0.49	-	-	-
Trans-Linalool oxide ^b	1088	-	-	-	-	0.44	-
Linalool ^a	1091	0.07	9.32	-	-	-	-
Hotrienol ^a	1092	3.73	0.59	1.58	8.35	0.93	0.14
Isotujol ^b	1128	1.31	4.12	-	-	-	-
2,6-Dimethyl-1,3,5,7-octatetraene ^b	1134	-	-	-	-	0.98	0.32
Nerol oxide ^b	1143	-	0.00	0.46	-	0.39	0.20
1-Adamantanol ^b	1159	-	-	0.15	6.97	-	-
α -Terpineol ^b	1196	1.84	1.69	-	-	-	-
Pulegone ^b	1238	-	-	-	-	2.32	0.30
2,6-Diemtyl-3,7-Octadiene-2,6-diol ^b	1330	-	2.65	-	-	-	-
α -Copaene ^b	1357	-	5.00	1.71	4.24	0.23	0.08
Cedrene ^b	1393	-	-	-	-	0.39	0.16
Methyl Eugenol ^b	1341	7.30	8.81	-	-	-	-
α -Caryophyllene ^a	1418	2.40	0.52	3.28	13	-	-
β -Caryophyllene ^a	1421	-	-	1.33	-	2.80	0.33
α -Aromadene ^b	1439	-	-	-	-	0.50	0.78
β -Selinene ^b	1440	-	-	-	-	1.00	0.17
α -Farnesene ^b	1498	-	-	-	-	2.00	2.59
δ -Cardinene ^b	1503	-	-	-	-	1.26	0.50
Eremophyllene ^b	1526	-	-	-	-	0.44	-
β -Guaiene ^b	1485	-	-	1.35	4.15	-	-
<i>Total area</i>		16.79	33.01	11.81	48.22	17.25	8.35
<i>% area</i>		26.66	27.54	24.83	21.50	25.71	42.47
<i>Number of compounds</i>		<i>n= 7</i>	<i>n=10</i>	<i>n=10</i>	<i>n=7</i>	<i>n=14</i>	<i>n=13</i>

¹ Peak area count values, mean data from triplicate sample injection;

² LRI: Retention index in the VF-5MS column;

-: Undetected compound;

^a Positively identified compounds;

^b Identified compounds;

^c Tentatively identified compounds.

Table 5: F and pF ANOVA values of the sources of variation for the “blossom”, “bee” and “blossom*bee” interaction

Atributos	Blossom		Bee		Blossom*Bee	
	F	p	F	p	F	p
Acids	169.05	<.0001	10.00	0.0082	10.05	0.0027
Alcohols	2.71	0.1072	1.87	0.1970	4.73	0.0306
Aldehydes	9.48	0.0034	6.74	0.0234	6.74	0.0109
Benzenoids	1.25	0.3222	2.85	0.1171	0.82	0.4650
Ketones	5.78	0.0175	12.45	0.0042	2.04	0.1721
Esters	65.78	<.0001	21.86	0.0005	71.72	<.0001
Furans	3.95	0.0481	6.92	0.0219	3.24	0.0752
Hydrocarbons	19.13	0.0002	19.17	0.0009	26.02	<.0001
Norisoprenoids	53.82	<.0001	29.73	0.0001	34.01	<.0001
Sulfur	66.13	<.0001	129.81	<.0001	83.35	<.0001
Terpenoids	47.97	<.0001	95.85	<.0001	79.52	<.0001

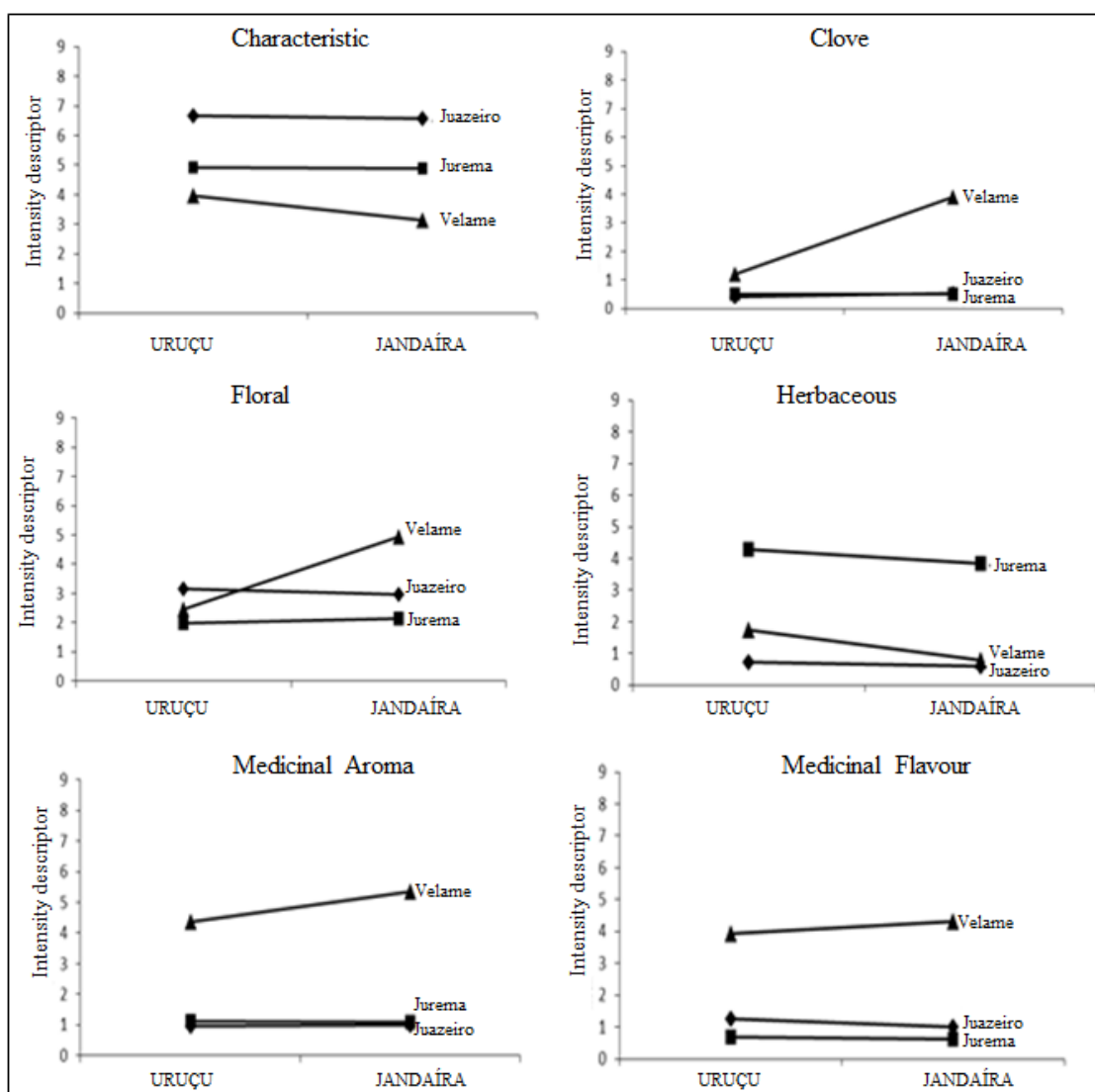


Figure 1 – Effects of bee and blossom species on descriptors with significant blossom*bee interactions.

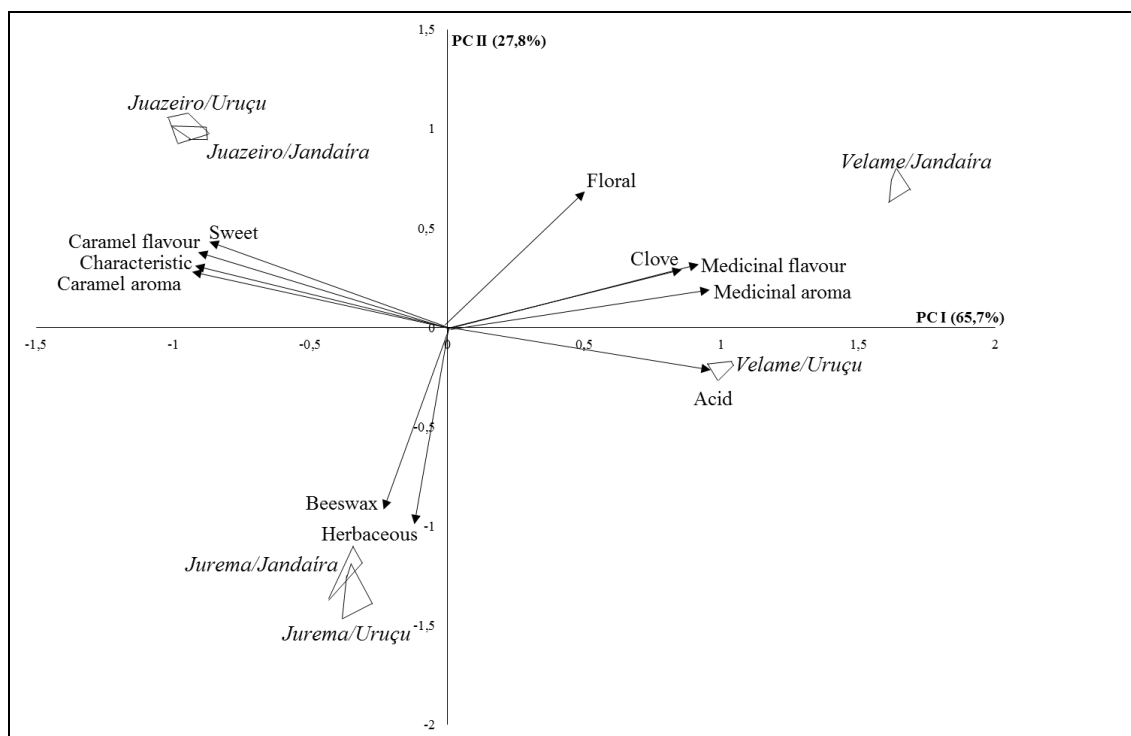


Figure 2 – Principal component analysis of the aroma, flavor and taste descriptors of the elegant mimosa, jua and velame blossom honeys produced by the jandaira and true uruçu stingless bees.

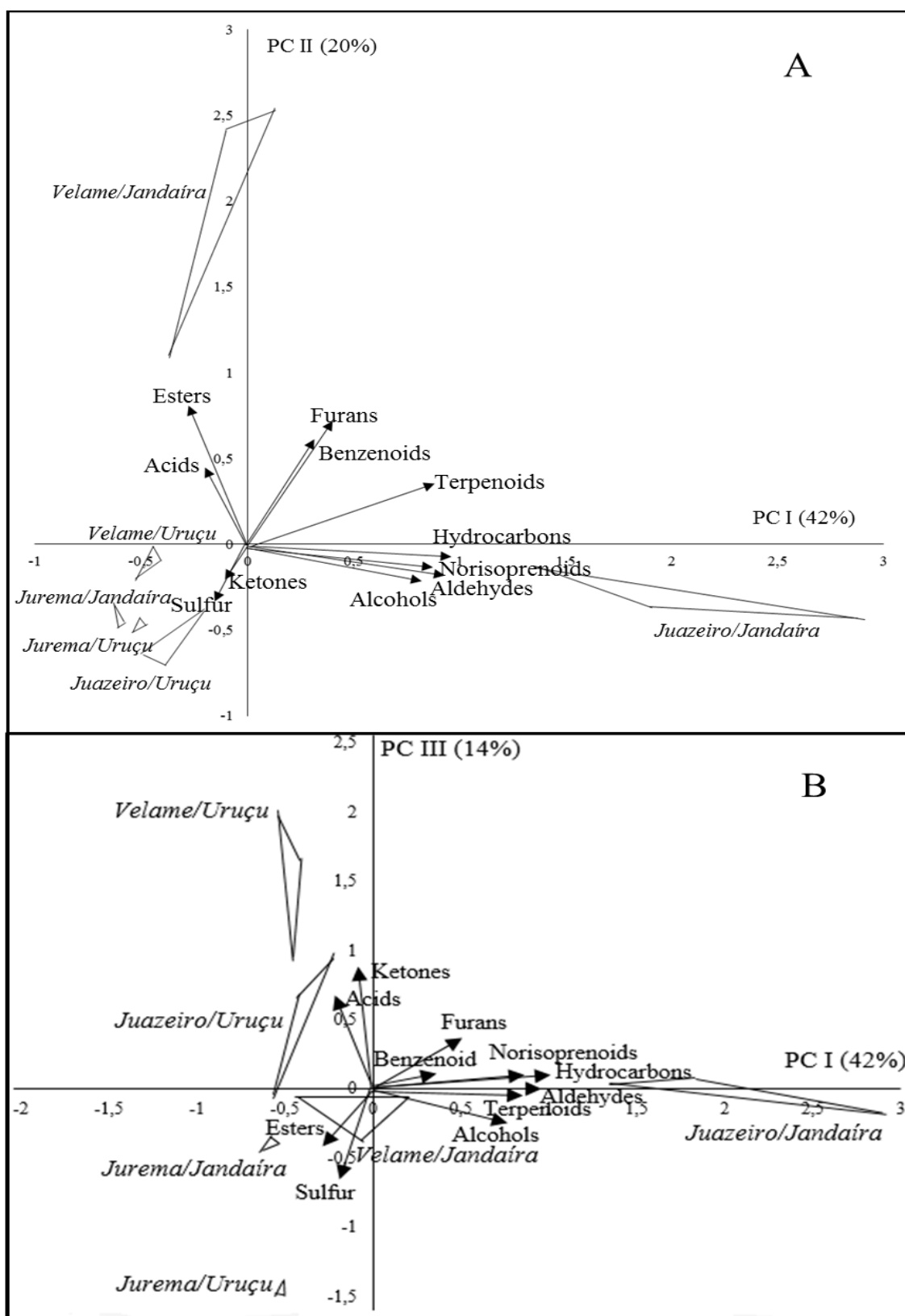


Figure 3 – Principal component analysis of the chemical classes of the aroma components of the elegant mimosa, jua and velame blossom honeys produced by the jandaíra and true uruçú stingless bees. (A) Sample variation regarding principal components I and II and (B) sample variation regarding principal components I and III.

ARTIGO 3:

IDENTIFICATION OF IMPORTANT VOLATILE COMPOUNDS FOR MELIPONA HONEY AROMA

ABSTRACT

The quality and power of each odorous volatile present in the headspace of unifloral honey velame branco (*Croton heliotropiifolius* Kunth) prepared by stingless urucu (*M. scutellaris* Latrelle) were evaluated using the GC-olfactometry Osme technique. Five trained panelists evaluated the sensory chromatographic effluent in three replications, and the results were integrated by SCDTI software. Of the 42 compounds identified in the chromatogram, 17 odorous stimuli were detected by the sensory panel. Among these compounds, the most odoriferous impact were pentanoate acetate "ripe fruit" safranal "green, medicinal plant" and methyl eugenol "clove, tea." Acetic acid was volatile odoriferous identified denied single impact. The furanel compounds hotrienol and benzaldehyde showed aroma notes associated with honey. These results are important since, in addition to reveal the presence of compounds which are not identified by other analytical methods, can also assist in the verification of monofloral honeys compliance.

Keywords: GC-O, Osme, urucu, velame branco

1 INTRODUCTION

Brazil has a noteworthy beekeeping potential due to its typical, diversified flora, large area and climatic variability. The semiarid northeast region of Brazil is notable for its favourable environmental conditions for beekeeping as well as its endemic stingless bee species, also known as Melipona, including the *Melipona scutellaris* Latrelle species ('uruçu'). The honeys produced by these bees have unique characteristics and high commercial value due to their bioactive compounds, which are widely used in traditional medicine. However, quality standards for these honeys in regard to their physicochemical and sensory characteristics have yet to be established, as the quality standards currently available for honey are based on the characteristics of the honey from Apis bees (SOUSA et al., 2013; SOUSA et al., 2016).

Each type of honey has a highly specific aroma profile due to its volatile composition, which includes tens to hundreds of compounds derived from the original nectar and the climatic conditions of the geographic region where the beehive is located. Currently, more than 600 volatile compounds have been identified, and their different profiles have been studied by many authors for use as a digital fingerprint of the product when determining its floral and/or geographic origin (KARABAGIAS et al., 2014; SEISONEN et al., 2015; SILVA et al., 2016).

Among the volatile compounds identified in food products, many are odourless, and only a small fraction has a significant impact on the aroma and flavour of the product (SAMPAIO et al., 2015). Hence, to complement the identification of volatiles through instrumental methods such as gas chromatography (GC) or mass spectrometry (GC-MS), the identification of important volatiles for the aroma and flavour of food products requires the use of techniques that associate chromatography with olfactometry, known as GC-olfactometry or GC-O. Among the different GC-O techniques, the Osme technique enables quantification of the perceived aroma intensity over time, i.e., the rate, duration and intensity of the aroma, using a time-intensity scale (GARRUTI et al, 2003; SAMPAIO et al., 2013).

Studies performed by our research group on the sensory and volatile profiles of monofloral honeys produced by stingless bees from typical flowers of the semiarid northeast region of Brazil indicated a strong effect of the flowers on the sensory and volatile profiles of the honeys (COSTA et al., 2016). The honey from *Croton heliotropiifolius* Kunth ('velame branco') flowers stood out in the volatile profile due to

the presence of acids associated with the acidic taste, in addition to being described as having a medicinal flavour and a clove, floral and medicinal odour. In this context, the aim of this study was to understand the odoriferous impact of volatile compounds from the monofloral ‘velame branco’ honey produced by stingless bees by applying the Osme GC-Olfactometry technique.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Sample

The honey used in this study was produced by the stingless bee ‘uruçu’ (*Melipona scutellaris* Latrelle) during the ‘velame branco’ (*Croton heliotropiifolius* Kunth) blooming period in an apiary located in the State of Paraíba, Brazil (7°10’15’’S, 35°51’14’’W), which lies in the semiarid region of Brazil. The honey was directly collected from the beehives following the procedure described by Costa et al. (2016). The melissopalynological analysis was performed according to Sousa et al. (2016) and indicated that the sample contained more than 65% pollen grains from the botanical source.

2.2 Analysis of the volatile compounds

The volatile compounds were extracted by headspace-solid phase microextraction (HS-SPME), and PDMS/DVB fibre was used (Supelco, Bellafonte, PA, USA). The extraction conditions were as follows: equilibration time of 15 minutes, extraction time of 45 minutes, extraction temperature of 45°C, magnetic stirring at 700 rpm and desorption time of 5 minutes.

For the separation and identification of the volatile compounds of the honey sample, a Shimadzu (GC2010) gas chromatograph was used, coupled to a mass spectrometer (QP2010) and an Rtx-5 column (60 m x 0.25 mm x 0.25 µm). The chromatographic conditions were as described by COSTA et al. (2016).

The compounds were identified by comparison of their experimentally obtained mass spectra with the compound spectra provided by the NIST database (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database, version 2.0, 2008), comparison of the linear retention indices (LRIs) with the values described in the literature for columns with the

same polarity (ADAMS, 2008; KARABAGIAS et al., 2014; JERKOVIC et al., 2014) and comparison of the mass spectra with the spectra of pure standards.

2.4 GC-Olfactometry

The technique used to determine the odoriferous importance of the volatile compounds of honey was the Osme approach (DA SILVA et al., 1992). A Varian-CP-3800 gas chromatograph was used and was adapted with an olfactometry system and operated under the conditions described in section 2.3, with the difference that the chromatography column was connected to a flow divider, which directs the effluent from the column to a disconnected column and then to the judge's nose. An ODO II system (SGE brand) was used to direct the effluent from the column to the judge's nose, in addition to humidifying and warming the tube through which the deactivated column passed.

Five previously selected and trained judges evaluated the output effluents of the chromatography column in triplicate. Using a scale displayed on the computer monitor and the data collection software Time-Intensity Data Collection System (Sistema de Coleta de Dados Tempo-Intensidade – SCDTI) (SAMPAIO et al., 2013), the judges recorded the intensity and duration time of each olfactory stimulus, also describing to the researcher the quality of the perceived odour. The odour intensity was evaluated using a 10-cm unstructured scale, anchored at the left and right ends with the intensity terms “none” and “strong”, respectively.

A consensus aromagram was generated for the ‘velame branco’ honey, considering all peaks detected at least twice by at least three judges. Using the same chromatographic conditions previously described, a chromatogram was also generated by a flame ionization detector (FID) for the stingless bee honey. Finally, by comparing the aromagrams with the chromatograms obtained by GC-FID, along with the identification of volatiles by GC-MS, it was possible to determine the odoriferous importance of each volatile compound in the sample.

3 RESULTS

The use of gas chromatography coupled with mass spectrometry allowed the detection of 42 volatile compounds (Table 1), from 12 different chemical classes: esters (10 compounds), acids (7), terpenes (7), alcohols (4), norisoprenoids (4), benzene compounds (3), ketones (2), hydrocarbons (2), furanes (1), lactones (1) and sulphur compounds (1). Terpenes and acids were the major chemical classes, representing 56% of the chromatogram. The alcohols, ketones, benzene compounds, esters and norisoprenoids together represented approximately 41% of the chromatogram, and the remaining 3% were associated with hydrocarbons, furanes, lactones and sulphur compounds. The major compounds were acetic acid (14.43%), methyl eugenol (9.16%), hexanoic acid (8.48%), safranal (5.96%) and hotrienol (5.94%).

Table 2 shows the identification of the odoriferous volatiles present in the aromagram and, for each volatile, the linear retention index (LRI), perceived odour intensity in the chromatographic effluents, area and percentage area of the odoriferous peak in relation to the total area of the aromagram and the quality of the aroma according to the description of the sensory team evaluating the chromatographic effluents.

The team of judges was able to detect 17 odoriferous stimuli. As shown in Table 2, among the 17 detected peaks, 4 were esters. Of these esters, only ethyl pentanoate, which represented 11.43% of the total area of the aromagram, could be considered a volatile with high odoriferous impact on honey aroma, presenting an aroma intensity higher than 4.0 on the 10-cm scale. The following compounds were identified and are listed here in ascending order of odoriferous importance: ethyl pentanoate (ripe fruit), ethyl phenylacetate (honey, treacle), ethyl propanoate (fruity, tangerine) and isobutyl acetate (sweet, tutti-frutti). Altogether, the esters represented 29.31% of the total area of the aromagram, where they were all described with positive notes for the honey quality, such as “honey”, “treacle”, “ripe fruit”, “fruity” and “sweet”, and “tutti-frutti”.

Table 2 also shows that the norisoprenoids and terpenes are 2 important chemical classes for the aroma of the studied honey, corresponding to 24.13% and 21.86% of the total area of the aromagram, respectively. Among the norisoprenoids with odoriferous power, safranal stood out, presenting an aroma intensity higher than 4.0 on the 10-cm scale, thus representing 1 of the volatiles with greater odoriferous importance for the honey aroma. Safranal represented 8.09% of the total area of the

aromagram and was described as a “green” and “medicinal plant” odour. The norisoprenoids α -isophorone and β -damascenone are compounds of intermediate importance, as the odour intensity of these volatiles was located between 2.0 and 4.0 on the 10-cm scale.

In regard to terpenes, among the 7 compounds of this chemical class identified in the honey headspace, only 3 had an odoriferous impact in the chromatographic effluent. The terpenes exhibited aroma intensities ranging from 1.8 and 4.1 and corresponded, in ascending order of odoriferous importance, to the compounds methyl eugenol, cis-linalool oxide and hotrienol. The terpene of highest odoriferous importance was methyl eugenol, which also occupied a significant percentage of the total area of the aromagram (11.67%) and was described as having “clove” and “tea” notes. All terpenes perceived by the judges contributed positive notes to the overall aroma of the honey under study.

The chemical class of ketones also presented an odoriferous impact in the chromatographic effluent of the honey sample. Two ketones were detected in the chromatographic effluent, and together, they represented 4.6% of the total area of the aromagram. The 2-tridecanone ketone was described as “brushwood” and “grass” and 2-pentadecanone as “lavender”.

Among the 7 volatile acids identified in the honey headspace, the only one with an odoriferous impact in the chromatographic effluent was acetic acid, whose aroma was described as “unpleasant” and “pungent”. This acid had intermediate importance for the overall honey aroma.

In addition to the previously mentioned compounds, the following were also important for the honey aroma: the benzaldehyde benzene aldehyde and the furan-derived compound furaneol; these compounds corresponded, respectively, to 2.68% and 5.54% of the total area of the aromagram of the sample. Despite the low odoriferous intensity, the aroma resulting from the sum of these compounds contributed to the overall aroma of the honey.

In this study as well as in others that used the Osme technique (GARRUTI *et al.*, 2003; GARRUTI *et al.*, 2006), the judges perceived the presence of odours in chromatogram regions where the FID did not detect a volatile compound. As observed in table 2, peak 5 was detected only by the olfactometry analysis, not by the chromatograph detector (FID) nor by the mass detector. This finding is common in many GC-olfactometry studies and indicates that this compound is at a very low

concentration, below the limit of detection of the equipment, but due to its high odoriferous power with a very low threshold value, it was sensorially perceived by human olfaction.

Figure 1 compares the chromatogram of the volatile compounds obtained from the headspace of the honey sample (Figure 1A) to the consensual aromagram of the team of 5 judges (Figure 1B), to assist in the visualization of the important volatile compounds for the ‘velame branco’ honey aroma. The enumeration of the chromatogram and aromagram peaks is the same, facilitating the comparison.

By comparing Figures 1A and 1B, it is observed that among the 42 detected peaks in the chromatogram, only 16 corresponded to volatiles with odoriferous importance. Among the major compounds in the chromatogram, peaks 11 (safranal) and 13 (methyl eugenol) presented a high intensity of odoriferous impact in the chromatographic effluent. However, other major peaks in the chromatogram, such as acetic acid (peak 1) and hotrienol (9) – despite their intermediate and low odoriferous impacts, with intensities of 3.8 and 1.8, respectively – were also considered important compounds for the overall honey aroma. In turn, although hexadecanoic acid occupies a large area in the chromatogram, it was not perceived by the judges in the chromatographic effluent. Furthermore, some peaks detected by the FID as minor compounds (Figure 1A), such as peaks 2, 6 and 7, which correspond to ethyl propanoate (area of 1.01%), benzaldehyde (area of 1.01%) and furaneol (area of 0.99%), consisted of volatiles with an odoriferous impact in the chromatographic effluent.

In a previous study by our research group, ‘velame branco’ honeys produced by stingless bees also exhibited a higher percentage of area for the acid and terpene chemical classes and were sensorially characterized mainly by the “acid taste”, “clove aroma”, “medicinal aroma” and “medicinal taste” descriptors (COSTA et al., 2016). The volatile profile in Table 1 indicates that the ‘velame branco’ honey contained methyl eugenol, a compound that typically provides a “clove”, “spicy” and “hot” aroma (www.odour.org.uk). Many species of the same genus of ‘velame branco’, such as *Croton adamantinus*, *Croton zehntneri*, and *Croton malambo*, include methyl eugenol as one of the main chemical constituents of their essential oils (COLORADO et al., 2010; XIMENES et al., 2013; CABRAL et al., 2014). According to Manyi-Loh et al. (2011), the acids in honeys have different aromas that range from spicy to rancid, depending on the length of the carbon chain. Short-chain acids such as acetic acid have a spicy aroma and taste, while those with longer chains are associated with a rancid

aroma. In addition, according to the study by Costa et al. (2016), the “floral aroma” attribute characterized the ‘velame branco’ honeys, and cis-linalool oxide and 2-pentadecanone, which were described as “floral, rose” and “lavender”, respectively, could be involved in the development of the floral aroma perceived by the sensory team in the descriptive quantitative analysis.

In one of the few studies that directly assessed the odoriferous importance of honey volatiles, Pino (2012), using the aroma extract dilution analysis (AEDA) technique, concluded that the compounds contributing to the overall aroma of black mangrove honey were (E)- β -damascenone (sweet, honey), nonanal (floral) and decanal (sweet).

4 CONCLUSION

The olfactometry analysis detected 17 odoriferous compounds, among which only ethyl pentanoate, safranal and methyl eugenol were considered of high odoriferous importance for the overall ‘velame branco’ aroma. These results are important because in addition to revealing the presence of compounds that are not detected by other analytical methods, they can also assist in assessing the conformity of monofloral honeys.

Table 1 – Volatile composition of ‘velame branco’ with its respective LRIs and percentages of area, as well as the odour quality described by the sensory team for the volatile odoriferous components present in the honey headspace, odour intensity, area and percentage of peak area relative to the total area of the aromagram.

Peak	Compound	LRI ¹	%Area DIC	Odor description	I _{max} ²	Area Osme	%Area Osme
1	Acetic acid ^c	<800	15,36	unpleasant, pungent	3,8	6,29	7,62
	Methyl Etanoate ^c	<800	1,76				
	Ethyl Propanoate ^c	<800	1,32	fruity, tangerine	1,8	4,24	5,14
	Propyl Acetate ^c	<800	1,08				
	Pentanol ^c	<800	0,87				
2	2-Methyl-1-Butanol ^c	<800	0,94				
	Toluene ^c	<800	0,48				
	Methanethiol ^c	<800	0,13				
	Octane ^b	800	0,72				
3	Isobutyl acetate ^c	<800	5,95	sweet, tutti-frutti	1,1	3,98	4,82
	Ethyl 2-methyl butyrate ^b	842	0,15				
4	Ethyl Pentanoate ^b	891	0,95	ripe fruit	4,6	11,43	13,85
5	nd	-	-	smoke, stinky foot	1,8	3,51	4,25
6	Benzaldehyde ^a	962	1,35	caramel, honey	0,7	2,21	2,68
7	Furaneol ^b	1052	1,31	sugar burned, honey	1,4	4,57	5,54
	4-Methyl-1-methoxybenzene ^b	1007	2,16				
8	Cis-Linalool oxide ^b	1076	2,86	floral, rose	2,9	5,76	6,98
	Octanol ^b	1075	1,67				
	Linalool ^a	1091	2,77				
9	Hotrienol ^a	1092	6,32	honey	1,8	2,65	3,21

10	α -Isophorone ^b	1123	5,77	woody	3,1	5,23	6,34
	Isothujol ^b	1128	1,75				
	Nonanol ^b	1162	0,96				
11	Safranal ^b	1184	6,35	green, medicinal plant	4,1	6,68	8,09
	α -Terpineol ^b	1196	2,46				
12	Ethyl 2-phenylethanoate ^b	1223	0,20	Honey, treacle	1,8	4,54	5,5
	δ -Octalactone ^b	1282	0,17				
13	Methyl Eugenol ^b	1341	9,75	clove, tea	4,1	9,63	11,67
	Decanoic acid ^b	1375	0,29				
14	β -Damascenone ^b	1368	1,64	honey	2,3	6,35	7,68
	Ethyl Decanoate ^b	1396	0,31				
	α -Caryophyllene ^a	1418	3,21				
15	β -Ionone ^b	1477	1,35	brushwood, wet soil	0,8	1,67	2,02
16	2-Tridecanone ^b	1492	1,26	lawn, grass	0,6	1,22	1,48
	Dodecanoic acid ^b	1530	0,60				
	Ethyl Dodecanoate ^b	1595	0,24				
17	2-Pentadecanone ^b	1688	0,77	Lavander	0,9	2,58	3,13
	Tetradecanoic acid ^b	1764	2,70				
	Pentadecanoic acid ^b	1862	0,23				
	Hexadecanoic acid ^b	1967	9,19				
	Ethyl Hexadecanoate ^b	1994	0,45				
	Octadecanoic acid ^b	2167	1,82				
	Tricosane ^b	2398	0,37				

LRI: Retention index in the Rtx-5 column

² Odour intensity. Score in a 10-cm scale

^a Compounds identified by pure standard

^b Compounds identified by MS and LRI

^c Compounds tentatively identified by MS

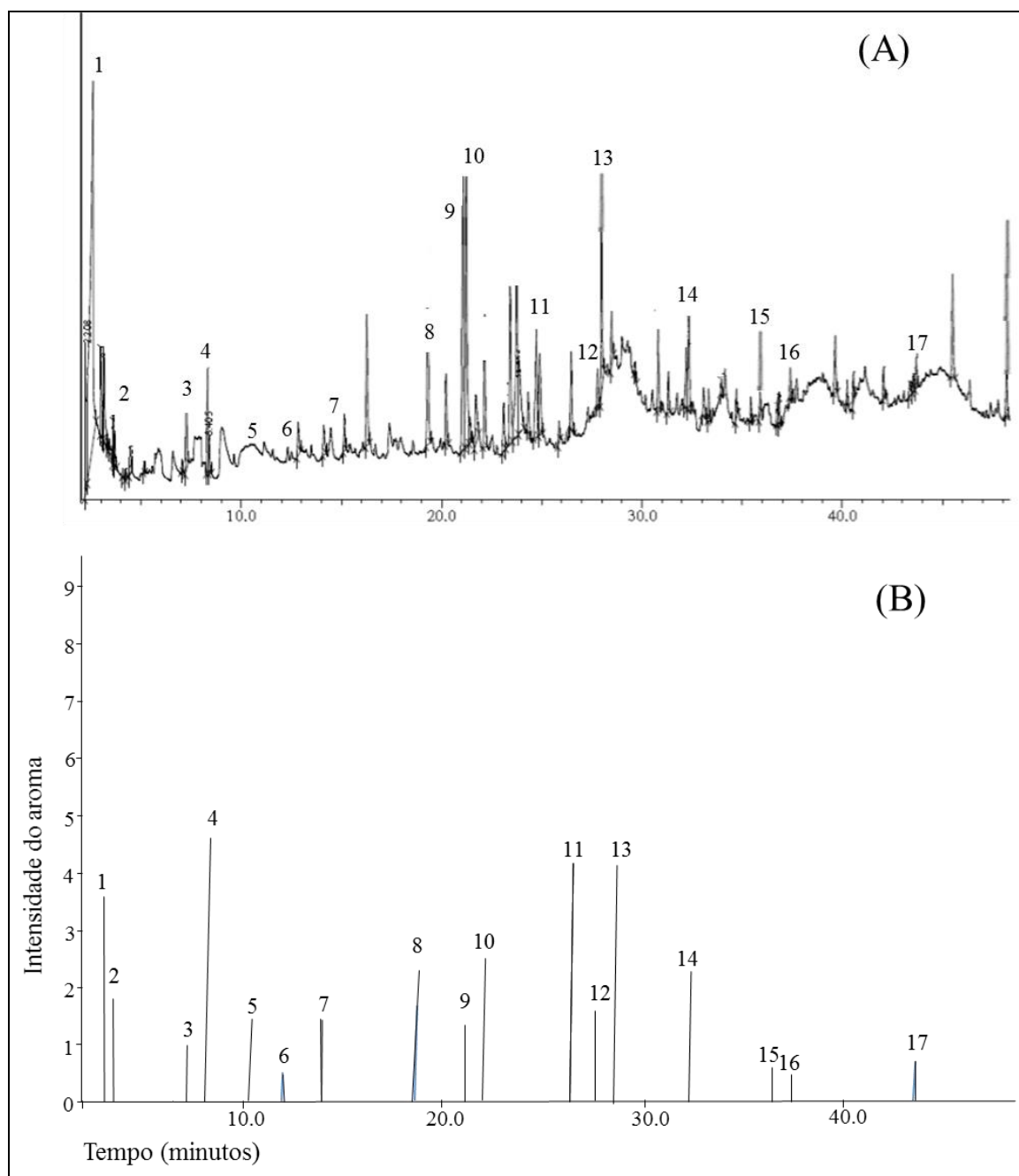


Figure 1 – (A) Chromatogram and (B) Aromagram.

REFERENCES

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, fourth ed., Illinois, USA, 2008.
- BIASOTO, A. C. T.; NETTO, F. M.; MARQUES, E. J. N.; SILVA, M. A. A. P. Acceptability and preference drivers of red wines produced from *Vitis labrusca* and hybrid grapes. **Food Research International**, v. 62, p. 456-466, 2014.
- CABRAL, P. H. B.; CAMPOS, R. M.; FONTELES, M. C.; SANTOS, F. S.; CARDOSO, J. H. L.; NASCIMENTO, N. R. F. Effects of the essential oil of *Croton zehntneri* and its major components, anethole and estragole, on the rat corpora cavernosa. **Life Sciences**, v. 112, p. 74-81, 2014.
- COLORADO, B. E. J.; DUARTE, E.; MUNOZ, K.; STASHENKO, E. Volatile chemical composition of essential oil from Colombian *Croton malambo* H. Karst. And determination of its antioxidant activity. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 15, p. 133-142, 2010.
- DA SILVA, M. A. A. P., LUNDAHL, D. S., MCDANIEL, M. R. The capability and psychophysics of Osme: a new GC-olfactometry technique. In: MAARSE, H.; VAN DERHEIJ, D.G. (eds) **Trends in flavour research: Proceedings of the 7th Weurman Flavour Research Symposium** Amsterdam: Elsevier, p. 191-209, 1992.
- GARRUTI, D. S., FRANCO, M. R. B., DA SILVA, M. A. A. P., JANZANTTI, N. S., ALVES, G.A. (2003). Evaluation of volatile flavour compounds from cashew apple (*Anacardium occidentale* L) juice by Osme gas chromatography/olfactometry technique. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 83, p. 1455-1462, 2003.
- GARRUTI, D. S.; FRANCO, M. R. B.; DA SILVA, M. P. A. P.; JANZANTTI, N. S.; ALVES, G. L. Assessment of aroma impact compounds in a cashew apple-based alcoholic beverage by GC-MS and GC-olfactometry. **LWT-Food Science Technology**, v. 39, p. 373-378, 2006.
- JERKOVIC, I; KUS, P. M. Terpenes in honey: occurrence, origin and their role as chemical biomarkers. **The Royal Society of Chemistry**, v. 4, p. 31710-31728, 2014.
- 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.
- MANYI-LOH, C. E.; NDIP, R.; 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, p. 9514-9532, 2011.
- PINO, J. A. Analysis of odour-active compounds of black mangrove (*Avicennia germinans* L.) honey by solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 1688-1694, 2012.

SAMPAIO KL, BIASOTO ACT, MARQUES E JN, BATISTA EAC AND DA SILVAMAAP. Dynamics of the recovery of aroma volatile compounds during the concentration of cashew apple juice (*Anacardium occidentale* L.). **Food Research International**, v. 51, p. 335–343, 2013.

SAMPAIO, A.; KARINA, L.; ALINE, C. T.; BIASOTOA, B.; SILVA, M. A. P. Comparison of techniques for the isolation of volatiles from cashew apple juice. **Journal Science Food Agriculture**, v. 95, p. 299–312, 2015.

SEISONEN, S.; KIVIMA, E.; VENE, K. Characterisation of the aroma profiles of different honeys and corresponding flowers using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry. **Food Chemistry**, v. 169, p. 34–40, 2015.

SILVA, P. M.; GAUCHE, C.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 309–323, 2016.

SOUSA, J. M. B.; SOUZA, E. L.; MARQUES, G.; BENASSI, M. T.; GULLÓN, B.; PINTADO, M. M.; MAGNANI, M. Sugar profile, physicochemical a- 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.

SOUSA, J. M. B.; AQUINO, I. S.; MAGNANI, M.; ALBUQUERQUE, J. R.; SANTOS, G. G.; SOUZA, L. S. Physicochemical aspects and sensory profile of stingless bee honeys from Seridó region, State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, p. 1763–1772, 2013.

XIMENES, R. M.; MORAIS NOGUEIRA, L.; CASSUNDÉ, N. M. R.; JORGE, R. J. B.; SANTOS, S. M.; MAGALHÃES, L. P. M.; SILVA, M. R.; BARROS VIANA, G. S.; ARAÚJO, R. M.; SENA, K. X. D. F. R.; ALBUQUERQUE, J. F. C.; MARTINS, R. D. Antinociceptive and wound healing activities of *Croton adamantinus* Müll. Arg. Essential oil. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, p. 758–764, 2013.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os méis monoflorais de *Turnera ulmifolia* L. (chanana), *Mimosa quadrivalvis* L. (malícia) *Ziziphus joazeiro* (juazeiro), *Croton heliotropiifolius* Kunth (velame branco), *Mimosa arenosa* Willd Poir (jurema branca), *Anadenanthera colubrina* (angico) e *Prosopis juliflora* (algaroba) produzidos pelas espécies de abelhas *Melipona subnida* Duke (janadaíra) e *M. scutellaris* Latrelle (uruçu) na região do Semiárido brasileiro apresentaram perfis aromáticos altamente específicos e influenciados fortemente pela origem botânica. Foram encontrados potenciais marcadores específicos (químicos e sensoriais) para os méis monoflorais estudados que podem tornar possível estabelecer, em estudos futuros, uma relação entre a composição aromática e sua identidade, origem geográfica e fonte floral.

O conhecimento da origem botânica do mel e de sua relação com a procedência do mesmo pode gerar um diferencial no mercado e contribuir para a sua valorização, uma vez que a fixação de um padrão diferenciado de qualidade e de sua certificação, no contexto atual, é uma alternativa capaz de assegurar a expressão do potencial da atividade meliponicultora do Semiárido Nordeste, ao mesmo tempo, de preservar os recursos ecológicos e promover o bem estar das populações que nela vivem e dependem.

Apesar da necessidade de um conjunto mais amplo de amostras de cada tipo avaliado, e produzido a partir de várias colheitas, esses são os primeiros relatos sobre a composição de voláteis destes méis exóticos do Semiárido brasileiro e representam uma contribuição importante na disponibilização de informações que irão contribuir para a construção do conhecimento de parâmetros que podem caracterizar os méis de abelhas sem ferrão produzidos no Brasil.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 2ª Reunião realizada no dia 19/02/2013, o projeto de pesquisa intitulado: "ASPECTOS DE QUALIDADE E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE MÊIS MONOFLORAIS DE ABELHAS NATIVAS SEM FERRÃO PRODUZIDOS NO SEMIÁRIDO" da Pesquisadora Janaina Maria Batista de Sousa. Prot. nº 00494/12. CAAE: 06371012.8.0000.5188.

Igualmente, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Drª Eliane Marques D. Sousa
Coordenadora CEPICCS/UFPA
Mat. SIAPE: 0332618

APÊNDICES

APENDICE 1 – Questionário de recrutamento.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
DOUTORANDA: ANA CAROLINY VIEIRA DACOSTA

Questionário de recrutamento para análise sensorial de Mel

Nome: _____

Telefone: _____ E-mail: _____

1. Faixa etária: () 18-30 () 31-40 () 41-50 () 51-59
2. Gênero: () Feminino () Masculino
3. Estado civil: () Solteiro () Casado () Viúvo () Separado () Outro _____
4. Grau de escolaridade:
() Ensino médio completo () Ensino superior incompleto () Ensino superior completo () Pós-Graduação incompleta () Pós-Graduação completa
5. Consome mel? () Não () Sim
6. Se SIM, com que frequência consome?
() Diariamente () Semanalmente () Quinzenalmente () Mensalmente
() Raramente
7. Onde você consome mel?
() Casa () Trabalho/Universidade () Viagem/hotel () Lanchonete
() Restaurante () Outro _____
8. Em que momento do dia consome mel?
() Jejum () Café da manhã () Lanche () Almoço () Jantar () Antes de dormir
9. Condição de consumo
() Puro () Em sucos ou com frutas () Com cereais matinais ou granola
() Iogurte () Sobremesas () Em forma de medicamento (pastilha, spray, xaropes e compostos de mel)
10. Qual o motivo de consumir mel
() Paladar () Saúde () Auxílio no tratamento de saúde (gripe, resfriado, dor de garganta)
11. Apresenta alguma intolerância ou alergia alimentar?
() Não () Sim Quais? _____
12. Apresenta alguma restrição alimentar em virtude de alguma doença (ex.: diabetes, dislipidemia, hipertensão)
() Não () Sim Quais? _____
13. Toma alguma medicação que afete seus sentidos, especialmente o paladar e o olfato? Se SIM, qual? _____
14. É diabético? () Sim () Não
15. Tem disponibilidade para participar da análise sensorial? () Não () Sim
16. Tem preferência por algum dia ou horário para as sessões? _____
17. Existe algum dia ou horário no qual não possa participar das sessões de ADQ? _____

Obrigada por sua participação!

APENDICE 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que foi assinado pelos julgadores concordando em participar voluntariamente dos teste.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre a avaliação do aroma de méis de abelha de ferrão e está sendo desenvolvida pela pesquisadora Ana Carolyn Vieira da Costa, aluna do Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação do Professora Dr^a Marta Suely Madruga e está norteado pela Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Os objetivos do estudo são avaliar o perfil do aroma de méis produzidos por abelhas nativas sem ferrão a fim de contribuir para a descrição e percepção do aroma desses tipos de méis.

Solicitamos a sua colaboração para a análise sensorial, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de alimentos e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos que essa pesquisa não oferece riscos, previsíveis, para a sua saúde.

Durante o decorrer da entrevista e da análise sensorial, caso o(a) senhor(a) se sentir constrangido a responder determinada pergunta ou a não querer proceder com o teste sensorial, é possível não responder ou deixar o local sem qualquer prejuízo.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição. Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

Assinatura do Participante da Pesquisa

Assinatura da Testemunha

APENDICE 3 – Ficha para avaliar a habilidade dos provadores em exprimir proporcionalidade por meio de escala.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
DOUTORANDA: ANA CAROLINY VIEIRA DACOSTA

Marque na linha direita de cada figura, um trecho que indique a proporção da figura que foi coberta de preto (não use régua, use apenas sua capacidade visual de avaliar).

Exemplos:

a)



nenhum |-----+-----| todo



b)

nenhum |-----+-----| todo

c)



nenhum |-----+-----| todo

Sua vez:

d)



nenhum |-----+-----| todo

e)



nenhum |-----+-----| todo

f)



nenhum |-----+-----| todo

g)



nenhum |-----+-----| todo

APENDICE 4 – Ficha para o Teste Triangular

Nome: _____ Data: ____/____/____

TESTE TRIANGULAR

Você está recebendo 3 amostras de méis. Duas amostras são iguais e uma é diferente. Avalie o aroma de cada amostra atentamente e faça um círculo no número da amostra que você acha que é diferente.

685

492

521

Comentários: _____

Nome: _____ Data: ____/____/____

TESTE DE RECONHECIMENTO DE ODORES

Instruções:

- Avalie cada amostra na ordem apresentada;
- Passe o frasco na frente do nariz fazendo movimentos de vai-e-vem, por no máximo 2 segundos, com leves cheiradas. Não inspire profundamente;
- Identifique pelo nome o conteúdo de cada frasco;
- Quando tiver dúvida, associe ou descreva o odor percebido;
- Não utilizar os termos agradável/desagradável.
- Entre uma amostra e outra, cheire o pulso e aguarde 20 segundos.

Nº da amostra	Identificador do odor
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Muito obrigada por sua participação!

APENDICE 6 – Ficha de avaliação contendo os termos escolhidos em consenso pela equipe sensorial e uma escala linear não-estruturada de 9 cm, ancorada nas extremidades com termos que expressam intensidade para cada descritor

ANÁLISE QUANTITATIVA DESCRITIVA DO MEL DE ABELHA SEM FERRÃO	
Nome: _____ Data: ____/____/____	
Por favor, prove a amostra e avalie a intensidade percebida para cada atributo colocando um traço vertical nas escalas correspondentes.	
AROMA CARACTERÍSTICO Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ FRACO FORTE	MEDICINAL Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ FRACO FORTE
FLORAL Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ FRACO FORTE	CERA DA ABELHA Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ FRACO FORTE
CARAMELIZADO Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ FRACO FORTE	CRAVO Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ FRACO FORTE
HERBÁCEO Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ FRACO FORTE	
SABOR	
ACIDO Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ FRACO FORTE	
DOCE Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ FRACO FORTE	
MEDICINAL Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ FRACO FORTE	
CARAMELO Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ Amostra: _____ FRACO FORTE	
Muito Obrigada!!	

APENDICE 7 – Definição e referência dos descritores utilizados.

DESCRIPTOR	DEFINIÇÃO	REFERÊNCIA
AROMA		
Característico	Próprio do mel, que lembra mel; o conjunto das notas que sente-se ao abrir um vidro de mel	Fraco: Nenhum Forte: Mel de Abelha <i>Apis mellifera</i>
Floral	Próprio das flores, levemente doce.	Fraco: 1 gota de essência floral diluído em 1 L de água. Forte: 3 gotas de essência floral diluído em 1 L de água
Caramelo	Açúcar aquecido, levemente queimado.	Fraco: 50g de açúcar cristal caramelizado por 2' 7" Forte: 50g de açúcar cristal caramelizado por 3' 50"
Medicinal	Aroma de chás medicinais caseiros	Fraco: 10 mL de chá concentrado de diversas folhas diluído em 40 mL de água Forte: chá concentrado de diversas folhas (1g de eucalipto, 1g de erva doce, 0,5g de malva, 1g de boldo, 0,5g de camomila diluídos em 100mL de água fervente)
Cera	Cheiro da cera alveolada, separada do favo	Fraco: Nenhum Forte: Cera da abelha
Cravo	Associado a especiaria cravo	Fraco: Nenhum Forte: Solução de cravo a 10%
Herbáceo	Odor associado com jardim, notas de folhas verdes	Fraco: Nenhum Forte: Grama macerada
SABOR		
Ácido	Característico de soluções de ácidos orgânicos (ácido cítrico).	Fraco: 0,05g de ácido cítrico em 100mL de água Forte: 0,1g de ácido cítrico em 100mL de água
Doce	Associado à solução de sacarose.	Fraco: 2g de sacarose comercial em 100mL de água Forte: 10g de sacarose comercial em 100mL de água
Medicinal	Sabor proveniente da infusão de folhas, cascas ou caules.	Fraco: 10 mL de chá concentrado de diversas folhas diluído em 40 mL de água Forte: chá concentrado de diversas folhas (1g de eucalipto, 1g de erva doce, 0,5g de malva, 1g de boldo, 0,5g de camomila diluídos em 100mL de água fervente)
Caramelizado	Gosto doce proveniente da caramelização dos açúcares.	Fraco: 50g de açúcar cristal caramelizado por 2' 7" Forte: 50g de açúcar cristal caramelizado por 3' 50"

