



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA
GRADUAÇÃO EM BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**COMPARAÇÃO ENTRE METODOLOGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO DA ORIGEM
BOTÂNICA EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL UNIFLORAL**

JULIO CESAR ALVES DE SOUSA

GOIÂNIA

2024

JULIO CESAR ALVES DE SOUSA

**COMPARAÇÃO ENTRE METODOLOGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO DA ORIGEM
BOTÂNICA EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL UNIFLORAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Escola de Ciências Médicas e da Vida, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Mariana Pires de Campos Telles

Co-orientadora: Dra. Carmen Elena Barragan Ruiz

GOIÂNIA

2024

JULIO CESAR ALVES DE SOUSA

**COMPARAÇÃO ENTRE METODOLOGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO DA ORIGEM
BOTÂNICA EM AMOSTRAS COMERCIAIS DE MEL UNIFLORAL**

Este Trabalho de Conclusão de Curso julgado adequado para obtenção ao título de Bacharel em Biologia, e aprovado em sua forma final pela Escola de Ciências Médicas e da Vida, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, em ____ / ____ / ____.

Profa. Dra. Maira Barberi

Coordenadora de Trabalho de Conclusão de
Curso

Banca Examinadora:

Orientadora: Dra. Mariana Pires de Campos Telles

Profa. Dra. Maira Barberi

Dra. Carmen Elena Barragan Ruiz

GOIÂNIA

2024

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à PUC Goiás por me beneficiar com a bolsa do vestibular social, pois sem ela jamais conseguiria concluir o curso de biologia.

Gostaria também de agradecer às agências financiadoras que foram fundamentais para que os dados pudessem ser obtidos. Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Ecologia, Evolução e Conservação da Biodiversidade (INCT-EECBio (FAPEG – Processo: 201810267000023, Chamada N°. 16/2014 e CNPq – Processo: 465610/20145); Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) agradeço também pela bolsa de iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBIT), concedida por meio da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (UFG).

Ao Centro de Estudos e Pesquisas Biológicas da PUC Goiás (CEPB) e ao laboratório de paleoecologia, pela disponibilização de equipamentos, materiais e livros, essenciais para o progresso deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Mariana Pires Campos Telles, pela paciência e firmeza para que eu finalizasse com exatidão o trabalho e pelas oportunidades para estágio e iniciação científica, que consequentemente levaram ao desenvolvimento desse trabalho no laboratório de Genética & Biodiversidade (LGBio) da UFG, onde conheci vários estudantes e profissionais incríveis.

A toda equipe de professores do curso de Biologia e à atual coordenadora do curso, Profa. Dra. Maira Barbieri, pelo acolhimento e tempo disponibilizado para me auxiliar com uma parte da metodologia utilizada nesse trabalho.

Aos colegas e amigos que conheci no campus, pelo companheirismo, apoio e motivação para seguir firme na jornada para a conclusão do curso.

A minha namorada Thais Barros, por todo apoio, suporte, incentivo e alegria tanto em dias difíceis quanto em dias tranquilos.

Minha mais sincera gratidão à minha família que me ajuda e apoia nos momentos difíceis e desafiadores que a vida tende a levantar.

RESUMO

O mel é uma substância doce, viscosa e orgânica produzida por um dos animais mais importantes para o funcionamento dos ecossistemas, as abelhas. As abelhas produzem os mais diversificados tipos de mel, onde se diferenciam através da coloração, pH e sabor, por exemplo, dependendo da espécie e ou da florada em que elas coletam o pólen. A comercialização desse produto envolve alimentação, saúde e cosméticos. Entretanto, devido a sua naturalidade e doçura é considerado um dos alimentos mais falsificados do mundo, levantando dúvidas, lesando o consumidor com a venda falsa e afetando o real comerciante que cumpre as normas e legislação sobre o produto. O objetivo deste trabalho foi analisar e relacionar metodologias que permitem a identificação da origem botânica de amostras comerciais de mel, com o intuito de validar tal produto de acordo com o declarado nos rótulos. Para tanto, duas metodologias foram utilizadas: A primeira pela técnica de DNA Barcoding, que possibilita identificar a origem botânica através do sequenciamento genômico e a segunda, pela Melissopalínologia, que é uma técnica derivada da palinologia que utiliza a descrição morfológica de grãos de pólen de amostras para determinar a origem botânica. Neste estudo foram utilizadas seis amostras de mel comercializados em Goiânia, Goiás. A partir dos resultados analisados foi possível constatar que a rotulagem de todas as amostras de mel comercializadas utilizadas nesse trabalho não está correta para nenhum dos métodos apresentados, indicando o não cumprimento da norma instrutiva de regulamentação de mel.

Palavras – Chave: Origem botânica, Pólen, DNA-Barcoding, Melissopalínologia, Veracidade de rotulagem.

ABSTRACT

Honey is a sweet, viscous, and organic substance produced by one of the most important animals for ecosystem functioning: bees. Bees produce diverse types of honey, which differ in color, pH, and flavor, depending on the species and/or the flowering plants from which they collect pollen. The commercialization of honey spans the food, health, and cosmetics industries. However, due to its natural origin and sweetness, honey is considered one of the most adulterated foods in the world, raising concerns, misleading consumers with counterfeit products, and harming genuine producers who comply with regulations and standards. The objective of this study was to analyze and correlate methodologies that allow the identification of the botanical origin of commercial honey samples, aiming to validate the product according to the claims on their labels. Two methodologies were employed: the first involved the DNA barcoding technique, which identifies botanical origin through genomic sequencing, and the second was Melissopalynology, a derivative of palynology that uses morphological descriptions of pollen grains in samples to determine botanical origin. This study analyzed six honey samples commercially available in Goiânia, Goiás. The results revealed that the labeling of all honey samples analyzed did not conform to either method used, indicating non-compliance with honey regulatory standards.

Keywords: Botanical origin, DNA-Barcoding, Labeling accuracy, Melissopalynology, Pollen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Amostras de mel unifloral comercializadas e enumeradas coloquialmente da esquerda para a direita com as seguintes floradas: (1) Cipó Uva; (2) Sucupira; (3) Flores do Cerrado; (4) Flores do Campo; (5.1) Laranjeira; (5.2) Laranjeira. Obtidas em Goiás.	12
Figura 2. Tipos de grãos de pólen em vista polar e equatorial	18
Figura 3. Tipos de aberturas, número e posição mais comumente encontrados em pólen neotropical.	19
Figura 4. Categorias de ornamentação positiva e negativa.	20
Figura 5. Eletroforese horizontal em gel de agarose das amostras de Cipó-uva, Sucupira, Flores do Cerrado e Campo silvestre em dois protocolos distintos com destaque ao SDS/TRITON que apresentou pellets na etapa de extração, porém não se obteve DNA.	21
Figura 6. Eletroforese horizontal em gel de agarose das amostras de Sucupira, onde a extração foi feita com o tampão de CTAB 2%, porém foi seguido os passos de: Protocolo 1 - Manivanan et al. 2018; Protocolo 2 - Karaali & Çöl, 2016. Provável extração de RNA.	22
Figura 7. Eletroforese horizontal em gel de agarose das amostras de Sucupira e Flores do Cerrado com protocolo CTAB 2% e o Extrator Big Fish. As amostras tiveram um pellet visível no final, porém o padrão seguiu o mesmo do teste anterior, parecendo RNA no gel.	22
Figura 8. Eletroforese horizontal em gel de agarose de todas as amostras, com exceção da Laranjeira 5.1 com o protocolo CTAB 2%. As amostras foram quantificadas em duas situações, sobre secagem na bancada (Temperatura ambiente) e no concentrador plus.	23
Figura 9. Eletroforese vertical de quantificação da PCR das amostras de sucupira e flores do cerrado com o marcador 1 Kb Plus (Kilobase). As amostras de sucupira se encontram nas cinco bandas em sequência e a amostra de flor do cerrado, na sexta banda (Última).	25
Figura 10. Eletroforese vertical de quantificação da PCR das amostras de sucupira e flores do cerrado com o marcador 1 Kb Plus (Kilobase). Foi utilizado os primers “rbcLa” e “rbcLb” nas respectivas temperaturas 48°C e 50°C. Aparentemente foi quantificado DNA.	25
Figura 11. . Grãos de pólen dominante da família Vitaceae e reconhecido morfolologicamente como a espécie <i>Cissus albida</i>	27
Figura 12. Grãos de pólen secundário da família Myrtaceae e reconhecido morfolologicamente como a espécie <i>Myrcia cerqueira</i>	28
Figura 13. Grãos de pólen dominante da família Fabaceae – Caesalpinioideae e identificada como tipo <i>Cassia</i>	28
Figura 14. Grãos de pólen dominante da família Fabaceae e reconhecido morfolologicamente como <i>Mimosoideae sp.</i>	29
Figura 15. Grãos de pólen secundário da família Bombacaceae e reconhecido morfolologicamente como <i>Eriotheca</i>	29
Figura 16. Grãos de pólen secundário da família Euphorbiaceae e reconhecido morfolologicamente como <i>Euphorbiaceae sp.</i>	30
Figura 17. Grãos de pólen dominante da família Fabaceae, e morfolologicamente descrito como <i>copaifera</i> ou <i>pau óleo</i>	30
Figura 18. . Grãos de pólen secundário da família Myrsinaceae e identificada como tipo <i>Rapanea</i>	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivos Gerais	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. METODOLOGIA	12
3.1 Identificação por marcadores de DNA Barcode	12
3.1.1 Preparo das amostras para Extração	12
3.1.2 Extração e Precipitação do DNA	13
3.1.3 Quantificações do DNA	14
3.1.4 Montagem e Quantificação de PCR / Etapa de Purificação	14
3.1.5 Reação de Sequenciamento	15
3.2 Melissopalynologia	16
3.2.1 Método de Preparo de Pólen	17
3.2.2 Identificação Palinológica	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Extração e Quantificação do DNA	21
4.2 PCR e Análise no Banco de Dados	25
4.3 Tipos e Descrições dos grãos de pólen no Microscópio	27
4.4 Discussão	33
5. CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1. INTRODUÇÃO

É natural do ser humano, o ato de realizar trocas ou comercialização como forma de obter alguma coisa que ele desconhece ou não possui. Tal prática tem sido aprimorada com o passar dos séculos até chegar na atualidade. O comércio se estende aos mais diversificados produtos, porém, junto com essa tendência comercial no mundo, também surge à prática de adulteração e fraude, um conjunto de atos ilegais que tem por objetivo obter lucro ou ganho com produtos falsificados e ou adulterados (LIMA, 2019).

A comercialização de determinados produtos tal como o mel desde muito tempo exige uma comprovação referente à sua autenticidade, uma vez que estudos prévios apontam para uma carência no controle da autenticidade para o comércio seguro (CANO, 1992). A fim de desmistificar a não autenticidade de tais mercadorias várias metodologias foram desenvolvidas ao longo dos anos, com especificações para cada uma delas. Para comprovar a veracidade do mel, por exemplo, pode-se utilizar pelo menos dois métodos que permite inferir a origem botânica. Um método que utiliza a determinação do grão de pólen, uma forma mais convencional e um outro que utiliza tecnologias mais recentes de identificação molecular por DNA Barcoding (CHIN, 2020).

O pólen é o alimento natural das abelhas. A partir dele, inicia-se todo um ciclo entre as classes determinantes de abelhas na colmeia, porém, assim como alimentação, ele também pode ser encontrado no mel de forma subliminar, mas o suficiente para permitir a inferência da identificação botânica relacionada com a florada que deu origem ao mel (HOOVER, 2018).

O mel é uma substância natural produzida a partir do néctar de flores (Floral) e, ou caules, folhas e pecíolos (Extraflorais), que é coletado por um dos insetos mais importantes para a renovação e manutenção de todo um ecossistema, as abelhas. O néctar coletado é armazenado em uma estrutura interna no corpo das abelhas, o papo, e ali entra em contato com duas enzimas, a invertase e a glicose oxidase. Essas enzimas são as responsáveis por gerar o teor dos açúcares (Glicose e Frutose) e tornar a substância imune a ações bacterianas que levariam a uma consequente fermentação (OZCAN, 2014).

Apresentam-se diversificados tipos de mel com colorações, propriedades e pH distintos que destacam a importância dele que está relacionado com cada florada localizada em diferentes ecossistemas e que varia também com a espécie de abelha que realiza esse processo. O comportamento de forrageamento que leva a abelha a selecionar as floradas que predominam em determinada localidade ao longo do ano (SILVA, 2016).

O mel é um composto orgânico natural produzido pelas abelhas que é rico em nutrientes e totalmente viável para melhorar a imunidade do corpo, sendo facilmente combinado com bebidas, como o chá. Além disso, ele apresenta uma alta comercialização, tanto por sua importância medicinal, como também pelo efeito terapêutico e seu valor nutritivo. Porém, em função de ser rico e com alto teor de açúcares, pode ser facilmente adulterado, inclusive em sua coloração por conta de aditivos químicos e adição de outros produtos comerciais como amido e o açúcar (AMORIM, 2019).

A consumação do mel se dá por diversos animais, incluindo o ser humano, como citado acima, por conta de suas atribuições medicinais. Além disso, por apresentar atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antiviral, entre outros. Estes compostos são metabolitos secundários que podem ser encontrados em diversos outros alimentos como as frutas, vegetais ou bebidas derivadas de plantas como o chá e o vinho (LIMA, 2021).

A biologia molecular nos últimos anos desenvolveu uma série de técnicas que permitiram disponibilizar metodologias de identificar de forma molecular as espécies a partir do DNA. Uma das aplicações ficou conhecida como código de barras do DNA ou DNA Barcoding. Nesta metodologia uma ou mais regiões específicas do DNA podem ser sequenciadas, comparadas com um banco de dados e utilizadas como uma ferramenta para a identificação das espécies. Esse é um método considerado moderno para reconhecer a origem botânica que o mel foi produzido (JANZEN, 2009; COZENTINO, 2014).

No caso das plantas, devem ser utilizados parte do genoma cloroplastidial, mais comumente os marcadores moleculares relacionados com os genes *rbcl* e o *matK*. Esses genes são os responsáveis pela produção da ribulose-1,5-bisfosfato ou

Rubisco (rbcL), assim como a enzima maturase (matK), envolvida no splicing de introns em alguns genes do cloroplasto (GALIMBERTI, 2014).

Outra área de estudo que implica na identificação da origem botânica, a partir do pólen é a palinologia, uma metodologia aplicada desde o século XVIII com a introdução do microscópio, onde se observava vários aspectos e formas à medida que ia se aumentando o foco da lente óptica (LABOURIAU, 2006). Sua aplicabilidade se direciona desde estudos que buscam entender e datar o surgimento das plantas até o reconhecimento de seus grupos taxonômicos botânicos (ERDTMAN, 1963).

Uma subárea que determina a compreensão do pólen em sua forma com aspecto líquido viscoso (Mel) é a melissopalynologia, onde tal estudo resulta em análises tanto qualitativas quanto quantitativas do pólen do mel, levando assim, a sua possível padronização, dependendo da amostra obtida (SENGUL et.al, 2023)

De acordo com Barth (2004, p.342-350): “A análise polínica de produtos apícolas (mel, pólen e própolis) considera os grãos de pólen, suas características morfológicas que levam à indicação da espécie ou dos táxons botânicos de sua origem, bem como a quantidade que pode ser indicativa de a qualidade”.

Existem alguns tipos de mel que apresentam florada cuja taxonomia se dá apenas pelo lugar em que foi produzida, ou seja, a vegetação predominante. Em seus frascos descritos como “Flores do cerrado” e “Flores do campo Silvestre” determinam em qual bioma se localizam e em um aspecto mais específico até a sua fitofisionomia, conseguindo até pré-determinar a quais possíveis espécies existentes naquelas áreas aparentemente pode ser a florada. De acordo com a instrução normativa N°11/2000, considerando a origem, a classificação do mel se apresenta como: - Mel uni-floral ou mel mono-floral (O produto origina-se de flores do mesmo gênero, família ou espécie e possui características próprias); Mel multifloral ou mel poli-floral (Mel obtido a partir de origens florais) (JUST; NEPOLO, 2010).

O Ministério da Agricultura e Pecuária, decreta através de órgãos, tanto federais (SIF-Serviço de Inspeção Federal), quanto estaduais (SIE-Serviço de Inspeção Estadual) para que os produtos apícolas sigam à risca os regulamentos e instruções normativas, onde deverá ser assegurado que a rotulagem do produto descrito em frascos comerciais seja veridicamente constado. Considerando também as normas

técnico descritivas da MERCOSUL para que o produto se consta regularizado para condições higiênico-sanitárias, e entre outras condições.

O trabalho realizado busca compreender a eficácia das metodologias para determinar a origem botânica que deu origem às amostras de mel comercializadas e rotuladas, apresentando as vantagens e limitações de cada técnica, uma vez que tais produtos são considerados um dos mais fraudados do Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Validar metodologias para identificação da origem botânica relacionada com amostras comerciais de mel, com o intuito de certificação do produto de acordo com as normas para rotulagem.

2.2 Objetivos Específicos

- Testar e adaptar protocolos da literatura para extração de DNA do pólen presente no mel
- Padronizar a amplificação de primers no DNA extraído de amostras de mel;
- Utilizar o banco de dados para realizar a identificação molecular da espécie oriunda do pólen no mel;
- Adaptar protocolo que envolve a observação de grãos de pólen em lâmina para as amostras de mel;
- Identificar e localizar as espécies descritas nas lâminas através de chave taxonômica palinológica;
- Comparar as metodologias distintas, apontando vantagens e limitações de ambas.

3. METODOLOGIA

3.1 Identificação por marcadores de DNA Barcode

Para o estudo foram adquiridas seis amostras distintas em Goiás. As amostras de mel utilizadas foram adquiridas em quatro diferentes estabelecimentos no estado de Goiás, Brasil. Seis amostras distintas foram utilizadas para o preparo e uso posterior nos demais experimentos. De acordo com o descrito nos rótulos, cada mel era oriundo das seguintes floradas: (1) Cipó Uva; (2) Sucupira; (3) Flores do Cerrado; (4) Flores do Campo; (5) Laranjeira; (6) Laranjeira (Figura 1).

Figura 1. Amostras de mel unifloral comercializadas e enumeradas coloquialmente da esquerda para a direita com as seguintes floradas: (1) Cipó Uva; (2) Sucupira; (3) Flores do Cerrado; (4) Flores do Campo; (5.1) Laranjeira; (5.2) Laranjeira. Obtidas em Goiás.



Fonte: Autoria própria

3.1.1 Preparo das amostras para Extração

Foram avaliados dois preparos, sendo que o primeiro foi seguido o protocolo descrito por Manivanan e colaboradores (2018) e o segundo, seguiu uma adaptação do primeiro com o descrito em Karaali & Çol (2016). No primeiro preparo, foram pesadas 10 g de cada amostra de mel e distribuídas em quatro tubos falcon de 50 mL, sendo que o volume foi completado até 40 mL com água ultrapura. Os tubos foram vortexados pelo prazo de 2 min ou até homogeneizar por completo e incubados a 40°C durante 10 min para minimizar a natureza altamente viscosa do mel. Os tubos foram centrifugados a 8000 rpm durante 15 min e os sobrenadantes foram

descartados. Os pellets dos quatro tubos foram reunidos num só tubo e novamente suspensos a um volume final de 40 mL utilizando água ultrapura. Os tubos foram novamente centrifugados a 8.000 rpm durante 15 min e o pellet resultante, que contém os pólenes precipitados, foi transferido para tubos eppendorf estéreis de 2 mL para subsequente extração do DNA. No segundo preparo, foram pesadas 12,5g de cada amostra de mel em tubos falcon de 50 mL e o volume foi feito em 40 mL com água ultrapura. Os tubos foram vortexados pelo prazo de 3 min ou até homogeneizar por completo e incubados a 43,3°C durante 20 min para retirar a natureza altamente viscosa do mel. Os tubos foram centrifugados a 4500 rcf durante 10 min e os sobrenadantes foram descartados. Os pellets foram então diluídos com água destilada e colocados em dois únicos tubos para subsequente extração de DNA.

3.1.2 Extração e Precipitação do DNA

Para esta etapa foram utilizados quatro protocolos, sendo dois deles adaptações e um do protocolo original do brometo de cetil trimetil amônio a 2 por cento (CTAB 2%) (Doyle e Doyle, 1987) e o último sendo o dodecil sulfato de sódio (SDS-Triton).

O processo de extração consiste no isolamento do ácido desoxirribonucleico (DNA) presente no núcleo das células de outros componentes celulares como as organelas, purificando o material para realizar os próximos passos consistentes na biologia molecular. Primeiramente foi realizado um procedimento denominado lise celular que tem como função o rompimento da membrana celular, sendo um pré-requisito para purificar proteínas intracelulares. Nas células eucarióticas presentes na substância floral estudada a lise foi realizada por procedimentos químicos (SDS e CTAB) que ajudam a dissolver a bicamada lipídica que compõe a membrana plasmática e as membranas das organelas.

Em seguida, desse processo foi realizada a retirada das proteínas envoltas nos reagentes, tais que podem impossibilitar a análise do DNA. Para realizar esse processo foi utilizado como mecanismo o solvente orgânico (Fenol; Clorofórmio; e ou Clorofórmio: álcool isoamílico – CIA) que dissolve as proteínas para remoção da solução.

Para finalizar, foi realizada a precipitação ou purificação do DNA, um dos passos mais importantes que irá determinar o sucesso da amostra nos métodos seguintes e que vai garantir que não haja resquícios de reagente e ou proteína no pellet do DNA. São utilizados dois tipos de precipitação no estudo, como comparação de efetividade – Em álcool que tem como função manter o DNA agrupado, separado dos demais componentes celulares (O DNA não é solúvel em etanol) e quanto mais gelado estiver o álcool, menos solúvel o DNA vai estar; E em isopropanol, onde se utiliza menor volume porque o DNA é menos solúvel ao isopropanol do que ao etanol. Em seguida, foi realizada a secagem dos pellets obtidos na etapa anterior em dois métodos diferentes em secagem por temperatura ambiente na bancada, e ou no secador laboratorial. As amostras com DNA são então ressuspensas em 50 µl de tampão TE (É adicionado RNase na concentração final de 10 µg/mL de amostra) e então mantido no freezer em over-night para posteriores experimentos.

3.1.3 Quantificações do DNA

Para as amostras analisadas foi utilizado o gel de agarose em 1% e o TBE com o reaproveitamento limite de até duas vezes. A medida determinada para essas amostras se deu: 3 µl (DNA) + 4 µl de tampões (BJ+BE) e 1 µl (Lambda) + 4 µl de tampões (BJ+BE). Os primers utilizados foram os seguintes: trnL+trnF; ETS/ETS 18S; trnC/ycf6; psbA/trnH; rbcLa e rbcLb, com ambos sobre o marcador em uma quilobase.

Quantificação por Fluorimetria: A medição fluorométrica de ácidos nucleicos baseia-se na utilização de corantes fluorogênicos que se ligam selectivamente ao ADN ou ARN. Este método é útil para casos em que a concentração é muito baixa para avaliar com precisão pela espectrofotometria e nos casos em que os contaminantes que absorvem a 260 nm (Nanômetros) impossibilitam a quantificação exata por esse método. Para esse estudo foi utilizado por conta da degradação do DNA.

3.1.4 Montagem e Quantificação de PCR / Etapa de Purificação

Após a etapa de quantificação do DNA, onde determina a quantidade e qualidade das amostras, foi preparado os reagentes para a PCR. Foi utilizado o termociclador Veriti 7 para a realização da reação em cadeia da polimerase. A amplificação com os primers desenhados para testar algumas regiões do genoma cpDNA foram testadas e otimizadas seguindo o protocolo padrão de PCR com as seguintes condições: um volume total de reação de 12,75 µl, onde será feito o mix para o número determinado de amostras para reação, com 2,25 µl de DNA alvo, Tp+Mg com 1,5 µl, BSA (DMSO para primers nucleares) com 1,5 µl, Primer F+R com 2,25 µl, 1,5 µl de cada dNTP (2,5µM), 5 U Taq DNA polimerase (Phoneutria, BR) 0,23 µl e por fim, 5,77 µl de H₂O.

As etapas do termociclador foram: Desnaturação inicial - 3 minutos a 94°C e uma segunda desnaturação - 1 minuto a 94°C, em seguida é realizado o Anelamento do primer - 1 minuto por 35 ciclos, adiante é realizado a extensão, onde a temperatura é ótima da enzima. Para a Taq (Enzima DNA Polymerase), utiliza-se 1 minuto a 72°C, e sua extensão final, após o término dos ciclos, leva-se 10 minutos a 72°C, como oportunidade adicional para a polimerase agir e assim, a extensão seja realizada a partir da extremidade 3' do primer, pela adição de nucleotídeos. Para finalizar programa-se o termociclador para um hold, de 0 a 4°C, para manter as amostras conservadas até o momento de estocagem.

O produto de PCR foi utilizado para preparar uma reação com as enzimas Exo-SAP (Purificação): A reação de PCR faz uso de dois primers, dNTPs e DNA polimerase para produzir múltiplas cópias de uma sequência de DNA específica. Quando a reação termina a maior parte dos primers e dNTP permanece intacta, e, se não retirados, irão interferir no sequenciamento. As enzimas Exonuclease I (Exo I) e Shrimp alkaline Phosphatase (SAP) removem estes materiais indesejados. Depois deste procedimento o sequenciamento é feito normalmente. As etapas da purificação com Exo-Sap: É utilizado o termociclador inicialmente em 37°C por 90 minutos e em seguida 80°C por 20 minutos e mantido por tempo indeterminado em 4°C.

3.1.5 Reação de Sequenciamento

Cada amostra que amplificou foi utilizada para montar as reações de sequenciamento que combina em um tubo com primer, DNA polimerase e nucleotídeos de DNA (dATP, dTTP, dGTP e dCTP). Os quatro nucleotídeos

terminadores de cadeia marcados são adicionados também, mas em concentração muito menor que a dos nucleotídeos comuns. Com isso, e realizado primeiramente, o aquecimento para a desnaturação do DNA molde (separar as fitas), então são resfriadas para que os primers possam se ligar ao molde de fita simples. Uma vez que o primer se ligou, a temperatura é aumentada novamente, permitindo que a DNA polimerase sintetize um novo DNA a partir do primer. A DNA polimerase continuará a adicionar nucleotídeos à cadeia até que aconteça a adição de um ddNTP ao invés de um normal. Nesse ponto, os nucleotídeos não podem mais ser adicionados, e, portanto, a fita terminará em um dideoxinucleotídeo (ddNTP).

Este processo é repetido em um número de ciclos. Quando o ciclo se completa, é praticamente garantido que um ddNTP terá se incorporado em todas as posições do DNA alvo em pelo menos uma reação. Ou seja, o tubo irá conter fragmentos de diferentes comprimentos, terminando em cada uma das posições de nucleotídeos no DNA original. As extremidades dos fragmentos serão rotuladas com corantes que indicam o nucleotídeo final. Depois que a reação é executada, os fragmentos são levados através de um longo e fino tubo contanto uma matriz de gel em um processo chamado de eletroforese capilar em gel no equipamento ABI3500. Os dados registrados pelo detector consistem em uma série de picos em intensidade de fluorescência, a sequência de DNA é lida a partir dos picos no cromatograma (Connie, et al., 2016).

Todas as sequencias produzidas foram comparadas com o banco de dados NCBI e BOLD Systems para realizar a identificação molecular das espécies presentes em cada amostras de mel.

3.2 Melissopalínologia

Foram utilizadas as mesmas amostras de mel uni-floral comercializado de estabelecimentos distintos da metodologia anterior, com a diferença da ausência da amostra 02 que se refere a florada de sucupira por não apresentar quantidade suficiente para se realizar o preparo.

Para realizar a identificação e descrição dos grãos foram utilizados textos e imagens (Fotos e desenhos) como base que referem se a chaves taxonômicas,

catálogos e tipos polínicos. Foram utilizados os seguintes referenciais teóricos: Erdtman (1952), Heusser (1971), Salgado-Laubouriau (1973), Salgado-Laubouriau et al. (1992), De Oliveira (1992), Barberi (2001), Lorente et al. (2017). Além disso, foi utilizado o site de catálogos polínicos RCPOL, disponível em <https://rcpol.mn.ufrj.br/pt/home/>.

3.2.1 Método de Preparo de Pólen

Para o preparo das amostras de mel foi adaptado da Técnica de Wodehouse e Hidróxido de Potássio (KOH), citada por Labouriau (1973) e criada por Wodehouse (1930), tende a ser uma técnica fácil e eficaz para se observar de forma preliminar a morfologia do pólen.

É colocado 10 g ou 10 ml de amostra de mel somado a 40 ml de água destilada em béquer de 50 ml, onde é submetido a uma homogeneização com bastão de vidro. Há exceção para amostras, onde o mel se apresenta cristalizado, no qual é preciso que seja aquecido em banho-maria até que se torne solúvel novamente; Após a homogeneização é centrifugado no limite de 2.200 rpm (Para evitar quebra de grãos frágeis) por 15 min e então é descartado o sobrenadante; Quando a água não se apresentar límpida, é necessária uma nova limpeza com água destilada; Em seguida é realizada uma nova homogeneização das amostras onde o pH deve ser verificado (Deve estar neutro em 7); Em seguida, novamente é realizada outra centrifugação em 2.200 rpm por 15 min (Caso tenha sobrado muita água a amostra, é necessário que se reduza até o ponto de não ficar completamente seca).

É adicionado ao material decorrente glicerina e acondicionado em tubo de ensaio tampado com algodão para evitar contaminação; Em seguida, a amostra é homogeneizada por 2 min com o auxílio de palito de dente, para ajudar a soltar os grãos grudados no fundo do tubo de ensaio; Após, goteie de uma a duas vezes o material sobre uma lâmina de vidro e cubra com uma lamínula; É aguardado por um tempo que o material se espalhe e se acomode (Por algumas horas ou uma noite) e depois são seladas suas laterais da lamínula com esmalte de unha incolor com um palito de dente (Os palitos de dente são utilizados de forma unitária para cada lateral evitando contaminações posteriores); A selagem da lateral da lamínula impede que os grãos se espalhem para fora da lamínula, mas permite girar os grãos com o auxílio de

um material de ponta fina, para ajudar a identificar os grãos em vista polar e vista equatorial (A identificação geralmente é feita na óptica de 40X, tamanho ideal para se observar os grãos).

3.2.2 Identificação Palinológica

Foram identificados variados tipos de grãos, onde se classificaram estatisticamente em grupos da seguinte forma: - Pólen predominante (O grão que prevalece na lâmina, +45%); - Pólen secundário (Entre 16-45%); - Pólen menor (Entre 3-15%); - Pólen rastreado (Menos que 3%).

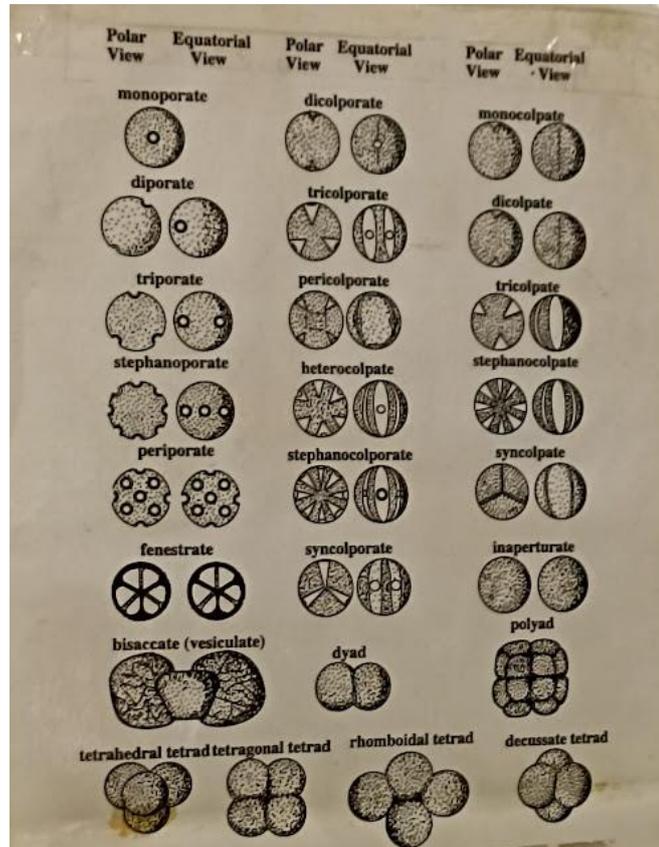
Para determinar e indicar a táxon dos grãos de pólen é necessário ter o tamanho, tipo, número de aberturas, forma e a ornamentação, como apresentado pelas figuras abaixo:

Figura 2. Tipos de grãos de pólen em vista polar e equatorial

	DI-		TRI-		TETRA-		PENTA-		HEXA-		POLY-	
	polar	eq	polar	eq	polar	eq	polar	eq	polar	eq	polar	eq
ZONOPORATE												
	e.g. Colchicum		e.g. Betula		← e.g. Alnus, Ulmus →				→			
ZONCOLPATE												
	e.g. Tofieldia		e.g. Acer		e.g. Hippuris		← e.g. Labiatae, Rubiaceae →					
ZONCOLPORATE												
			e.g. Parnassia		e.g. Rumex		e.g. Viola		e.g. Sangisorba		e.g. Utricularia	
PANTOPORATE												
			← e.g. Urtica →		e.g. Plantago						Chenopodiaceae	
PANTOCOLPATE												
					e.g. Ranunculaceae				e.g. Spargula		e.g. Polygonum amphitrum	
PANTOCOLPORATE												
					e.g. Rumex				e.g. Polygonum rai			

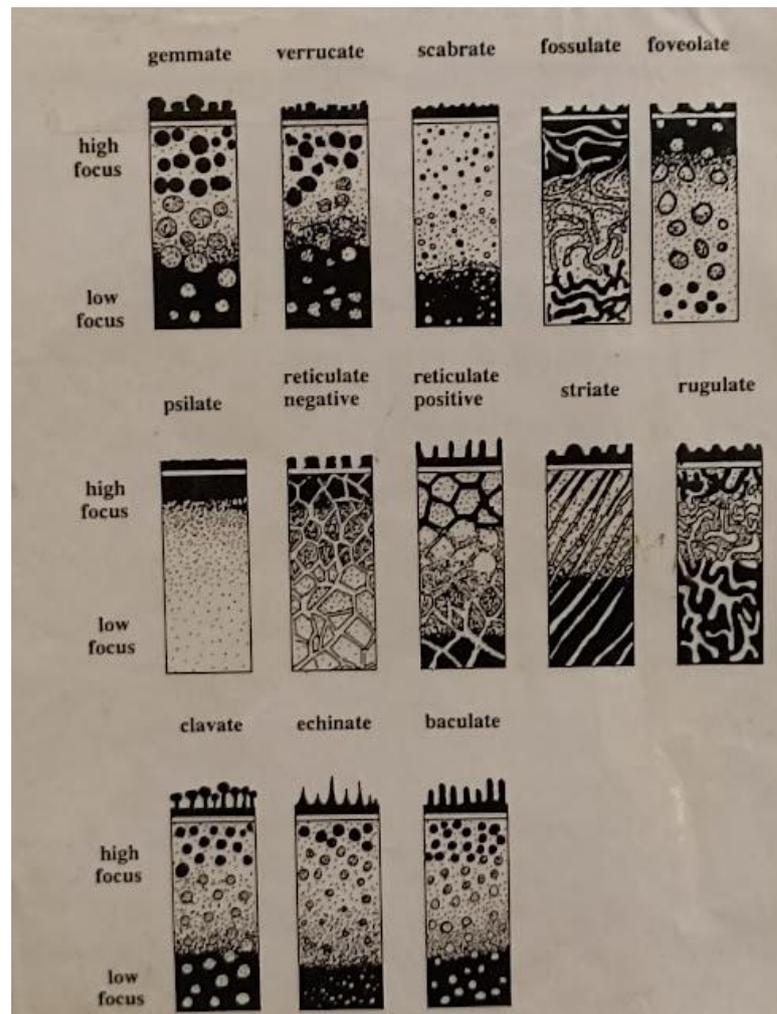
Fonte: (Salgado, 1978)

Figura 3. Tipos de aberturas, número e posição mais comumente encontrados em pólen neotropical.



Fonte: Salgado, 1979.

Figura 4. Categorias de ornamentação positiva e negativa.



Fonte: Salgado, 1979.

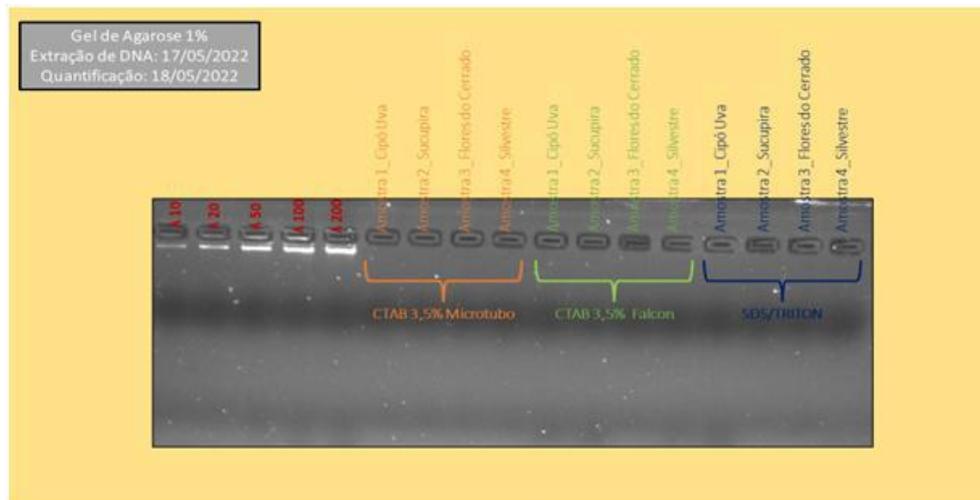
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração e Quantificação do DNA

Para a etapa de extração do DNA, foi comprovado que o protocolo de CTAB 2% é considerado o mais eficaz em comparação aos outros. Já no preparo ou pré-extração das amostras de mel foi utilizado uma adaptação de dois autores (Manivanan et al., 2018 e Karaali & Çol, 2016).

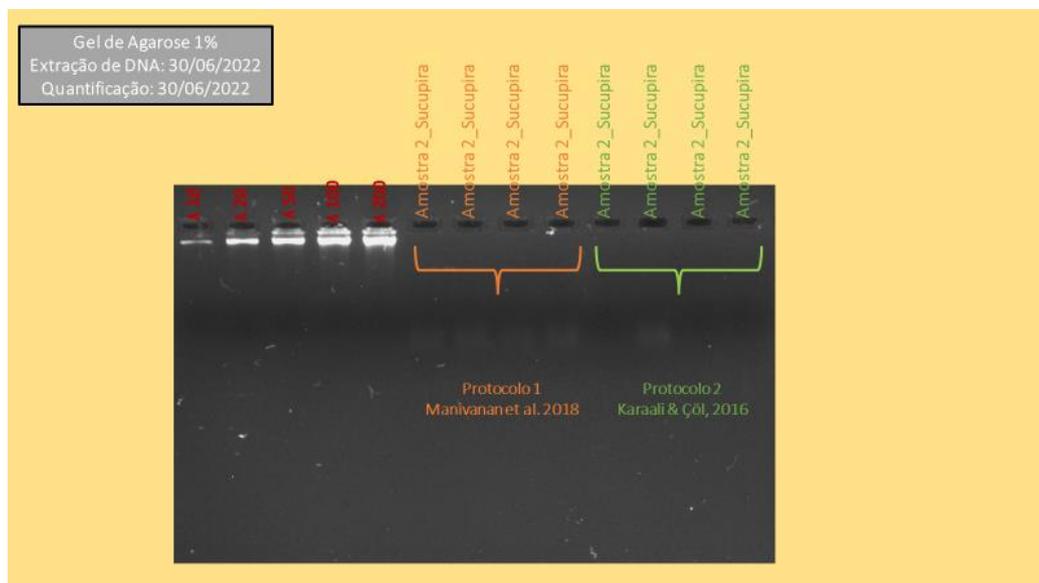
As primeiras tentativas de extração de DNA não possibilitaram quantidade visível em gel de agarose 1% (Figura 2). Na segunda e terceira tentativas foi possível identificar a presença de RNA, mas não de DNA (Figuras 3 e 4).

Figura 5. Eletroforese horizontal em gel de agarose das amostras de Cipó-uva, Sucupira, Flores do Cerrado e Campo silvestre em dois protocolos distintos com destaque ao SDS/TRITON que apresentou pellets na etapa de extração, porém não se obteve DNA.



Fonte: Autoria Própria

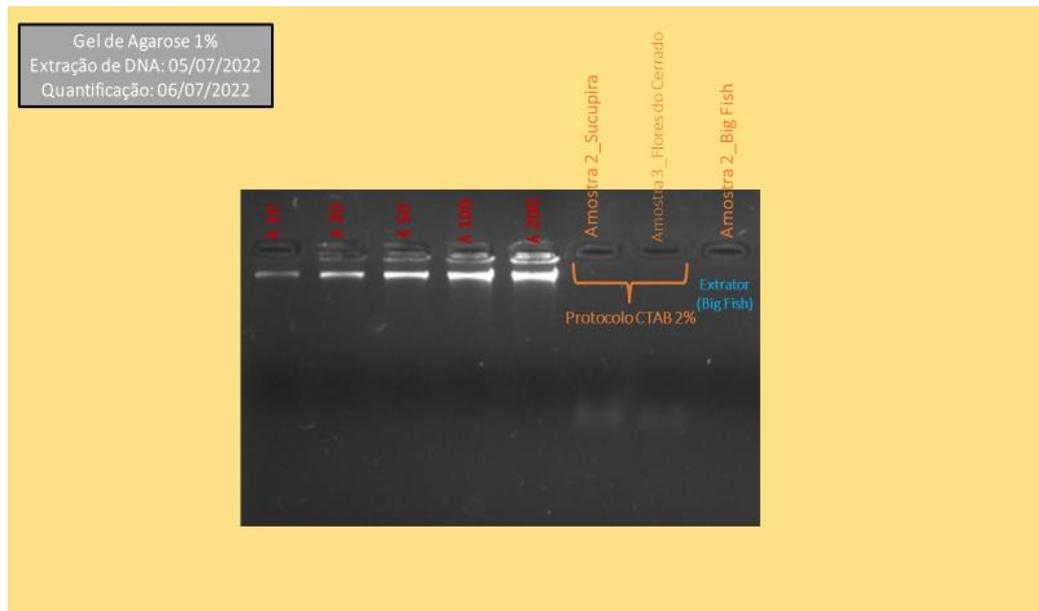
Figura 6. Eletroforese horizontal em gel de agarose das amostras de Sucupira, onde a extração foi feita com o tampão de CTAB 2%, porém foi seguido os passos de: Protocolo 1 - Manivanan et al. 2018; Protocolo 2 - Karaali & Çöl, 2016. Provável extração de RNA.



Fonte: Autoria Própria

Figura 7. Eletroforese horizontal em gel de agarose das amostras de Sucupira e Flores do Cerrado com protocolo CTAB 2% e o Extrator Big Fish. As amostras tiveram um

pellet visível no final, porém o padrão seguiu o mesmo do teste anterior, parecendo RNA no gel.

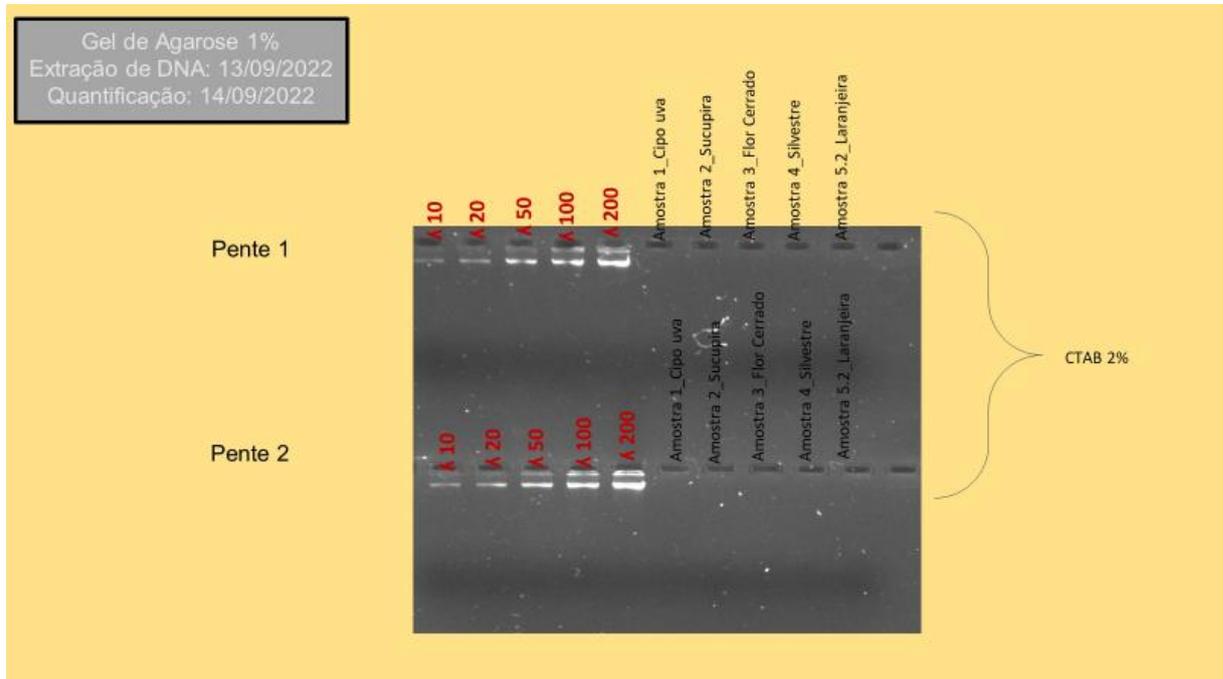


Fonte: Autoria própria.

Com o protocolo CTAB foram realizadas novas tentativas de extração de DNA e não foi possível verificar a presença de bandas visível de DNA nas amostras testadas (Figura 5).

Figura 8. Eletroforese horizontal em gel de agarose de todas as amostras, com exceção da Laranjeira 5.1 com o protocolo CTAB 2%. As amostras foram

quantificadas em duas situações, sobre secagem na bancada (Temperatura ambiente) e no concentrador plus.



Fonte: Autoria Própria.

Na tentativa de verificar se existia uma quantidade pequena de DNA, que não estava sendo visualizada com a técnica de eletroforese, foi realizada uma quantificação com o Qubit. Para tanto, foram utilizados os reagentes DS RNA/DNA High Sensitive para confirmar se há amostra o suficiente para o passo seguinte, que é a PCR (Tabelas 1 e 2). Conforme observado, a maioria das amostras apresentou mais RNA do que DNA, conforme havia sido imaginado a partir do gel da extração da Figura 2. Porém, pode-se perceber que a amostra 6 teve pouco RNA em relação à quantidade de DNA. Dessa forma, essa amostra foi utilizada para testar a amplificação via PCR.

Tabela 1. Quantificação das amostras de Sucupira sobre a condição de dois protocolos (Protocolo 1 - Manivanan et al. 2018; Protocolo 2 - Karaali & Çöl, 2016) com o reagente DS DNA High Sensitivity:

Nº da amostra	Nome da amostra	Quantificação (ng/µL)
1	2_Sucupira (CTAB 2%_Protocolo 1)	1,03
2	2_Sucupira (CTAB 2%_Protocolo 1)	1,25
3	2_Sucupira (CTAB 2%_Protocolo 1)	1,23
4	2_Sucupira (CTAB 2%_Protocolo 1)	1,26
6	2_Sucupira (CTAB 2%_Protocolo 2)	1,40

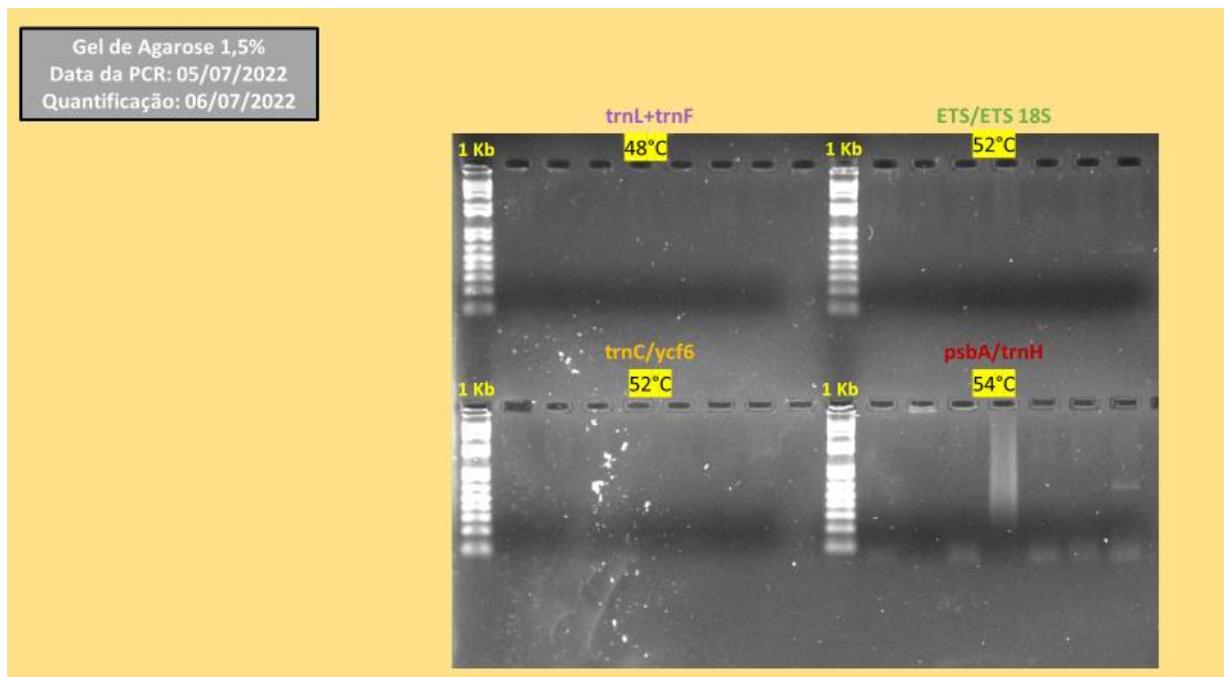
Tabela 2. Quantificação de amostras de Sucupira sobre a condição de dois protocolos (Protocolo 1 - Manivanan et al. 2018; Protocolo 2 - Karaali & Çöl, 2016) com o reagente DS RNA High Sensitivity:

Nº da amostra	Nome da amostra	Quantificação (ng/ μ L)
1	2_Sucupira (CTAB 2%_Protocolo 1)	Too Low
2	2_Sucupira (CTAB 2%_Protocolo 1)	5,46
3	2_Sucupira (CTAB 2%_Protocolo 1)	3,49
4	2_Sucupira (CTAB 2%_Protocolo 1)	2,69
6	2_Sucupira (CTAB 2%_Protocolo 2)	Too Low

4.2 PCR e Análise no Banco de Dados

Para a etapa de PCR, seis conjuntos de primers foram utilizados nas amostras oriundas do mel de sucupira e de flores do cerrado, que foram o que aparentemente havia uma quantidade suficiente para amplificação (Figuras 6 e 7).

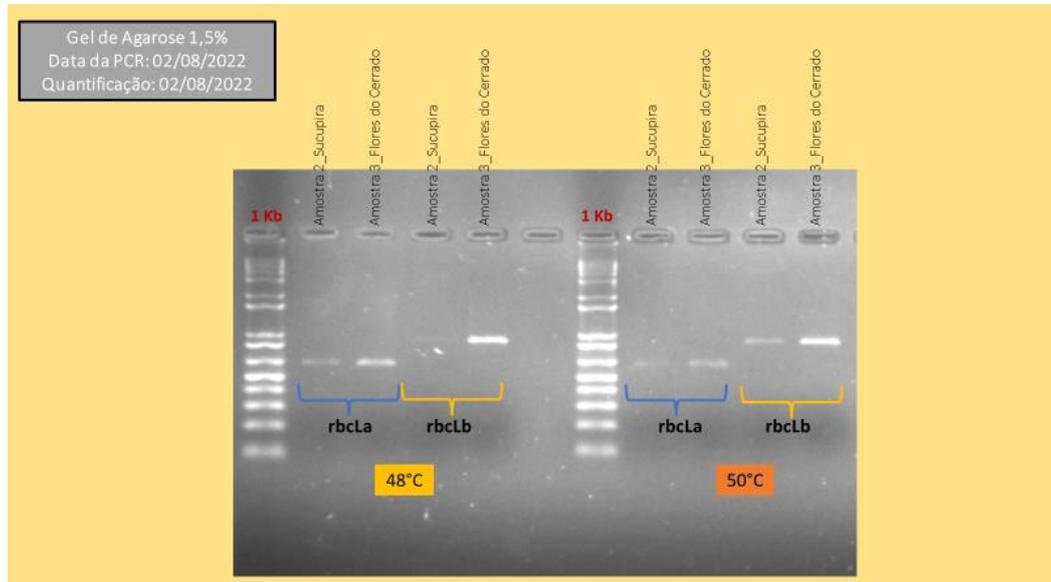
Figura 9. Eletroforese vertical de quantificação da PCR das amostras de sucupira e flores do cerrado com o marcador 1 Kb Plus (Kilobase). As amostras de sucupira se encontram nas cinco bandas em sequência e a amostra de flor do cerrado, na sexta banda (Última).



Fonte: Autoria Própria.

Figura 10. Eletroforese vertical de quantificação da PCR das amostras de sucupira e flores do cerrado com o marcador 1 Kb Plus (Kilobase). Foi utilizado os primers “rbcLa”

e “rbcLb” nas respectivas temperaturas 48°C e 50°C. Aparentemente foi quantificado DNA.



Fonte: Autoria Própria.

O melhor padrão de amplificação foi para a região rbcL (Figura 7), com uma qualidade e concentração adequada para o sequenciamento. A partir do sequenciamento dessas amostras que amplificaram foi possível avaliar que nenhuma delas se referia à espécie que estava descrita no rótulo, indicando que a rotulagem desses produtos não está correta (Tabela 3).

Como observado na Tabela 3, nenhuma amostra apresentou equivalência com a espécie ou gênero descrito no rótulo do produto. A amostra descrita como Flores do Cerrado apresentou uma sequência compatível com a espécie *Cocos nucifera* (Coco), natural de locais litorâneos e não é nativa do Cerrado. A amostra descrita como Sucupira apresentou resultados distintos, podendo indicar um mel polifloral, uma vez que foram realizadas duas ampliações em diferentes datas. Em sua primeira etapa, a amostra coincide em ambos os bancos de dados como *Simarouba amaraba*, porém em sua segunda etapa, há divergências entre as espécies apontadas pelos bancos de dados, com valores de similaridade relativamente baixos e distintos. As amostras restantes (Cipó uva, Laranjeira 2 e Campo silvestre) também apresentaram distintas espécies nos bancos de dados, com valores de similaridade variável também. A amostra de Laranjeira 1 não amplificou banda na etapa de PCR para sequenciar, o que justifica sua ausência nos resultados da tabela.

Tabela 3. Identificação molecular das amostras de mel e sua percentagem de caracterização nos bancos de dados genéticos NCBI e Bold System com a pesquisa Blast.

Identificação Molecular das Amostras de Mel em Perc. %				
Espécie descrita no frasco	Espécie determinada nos Banco de Dados		Banco de dados (BD)	
	(NCBI)	(Bold System)	NCBI	Bold System
Cipó Uva (<i>Serjania lethalis</i>)	<i>Aiphanes sp. 1 LDT-2019</i>	<i>Prestoea decurrens</i>	98,5 %	98,5%
Sucupira 48°/50° C (<i>Pterodon spp.</i>)	<i>Simarouba amaraba</i>	<i>Simarouba amaraba</i>	99,1 %	96,8%
Sucupira (<i>Pterodon spp.</i>)	<i>Amburana cearensis</i>	<i>Andira inermis</i>	97,6 %	96,2%
Flores Cerrado 48°/50° C	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Cocos nucifera</i>	100%	100%
Flores Cerrado	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Cocos nucifera</i>	100%	100%
Laranjeira 1 (<i>Citrus spp.</i>)	-	-	-	-
Laranjeira 2 (<i>Citrus spp.</i>)	<i>Amburana cearensis</i>	<i>Sophora japonica</i>	97,8 %	97,6%
Flores Campo Silvestre	<i>Simarouba versicolor</i>	<i>Toona sinensis</i>	99,2 %	96,4%

4.3 Tipos e Descrições dos grãos de pólen no Microscópio

Identificam-se como grãos de pólen monades, tamanho médio, tricolporados, âmbito triangular convexo a trilobado, granulares, espessura da parede fina nos polos, poros alongados e colpos com margem. Com diâmetro médio de 29 a 36 μm (Figura 11).

Amostra 1 – Rotulado como Cipó Uva:

Figura 11. . Grãos de pólen dominante da família Vitaceae e reconhecido morfologicamente como a espécie *Cissus albida*.



Fonte: Autorial Própria.

Identificam-se como grãos de pólen mônades, tricolporados, âmbito triangular reto, oblatos, microrreticulados, homobrocados, poros elípticos, endoaberturas alongadas. Com diâmetro médio de 13 a 19,4 μm (Figura 12).

Figura 12. Grãos de pólen secundário da família Myrtaceae e reconhecido morfologicamente como a espécie *Myrcia cerqueira*.



Fonte: Autorial Própria.

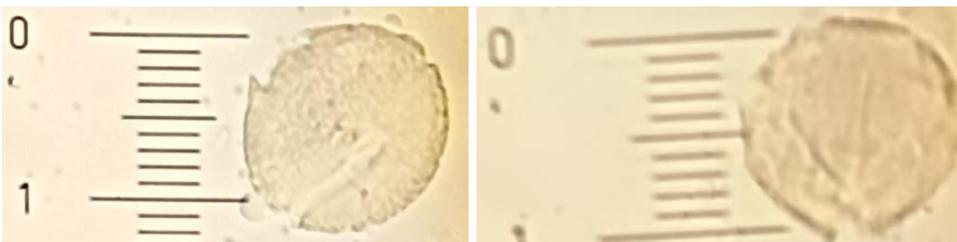
Amostra 3 – Rotulado como Flores do Cerrado:

Não foi possível identificar grãos nas lâminas, onde presume-se que a etapa de preparo apresentou a falta ou o acréscimo de diluição com água destilada, determinando assim a insuficiência das amostras observadas.

Identificam-se como grãos de pólen elípticos, com o polo proximal mais convexo que o distal, com sexina reticulada, escrobiculada, verrucosa ou espiculada. Com diâmetro médio de 20 a 80 μm (Figura 13).

Amostra 4 – Rotulado como Flores do Campo:

Figura 13. Grãos de pólen dominante da família Fabaceae – Caesalpinioideae e identificada como tipo *Cassia*.

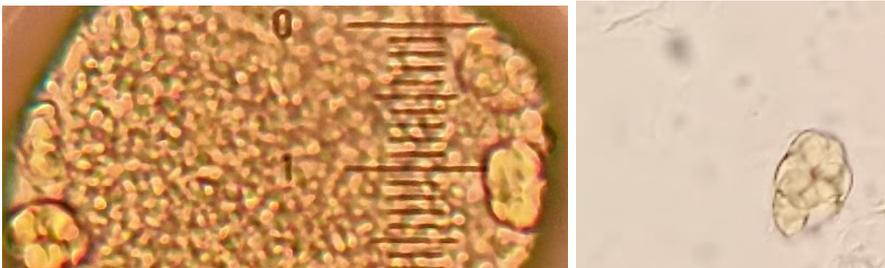


Fonte: Autorial Própria.

Identificam-se como grãos políades compostos por cerca de 10 grãos de pólen, psilados com diâmetro variando entre 15 a 23,3 μm (Figura 14).

Amostra 5.1 – Rotulado como Laranjeira:

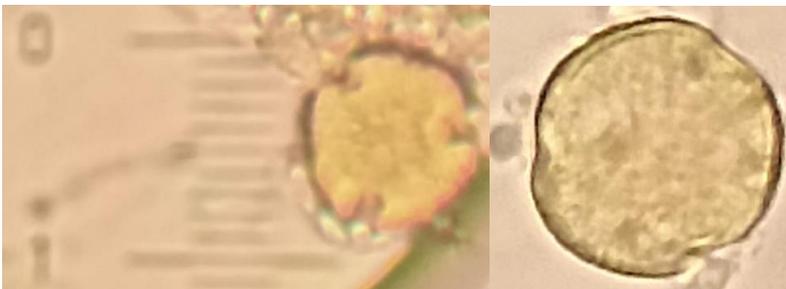
Figura 14. Grãos de pólen dominante da família Fabaceae e reconhecido morfológicamente como Mimosoideae sp.



Fonte: Autoria Própria.

Identificam-se como grãos com amb.triangular tendendo a esférico, com lados convexos, três aberturas e colporos e com colpo curto, com a exina mais espessa junto as aberturas e com a medida entre 18 a 31 μm (Figura 15).

Figura 15. Grãos de pólen secundário da família Bombacaceae e reconhecido morfológicamente como Eriotheca.



Fonte: Autoria Própria.

Identificam-se como grão com o formato oblato e perprolata e fossaperturado, não aperturados, porados ou colporados, com três aberturas, com exina espessa, sexina reticulada e com medida variando entre 13 a 100 μm (Figura 16).

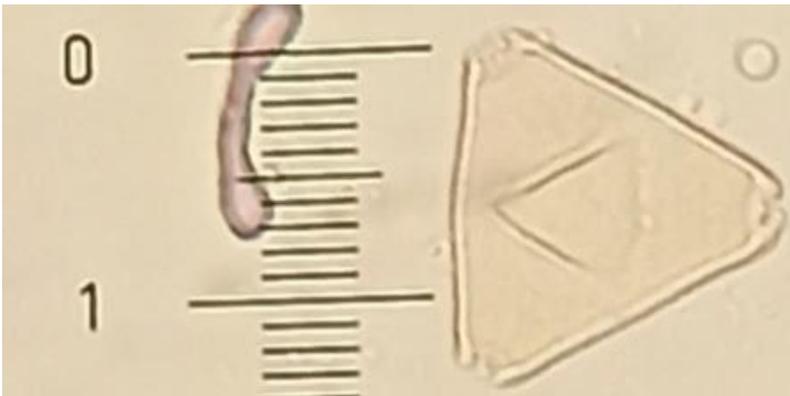
Figura 16. Grãos de pólen secundário da família Euphorbiaceae e reconhecido morfológicamente como Euphorbiaceae sp.



Fonte: Autoria Própria.

Amostra 5.2 – Rotulado como Laranjeira:

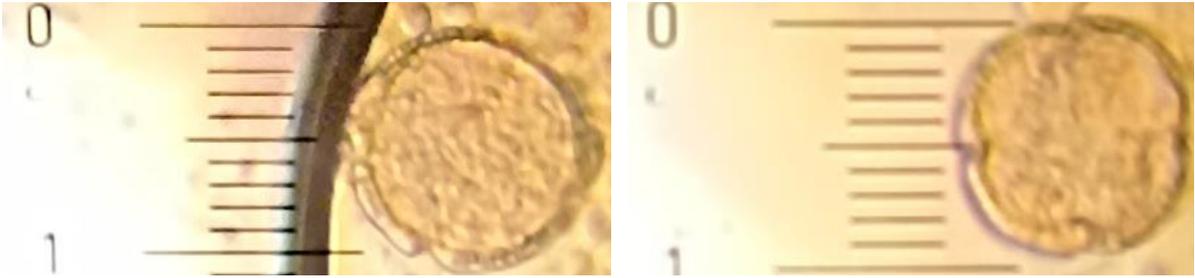
Figura 17. Grãos de pólen dominante da família Fabaceae, e morfológicamente descrito como copaifera ou pau óleo.



Fonte: Autoria Própria

Grãos de pólen mônades, tamanho médio, tricolporados, anguloaperturados, âmbito triangular reto, microrreticulados e homobrocados, com tamanho variando entre 20 a 26 μm (Figura 17).

Figura 18. . Grãos de pólen secundário da família Myrsinaceae e identificada como tipo Rapanea.



Fonte: Autoria Própria.

Tabela 4. Identificação melissopalínologica para descrever a origem botânica das amostras de mel, com os grãos dominantes e grãos secundários localizados na lâmina.

Identificação Palinológica das amostras de mel comercializadas		
Amostras descritas	Grãos Observados	
Cipó uva (<i>Serjania lethalis</i>)	<i>Cissus albida</i>	<i>Myrcia cerqueira</i>
Flores do cerrado	-	-
Flores do campo	<i>Cassia - Caesalpinioideae</i>	-
Laranjeira 1 (<i>Citrus spp.</i>)	<i>Mimosoideae sp.</i>	<i>Eriotheca // Euphorbiaceae sp.</i>
Laranjeira 2 (<i>Citrus spp.</i>)	<i>Fabaceae - Copaifera</i>	<i>Rapanea - Myrsinaceae</i>

Ao se comparar as origens botânicas obtidas por ambas as metodologias para as amostras de mel, é possível compreender a severa distinção entre elas, induzindo a uma complexidade para poder entender e descrever suas espécies em específico. Para justificar tais divergências, foi observado duas situações, onde na primeira, compreende-se que as amostras apresentem mais de uma origem botânica, o que explica a variabilidade de espécies encontradas. Já na segunda situação, é observado uma prevalência de espécie obtida através do pólen, onde dependendo da quantidade ou da “parte” coletada do mel para realizar o preparo para se obter esse grão (Possibilidade quando se faz mais de uma testagem, como o caso do trabalho), pode mudar totalmente a sua origem botânica, tendo em mente que as abelhas podem sim ter acesso a outras floras.

Identificação Molecular das Amostras de Mel em Perc. %				
Espécie descrita no frasco	Espécie determinada nos Banco de Dados		Banco de dados (BD)	
	(NCBI)	(Bold System)	NCBI	Bold System
Cipó Uva (<i>Serjania lethalis</i>)	<i>Aiphanes sp. 1 LDT-2019</i>	<i>Prestoea decurrens</i>	98,5 %	98,5%
Sucupira 48°/50° C (<i>Pterodon spp.</i>)	<i>Simarouba amaraba</i>	<i>Simarouba amaraba</i>	99,1 %	96,8%
Sucupira (<i>Pterodon spp.</i>)	<i>Amburana cearensis</i>	<i>Andira inermis</i>	97,6 %	96,2%
Flores Cerrado 48°/50° C	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Cocos nucifera</i>	100%	100%
Flores Cerrado	<i>Cocos nucifera</i>	<i>Cocos nucifera</i>	100%	100%
Laranjeira 1 (<i>Citrus spp.</i>)	-	-	-	-
Laranjeira 2 (<i>Citrus spp.</i>)	<i>Amburana cearensis</i>	<i>Sophora japonica</i>	97,8 %	97,6%
Flores Campo Silvestre	<i>Simarouba versicolor</i>	<i>Toona sinensis</i>	99,2 %	96,4%

Identificação Palinológica das amostras de mel comercializadas		
Amostras descritas	Grãos Observados	
Cipó uva (<i>Serjania lethalis</i>)	<i>Cissus albidia</i>	<i>Myrcia cerqueira</i>
Flores do cerrado	-	-
Flores do campo	<i>Cassia - Caesalpinioideae</i>	-
Laranjeira 1 (<i>Citrus spp.</i>)	<i>Mimosoideae sp.</i>	<i>Eriotheca // Euphorbiaceae sp.</i>
Laranjeira 2 (<i>Citrus spp.</i>)	<i>Fabaceae - Copaifera</i>	<i>Rapanea - Myrsinaceae</i>

4.4 Discussão

O trabalho realizado buscou compreender e relacionar metodologias distintas que tem um objetivo em comum, a identificação da origem botânica das amostras coletadas em frascos comercializados. Estudos que já foram realizados comprovam a eficácia de ambos os métodos, apresentando pontos importantes de favorecimento e ou eficácia, mas também de desfavorecimento e ou ineficácia.

Para estudos feitos com base no DNA Barcoding, foram realizadas diversas testagens das amostras de mel de acordo com o tamanho do pólen obtido por um pré preparo distinto, variando para cada trabalho utilizado como referência, para assim, identificar o primer ideal para quantificar o DNA e PCR e conseqüentemente determinar sua origem floral. Para o manuseio de plantas, três regiões do genoma são exclusivamente utilizadas, sendo o: *rbcL*, o *trnH-psbA* e o *matK*, porém existem trabalhos que também fazem uso do ITS, abrangendo as possibilidades e uso para proceder com a técnica forense.

A comparação entre vários trabalhos (Com destaque ao JAIN et.al, 2013; Çol e Karaali, 2016 ; e Manivanan et.al, 2018) evidenciam o *rbcL* como a região genômica e também marcador molecular mais adequado para se realizar a quantificação de PCR e assim, gerar a sequência genética para as amostras estudadas.

Os resultados obtidos indicam uma divergência de resultados quando comparado em dois bancos de dados distintos, apresentando assim a carência de mais de um marcador molecular para demonstrar uma comparação mais ampla e confiável. Tal situação se comprova quando se espelha com outros trabalhos, onde os autores conseguem determinar qual espécie prevalece no banco de dados com mais de uma região genômica e marcador molecular.

Para estudos feitos com base na melissopalínologia, o preparo do mel para tornar observável os grãos de pólen, é de extrema importância, pois é a partir dele que será possível identificar grãos na mais alta qualidade possível e assim descrever seu táxon, a quantidade de amostra e diluição, e o pH são essenciais para se obter ótimos grãos.

Os trabalhos realizados a essa metodologia, apresentam uma margem de eficácia demasiadamente alta, identificando com exatidão a espécie observada e podendo

determinar a região de origem da planta. Contudo a complexidade em volta de diferenciar alguns grãos de aspecto semelhante e famílias distintas, torna todo esse estudo, um grande desafio para aqueles que não se espelham como especialistas.

Os resultados a partir do método melissopalínológico não se apresentaram diferentes dos obtidos ao DNA-Barcoding, referente as amostras testadas e comparadas a chave taxonômica, onde não bateram as espécies constadas nos frascos comercializados.

Os dois métodos apresentam suas eficácias e ineficácias, mesmo apresentando uma diferença severa de tempo entre a aplicação dos dois. Para o DNA-Barcoding existem as seguintes vantagens: Precisão taxonômica, com base no genoma do indivíduo coletado; Aplicação de uso em pólenes degradados; E uma menor dependência para especialistas, tornando a experiência mais prática e rápida. Já como desvantagens: O custo elevado para manuseio de equipamentos essenciais, dependendo de um laboratório molecular; Dependência em base de dados, limitando assim sua área de busca; E o risco potencial de contaminação da amostra, onde pode levar a perda total dela. Para a melissopalínologia existem as seguintes vantagens: Baixo custeio; Método reconhecido e regularizado em indústrias e órgãos públicos; E seus dados complementares para um banco de dados genéticos, por exemplo. Como desvantagens: Requer da necessidade de profissionais especialistas; Limitação dos fragmentos de grãos; E sua baixa resolução final, o que dificulta a distinção de espécies.

E por fim, ambas metodologias se apresentaram serem confiáveis e precisas para a análise do mel, levando ao fato de poderem ser utilizadas em conjunto, como uma forma de complementar para uma análise mais abrangente.

5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos no trabalho determinam o quão importante é testar, pesquisar e aplicar metodologias para reconhecer e evidenciar a veracidade de produtos comercializados, em destaque para as amostras de mel que tendem a ser uma das mercadorias com mais tendência e facilidade de ser falsificado.

Os resultados indicam uma contradição entre as espécies descritas nos rótulos com as indicadas pelos métodos utilizados, onde levanta-se questionamentos em volta dos procedimentos técnicos. Com o DNA Barcoding foi possível se observar a sequência genômica gerada em percentagem, indicando a eficácia de sua prática, porém sua limitação no banco de dados é notória, tendo em mente que é uma técnica recente ainda precisa de uma complementação taxonômica. E para a melissopalínologia, a sua eficácia referente a reconhecimento morfológico é bem alta, porém sua limitação também fica explícita, onde existem muitas famílias, gêneros e espécies de plantas, com distinções quase que nulas entre alguns grãos.

Por fim, todas as amostras de mel comercializadas utilizadas para o trabalho, com o objetivo de evidenciar e comprovar sua veracidade não coincidiram em nenhum dos métodos apresentados, indicando o não cumprimento da norma instrutiva de regulamentação de mel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, Claudia Vivían de Oliveira et,al. **Fraudes no mel de abelha comercializado no mercado público de Maceió** – AL. Higiene Alimentar, 33(288/289): 1864-1867, abr.-maio 2019. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta/resource/pt/vti-26204>.

BARTH, Ortrud Monika. **Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees**. Scientia Agricola, v. 61, p. 342-350, 2004.

BARBERI, Maira. **Mudanças paleoambientais na região dos cerrados do Planalto Central durante o Quaternário tardio: O estudo da Lagoa Bonita**, DF. São Paulo, 2001.

BIFFI, Giovanna Yasmin Mokarzel. **Determinação de compostos antioxidantes em mel de abelha sem ferrão**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2021. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/26593>.

BRAGA, Adriana Reatto dos Santos et,al. **CERRADO: Ecologia e Flora**. Editora: Embrapa; v.1; cap.6; pag.164-185; Brasília, 2008.

CANO, et,al. **Mel: Fraudes e condições sanitárias**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, [S. l.], v. 52, n. 1-2, p. 1-4, 1992. Disponível em: <https://periodicos.saude.sp.gov.br/RIAL/article/view/35956>. Acesso em: 7 set. 2023.

ÇOL, Bekir; KARAALI, Mehmet. **EVALUATION OF DIFFERENT DNA ISOLATION METHODS FROM PINE HONEY**. Journal of Agricultural and Hacettepe Journal of Biology and Chemistry Food Chemistry, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.15671/hjbc.623487>. Acesso em: 30 set. 2023.

CHAVAN, Dimple et al. **Isolation and barcoding of tracen pollen-free DNA for Authentication of honey**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.2c04309>. Acesso em: 30 set. 2023.

ERDTMAN, Gunnar; SORSA, P. **Pollen morphology and plant taxonomy**. Stockholm: Almqvist & Wiksell, 1952.

GALIMBERTI, Andrea; et, al. **DNA Barcoding for Minor Crops and Food Traceability**. Hindawi, 2014. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/aag/2014/831875/>. Acesso em: 30 set. 2023.

HEUSSER, C.J. **Pollen and Spores of Chile**. The University of Arizona Press, 1971.

HOLLINGSWORTH, et,al. DP (2009). **Um código de barras de DNA para plantas terrestres**. Anais da Academia Nacional de Ciências dos Estados Unidos da América, v.106 cap. (31), pag. 12794–12797. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>.

HOOVER, Shelley E; OVINGE, Lynae P. **Pollen Collection, Honey Production, and Pollination Services: Managing Honeybees in an Agricultural Setting**. Journal of Economic Entomology, V. 111, E. 4, agosto de 2018, p. 1509–1516. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jee/toy125>.

JAIN, Sona Arun et al. **Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for Botanical Identification**. Food Science and Technology, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.15671/hjbc.623487>. Acesso em: 30 set. 2023.

JANZEN, D. H. et al. **Integração de código de barras de DNA em um inventário contínuo de biodiversidade tropical complexa**. Recursos de Ecologia Molecular, cap.9: pag.1-26, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02628.x>.

JUST; NESPOLO. **O mel e suas propriedades**. SB Rural, Ed.47, 2010.

LABOURIAU, Maria Lêa Salgado. **Contribuição á Palinologia dos Cerrados**. Academia Brasileira de Ciências, São Paulo, 1973.

LABOURIAU, Maria Lêa Salgado. **Crítérios e Técnicas para o Quaternário**. Editora Edgar Blucher, 2006.

LIMA, Stéfane Paula Costa de Holanda et al. **Serviços de inspeção de produtos de origem animal no Brasil: histórico e atualidades**. 2019.

LORENTE, Flavio Lima et al. **Atlas Palinológico: Laboratorio ¹⁴C – Cena/USP**. FEALQ, São Paulo, 2017.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, Anna; VORWOHL, G. **Methods of melissopalynology**. *Bee world*, v. 59, n. 4, p. 139-157, 1978.

MAIA et.al. **As abelhas sem ferrão (*Melipona subnitida*) ajustam a produção de crias em vez da atividade de forrageamento em resposta às mudanças nos estoques de pólen**. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroetologia, Fisiologia Sensorial, Neural e Comportamental*, 2016, v.202 cap.(9–10), pag.723–732. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00359-016-1095-y>.

MANIVANAN, Praghadeesh et al. **Studies on authentication of true source of honey using pollen DNA barcoding**. *Journal of entomology and zoology studies*, 2018. Disponível em: <https://www.entomoljournal.com/archives/2018/vol6issue3/PartD/6-2-242-140.pdf>. Acesso em: 30 set. 2023.

NOGUEIRA-COUTO, R. H. **As abelhas na manutenção da biodiversidade e geração de rendas**. CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 12, 1998, Salvador-BA. Anais... Salvador:1998, pag. 101.

ÖZCAN, M. M.; ÖLMEZ, Ç. **Some qualitative properties of different monofloral honeys**. *Food Chemistry*, Volume 163, abril de 2014, pag. 212-218.

SARAVANAN, Mohanasundaram et al. **O código de barras do DNA detecta a origem floral de amostras de mel indiano**. *Genoma*, v. 62, n. 5, pág. 341-348, 2019.

SENGUL, Memmune et al. **IMPORTANCE OF POLLEN ANALYSIS IN HONEY: MELISSOPALYNOLOGY**. *Current Research in Agriculture, Forestry and Aquaculture*, Volume 22, 2023, Cap.3, pag. 25-38.

SILVA, Albeane Guimarães. **Memória temporal no forrageamento da abelha sem ferrão *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae)**. 2016. 39 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Conservação/CCBS) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2016.

SOUZA, Vinicius Castro. **Botânica Sistemática**, 3 ed, cap.2, 2012.

