



KELINTON CÂNDIDO SANTOS

**COMBINAÇÕES DE ANÁLISES
FÍSICO-QUÍMICAS E TÉCNICAS ANALÍTICAS
PARA DETECÇÃO DA PARAFINA À
CERA DE *Apis mellifera* Linnaeus**

LAVRAS-MG

2015

KELINTON CÂNDIDO SANTOS

**COMBINAÇÕES DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E TÉCNICAS
ANALÍTICAS PARA DETECÇÃO DA PARAFINA À
CERA DE *Apis mellifera* Linnaeus**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Entomologia, para obtenção do título de Mestre.

Dr. César Freire Carvalho
Orientador

Dr. Mário César Guerreiro
Coorientador

**LAVRAS-MG
2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Santos, Kelinton Cândido.

Combinações de análises físico-químicas e técnicas analíticas
para detecção da parafina à cera de *Apis mellifera* Linnaeus /
Kelinton Cândido Santos. – Lavras : UFLA, 2015.

59p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador(a): César Freire Carvalho.

Bibliografia.

1. Abelhas. 2. *Apis mellifera*. 3. Cera. 4. Parafina. 5. Parafina
adicionada a cera. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

KELINTON CÂNDIDO SANTOS

**COMBINAÇÕES DE ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E TÉCNICAS
ANALÍTICAS PARA DETECÇÃO DA PARAFINA À
CERA DE *Apis mellifera* Linnaeus**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Entomologia, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 fevereiro 2015.

Dr^a. Priscila Ferreira de Sales UFLA

Dr. Stephan Malfitano Carvalho UFU

Dr. César Freire Carvalho
Orientador

Dr. Mário César Guerreiro
Coorientador

**LAVRAS-MG
2015**

A Deus por estar sempre iluminando meus passos e me concedendo novas oportunidades.

Aos meus pais, Edmar Cândido dos Santos e Maria da Conceição Santos, pelo amor e carinho que sempre tiveram comigo.

Aos meus familiares, em especial minha esposa Daniela Zanon Bagetti, pelo amor, compreensão, apoio e por ter me agraciado com uma filha Alexandra Bagetti dos Santos.

Em memória de meu irmão Rosnei Cândido dos Santos, que sempre foi mais do que um irmão, um amigo. Mesmo fisicamente distante, continua a guiar meus passos, com aquele sorriso singular.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), principalmente ao Departamento de Entomologia, e todos seus docentes, pelos conhecimentos adquiridos, amizade e a oportunidade dessa realização.

Ao Conselho de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Com muito respeito, carinho e grande admiração, ao meu orientador Prof. Dr. César Freire Carvalho que, com grande competência e amizade, auxiliou-me na condução e concessão deste trabalho.

Com enorme admiração, carinho e respeito, a Prof.^a Brígida Souza, que busca sempre maximizar o conhecimento de seus alunos com muito carinho e dedicação.

Ao Prof. Geraldo A. Carvalho pela amizade, conhecimento repassado, carinho e auxílios na condução de minha qualificação.

A Dr.^a Lidiany Mendonça Zacaroni Lima CPQ/DQI-UFLA, pela amizade, e a ajuda na realização das análises químicas.

A Dr.^a Priscila Ferreira de Sales CPQ/DQ-UFLA, pela amizade, auxílio na condução das análises químicas e das análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Mário César Guerreiro CPQ/DQI-UFLA, pela amizade, orientação e auxílio na interpretação dos dados.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia, Júlio A. O. Filho, Nazaré A. Moura e Elaine A. Louzada.

Aos colegas e amigos da pós-graduação pela amizade durante esta caminhada.

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho analisar física e quimicamente a cera de *Apis mellifera* na qual foram adicionados diferentes teores de parafina. As avaliações foram realizadas por meio de técnicas de cromatografia gasosa associada espectrometria de massas (GC-MS), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), calorimetria diferencial exploratória (DSC) e análises físico-químicas, as quais incluem índice de acidez, índice de saponificação e temperatura de fusão, para tanto, empregou-se cera contendo parafina em diferentes proporções, correspondentes a 1,5%; 3%; 6%; 12%; 24% e 48%. O preparo das amostras foi realizado no Departamento de Entomologia (DEN/UFLA) e analisadas no Departamento de Química, central de análises e prospecção química (CAPQ/DQI-UFLA). O conjunto de dados provenientes das análises de GC-MS e FT-IR foi analisado utilizando o reconhecimento de padrões, o qual envolveu a análise de componentes principais (PCA) e a análise de Componentes Hierárquicos (HCA). A análise de CG-MS permitiu identificar 21 compostos presentes na cera pura de *A. mellifera* e cera com parafina, sendo que pelas análises de PCA e HCA, a amostra contendo 48% de parafina (T6) foi a que mais permitiu detectar a presença de parafina à cera. Na análise do índice de acidez foi verificado que o aumento do teor de parafina na cera ocasionou a redução da acidez quando comparado com a cera pura. A análise de saponificação revela que essa técnica não pode ser considerada como satisfatória para a detecção de adição de parafina à cera. A análise de DSC mostra uma redução na temperatura de fusão de acordo com o aumento de adição de parafina, conduzindo a resultados não condizentes com o parâmetro pré-estabelecido na literatura quando se tem adição de parafina acima de 12%. Os resultados foram conclusivos e permitiram caracterizar uma amostra de cera com adição de parafina.

Palavras-chave: Cera de abelha. Adição de parafina. Análises físico-químicas. CG-MS. FTIR. DSC.

ABSTRACT

The objective was to analyze physical and chemically the wax of *Apis mellifera* in which were added different paraffin contents. The evaluations were performed by gas chromatography techniques associated mass spectrometry (GC-MS) spectroscopy in the infrared with Fourier transform (FT-IR), differential scanning calorimetry (DSC) and physic-chemical analyzes, which include acid value, saponification value and melting temperature, therefore, it was used wax containing paraffin in different proportions, corresponding to 1.5%; 3%; 6%; 12%; 24% and 48%. The sample preparation was conducted at the Entomology Department (DEN/UFLA) and analyzed at the Chemistry Department, central analysis and chemical prospecting (CAPQ/DQI-UFLA). The data set from the GC-MS and FT-IR analysis was analyzed using pattern recognition, which involved the principal component analysis (PCA) and the analysis of Hierarchical Components (HCA). The GC-MS analysis identified 21 compounds in pure wax *A. mellifera* and wax with paraffin, and by analysis of PCA and HCA, the sample containing 48% paraffin (T6) was the most possible to detect the presence of paraffin in the wax. In the analyzing of the acid value was found that increasing the paraffin wax content caused the acidity reduction when compared with pure wax. Saponification analysis reveals that this technique can not be considered satisfactory for the detection of adding paraffin in the wax. The DSC analysis shows a decrease in melting temperature according increasing addition of paraffin, leading to inconsistent results with pre-defined parameter in the literature when it is added paraffin above 12%. The results were conclusive and allowed to characterize a wax sample with paraffin addition.

Keywords: Bees wax. Adding paraffin. Physical-chemical analysis. CG-MS. FTIR. DSC.

LISTA DE ABREVIATURAS

P.	Parafina
C.	Cera
T.	Tratamentos

LISTA DE SIGLAS

CAPQ	Central de análises e prospecção química
DEN	Departamento de Entomologia
DQI	Departamento de Química
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier
GC-MS	Cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa
HCA	Análises de componentes hierárquicos
PCA	Análises de componentes principais
UFLA	Universidade Federal de Lavras

LISTA DE SÍMBOLOS

m/z	Massa-carga
g	Gramas
M	Molar
mL	Mililitro
ms	Milisegundos

SUMÁRIO

RESUMO	7
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Importância econômica das abelhas	15
2.2 Caracterização da cera de abelha	18
2.3 Caracterização da parafina.....	23
2.4 Cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas.....	24
2.5 Espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).....	25
2.6 Análises físico-químicas.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Preparo das amostras.....	28
3.2 Amostras e reagentes.....	29
3.3 Cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-MS)	29
3.4 Análise por espectroscopia na região do infravermelho.....	30
3.5 Determinações de parâmetros físico-químicos da cera de abelha.....	31
3.5.1 Índice de acidez.....	31
3.5.2 Índice de saponificação.....	32
3.5.3 Temperatura de fusão	32
3.5.4 Aplicação do reconhecimento de padrões para análise quimiométrica dos dados	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Composição química da parafina e da cera de <i>Apis mellifera</i>	34
4.2 Análise da cera de <i>Apis mellifera</i> associada com diferentes teores de parafina.	39

4.4	Análise de espectroscopia no infravermelho.....	42
4.5	Análises físico-químicas da cera de abelha <i>Apis mellifera</i>	47
4.5.1	Índice de acidez.....	47
4.5.2	Índice de saponificação.....	48
4.5.3	Temperatura de fusão por DSC	50
5	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

A cera das abelhas *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (Hymenoptera: Apidae) é um dos principais produtos apícolas, essencial para o desenvolvimento de uma colônia, a qual é utilizada na construção de favos, servindo como local de armazenamento de alimento (o pólen e o mel) e desenvolvimento de ovos, larvas e pupas. A cera é produzida por oito glândulas cerígenas dispostas aos pares na parte ventral do quarto ao sétimo urosternito do abdome das abelhas operárias, estando amplamente desenvolvidas com 12 a 18 dias de vida. A produção de cera de uma colônia demanda uma quantidade significativamente importante de energia, o equivalente a cerca de 7,5 kg de mel para produzir 1,2 kg de cera (TAUTZ, 2010). É uma substância que tem muitos usos na indústria, como impermeabilizantes, polimento de superfícies, produção de armas, móveis, couros, fabricação de velas, na produção de cosméticos, loções, cremes faciais e labiais (COUTO; COUTO, 2006; TOLLOCH, 1980; WIESE, 2005).

A cera que possui a melhor qualidade é aquela procedente de opérculos, por não conter resíduos dos conteúdos tegumentares das larvas, pedaços da pupa e fragmento de própolis (COUTO; COUTO, 2006). Assim, a produção comercial e utilização da cera de qualidade tornam-se vantajosas não só para a produtividade e qualidade do mel obtido, mas também para aumentar os lucros do apicultor (BARROS et al., 2009).

A cera de abelha é composta por uma mistura de ésteres (67%), hidrocarbonetos (14%), ácidos graxos (12%) e álcoois (1%) (TULLOCH, 1980). Cada um desses compostos químicos possui diferentes comprimentos de cadeia de átomos de carbono, sendo praticamente impossível fracionar esses componentes da cera por métodos como a destilação e a cristalização, mas a

determinação da composição detalhada de cera de abelha só se tornou possível a partir de 1960, por meio da aplicação de procedimentos modernos de cromatografia, como por exemplos a cromatografia gasosa que possibilitou a identificação de mais de 300 compostos químicos diferentes (BARROS et al., 2009; TAUTZ, 2010; TOLLOCH, 1980).

Contudo, sua composição depende das subespécies de abelhas, a idade da cera e as circunstâncias climáticas de sua produção (BONVEHI; BERMEJO, 2012). No manejo realizado para criação de abelhas e conduzido tecnicamente, o profissional em apicultura prepara os quadros das colmeias, ninho e melgueiras, colocando lâminas de cera alveolada de modo a facilitar e acelerar sua construção. Essas são a base pura para construção dos favos, sendo os prismas hexagonais usados para reprodução da colônia e armazenamento do alimento, o pólen e o mel. As lâminas são produzidas em cilindros alveoladores por uma prensa especializada ou mesmo pelo próprio apicultor. Nesse processo é utilizada toda a cera obtida no manejo das colmeias e também aquela oriunda dos opérculos e recolhida durante o processamento dos quadros na desoperulação e centrifugação do mel (SEMKIW; SKUBITA, 2013). Uma das situações indesejáveis que ocorre no processamento da cera são adições de parafina. A utilização desse composto tem como objetivo a redução de custos, uma vez que a parafina é um produto barato e também aumenta o volume de cera alveolada produzida (COUTO; COUTO, 2006). Contudo, o uso de alguma substância estranha à cera provoca o fenômeno da rejeição (SEMKIW; SKUBITA, 2013). Nesse caso, as operárias não aceitam as lâminas alveoladas e não constroem os prismas hexagonais e em algumas situações há total rejeição pelas abelhas, podendo mesmo ocorrer o abandono da colmeia (SILVA et al., 2008). Porcentagens elevadas de parafina incorporada à cera é uma das fases que induz os adultos a não aceitação das lâminas inseridas nos quadros, sendo que em algumas situações pode ser detectado até 50% de parafina. A parafina

por ser um produto que possui algumas características físico-químicas próximas à cera é praticamente improvável reconhecer visualmente se foi ou não incorporada à cera. Porém, uma das maneiras para conhecer se uma porção de cera apresenta ou não parafina é por meio de análises químicas.

Assim, considerando que a cera é o principal produto empregado pelas operárias de abelhas na colmeia e a possibilidade real de rejeição desses insetos em casos de adição de parafina pelo apicultor, objetivou-se nesta pesquisa analisar por meio de atributos físico-químicos a composição de cera de *A. mellifera* oriunda de favos de mel que foram desoperculados e incorporada com diferentes teores de parafina por meio de técnicas de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas, espectroscopia na região do infravermelho transformada de Fourier, calorimetria diferencial exploratória, Índice de acidez, Índice de saponificação e Temperatura de fusão.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância econômica das abelhas

As abelhas *A. mellifera* são insetos valiosos na polinização de plantas superiores, as angiospermas (SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES, 2007). Elas, ao visitarem as flores, coletam um pouco de pólen armazenando-o na parte da tíbia do terceiro par de pernas, região chamada de corbícula. Também coletam néctar, sendo as matérias-primas naturais renováveis que servirão para alimentação, construção e o funcionamento da colônia (TAUTZ, 2010). O pólen, presente nas anteras de flores masculinas, além de ser necessário para a reprodução das mesmas foi evoluído de modo a ser atraente e alimento para as abelhas, sendo a fonte natural e contendo de 6% a 28% de proteínas, um componente importante para o desenvolvimento da colmeia (BARBOSA-COSTA et al., 2011; WINSTON, 2003). Todavia, ao garantir o desenvolvimento de sua colônia, as abelhas também perpetuam as espécies vegetais, aumentando a qualidade e quantidade dos produtos agrícolas pelo seu serviço de polinização.

A prestação de serviço de polinização realizada pelas abelhas às plantas é responsável por mais de 70% da produção agrícola de sementes e frutas sendo considerada essencial para a regulação de ecossistemas e produção de culturas alimentícias (IMPERATRIZ-FONSECA, 2010; RICKETTS et al., 2008) em que se verifica que flores bem polinizadas produzem frutos em maior número e de melhor qualidade. Contudo, o recente declínio dos polinizadores em todo o mundo e a queda na produção de muitas culturas alimentícias como a de legumes e frutas mostra a vulnerabilidade dessas culturas na dependência por agentes polinizadores (GALLAI et al., 2009).

Segundo Imperatriz-Fonseca et al. (1993) o surgimento e a proliferação das abelhas relacionam com o aparecimento das angiospermas. Teriam surgido na metade do período Cretáceo, após a origem das plantas com flores

(RAMALHO; SILVA; CARVALHO, 2007), onde podem apresentar comportamento solitário, parassocial, subsocial e eussocial (MICHENER, 1974). As relações sociais mais complexas existem nas eussociais, com sobreposição de gerações, existência de castas definidas e divisão do trabalho, onde o nível mais complexo é encontrado nas espécies de Apinae (SANTOS, 2010).

Para Kerr et al. (1996) as abelhas eussociais são responsáveis, de acordo com o ecossistema, por 40 a 90% da polinização das espécies silvestres. De acordo com Wille (1983) essas abelhas visitam frequentemente as flores nas altas copas, podendo essa vegetação ser prejudicada pela sua ausência e falta de polinização, causando modificações nas comunidades de árvores e florestas tropicais. Sua conservação juntamente a outros polinizadores é de suma importância (KEARNS; INOUE; WASER, 1998), uma vez que são consideradas mantedoras da biodiversidade por meio dos serviços prestados às comunidades florísticas de todo o mundo via polinização (REGO et al., 2006).

O hábito generalista é considerado uma necessidade básica e, portanto, aceito como padrão entre essas abelhas eussociais da família Apidae, com grandes colônias perenes, altas taxas de reprodução de indivíduos, que precisam de muito alimento, ao longo do ano inteiro (RAMALHO; SILVA; CARVALHO, 2007). A polinização representa atualmente um fator de produção fundamental na condução de muitas culturas agrícolas em todo o mundo. A polinização pode ocorrer na própria planta ou em plantas de mesma espécie que estejam em lugares distintos, onde o grão de pólen é transportado para o estigma da flor ou, ainda, com a transferência dos grãos de pólen da antera de uma flor para o estigma de outra flor, sendo esse da mesma espécie, mas de plantas diferentes com intervenção de agentes polinizadores, como por exemplo, os insetos (IMPERATRIZ-FONSECA, 2010).

O Brasil apresenta uma grande diversidade de espécies de abelhas, estimadas em 3000 (VOLLET-NETO et al., 2010). Isso demonstra o seu potencial para obtenção de quantidade expressiva de produtos apícolas, pois apresenta características climáticas favoráveis, ampla e variada vegetação silvestre. Essas abelhas possuem alta rusticidade e potencial para a produção de mel, pólen, cera, própolis, apitoxina e geleia real (SEREIA et al., 2010).

Segundo Da Silva et al. (2010), as abelhas que coletam pólen limitam suas visitas às flores masculinas, enquanto que as abelhas coletoras de néctar visitam todas as flores, realizando a polinização cruzada. O pólen é a fonte principal de proteínas e vitaminas, importante para o desenvolvimento completo das larvas, abelhas recém-nascidas e rainha. O mel é produzido pelas abelhas a partir do néctar recolhido de flores e processado pelas enzimas do trato digestório desses insetos, sendo armazenado em favos para servir-lhes de alimento.

As abelhas são essenciais agentes entomófilos, voam longas distâncias em busca de matéria-prima, pólen e néctar, para manutenção da colmeia, também promovendo a polinização, influenciando na produção de frutos, sementes e melhoria na reprodução de espécies vegetais. Proporções de proteínas, carboidratos, vitaminas, sais minerais e água são encontrados no pólen e mel, os quais compõem a dieta indispensável para o desenvolvimento das colônias (SOUZA; EVANGELISTA-RODRIGUES, 2007; CARVALHO-ZILSE et al., 2007).

A confecção dos favos oferece às abelhas, proteção e local adequados para desenvolver seus indivíduos e manter o estoque de alimento. Os favos contêm feromônios que são identificados pelas abelhas e servem como um substrato para a comunicação (SILVA et al., 2008).

De acordo com Ramalho, Silva e Carvalho (2007), as colônias de *A. mellifera* possuem mecanismos eficientes de monitoramento que levam à exploração mais intensa das fontes florais mais produtivas do ambiente.

A multiplicação artificial e comercialização de colônias de abelhas melíferas podem tornar-se uma alternativa de mercado para os apicultores, pois a taxa de sucesso na captura de enxames silvestres vem caindo ano após ano, devido tanto ao aumento no número de colmeias a serem povoadas, como à redução das condições favoráveis para a multiplicação natural dos enxames, principalmente com o aumento das áreas desmatadas (SILVA; FREITAS, 2004).

De acordo com Imperatriz-Fonseca, Saraiva e Gonçalves (2007), a importância econômica das abelhas como agentes entomófilos na agricultura comercial, tem demonstrado a vulnerabilidade da produção de alimento em decorrência do alto declínio de polinizadores em todo o mundo, realçando consequências drásticas como a redução da produção de frutas e verduras para números abaixo do ideal ao consumo atual ao se pensar em uma escala global.

A apicultura é uma atividade dependente dos recursos naturais, ocorrendo oscilação de produção de acordo com as condições climáticas e ambientais de cada região, pois as abelhas buscam seu alimento na natureza, e possuem uma relação mútua com as plantas, que fornecem seus alimentos (néctar e pólen) e outros materiais essenciais à dieta desses insetos e como recompensa as plantas recebem os serviços de polinização realizados pelas abelhas (ANDRADE et al., 2013).

2.2 Caracterização da cera de abelha

A produção de cera de abelha em uma colônia é fundamental para o sucesso da espécie, pois a cera serve para construir os favos, além de armazenarem alimentos atuam na regulação térmica, distribuição de feromônios e para oviposição da rainha (TAUTZ, 2010; WINSTON, 2003).

A cera de abelha está ligada à história dos povos indígenas, havendo evidências da importância dos produtos desses insetos como fonte de alimento e uso medicinal para o homem (mel, pólen, própolis). A cera é utilizada na conservação de produtos agrícolas, confecção de artefatos, artesanatos, etc., servindo também em misturas com resinas na confecção de artefatos para caça e pesca por populações nativas (SAMPAIO; CASTRO; SILVA, 2009).

Segundo Bernal et al. (2005), a cera de abelha é um produto gorduroso natural, com uma produção mundial de cerca de 60 mil toneladas. A cera de abelha tem múltiplos usos em cosméticos, farmácia, alimentação e também na indústria como: impermeabilizantes, lustres para pisos, marmorarias, produção de armas, móveis, couros e fabricação de velas, além de ser utilizado pelos apicultores para fazer uma melhor utilização das floradas. Antigamente o produtor rural sustentava sua família com a venda de cera e mel produzido em sua propriedade (IMPERATRIZ-FONSECA; SARAIVA; GONÇALVES, 2007). É uma alternativa para manutenção das espécies, sendo uma atividade de desenvolvimento sustentável (KERR et al., 1996).

Segundo Brasil (2001) a cera de abelha destinada à comercialização deve atender aos requisitos mínimos de composição e qualidade. É caracterizada como um produto secretado pelas abelhas para formação dos favos nas colmeias de consistência plástica, de cor amarelado-parda, de fácil fusão, e quando não tiver passado por qualquer processo de purificação, untuosa ao tato, mole e plástica ao calor da mão, fratura granulosa, odor lembrando o do mel, sabor levemente balsâmico, temperatura de fusão 61°C a 65°C, insolúvel em água, solúvel em óleos voláteis, éter, clorofórmio e benzeno, índice de acidez de 17 a 24mg KOH/g, índice de ésteres 72 a 79, índice de relação de ésteres e acidez 3,3 a 4,2 e ponto de saponificação turva de no máximo 65°C.

A composição química da cera de abelha depende em parte das subespécies de *A. mellifera*, da idade da cera e das condições climáticas da sua

produção. Essa variação ocorre principalmente na quantidade relativa dos diferentes compostos químicos presentes na cera, sendo esses hidrocarbonetos, ácidos graxos livres, monoésteres, diésteres, triésteres, hidroximonoésteres, hidroxipoliésteres, monoésteres, poliésteres de ácidos graxos (Figura 1) (BARROS; NUNES; COSTA, 2009; MAIA; NUNES, 2013).

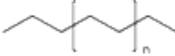
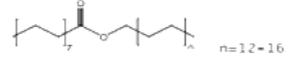
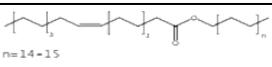
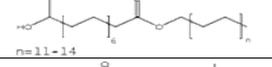
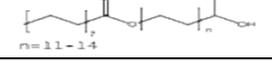
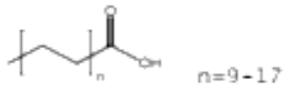
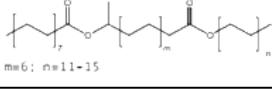
Estrutura		%
Hidrocarbonetos	Alcanos  n=9-13	12,80%
	Alcenos  n=7-13	2,90%
	Total Hidrocarbonetos	14-16%
Ácidos Graxos Livres		12-15%
Monoésteres	Ésteres alquilo do ácido palmítico  n=12-16	40,80%
	Ésteres alquilo do ácido oleico  n=14-15	
Hidroximonoésteres	Ésteres do ácido hidroxipalmítico  n=11-14	9,20%
	Diolésteres do ácido palmítico  n=11-14	
Diésteres	Diésteres de diois  n=9-17	7,40%
	Ésteres de hidroxiaçidos acilados  m=6; n=11-15	
Total Ésteres		57-67%
Álcoois Livres		1%

Figura 1 Estrutura química e abundância relativa dos diferentes componentes da cera de abelha

Segundo Tulloch (1980), Barros, Nunes e Costa (2009) os hidrocarbonetos formam grupos de compostos químicos que são abundantes na cera. Os n-alcanos, representando cerca de 67% de todos os hidrocarbonetos que ocorrem em cera de abelhas, podendo estar presente alcanos ramificados em proporções menores de 0,2%, sendo possivelmente provenientes em sua maioria de fontes exógenas, em que esses possuem um número par de átomos de carbono na molécula. Além dos hidrocarbonetos saturados, podem ser encontrados na cera de abelha os hidrocarbonetos insaturados alifáticos com ligações duplas entre dois átomos de carbono, os alcenos (WAS et al., 2014). Contudo, alguns pesquisadores (JIMÉNEZ et al., 2004, 2006; TULLOCH, 1980) observaram a presença de dienos, os quais são definidos como hidrocarbonetos insaturados com duas ligações duplas.

Entretanto, Barros, Nunes e Costa (2009) sinalizaram que além desses compostos, podem estar presentes na cera de abelha os monoésteres representando em média 40,8% com 20 a 36 átomos de carbono de cadeia linear com carbonos pares de átomos na molécula (Figura 1).

A coloração mais escura apresentada na cera de abelha, segundo Maia e Nunes (2013), se deve ao acúmulo de resíduos cuticulares de abelhas encontradas nos favos de ninho, indicando grande quantidade de alcanos de cadeias lineares pares.

Segundo Semkiw e Skubita (2013), na cera pura, o índice de acidez é um indicador do conteúdo de ácidos graxos livres e monoésteres ácidos presentes na cera, sendo o índice de saponificação um indicador do conteúdo de ácidos graxos livres e de ácidos graxos esterificados, os quais são libertados durante o processo de saponificação.

Os compostos químicos presentes na cera de abelha consistem de uma série de homólogos diferindo apenas no comprimento da cadeia de carbono da molécula com dois átomos. Jimenez et al. (2007), estudando formas para

detectar adulteração com parafina em diferentes porcentagens de cera utilizando a técnica analítica GC/FID, observaram que criar parâmetros que sirvam de guia para cera pura tem mostrado resultados interessantes para detectar porcentagens acima de 1%.

Contudo, Barros, Nunes e Costa (2009) e Maia e Nunes (2013) citaram que o estudo da composição química da cera de abelha ainda apresenta grandes desafios, devido à diversidade de componentes de natureza lipídica e pela fácil volatilização. Dessa maneira, torna-se difícil criar padrões da composição de cera de abelha que sirvam de guia para cera pura, pois apicultores vêm realizando misturas de quadros velhos com quadros novos, quando vão realizar o seu processamento, o que acaba modificando os padrões físico-químicos.

Na indústria, a cera de abelha passa por vários processos, sendo limpa onde são retirada todos os resíduos por meio de fusão (podendo ser por fervura em água, por meio de vapor, ou pelo calor da energia elétrica ou solar) seguida por sedimentação e filtração (BARROS; NUNES; COSTA, 2009; BOGDANOV, 2004). Cera de abelha após passar pela reciclagem é comercializada em folhas laminadas que serão colocadas em quadros vazios nas colmeias com o intuito de acelerar a produção de favos.

Segundo Maia e Nunes (2013) a qualidade da cera de abelha mostra-se elementar na apicultura, com o propósito de preservar suas propriedades físico-químicas e de melhorar a qualidade e quantidade dos produtos oriundos de abelhas, evitando uma possível rejeição de folhas laminadas à base de cera de abelha. Contudo, o alto valor comercial da cera de abelha torna a sua adulteração com produtos lipídicos, em particular com parafina, frequente, sendo citado por vários estudos onde procuram encontrar parâmetros de reconhecimento da cera de abelha pelas abelhas, incluindo o uso de parâmetros físico-químicos (BERNAL et al., 2005; MAIA; NUNES, 2013; SERRA, 1990; TULLOCH, 1972, 1973, 1980) e estudos de cromatografia gasosa com detecção de ionização

de chama (BONVEHI; BERMEJO, 2012; MAIA; BARROS; NUNES, 2013; JIMÉNEZ et al., 2004, 2006, 2007, 2009; SERRA, 1988; TULLOCH, 1972, 1980; WAŚ et al., 2014).

2.3 Caracterização da parafina

A parafina incorporada à cera de abelha proporciona um maior volume de cera a ser utilizado pelo apicultor para produção de folhas laminadas a serem colocadas nos quadros, reduzindo a quantidade de cera gasta na produção de folhas laminadas e a quantidade de mel gasta pelas abelhas na produção de cera (SILVA et al., 2008).

A parafina é um produto oriundo do petróleo, formada por uma mistura de hidrocarbonetos de cadeia longa contendo mais de 15 átomos de carbono. Possui baixos teores de hidrocarbonetos poliaromáticos, de cor branca e estabilidade química, com temperatura de fusão que pode variar em função do tipo e grau de pureza para o qual foi produzida. Esse composto possui alcanos de cadeia linear saturada que compõem uma parte dominante dessa mistura, em que suas propriedades e composição podem variar dependendo da sua utilização (SEMKIW; SKUBITA, 2013).

Assim, vários autores discriminaram modificações na cera de abelha de acordo com os valores anormais de alguns parâmetros analíticos, por exemplo, a temperatura de fusão, o valor de saponificação ou o valor de iodo (BERNAL et al., 2005; BONVEHI; BERMEJO, 2012; SEMKIW; SKUBITA, 2013).

De acordo com Bonvehi e Bermejo (2012), a caracterização físico-química da cera de abelha pura é necessária para diferenciá-la corretamente a partir de folhas de cera de abelha processadas e adulteradas.

2.4 Cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas

Os espectrômetros de massas com quadrupolo linear são formados por quatro tubos cilíndrico paralelos, de comprimento variável entre 100 e 200mm (Figura 2), onde os íons entram no centro desses tubos pelas suas extremidades passando ao seu eixo, sendo que, somente os íons com determinado valor de massa-carga (m/z) mostram-se estáveis, sendo capazes de atravessar o quadrupolo até o detector. Os íons instáveis de m/z diferentes possuem instabilidade errática e acabam colidindo com os tubos ou saindo do quadrupolo (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). No espectro de massas, observam-se as massas dos fragmentos positivos, juntamente ao íon molecular nas suas concentrações relativas, em que a banda mais intensa do espectro é chamada de pico-base, que apresenta aleatoriamente uma intensidade 100%. A intensidade do íon molecular depende de sua estabilidade, pois, os íons moleculares estáveis são os de sistemas aromáticos. Os picos do íon moleculares produzidos e reconhecidos incluem geralmente cetonas, aminas, ésteres, ácidos carboxílicos, aldeídos, amidas e hidrocarbonetos.

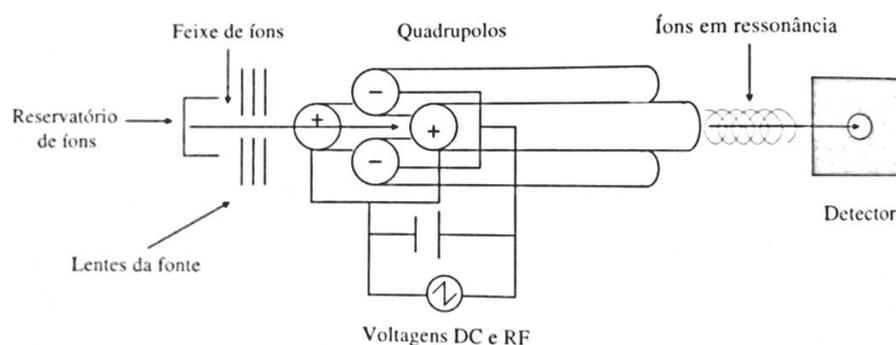


Figura 2 Esquema do “filtro de massas” com quadrupolo
Fonte: Silverstein, Webster e Kiemle (2006)

A cromatografia gasosa de alta temperatura com detecção por ionização de chama mostra-se como um procedimento atual para estudar a caracterização de cera de abelha e determinar a sua qualidade, assim, como a cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC-MS), que também tem sido utilizada para identificar os componentes encontrados na cera de abelha. Segundo Silverstein, Webster e Kiemle (2006) os valores anormais de alguns parâmetros analíticos são encontrados. Assim, a adulteradora adicionada pode ser apenas detectada por procedimentos de cromatografia em fase gasosa (BONVEHI; BERMEJO, 2012). Entretanto, (TULLOCH, 1980; JIMÉNEZ, BERNAL et al., 2004) citaram que a cromatografia em fase gasosa é a técnica mais comum para caracterizar diferentes tipos de ceras, por exemplo, a de abelhas, de acordo com seus compostos químicos constituintes, podendo ser utilizada para análises rápidas e comparações de grandes números de amostras.

2.5 Espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR).

A espectrometria na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) é uma técnica utilizada nos últimos anos, em que toda a faixa de radiação passa junto pela amostra com um grande ganho de tempo, permitindo melhorias na resolução ($\leq 0,001 \text{ cm}^{-1}$), obtendo dados de fácil manipulação. A radiação que mostra os dados de interesse fica entre $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ é separada por dois feixes (Figura 03). Com a variação no comprimento do pistão, ocorre um ajustamento do espelho B realizando uma variação na distância percorrida pelo feixe B, assim, a passagem da radiação pela amostra transmite uma faixa de energia grande (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

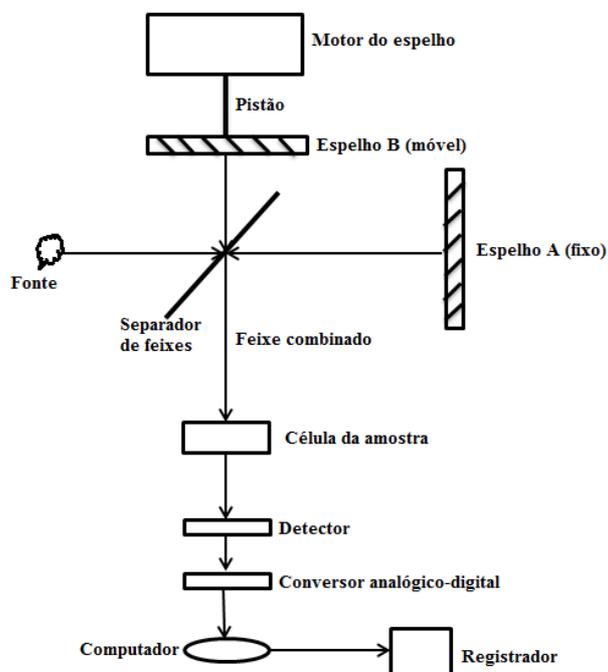


Figura 3 Esquema de um espectrômetro de FT-IR
Fonte: Silvestein, Webster e Kiemle (2007)

De acordo com Ribeiro (2012), um espectro de infravermelho possui um amplo conjunto de informações, o que pode prejudicar sua análise sem o auxílio de ferramentas quimiométricas que analisam os dados espectrais.

O reconhecimento de padrões tem sido utilizado como ferramenta multivariada em química analítica, pois, a quantidade de dados dos parâmetros analisados no reconhecimento de padrões é elevada e a utilização da descrição gráfica facilita a interpretação dos resultados. Esse conjunto de dados é capaz de elaborar gráficos que apresentam grande quantidade de informações compreendidas em um conjunto de dados analítico. Esse certamente é um método que não leva em consideração a identidade da amostra. Entre eles

observa-se à análise de componentes principais (PCA) e análise de componentes hierárquicos (HCA), que permitem a visualização gráfica de todo o conjunto de dados, podendo esses ser variáveis e elevados. O uso dessas ferramentas quimiométricas (PCA e HCA) aumenta a compreensão do conjunto de dados. A PCA reduz o tamanho do conjunto de dados original, preservando a maior quantidade de informação possível, enquanto a HCA agrupa as amostras em categorias, apoiando-se na similaridade dos dados de uma mesma categoria e nas diferenças entre os membros de categorias diferentes (CORREIA; FERREIRA, 2007; MAIA; NUNES, 2013).

2.6 Análises físico-químicas

Segundo Brasil (1981), a temperatura de fusão da cera não deve exceder 75°C, devendo acontecer nos limites de 62 a 65°C. Para Bernal et al. (2005) a temperatura de fusão seria aquela em que a cera estivesse completamente fundida, líquida, totalmente transparente e sem turbidez, ficando seus limites entre 61 a 66°C.

No índice de acidez, deve-se atentar para neutralização dos ácidos até que atinjam seu ponto de equivalência, para 1g de cera, mantendo seus valores médios entre 17 a 24 e o ponto de saponificação deve ser indicado pelo início da solidificação dos ácidos graxos (BRASIL, 1981).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparo das amostras

A cera de abelhas *A. mellifera* utilizada nas análises foi obtida de opérculos de quadros de melgueiras coletados no Apiário da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Após a coleta da cera dos opérculos ela foi derretida empregando-se um derretedor a vapor à uma temperatura situada entre $67\pm 2^{\circ}\text{C}$. Uma vez liquefeita foi mantida em repouso em um contêiner retangular até completar solidificação por um período de quatro horas. Desse material foram coletadas as amostras destinadas a experimentação. A parafina Solven Wax 140 Food Grade foi adquirida da empresa Solven Solventes e Químicos LTDA (Hortolândia, São Paulo). Utilizando uma balança de precisão, foram pesadas e preparadas oito amostras, sendo a primeira com a cera pura, outra com parafina pura e seis amostras de cera contendo 1,5%; 3,0%; 6,0%; 12,0%; 24,0% e 48% (p/p) de parafina, totalizando oito amostras (Tabela 1).

Tabela 1 Tratamentos (T) e as Amostras (A)

Tratamentos	Amostras
P0	Parafina = 100g
T0	Cera pura = 100g C
T1	1,5% P + 98,5% C
T2	3,0% P + 97,0% C
T3	6,0% P + 94,0% C
T4	12% P + 88,0% C
T5	24% P + 76,0% C
T6	48% P + 52,0% C

Legenda: T= tratamentos; P= parafina; C= cera

Após a pesagem, os tratamentos foram colocados em um Becker de 250 ml e em seguida submetidos a banho-maria à uma temperatura que oscilou entre

66±2°C. As amostras foram agitadas utilizando um bastão de vidro para cada tratamento por um período de 1,12 horas até correta homogeneização. Após as amostras estarem totalmente fundidas e as misturas de cera e parafina se tornarem homogêneas, os frascos com as amostras foram retirados do banho-maria ficando em repouso para sua total solidificação por um período de quatro horas. Os tratamentos foram identificados para posteriores análises de caracterização, as quais foram realizadas no laboratório do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.2 Amostras e reagentes

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, espectroscopia no infravermelho, calorimetria exploratória diferencial, índice de acidez e índice de saponificação. Para a solubilização das amostras utilizou-se clorofórmio P.A (Vetec). Para as análises de índice de acidez os reagentes utilizados foram: hidróxido de potássio (Vetec), água destilada tipo III, ftalato ácido de potássio (padrão primário), álcool isopropílico PA (Merck). Nas análises de saponificação foram utilizados hidróxido de sódio (Sigma aldrich), ácido clorídrico PA (Vetec) e água destilada tipo III.

3.3 Cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-MS)

Para a análise por GC/MS, cerca de 3,0 mg de cera de abelha, parafina e cera com parafina foram solubilizadas em 4,0 mL de clorofórmio, sob agitação por 2 min. As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas GC-MS QP2010 Plus (Shimadzu, Japão) equipado com injetor automático para líquidos e gases AOC-5000 (Shimadzu, Japão).

Uma coluna SLB™ (5% feni- 95% dimetilsiloxano) 30 m × 0.25 mm × 0.25 μm foi utilizada para a separação e identificação dos compostos. A temperatura do injetor foi mantida a 290°C e operada no modo split 1:5. O gás de arraste utilizado foi He 5.0 com um fluxo de 1 mL min⁻¹. A temperatura do forno foi programada de 50°C (permanecendo por 3min) até 180°C (permanecendo por 1min) com uma rampa de aquecimento de 50°C min⁻¹, e de 180°C até 300°C (permanecendo por 5 min) com uma rampa de aquecimento de 3°C min⁻¹. O espectrômetro de massas utilizado foi o de impacto de elétrons (70 eV) utilizando o modo scan (40 a 850 Da) com um corte de solvente em 4,5 min. A temperatura da interface do detector e da fonte de íons permaneceu a 240°C e 200°C, respectivamente. Os compostos foram identificados comparando seus espectros de massa com espectros da biblioteca do GC/MS (Wiley 8 e FFNSC 1.2 libraries). As análises foram realizadas em duplicata.

3.4 Análise por espectroscopia na região do infravermelho

As análises de espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), foram realizadas na central de análises e prospecção química (CAPQ/DQI-UFLA), empregando-se 10 mg das amostras diluídas em 500 μL de clorofórmio. Em seguida, duas gotas das amostras diluídas foram adicionadas em janela de KBr. Após evaporação do solvente, as análises foram conduzidas no equipamento IR Affinity (Shimadzu) em uma faixa espectral situada entre 4000 cm⁻¹ e 400 cm⁻¹, resolução de 4 cm⁻¹ e 64 scans.

3.5 Determinações de parâmetros físico-químicos da cera de abelha

As análises para o índice de acidez, índice de saponificação e a temperatura de fusão seguiram a metodologia proposta por Bernal et al. (2002, 2005).

3.5.1 Índice de acidez

Para a análise do índice de acidez 1,0 grama das amostras de cera pura e com parafina foi adicionada em um Erlenmeyer de 250 mL, onde foi solubilizado em 50 mL de clorofórmio com agitação manual até a mistura se tornar homogênea. Em seguida, duas gotas de fenolftaleína foram adicionadas e a solução foi então titulada com solução metanólica NaOH 0,05M. Os sistemas foram agitados manualmente e continuamente durante a titulação. Uma amostra em branco de clorofórmio também foi titulada para correção da acidez do solvente. O índice de acidez (em mg de KOH/g) foi calculado pela fórmula:

$$\text{Índice de acidez} = \frac{56,1M(V-V')}{m}$$

Em que V é o volume, em mL, de solução de NaOH em metanol que é necessária para a amostra; V' é o volume, em mL, de solução de NaOH necessária para o ensaio em branco; M é a molaridade de uma solução de NaOH; e m é a massa, em gramas (g), da amostra de cera de abelha.

A solução de NaOH 0,05M foi previamente padronizada com uma solução aquosa de ftalato ácido de potássio ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$) utilizando 0,01 mol/L, mantida em um balão volumétrico de 1000 mL cerca de 1,0g, com aproximação de 0,1 mg, sendo o volume de ftalato ácido de potássio completado com 1L de água. A mistura foi agitada para dissolver a solução, sendo utilizadas 2 gotas de fenolftaleína como indicador. As análises foram feitas em triplicata.

3.5.2 Índice de saponificação

Uma quantidade de 0,3g das amostras de cera pura e com parafina foi pesado e colocado em um frasco de vidro de 10 mL. Em seguida, 4 mL de uma solução aquosa 4M de NaOH foi adicionado ao frasco. O frasco foi fechado e colocado em um forno para concluir a saponificação em 100°C por 1 h. Após tal procedimento, a fase aquosa foi vertida para um Erlenmeyer de 250 ml, e o frasco foi lavado com cerca de 5,0 mL de água, que também foi colocada no Erlenmeyer. À solução, ainda quente, foi adicionada duas gotas de fenolftaleína como indicador e realizada uma agitação manual constante, titulando com uma solução de HCl 0,5M. Um ensaio em branco também foi realizado. As determinações foram feitas em triplicata. À saponificação, expressa em mg de KOH/g, foi calculada pela fórmula:

$$\text{Índice de saponificação} = 56,1M \frac{(V-V')}{m}$$

Em que V é o volume, em mL, de solução de ácido clorídrico exigido pelo branco; V' é o volume, em mL, de solução de HCl necessário para a titulação; M é a molaridade da solução de HCl; e m é a massa, em g, da amostra de cera de abelha.

3.5.3 Temperatura de fusão

Esse índice foi determinado seguindo o método da Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC-60 A SHIMADZU). Para tanto, foram utilizados aproximadamente 9,8 mg das amostras de cera pura de *A. mellifera* e cera com parafina, sendo analisadas em um recipiente tipo “panelinha” e lacradas para posteriormente serem inseridas no equipamento à uma temperatura de 25°C a

500°C em uma taxa de 10°C min⁻¹ e fluxo de 30mL min⁻¹ de gás nitrogênio (N₂). Um ensaio em branco (parafina) também foi conduzido.

3.5.4 Aplicação do reconhecimento de padrões para análise quimiométrica dos dados

As análises quimiométricas foram realizadas utilizando o software Chemoface versão 1.4 (NUNES et al., 2012). Foram realizadas análises de Agrupamento de Componentes Hierárquicos (HCA - *hierarchical component analysis*), onde a distância euclidiana foi utilizada para verificar as similaridades pelo vizinho mais próximo das amostras e a Análise de Componentes Principais (PCA – *principal component analysis*), por ser um dos métodos mais utilizados nas análises exploratórias de dados. A partir dos resultados da intensidade dos picos correspondentes foi possível correlacionar as características da cera de abelha com os respectivos produtos químicos de sua composição nas diferentes amostras analisadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição química da parafina e da cera de *Apis mellifera*

A determinação da composição química da parafina e da cera de *A. mellifera* foi realizada quantificando o seus conteúdos de hidrocarbonetos, ésteres e álcoois livres por meio de cromatografia gasosa com detector de massas (GC-MS). Nos cromatogramas obtidos podem ser verificados que muitos alcanos são encontrados tanto na cera pura de *A. mellifera* quanto na parafina, diferenciando, sobretudo na intensidade do pico de cada composto. Os compostos 1-Hexacosanol e 1-Heneicosil formato não foram observados na parafina pura, o que leva a inferir que esse composto não possui álcoois e ésteres, sendo formada por hidrocarbonetos como o Docosano e Hentriacontano, os quais apresentaram um pico significativo na amostra da parafina avaliada (Figura 4).

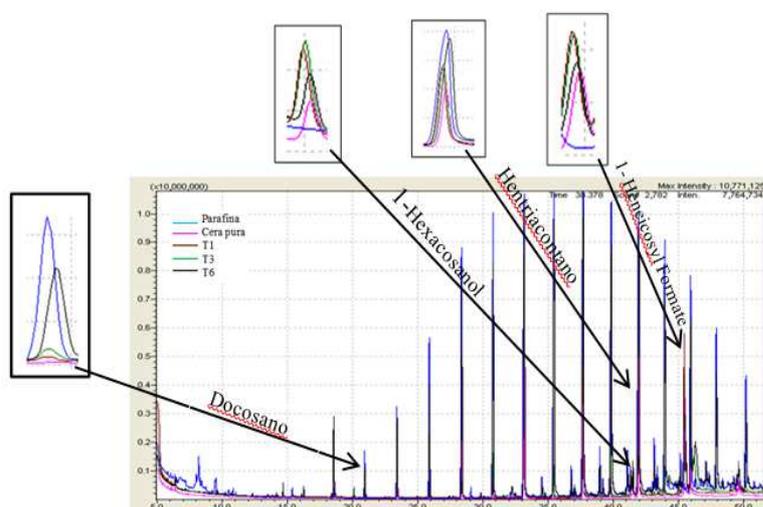


Figura 4 Cromatogramas sobrepostos de cera pura de *Apis mellifera*, parafina e cera contendo 1,5%; 6,0% e 48% de parafina

Em relação aos hidrocarbonetos com números pares e ímpares de átomos de carbono e detectados na cera pura de *A. mellifera* e com 48% de parafina (Tabela 2), constatou-se que esses resultados foram semelhantes e encontra-se em conformidade a trabalhos dispostos na literatura (BONVEHI; BERMEJO, 2012; JIMENEZ et al., 2004, 2006, 2007, 2009; MAIA; NUNES, 2013; TULLOCH, 1980; WAŚ et al., 2014).

Tabela 2 Compostos químicos detectados em cera pura de *Apis mellifera* e com 48% de parafina por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS)

Nº de carbono na molécula	Tempo de retenção (min)		Compostos	Fórmula
	Cera pura	Cera com parafina		
C ₂₁	18,568	18,557	Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄
C ₂₀	20,15	20,137	Etil (9Z)-9-octadecenoato	C ₂₀ H ₃₈ O ₂
C ₂₂	20,96	20,953	Docosano	C ₂₂ H ₄₆
C ₂₃	23,425	23,421	Triacosano	C ₂₃ H ₄₈
C ₂₄	25,902	25,903	Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀
C ₂₅	28,366	28,379	Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂
C ₂₆	30,77	30,797	Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄
C ₂₇	33,152	33,183	Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆
C ₂₈	35,415	35,466	Octacosano	C ₂₈ H ₅₈
C ₂₉	37,66	37,707	Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀
C ₃₀	39,805	39,853	Triaconano	C ₃₀ H ₆₂
C ₁₈	41,042	41,118	1-Octadecanol	C ₁₈ H ₃₈ O
C ₂₆	41,528	41,524	1-Hexacosanol	C ₂₆ H ₅₄ O
C ₃₁	41,932	41,964	Hentriacontano	C ₃₁ H ₆₄
C ₃₂	43,941	43,974	Dotriacontano	C ₃₂ H ₆₆
C ₃₀	45,479	45,465	1-Triacontanol	C ₃₀ H ₆₂ O

Tabela 2 Continuação

Nº de carbono na molécula	Tempo de retenção (min)		Compostos	Fórmula
	Cera pura	Cera com parafina		
C ₃₀	45,599	45,596	1-Heneicosil formato	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
C ₃₃	45,928	45,951	Tritriacontano	C ₃₃ H ₆₈
C ₃₄	47,902	47,932	Tetratriacontano	C ₃₄ H ₇₀
C ₃₁	49,65	49,647	1-Hentriacontanol	C ₃₁ H ₆₄ O
C ₃₅	50,1	50,213	Pentatriacontano	C ₃₅ H ₇₂

Outros compostos encontrados foram os ésteres com números pares de átomos de carbono, Etil (9Z)-9-octadecenoato (C₂₀H₃₈O₂), contendo 20 carbonos e 1-Heneicosil formato (C₂₂H₄₄O₂) com 22 átomos de carbono na molécula (JIMENEZ et al., 2004). Também foram detectados os álcoois livres, 1-Octadecanol (C₁₈H₃₈O), com 18 carbonos, 1-Hexacosanol (C₂₆H₅₄O), contendo 26 carbonos, 1-Triacontanol (C₃₀H₆₂O), com 30 carbonos e 1-Hentriacontanol (C₃₁H₆₄O), com 31 carbonos na sua molécula, resultados semelhantes aos relatados por (MAIA; NUNES, 2013). Contudo, neste trabalho não foi observada a presença de hidrocarbonetos insaturados nas amostras de cera de abelha analisadas por GC-MS, como relatado nas pesquisas de (TULLOCH, 1980; WAŚ et al., 2014), devido possivelmente a serem compostos que volatilizam facilmente.

Nas amostras de cera e dentre os n-alcanos de números ímpares de carbono, o principal composto detectado foi o Heneicosano (C₂₁H₄₄) (Figura 5), seguido pelo Triacosano (C₂₃H₄₈) (Figura 6) e pelo Pentacosano (C₂₅H₅₂) (Figura 7), e ainda Heptacosano (C₂₇H₅₆), Nonacosano (C₂₉H₆₀), Hentriacontano (C₃₁H₆₄), Tritriacontano (C₃₃H₆₈) e Pentatriacontano (C₃₅H₇₂).

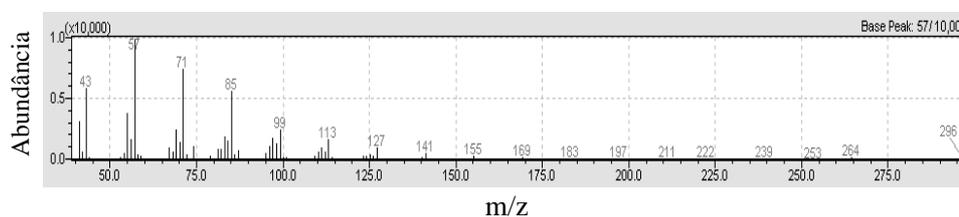


Figura 5 Espectro de impacto de elétron de Heneicosano ($C_{21}H_{44}$) com íon molecular de $m/z = 296$

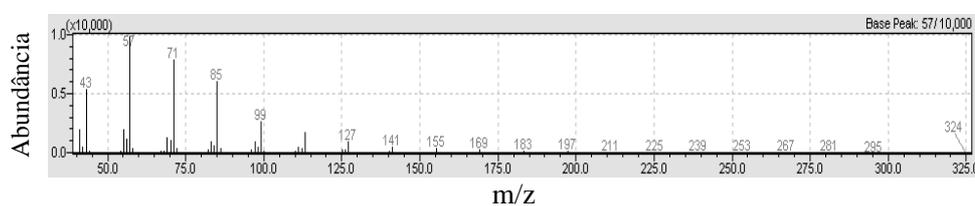


Figura 6 Espectro de impacto de elétron de Triacosano ($C_{23}H_{48}$) com íon molecular de $m/z = 324$

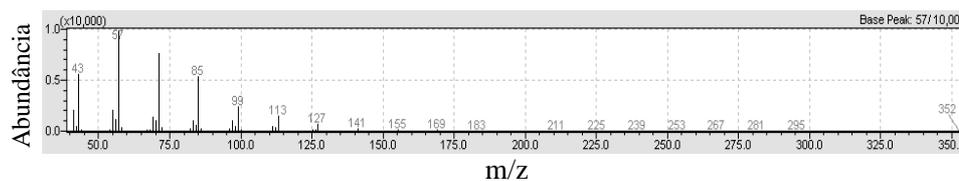


Figura 7 Espectro de impacto de elétron de Pentacosano ($C_{25}H_{52}$) com íon molecular de $m/z = 352$

Também estiveram presentes, contudo em menor quantidade, os hidrocarbonetos com números pares e contendo de 22 a 34 átomos de carbono e que incluem o Docosano ($C_{22}H_{46}$) (Figura 8), o Tetracosano ($C_{24}H_{50}$) (Figura 9), o Hexacosano ($C_{26}H_{54}$) (Figura 10), o Octacosano ($C_{28}H_{58}$), Triaconano ($C_{30}H_{62}$), Dotriacontano ($C_{32}H_{66}$) e Tetratriacontano ($C_{34}H_{70}$).

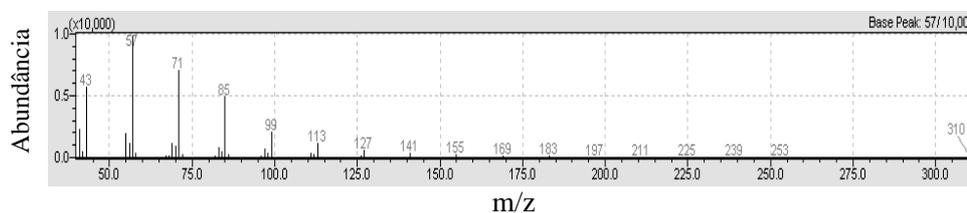


Figura 8 Espectro de impacto de elétron de Docosano ($C_{22}H_{46}$) com íon molecular de $m/z = 310$

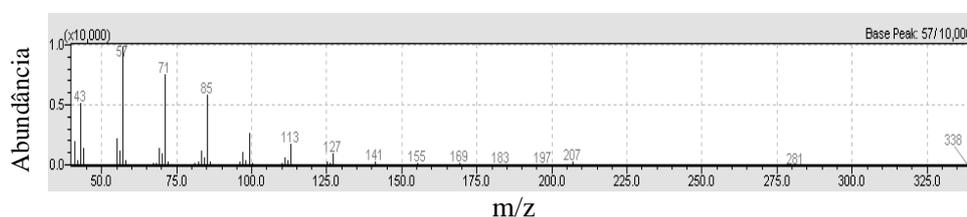


Figura 9 Espectro de impacto de elétron de Tetracosano ($C_{24}H_{50}$) com íon molecular de $m/z = 338$

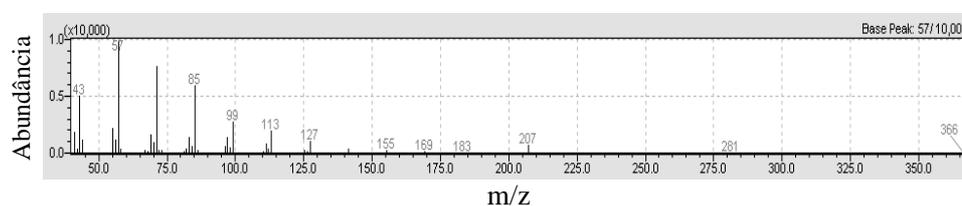


Figura 10 Espectro de impacto de elétron de Hexacosano ($C_{26}H_{54}$) com íon molecular de $m/z = 366$

Na determinação qualitativa dos n-alcenos verificou-se que o grupo de hidrocarbonetos que aparece com maior representatividade na cera de abelha, sendo detectados os alcanos $C_{21}H_{44}$, $C_{24}H_{50}$, $C_{26}H_{54}$, $C_{28}H_{58}$, $C_{30}H_{62}$, $C_{32}H_{66}$, $C_{34}H_{70}$, $C_{21}H_{44}$, $C_{23}H_{48}$, $C_{25}H_{52}$, $C_{27}H_{56}$, $C_{29}H_{60}$, $C_{31}H_{64}$, $C_{33}H_{68}$, $C_{35}H_{72}$, contendo 21 a 35 átomos de carbonos nas suas moléculas, sendo encontrados 21 compostos (Tabela 2). Além dos alcanos foram encontrados na cera os ésteres Etil (9Z)-9-octadecenoato ($C_{20}H_{38}O_2$), 1-Heneicosil formato ($C_{22}H_{44}O_2$) e ácidos

livres $C_{18}H_{38}O$, $C_{26}H_{54}O$, $C_{30}H_{62}O$, $C_{31}H_{64}O$. Esses resultados aproximaram dos dispostos na literatura (BONVEHI; BERMEJO, 2012; JIMENEZ et al., 2004, 2006, 2007, 2009; MAIA; NUNES, 2013; TULLOCH, 1980; WAŚ et al., 2014).

Foi empregada na presente pesquisa cera oriunda da abelha *A. mellifera* africanizada, um híbrido fértil que se encontra presente na região Zoogeográfica Neotropical. Os resultados obtidos para a composição da cera e quando comparados àqueles apresentados por pesquisas realizadas com abelhas desse mesmo grupo, contudo, de outra região geográfica, foram semelhantes. Pode-se inferir que a região Neotropical por apresentar condições climáticas e flora distintas poderia interferir na composição química da cera, aspecto não detectado nas análises realizadas. Pode-se ainda acreditar que os adultos alimentando-se de fontes proteicas (pólen) de outras espécies vegetais poderiam produzir substâncias químicas diferentes, contudo, na fisiologia desses insetos, há comportamentos semelhantes.

4.2 Análise da cera de *Apis mellifera* associada com diferentes teores de parafina.

Nesse ensaio foram empregadas amostras de cera de *A. mellifera* com 1,5%; 3,0%; 6,0%; 12,0%; 24,0% e 48,0% de parafina. Por meio da cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG-MS), foram identificados 21 hidrocarbonetos (Tabela 2). Embora sejam os mesmos compostos presentes na cera pura constatou-se diferenças na intensidade de seus picos, evidenciando que com a incorporação da parafina houve mudança na intensidade do composto submetido à análise. Os resultados obtidos podem ser comparados àqueles de Bonvehi e Bermejo (2012), os quais avaliaram porcentagens diferentes de parafina em relação às empregadas no presente ensaio, sendo portanto encontrados os mesmos compostos.

Assim, por meio das análises de PCA e HCA foi realizada uma avaliação comparativa dos perfis voláteis de cera pura, aplicando-se a análise aos dados cromatográficos obtidos por CG-MS e correlacionando-os as intensidades de seus picos encontrados para os compostos detectados (Figura 4).

Analisando os resultados obtidos pode-se constatar pela segunda componente principal (PC2) a qual retém 6,83% das informações do conjunto de dados dos escores obtidos, a existência de dois grupos distintos (Figura 11).

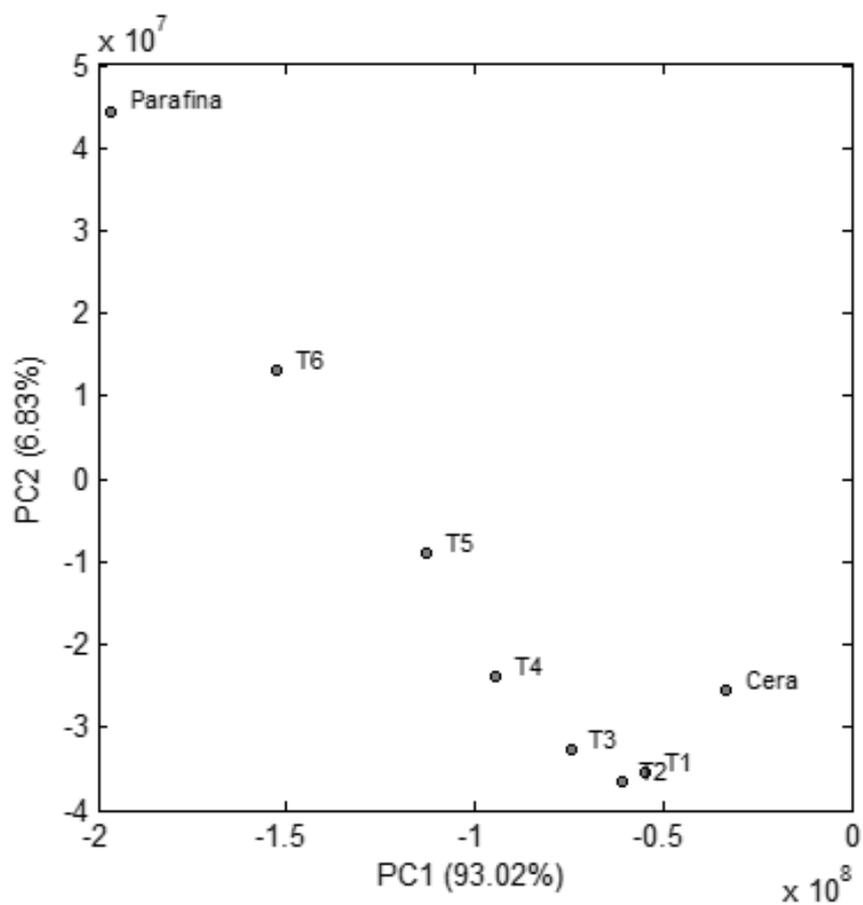


Figura 11 Gráfico de escores dos dados obtidos por GC-MS

O primeiro foi formado pela parafina pura e o tratamento 6 (T6), o qual possui 48% de parafina. O segundo grupo foi aquele constituído pela cera e pelos tratamentos T1, T2, T3, T4 e T5 contendo 1,5; 3,0; 6,0; 12,0; e 24,0% de parafina, respectivamente. Aumentando-se o teor de parafina incorporada à cera, há um aumento significativo de hidrocarbonetos e uma redução de ésteres modificando a intensidade dos compostos e os escores encontrados tornaram-se evidentes (MAIA; NUNES, 2013).

Os resultados obtidos por meio da Análise de Componentes Hierárquicos (HCA) levando em consideração a distância Euclidiana e o tipo de ligação pelo vizinho mais próximo permitiram a construção de um dendrograma fazendo-se a diferenciação entre a cera pura, essa adicionada com parafina e só esse composto (Figura 12).

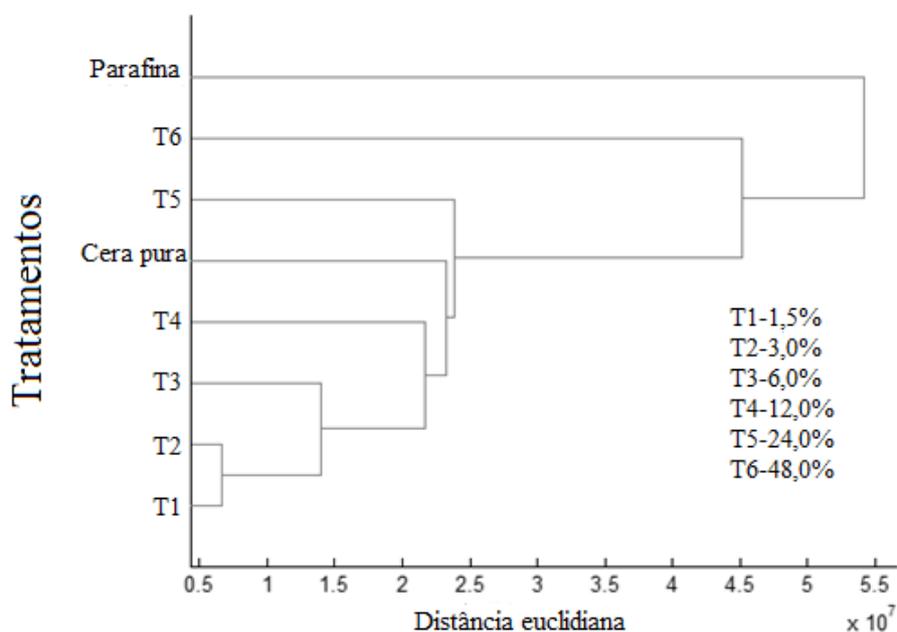


Figura 12 Dendrograma obtido a partir dos resultados de HCA provenientes dos dados de GC-MS, com cera de *Apis mellifera* com e sem parafina

Os resultados apresentados levando em consideração a distância Euclideana e o tipo de ligação pelo vizinho mais próximo revelaram que as amostras contendo até 12% de parafina (T1, T2, T3 e T4) se mostraram similares à amostra de cera, ao passo que as amostras com 24% (T5) e 48% (T6) de parafina começaram a exibir menor similaridade com a cera.

Na análise do dendrograma pode-se ainda inferir que a amostra 48% de parafina (T6) foi a que mais permitiu detectar a adição de parafina à cera, visto que a mesma é a que exibe maior similaridade com a parafina.

Tais resultados validam a utilização da técnica de CG-MS para a detecção de adição da parafina à cera de *A. mellifera*.

4.4 Análise de espectroscopia no infravermelho

Os espectros de infravermelho foram obtidos em duplicata, sendo observadas em todos os espectros as bandas de absorção na região correspondente a um estiramento axial de C-H de alcanos que ocorre na região de 3000 a 2840 cm^{-1} . Essa posição das vibrações de estiramento axial de C-H está entre aquelas que menos variam na posição no espectro. A presença de hidrocarbonetos alifáticos também foi observada devido à presença C-H (CH_3) na banda de absorbância 2926 cm^{-1} e 2853 cm^{-1} , apresentando um estiramento axial assimétrico ($\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$) e um estiramento axial simétrico ($\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$). Esse tipo de estiramento axial pertence ao grupo do metileno, o qual aumenta quando ele faz parte de um anel sob tensão.

As bandas com estiramento axial de C-H de hidrocarbonetos aromáticos ocorrem entre 3100 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} (A) (Tabela 3). As bandas de absorção ao redor de 2927 cm^{-1} (B), dos grupos C-H (CH_3) com um estiramento axial

assimétrico e as dos grupos C-H (CH₂) com 2852 cm⁻¹ (C) (Tabela 3) e com um estiramento axial simétrico mostrando grupamentos alifáticos de carbonos primários e secundários de alcanos. Constatou-se que a banda de absorção de C=O de aldeídos alifáticos ocorreu entre 1740 cm⁻¹ a 1720 cm⁻¹ (D) (Tabela 3) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006).

Tabela 3 Bandas de infravermelho e números de ondas obtidos em análise de espectrometria

Número de onda (cm⁻¹)	Tipo de vibração
3100-3000	Estiramento axial de C-H de hidrocarbonetos aromáticos
2927-2852	Vibrações simétricas e assimétricas de grupos C-H de alcanos
1737	Estiramento axial de C=O de aldeídos alifáticos
1463	Estiramento angular de hidrocarbonetos simétricos no plano (δ_s CH ₂)
1213	Estiramento angular fora do plano C-H do metileno
758	Estiramento angular fora do plano da ligação C-H aromática
669	Vibrações de estiramento angular de C-H de Alquinos

A banda com 1463 cm⁻¹ de C-H (E) apresentou um estiramento angular de hidrocarbonetos simétricos no plano (δ_s CH₂) em posição aproximadamente e semelhante às observações feitas por Barbosa (2007). Observa-se na banda 1213 cm⁻¹ (F) uma absorção intensa em razão de um estiramento angular fora do plano C-H do metileno. Na banda de absorção de 758 cm⁻¹ (G), ocorre estiramento angular fora do plano da ligação C-H aromática e a banda de absorção 669 cm⁻¹ (H) representa vibrações de estiramento angular de C-H de alquinos (Figura 13).

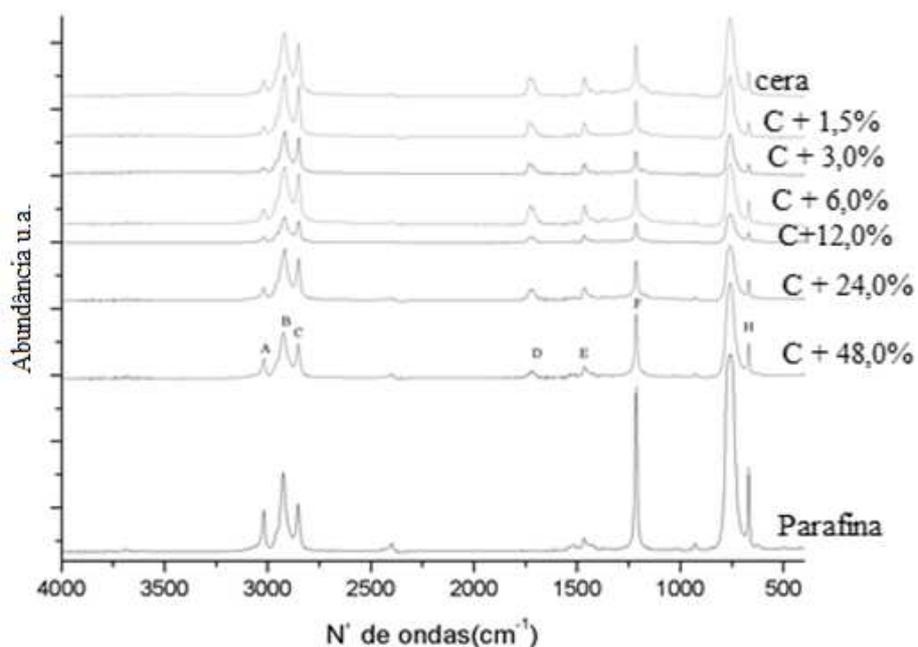


Figura 13 Espetro das amostras de cera de abelha e parafina. A. Estiramento axial de C-H de hidrocarbonetos aromáticos 3100 cm^{-1} e 3000 cm^{-1} . B. estiramento axial assimétrico dos grupos C-H (CH_3) ao redor de 2927 cm^{-1} . C. Estiramento axial simétrico dos grupos C-H (CH_2) na região de 2852 cm^{-1} . D. Deformação axial de C=O 1750 a 1735 cm^{-1} (ésteres alifáticos saturados). E. Estiramento angular de hidrocarbonetos simétricos no plano ($\square_s\text{CH}_2$) na banda 1463 cm^{-1} de C-H. F. Estiramento angular fora do plano C-H do metileno na banda 1213 cm^{-1} . G. Estiramento angular fora do plano da ligação C-H aromática ao redor de 758 cm^{-1} . H. Banda de absorção 669 cm^{-1} apresenta vibrações de estiramento angular de C-H de alquinos

Com o intuito de se avaliar a cera pura de abelhas por meio da análise comparativa de infravermelho associada com vários percentuais de parafina, aplicou-se a análise de PCA e HCA aos dados processados utilizando a conversão de transmitância para absorbância e correção multiplicativa de sinais. As variáveis foram correlacionadas aos números de onda correspondentes aos

grupos de hidrocarbonetos identificados, possibilitando verificar a presença de parafina acima de 6,0% nas amostras de cera (Figuras 14 e 15).

Os escores obtidos na análise do infravermelho evidenciaram que as porcentagens mais baixas de cera adicionada à parafina, representando os tratamentos com 1,5 % e 3,0 % foram aqueles que mais se aproximaram dos resultados obtidos para cera pura. A partir dessas concentrações, observou-se um distanciamento entre os escores obtidos para os tratamentos com 6,0; 12,0 e 24,0% de parafina, os quais se encontram em posição mediana. Em relação ao tratamento com 48,0%, verificou-se ser aquele que mais se aproximou dos escores obtidos para a parafina pura (Figura 14).

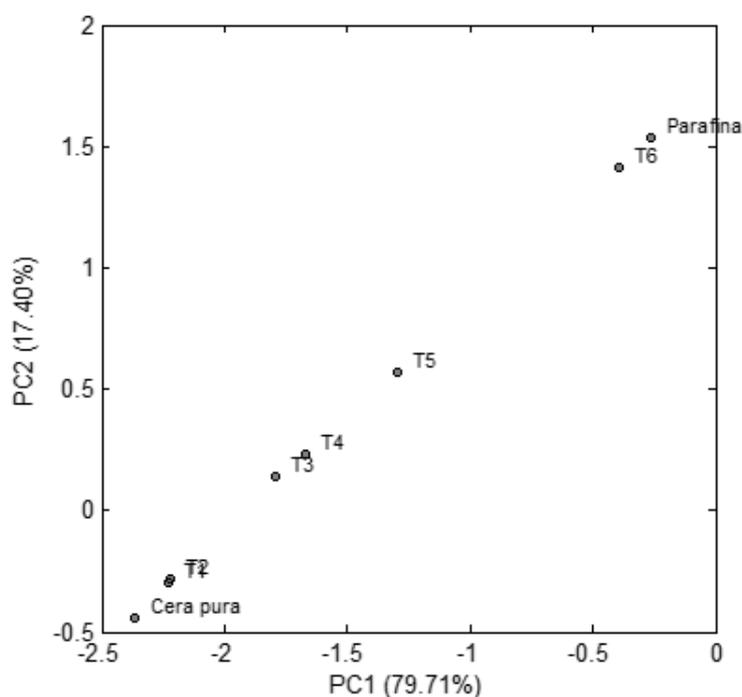


Figura 14 Escores do infravermelho da cera de *Apis mellifera*, parafina e cera contendo parafina

Ao se analisar os resultados obtidos por meio do dendrograma para os dados do infravermelho (Figura 15), constatou-se que nos tratamentos com 1,5 e 3,0% de parafina, foram próximos àqueles para cera pura. Os demais tratamentos e com maior porcentagem de parafina foram os que se destacaram, embora o tratamento com 48,0% de parafina apresente superior ao produto puro. Por esse método foi possível caracterizar com maior precisão a presença da parafina incorporada à cera.

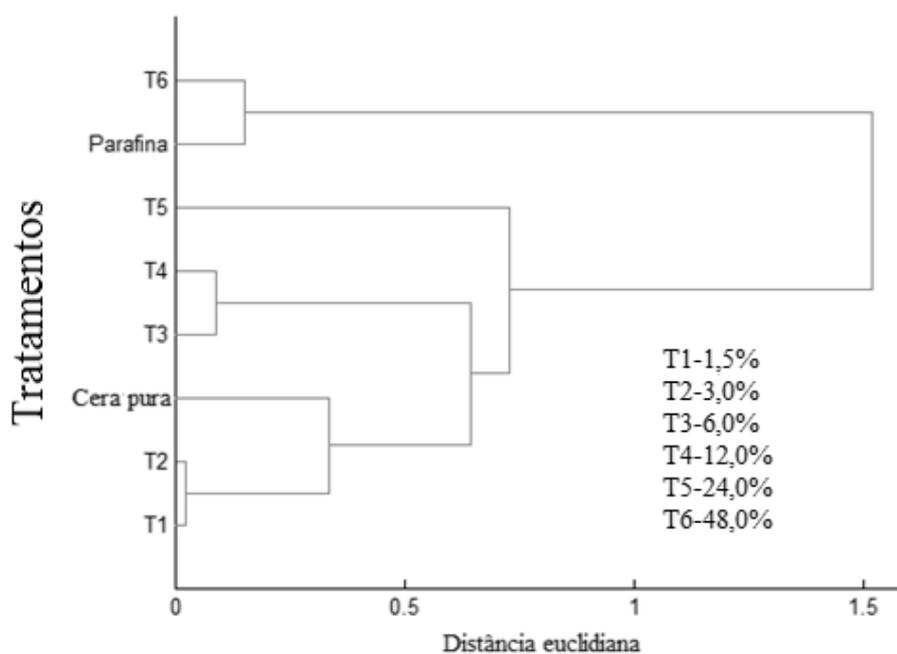


Figura15 Dendrograma obtido a partir dos resultados provenientes dos dados de infravermelho por HCA

4.5 Análises físico-químicas da cera de abelha *Apis mellifera*

4.5.1 Índice de acidez

O índice de acidez determinado nas amostras de cera de *A. mellifera* com e sem parafina, evidenciou redução significativa desse parâmetro em função da maior concentração da parafina. Com 48,0 % esse índice foi de 10, ao passo que na cera pura foi de 17, resultados similares aos reportados na literatura (BERNAL et al., 2005) em que o maior teor de parafina implica em redução linear do índice de acidez. Na literatura pertinente e de acordo com as informações em Brasil (2001), esse índice pode variar de 17 a 24 mg KOH g⁻¹ de cera.

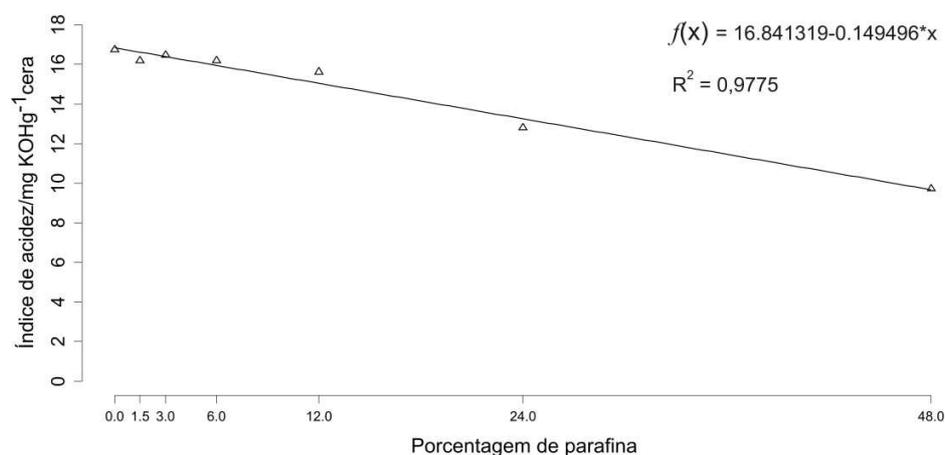


Figura 16 Índice de acidez de cera de *Apis mellifera* com parafina

A adição de parafina na cera também pode ser determinada por colorimetria dissolvendo a cera ou parafina em clorofórmio P.A. e titulando com NaOH 0,05M em metanol. Ao se diluir a parafina pura em 50 mL de clorofórmio, a coloração obtida foi o verde-claro (Figura 17 A) e após a titulação com NaOH em metanol, essa coloração tornou-se rosa (Figura 17 B). Constatou-se que a

cera pura apresentou coloração verde durante o processo de titulação (Figura 17 C) e marrom-claro próximo ao final da titulação e ao final do processo apresentou coloração rosa-claro (Figura 17 D). Um aspecto relevante foi àquele observado em todas as amostras de cera contendo 1,5; 3,0; 6,0; 12,0; 24,0 e 48,0 % de parafina, em que durante o processo de titulação, a coloração da solução passou diretamente para rosa-claro, não sendo detectada a coloração marrom-claro (Figura 17 D).

Os resultados permitiram inferir que esse método consiste de uma análise favorável para a detecção de incorporação de parafina em ceras.

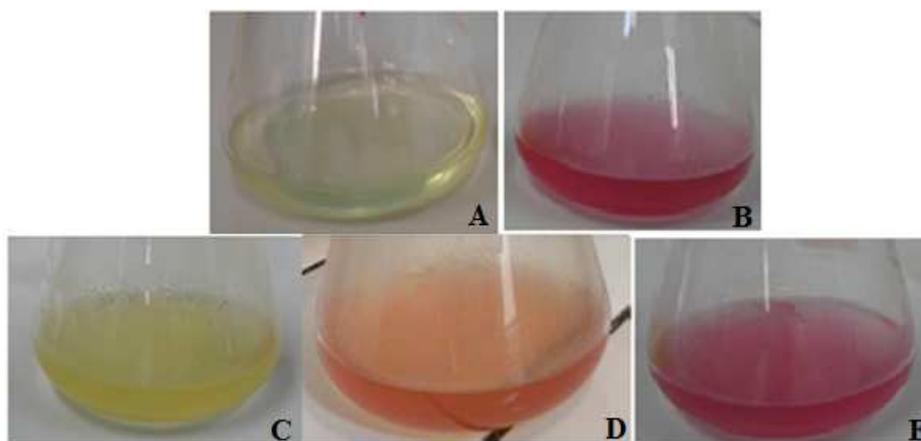


Figura17 Parafina diluída em clorofórmio (A) e titulada com NaOH 0,05M em metanol (B), cera de *Apis mellifera* diluída em clorofórmio (C) e titulada com NaOH 0,05M em metanol (D) e cera contendo parafina (E)

4.5.2 Índice de saponificação

O índice de saponificação foi empregado para se avaliar a adição de parafina à cera de abelha. Adotando-se o método analítico proposto por Bernal et al. (2005), as amostras de cera foram hidrolisadas com KOH em metanol e

posteriormente tituladas. Os resultados obtidos evidenciaram que houve redução linear ($R^2 = 0,7582$) do índice de saponificação com até 24% de parafina incorporada a cera (Figura 18). Contudo, com a adição de parafina em quantidade superior a este limiar (24%), verificou-se comportamento contrário caracterizado pelo aumento no índice de saponificação atingindo o valor de 210.14 ± 69.40 mg KOH g⁻¹ cera. Nesse caso, assumindo todo o gradiente de parafina (0 a 48%) adicionado à cera de *A. mellifera*, o modelo ajustado foi aquele de segundo grau ($R^2 = 0,801$) o qual é caracterizado por uma hipérbole (Figura 18). Esses resultados foram coincidentes àqueles obtidos por Bernal et al. (2005), os quais afirmaram que a cera de abelha quando apresenta parafina em sua composição não pode ser hidrolisada e a saponificação empregando KOH etanólico não se apresentou como método eficiente.

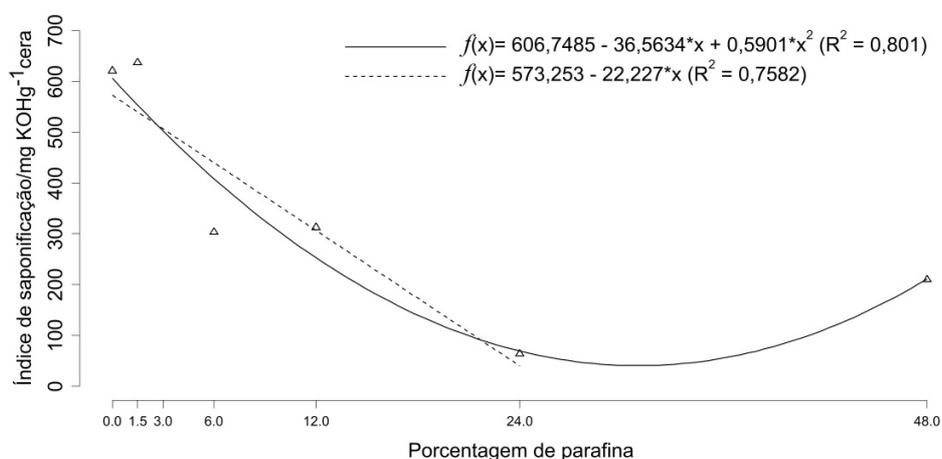


Figura 18 Índice de saponificação de cera pura *Apis mellifera* com parafina.

4.5.3 Temperatura de fusão por DSC

Quanto à temperatura de fusão para se avaliar a presença de parafina em diferentes concentrações de cera, foi evidenciado que a cera pura apresentou temperatura de fusão (PF) de 65,5 °C e a parafina de 62,3 °C. Analisando esse parâmetro em relação aos tratamentos avaliados, constatou-se que se aumentando o teor de parafina incorporada à cera, houve redução significativa da temperatura de fusão, sendo que com 1,5% de parafina encontrou-se 65,1 °C e com 48% o PF foi de 57,2 °C (Tabela 4).

Tabela 4 Temperatura de fusão obtida por DSC para cera de *Apis mellifera*, cera com parafina e parafina

Amostras	Termogramas DSC	Temperatura de fusão (°C)
Cera pura	A	65,5
T1- 1,5%	B	65,1
T2- 3,0%	C	64,0
T3- 6,0%	D	63,7
T4- 12,0%	E	61,4
T5- 24,0%	F	58,9
T6- 48,0%	G	57,2
Parafina	H	62,3

Analisando-se a correlação de energia em função da temperatura (Figura 19), os pontos de fusão nas amostras A, B, C e D encontram-se dentro dos padrões estabelecidos pelas normas brasileiras (BRASIL, 1981), contudo, para o tratamento 4 com 12,0 %, a curva endotérmica (E) pode ser considerada dentro dos limites para as normas no país e próxima aos resultados obtidos por Bernal et al. (2005). As temperaturas de fusão das amostras F e G divergiram dos

padrões estabelecidos por Brasil (1981), sendo que a cera deve apresentar PF de 62 a 65°C e também àqueles de Bernal et al. (2005).

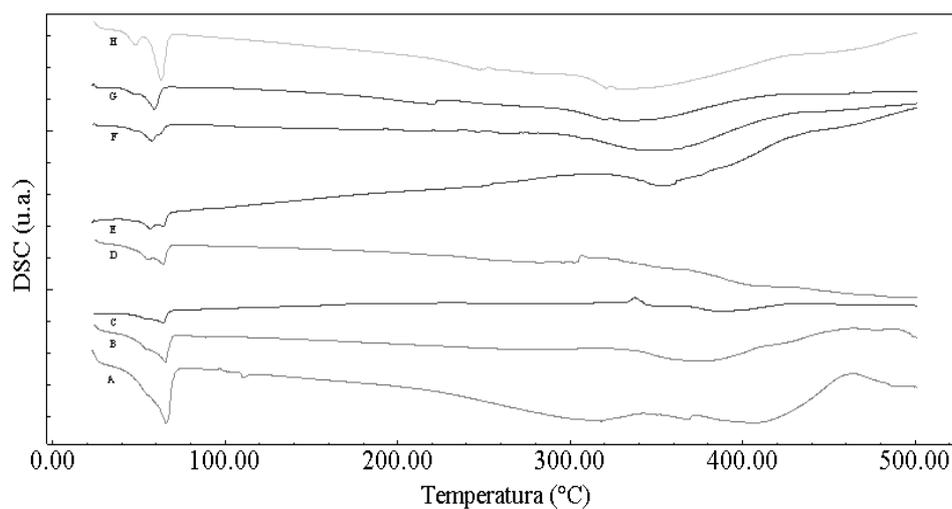


Figura 19 Termogramas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), obtidos para as amostras: Cera pura (A), T1-1,5% (B), T2-3,0% (C), T3-6,0% (D), T4-12,0% (E), T5-24,0% (F), T6-48,0% (G) e parafina (H)

5 CONCLUSÃO

Os métodos de análises de cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS), espectroscopia no infravermelho, empregando-se os métodos quimiométricos de análise de componentes principais (PCA) e de análise de componentes hierárquicos (HCA) mostram-se eficazes para verificação da adição de parafina em cera de abelha. O método físico-químico utilizado para determinação do índice de saponificação em cera associada à parafina não é adequado por não ocorrer saponificação quando existe a presença da parafina. A temperatura de fusão e o índice de acidez indicaram a adição de parafina à cera de abelha. O método de cor proposto por meio da titulação de acidez foi eficaz na determinação de adição de parafina à cera de abelha, em que o mesmo pode ser considerado como método barato, rápido e simples de ser realizado se comparado a GC-MS e IR, que demandam equipamentos de elevado custo, podendo ser realizado pelos apicultores na verificação de possível adição de parafina à cera de *A. mellifera*.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. B. A. et al. Influência da alimentação artificial energética na manutenção de enxames de *Apis mellifera* L. durante estiagem no município de São João do Rio do Peixe–PB. **Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v. 3, n. 2, 2013.

BARBOSA-COSTA, K.; J. L. SANTIAGO; T. J. FRAXE. 11909-Implantação da Meliponicultura em comunidade rural de várzea no Amazonas. **Cadernos de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 6, n. 1, p. 1-6, 2011.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 189 p.

BARROS, A. I. R. A.; NUNES, F. H. F. M.; COSTA, M. M. F. D. **Manual de boas práticas na produção de cera de abelha**. Lisboa: Princípios Gerais, 2009. 64 p.

BERNAL, C. et al. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, set. 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422002000500023&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 9 jan. 2015.

BERNAL, J. L. et al. Physico-chemical parameters for the characterization of pure beeswax and detection of adulterations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 107, p. 158-166, 2005.

BIERZYCHUDEK, P. Pollinator limitation of plant reproductive effort. **The American Naturalist**, Chicago, v. 117, p. 838-840, 1981.

BOGDANOV, S. Quality and standards of pollen and beeswax. **Apiacta**, Bucharest, v. 38, n. 11, p. 334-341, Sept. 2004.

BONVEHI, J. S.; BERMEJO, F. J. O. Detection of adulterated commercial Spanish beeswax. **Food Chemistry**, London, v.132, p. 642-648. Nov. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 3, de 19 de janeiro de 2001**. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. Disponível em: <<http://agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 maio 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 001 de 7 de outubro de 1981. Aprova os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II. Métodos físicos e químicos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 1981.

CARVALHO-ZILZE, G. et al. Atividade de vôo de operárias de *Melipona seminigra* (Hymenoptera: Apidae) em um sistema agroflorestal da Amazônia. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 1, p. 94-99, 2007.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, abr. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200042&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 1 mar. 2015.

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

DA SILVA, D. F. et al. Desenvolvimento e produção de pólen em colméias de *Apis mellifera* L. africanizadas mantidas em cultura de girassol. **Revista Agrarian**, Dourados, v. 3, p. 147-151, 2010.

GALLAI, N. et al. Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 68, n. 3, p. 810-821, 2009.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. et al. Abelhas sociais e flores: análise polínica como método de estudo. In: PIRANI, J. R.; CORTOPASSI-LAURINO, M. (Ed.). Flores e Abelhas em São Paulo. São Paulo: EDUSP/FAPESP, 1993. p. 17-30.

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. **Polinização**: os desafios de um Brasil biodiverso para o uso dos serviços ambientais prestados pelas abelhas. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2010. p. 48-58. (Documentos, 229).

IMPERATRIZ-FONSECA, V. L.; SARAIVA, A. M.; GONÇALVES, L. A iniciativa brasileira de polinizadores e os avanços para a compreensão do papel dos polinizadores como produtores de serviços ambientais. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, p. 100-106, 2007.

JIMÉNEZ, J. J. et al. Detection of beeswax adulterations using concentration guide-values. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 198, p. 682–690, 2007.

JIMÉNEZ, J. J. et al. Identification of adulterants added to beeswax: Estimation of detectable minimum percentages. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 111, p. 902–911, 2009.

JIMÉNEZ, J. J. et al. Quality assurance of commercial beeswax: Part I. Gas chromatography–electron impact ionization mass spectrometry of hydrocarbons and monoesters. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1024, p. 147-154, 2004.

JIMÉNEZ, J. J. et al. Sample preparation methods for beeswax characterization by gas chromatography with flame ionization detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1129, p. 262–272, 2006.

KEARNS, C. A.; INOUE, D. W.; WASER, N. M. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 29, n. 1, p. 83-112, 1998.

KERR, W. E. et al. **Abelha urucu**: biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte: Fundação Acangaú, 1996. 144 p.

MAIA, M.; BARROS, A. I.; NUNES, F. M. A novel, direct, reagent-free method for the detection of beeswax adulteration by single-reflection attenuated total reflectance mid-infrared spectroscopy. **Talanta**, London, v. 107, p. 74-80, 2013.

MAIA, M.; NUNES, F. M. Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis. **Food Chemistry**, London, v. 136, n. 2, p. 961-968, 2013.

MICHENER, C. D. **The social behavior of the bees**: a comparative study. Cambridge: Harvard University, 1974.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 11, Nov. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532012001100007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 29 dez. 2014.

RAMALHO, M.; SILVA, M. D.; CARVALHO, C. A. Dinâmica de uso de fontes de pólen por *Melipona scutellaris* Latreille (Hymenoptera: Apidae): uma análise comparativa com *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), no Domínio Tropical Atlântico. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 38-45, 2007.

REGO, M. M. P. et al. Aspectos da biologia de nidificação de *Centris flavifrons* (Friese) (Hymenoptera: Apidae, Centridini), um dos principais polinizadores do murici (*Byrsonima crassifolia* L. Kunth, Malpighiaceae), no Maranhão. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 35, p. 579-587, 2006.

RIBEIRO, R. M. **Infravermelho e PCA na análise da natureza química do carbono em diferentes culturas**. 2012. 63 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

RICKETTS, T.H. et al. Landscape effects on crop pollinations services: are there general patterns? **Ecology Letters** . v.11, p. 499 – 515, 2008.

SAMPAIO, J. A.; CASTRO, M.; SILVA, F. Uso da cera de abelhas pelos índios Pankararé no Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Arquivos do Museu Nacional**, Rio de Janeiro, v. 67, p. 3-12, 2009.

SANTOS, A. B. Abelhas nativas: polinizadores em declínio. **Natureza**, São Paulo, v. 8, p. 103-106, 2010.

SEMKIW, P.; SKUBITA, P. Comb construction and brood development on Beeswax Foundation Adulterated with paraffin. **Journal of Apicultural Science**, Varsóvia, v. 57, p. 75-83, 2013.

SEREIA, M. J. et al. Viabilidade financeira da produção de geleia real com abelhas africanizadas suplementadas com diferentes nutrientes. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, Maringá, v. 32, n. 4, p. 467-474, 2010.

SERRA, B. J. Estudio de la adulteración de la cera de abejas (*Apis mellifera* L.). **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 41, p. 69–72, 1990.

SERRA, B. J. Estudio de la composición de la cera de abejas (*Apis mellifera* L.). **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 39, p. 333–342, 1988.

SILVA, C. R. D. et al. Uso da parafina incorporada a cera alveolada em colonias de abelhas *Apis mellifera* L. africanizadas para produção de mel. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, Maringá, v. 24, p. 875-879, 2008.

SILVA, R. H. D.; FREITAS, B. M. Produção e desenvolvimento de colônias de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) a partir de diferentes áreas e idades de cria. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 545-549, 2004.

SILVERTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2007. 490 p.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A. As Abelhas como agentes polinizadores (The Bees Agents Pollinizer's). **REDVET. Revista electrónica de Veterinaria**, Madrid, v. 1695, p.7504, 2007.

TAUTZ, J. **O fenômeno das abelhas**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 288 p.

TULLOCH, A. P. Analysis of whole beeswax by gas liquid chromatography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 49, p. 609–610, 1972.

TULLOCH, A. P. Beeswax-composition and analysis. **Bee World**, Bucks, v. 61, p. 47-62, 1980.

TULLOCH, A. P. Factors affecting analytical values of beeswax and detection of adulteration. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 50, p. 269–272, 1973.

VOLLET NETO, A. et al. Dietas protéicas para abelhas sem ferrão. In: ENCONTRO SOBRE ABELHAS, 9., 2010, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FUNPEC, 2010. p. 121-129.

WAŚ, E. et al. Determination of beeswax hydrocarbons by gas chromatography with a mass detector (GC-MS) technique. **Journal of Apicultural Science**, Varsóvia, v. 58, n. 1, p. 145-157, Nov. 2014.

WIESE, H. **Apicultura: novos tempos**. 2. ed. Guaíba: Agrolivros, 2005. 378 p.

WILLE, A. Biology of the stingless bees. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 28, p. 41-64, Jan. 1983.

WINSTON, M. L. **A biologia da abelha**. Porto Alegre: Magister, 2003. 276 p.