

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**TESE**

**MÉIS DO SUDESTE BRASILEIRO: AVALIAÇÃO DE  
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CLASSIFICAÇÃO ATRAVÉS  
DE CLAE, RMN E ANÁLISE MULTIVARIADA**

**ALINE FIGUEIRA LIRA**

**Seropédica, Rio de Janeiro  
2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**MÉIS DO SUDESTE BRASILEIRO: AVALIAÇÃO DE  
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CLASSIFICAÇÃO ATRAVÉS  
DE CLAE, RMN E ANÁLISE MULTIVARIADA**

**ALINE FIGUEIRA LIRA**

**Sob a Orientação da Professora**

Dra. Rosane Nora Castro

**e Co-Orientação do Professor**

Dr. Victor Marcos Rumjanek

Tese submetida como requisito  
parcial para a obtenção do grau  
de **Doutor em Ciências**.

Seropédica, Rio de Janeiro  
Abril de 2014

615.535

L768m Lira, Aline Figueira, 1985-

T Méis do sudeste brasileiro: avaliação de parâmetros físico-químicos e classificação através de CLAE, RMN e análise multivariada / Aline Figueira Lira. - 2014.

189 f.: il.

Orientador: Rosane Nora Castro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Química, 2014.

Bibliografia: f. 126-161.

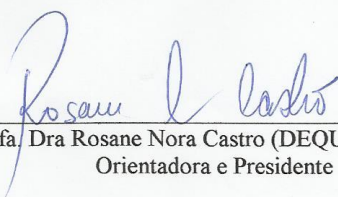
1. Mel - Uso terapêutico - Teses.  
2. Mel - Análise - Teses. 3. Mel como alimento - Teses. I. Castro, Rosane Nora, 1965-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Química. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS - DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

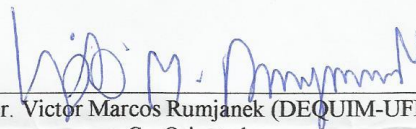
**ALINE FIGUEIRA LIRA**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Química como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor em Ciências, com área de concentração em Química de Produtos Naturais.

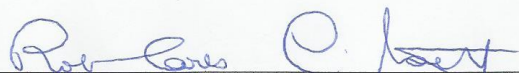
TESE APROVADA EM 16/04/2014



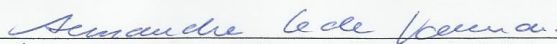
Prof.ª Dra Rosane Nora Castro (DEQUIM-UFRRJ)  
Orientadora e Presidente



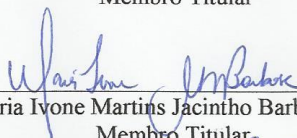
Prof. Dr. Victor Marcos Rumjanek (DEQUIM-UFRRJ)  
Co-Orientador



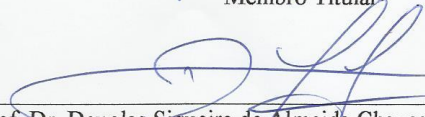
Prof. Dr. Roberto Carlos Campos Martins (IPPN-UFRRJ)  
Membro Titular



Prof.ª. Dra. Alessandra Leda Valverde (Instituto de Química- UFF)  
Membro Titular



Prof.ª. Dra. Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa (DTA-UFRRJ)  
Membro Titular



Prof. Dr. Douglas Siqueira de Almeida Chaves (DEQUIM-UFRRJ)  
Membro Titular

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Raimundo e Maria Lucia, que sempre me apoiaram em tudo e procuraram buscar para mim o melhor.

À Prof<sup>a</sup> Rosane Nora Castro, pela orientação, dedicação, amizade e paciência.

Ao Prof<sup>o</sup> Victor M. Rumjanek, pela amizade, ensinamentos e estímulo na continuação do meu trabalho.

Aos professores Mário Geraldo, Carlos Maurício, Aurélio Baird, João Batista e Marcia Cristina pelas aulas que contribuíram para meu crescimento profissional.

À amiga Fernanda que me ensinou cada procedimento, pela amizade e, além disso, se tornou minha madrinha de casamento.

À amiga Luiza Sant'Ana pela amizade e ajuda nas inúmeras apresentações no *power point*.

À Prof. Maria Cristina Affonso Lorenzon pelo fornecimento das amostras e pelo uso do laboratório nas análises melissopalínológicas.

À Dra. Mônica O. Barth pelo auxílio nas análises melissopalínológicas.

À aluna de iniciação científica Mariana pela realização das análises físico-químicas das amostras estudadas.

Aos demais amigos Wellison, Fábio, Vitor e Tatiany, pelo convívio no Laboratório 48B no DEQUIM-UFRRJ.

Aos amigos André Canuto, Juliana Paes Leme, Daniel Rosa, Janaina, Vinícius e Tereza, aos quais sou muito grata e sempre guardarei ótimas lembranças.

À banca examinadora por aceitar o convite e pelas futuras contribuições.

À UFRRJ e ao PPGQ, pela oportunidade e qualidade de ensino.

À CNPQ, pelo apoio financeiro.

E por fim, agradeço a Deus, por ter me ajudado a concluir esse trabalho.

## SUMÁRIO

Índice de Tabelas	i
Índice de Figuras	ii
Índice de Esquemas	iv
Índice de Abreviatura e Siglas	v
Resumo	vi
Abstract	vii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. O Mel: Definição, Composição e Classificação	2
2.2. Características físico-químicas do mel	6
2.3. Propriedades biológicas do mel	10
2.4. Capacidade Antioxidante do mel	13
2.5. Métodos para Avaliar a capacidade Antioxidante (AA)	16
2.5.1. Ensaio com radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).	16
2.5.2. Ensaio com ABTS ou TEAC	17
2.5.3. Ensaio do FRAP	18
2.6. Substâncias Fenólicas presentes no mel	20
2.7. Metodologias usadas para caracterização de mel	25
2.7.1 Análise Melissopalínológica	26
2.7.2. Métodos Alternativos para determinação da origem botânica	29
2.7.2.1. Análise do perfil de substâncias voláteis no mel	30
2.7.2.2. Análise do perfil de substâncias fenólicas no mel	35
2.7.2.3. Análise Multivariada em dados de Ressonância Magnética Nuclear	41
2.7.3 Análise Multivariada de dados	44
3 – OBJETIVO GERAL	45
3.1 – Objetivos Específicos	45
4 – PARTE EXPERIMENTAL	47
4.1 - Material e Métodos	47
4.2 - Amostras de Méis	48
4.3 - Análise Melissopalínológica	49
4.3.1.Preparo das lâminas	49
4.3.2 Identificação dos tipos polínicos	50
4.4.Determinação espectrofotométrica da cor do mel	51
4.5 - Determinação do teor de HMF no mel	52
4.5.1 - Preparo dos Reagentes	52
4.5.2 – Procedimento experimental	52
4.6 - Determinação do pH e Acidez Livre	53
4.7 - Preparo dos Extratos de Mel	54
4.8 - Determinação de fenólicos totais com reagente de Folin-Denis	55
4.8.1 – Preparo do reagente de Folin-Denis	56
4.8.2 - Procedimento Experimental	56
4.8.3 - Construção da curva analítica do ácido gálico	56
4.9 - Determinação de flavonoides totais com cloreto de alumínio	57
4.9.1 – Construção da curva analítica da quercetina	58
4.10 - Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH	58
4.10.1 -Determinação do CE <sub>50</sub> para amostra de mel in natura e extratos.	59
4.11 – Determinação da Atividade Antioxidante do mel pelo Método de Redução do Íon Férrico (FRAP)	60
4.11.1 - Construção da curva analítica com sulfato ferroso	61
4.12 - Determinação da Atividade Antioxidante pela Captura do Radical-Cátion (ABTS.+)	61
4.12.1 - Construção da curva analítica com Trolox	62

4.13 - Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	63
4.13.1 - Construção das Curvas Analíticas com os padrões	63
4.14 - Tratamento Quimiométrico	64
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1. Análise Melissopalínológica	65
5.2 - Caracterização físico-química das amostras de mel	71
5.3 – Determinação do teor em substâncias polifenólicas e avaliação da Atividade Antioxidante das amostras de mel.	76
5.4. Preparo dos extratos das amostras de mel	84
5.4.1 - Identificações das Substâncias Fenólicas nos Extratos por CLAE-DAD	86
5.4.2 - Determinação do teor em substâncias polifenólicas e avaliação da Atividade Antioxidante dos extratos de mel.	98
5.5 Análise quimiométrica em dados de RMN para os extratos dos méis	108
5.6. Análise quimiométrica em dados de CLAE-DAD para os extratos de mel	116
6 – CONCLUSÕES	125
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	126

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1-</b> Composição básica do mel	4
<b>Tabela 2-</b> Algumas floradas do Brasil	5
<b>Tabela 3-</b> Algumas fontes de antioxidantes na dieta	14
<b>Tabela 4 -</b> Substâncias fenólicas identificadas nos méis de eucalipto e silvestre	38
<b>Tabela 5 -</b> Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestre, assa-peixe e macieira	39
<b>Tabela 6 -</b> Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres e laranja	39
<b>Tabela 7 -</b> Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, laranja e eucalipto	40
<b>Tabela 8 -</b> Substâncias fenólicas identificadas nos méis assa- peixe e e eucalipto	40
<b>Tabela 9 -</b> Substâncias fenólicas identificadas nos méis assa-peixe, cambará e morrão de candeia	41
<b>Tabela 10 -</b> Amostras de méis de silvestres(S), assa-peixe(AS), Laranja(L), eucalipto(E) e morrão de candeia(M) estudadas neste trabalho	49
<b>Tabela 11-</b> Relação da cor do mel com escala de Pfund	52
<b>Tabela 12 -</b> Resultados obtidos a partir da curva analítica preparada com diferentes padrões	64
<b>Tabela 13-</b> Resultados obtidos pelas análises dos tipos polínicos dos méis de eucalipto	66
<b>Tabela 14-</b> Resultados obtidos pelas análises dos tipos polínicos dos méis de morrão de candeia.	67
<b>Tabela 15-</b> Resultados obtidos pelas análises dos tipos polínicos dos méis de laranja.	68
<b>Tabela 16-</b> Resultados obtidos pelas análises dos tipos polínicos dos méis de assa-peixe	69
<b>Tabela 17 -</b> Resultados obtidos pelas análises dos tipos polínicos dos méis Silvestre	69
<b>Tabela 18-</b> Valores médios e os desvios padrões dos parâmetros físico-químicos para os méis de eucalipto(E), morrão de candeia(M), assa-peixe(AS), laranja(L) e silvestre(S) estudados.	71
<b>Tabela 19-</b> Valores médios e os desvios padrões dos teores de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante, das amostras de méis de eucalipto(E), morrão de candeia(M), assa-peixe(AS), laranja(L) e silvestre(S) estudadas.	77
<b>Tabela 20 –</b> Rendimentos obtidos para os extratos dos méis estudados nesse trabalho.	85
<b>Tabela 21–</b> Tempos de retenção e máximos de absorção no UV das substâncias utilizadas como padrão	88
<b>Tabela 22-</b> Conteúdo das substâncias fenólicas das amostras de extratos de méis de eucalipto. (mg/100g de mel)	94
<b>Tabela 23-</b> Conteúdo das substâncias fenólicas das amostras de extratos de méis de morrão de candeia .	95
<b>Tabela 24-</b> Conteúdo das substâncias fenólicas das amostras de extratos de méis de assa-peixe .(mg/100g de mel)	95
<b>Tabela 25-</b> Conteúdo das substâncias fenólicas das amostras de extratos de méis de laranja .(mg/100g de mel)	96
<b>Tabela 26-</b> Conteúdo das substâncias fenólicas das amostras de extratos de méis silvestres.	96
<b>Tabela 27-</b> Valores médios e os desvios padrões dos teores de fenólicos, flavonoides totais, FRAP, ABTS e DPPH, das amostras de extrato de méis de eucalipto(EE), morrão de candeia(EM), assa-peixe(EAS), laranja(EL) e silvestre(ES) estudadas.	99
<b>Tabela 28 –</b> Avaliação da atividade antioxidante (CE <sub>50</sub> ) das substâncias fenólicas utilizados como padrão pelo método DPPH	104



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Estruturas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH	17
<b>Figura 2 -</b> Estabilização do radical ABTS <sup>•+</sup> por um antioxidante	18
<b>Figura 3 -</b> Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe <sup>3+</sup> .	19
<b>Figura 4-</b> Principais derivados de ácido benzóico encontrados em méis brasileiros	21
<b>Figura 5-</b> Principais derivados de ácido cinâmico encontrados em méis brasileiros	22
<b>Figura 6-</b> Estrutura básica dos flavonoides	23
<b>Figura 7 –</b> Exemplos de alguns tipos de flavonoides.	23
<b>Figura 8-</b> Estruturas de compostos voláteis encontrados no mel	34
<b>Figura 9-</b> Substâncias fenólicas identificadas no méis.	36
<b>Figura 10-</b> Nuvem de dados com formato elipsóide e seus dois componentes principais (PC1 e PC2)	45
<b>Figura 11-</b> Foto de grãos de pólen de diferentes espécies vegetais.	51
<b>Figura 12-</b> Modelo esquemático do preparo dos extratos do mel.	55
<b>Figura 13 -</b> Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico versus as absorvâncias (760 nm) para os ensaios de Folin-Denis.	57
<b>Figura 14 -</b> Curva analítica das médias das concentrações da solução de quercetina versus as leituras de absorvâncias (415 nm), após o ensaio com cloreto de alumínio.	58
<b>Figura 15 -</b> Esquema do ensaio de atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA.	59
<b>Figura 16-</b> Curva analítica das médias das concentrações da solução aquosa de FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O versus as leituras de absorvâncias (593 nm), após o ensaio com reagente de FRAP.	61
<b>Figura 17 -</b> Curva analítica das médias das concentrações da solução etanólica de Trolox versus as leituras de absorvâncias (760 nm), após o ensaio com reagente de ABTS.	62
<b>Figura 18-</b> Fotografias das lâminas avaliadas ao microscópio contendo grãos de pólen (A) <i>Cróton</i> ; (B) <i>Vernonia</i> (C) <i>Eucalyptus</i> ; (D) <i>Citrus</i> e (E) Silvestre.	70
<b>Figura 19-</b> Estruturas das substâncias usadas como padrões	87
<b>Figura 20-</b> Substâncias fenólicas identificadas no extrato: <b>A</b> -eucalipto <b>EE9</b> , <b>B</b> -morrão de candeia <b>EM8</b> , <b>C</b> - assa-peixe <b>EAS6</b> , <b>D</b> -laranjeira <b>EL7</b> e <b>E</b> -silvestre <b>ES6</b> por CLAE-DAD.	90
<b>Figura 21 -</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) do extrato EE4 (eucalipto em acetato de etila) em metanol deuterado (500MHz).	109
<b>Figura 22 -</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) do extrato EM9 (morrão de candeia em acetato de etila) em metanol deuterado (500MHz).	110
<b>Figura 23 -</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) do extrato ES3 (silvestre em acetato de etila) em metanol deuterado (500MHz).	110
<b>Figura 24 -</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) do extrato EL9 (assa-peixe em acetato de etila) em metanol deuterado (500MHz).	111
<b>Figura 25 -</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz) do extrato EL (laranjeira em acetato de etila) em metanol deuterado (500MHz).	111
<b>Figura 26 -</b> Gráfico <i>de scores</i> de PC-1 x PC-2 dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos vinte e quatro extratos.	113
<b>Figura 27-</b> Dendrograma de análise de <i>cluster</i> pelo quadrado da distância Euclidiana (Método de Ward) obtido através dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos em acetato de etila.	114
<b>Figura 28 -</b> Gráfico <i>de scores</i> de PC-1 x PC-2 dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos dezoito extratos.	115
<b>Figura 29-</b> Dendrograma de análise de <i>cluster</i> pelo quadrado da distância Euclidiana (Método de Ward) obtido através dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H dos extratos em acetato de etila.	115
<b>Figura 30 -</b> Gráfico <i>de scores</i> de PC-1 x PC-2 dos dados de CLAE-DAD dos vinte e um extratos divididos em 2 diferentes origens florais: azul-laranjeira ( <b>EL</b> ) e rosa-eucalipto( <b>EE</b> ).	117
<b>Figura 31 -</b> Dendrograma dos dados de CLAE-DAD dos extratos de laranjeira e eucalipto .	118

<b>Figura 32</b> - Gráfico de <i>loadings</i> das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de CLAE-DAD dos extratos de laranja e eucalipto	118
<b>Figura 33</b> - Gráfico de <i>scores</i> de PC-1 x PC-2 dos dados de CLAE-DAD dos dezoito extratos divididos em 2 diferentes origens florais: laranja (EL) e assa-peixe (EA).	119
<b>Figura 34</b> - Dendrograma dos dados de CLAE-DAD dos extratos de laranja e assa-peixe .	120
<b>Figura 35</b> - Gráfico de <i>loadings</i> das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de CLAE-DAD dos extratos de laranja e assa-peixe.	120
<b>Figura 36</b> - Gráfico de <i>scores</i> de PC-1 x PC-2 dos dados de CLAE-DAD dos dezoito extratos divididos em 2 diferentes origens florais: laranja (EL) e morrão de candeia (EM).	121
<b>Figura 37</b> - Dendrograma dos dados de CLAE-DAD dos extratos de laranja e morrão de candeia	121
<b>Figura 38</b> - Gráfico de <i>loadings</i> das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de CLAE-DAD.	122
<b>Figura 39</b> - Gráfico de <i>scores</i> de PC-1 x PC-2 dos dados de CLAE-DAD dos dezoito extratos divididos em 2 diferentes origens florais: laranja (EL) e silvestre (ES).	123
<b>Figura 40</b> -Dendrograma dos dados de CLAE-DAD dos extratos de laranja e silvestre.	123
<b>Figura 41</b> - Gráfico de <i>loadings</i> das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de CLAE-DAD dos extratos de laranja e silvestre.	124
<b>Figura 42</b> - Extrato EE01 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD.	162
<b>Figura 43</b> - Extrato EE02 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD.	162
<b>Figura 44</b> - Extrato EE03 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD.	162
<b>Figura 45</b> - Extrato EE04 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD.	162
<b>Figura 46</b> - Extrato EE05 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD.	163
<b>Figura 47</b> - Extrato EE06 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD.	163
<b>Figura 48</b> - Extrato EE07 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD.	163
<b>Figura 49</b> - Extrato EE08 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD.	163
<b>Figura 50</b> - Extrato EE09 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD.	164
<b>Figura 51</b> - Extrato EE10 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD.	164
<b>Figura 52</b> - Extrato EE11 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD.	164
<b>Figura 53</b> - Extrato EE12 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD.	164
<b>Figura 54</b> - Extrato EM01 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD	165
<b>Figura 55</b> - Extrato EM02 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD	165
<b>Figura 56</b> - Extrato EM03 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD	165
<b>Figura 57</b> - Extrato EM04 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD	165
<b>Figura 58</b> - Extrato EM05 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD	166
<b>Figura 59</b> - Extrato EM06 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD	166
<b>Figura 60</b> - Extrato EM07 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD	166
<b>Figura 61</b> - Extrato EM08 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD	166
<b>Figura 62</b> - Extrato EM09 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD	167
<b>Figura 63</b> - Extrato EAS01 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD	167
<b>Figura 64</b> - Extrato EAS02 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD	167
<b>Figura 65</b> - Extrato EAS03 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD	167
<b>Figura 66</b> - Extrato EAS04 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD	168
<b>Figura 67</b> - Extrato EAS05 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD	168
<b>Figura 68</b> - Extrato EAS06 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD	168
<b>Figura 69</b> - Extrato EAS07 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD	168
<b>Figura 70</b> - Extrato EAS08 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD	169
<b>Figura 71</b> - Extrato EAS09 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD	169
<b>Figura 72</b> - Extrato EL01 de mel de laranja analisado por CLAE-DAD	169
<b>Figura 73</b> - Extrato EL02 de mel de laranja analisado por CLAE-DAD	169

<b>Figura 74</b> - Extrato <b>EL03</b> de mel de laranjeira analisado por CLAE-DAD	170
<b>Figura 75</b> - Extrato <b>EL04</b> de mel de laranjeira analisado por CLAE-DAD	170
<b>Figura 76</b> - Extrato <b>EL05</b> de mel de laranjeira analisado por CLAE-DAD	170
<b>Figura 77</b> - Extrato <b>EL06</b> de mel de laranjeira analisado por CLAE-DAD	170
<b>Figura 78</b> - Extrato <b>EL07</b> de mel de laranjeira analisado por CLAE-DAD	171
<b>Figura 79</b> - Extrato <b>EL08</b> de mel de laranjeira analisado por CLAE-DAD	171
<b>Figura 80</b> - Extrato <b>EL09</b> de mel de laranjeira analisado por CLAE-DAD	171
<b>Figura 81</b> - Extrato <b>ES01</b> de mel silvestre analisado por CLAE-DAD	171
<b>Figura 82</b> - Extrato <b>ES02</b> de mel silvestre analisado por CLAE-DAD	172
<b>Figura 83</b> - Extrato <b>ES03</b> de mel silvestre analisado por CLAE-DAD	172
<b>Figura 84</b> - Extrato <b>ES04</b> de mel silvestre analisado por CLAE-DAD	172
<b>Figura 85</b> - Extrato <b>ES05</b> de mel silvestre analisado por CLAE-DAD	172
<b>Figura 86</b> - Extrato <b>ES06</b> de mel silvestre analisado por CLAE-DAD	173
<b>Figura 87</b> – Mistura1: Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD e seus espectros de UV: ácido <i>p</i> -cumárico, galangina, ácido protocatecuico , ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico, ácido <i>p</i> -Metoxi Benzoíco.	173
<b>Figura 88</b> - Mistura 2: cromatogramas dos padrões por CLAE-DAD e seus espectros de UV: ácido vanílico, hesperidina, naringenina e ácido cinâmico.	174
<b>Figura 89</b> – Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD e seus espectros de UV: 1- ácido gálico e 2 -HMF	175
<b>Figura 90</b> - Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD e seus espectros de UV: 3- <i>c,t</i> ABA, 4 – Canferol e 5- Luteolina.	176

**ABREVIATURAS E SIGLAS**

%AA	percentual de atividade antioxidante
ABA	ácido abscísico
CE <sub>50</sub>	concentração efetiva para redução de 50% dos radicais
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-ESI/MS	cromatografia líquida de alta eficiência por ionização com eletrón spray acoplada a espectrometria de massas
FRAP	poder antioxidante de redução do ferro
HCA	análise hierárquica de agrupamentos
HMF	5-hidroximetilfurfural
meq/kg	mili-equivalentes por quilograma
mgEAG	miligramas em equivalente de ácido gálico
mgEQ	miligramas em equivalente de quercetina
nm	nanômetros
PCA	análise de componentes principais
PCs	componentes principais
pág.	página
RMN de <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
t <sub>R</sub>	tempo de retenção
UV	ultravioleta
UV-Vis	ultravioleta ao visível
μM	micromolar
μm	micrômetros

## RESUMO

**LIRA, Aline Figueira.** MÉIS DO SUDESTE BRASILEIRO: AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E CLASSIFICAÇÃO ATRAVÉS DE CLAE, RMN E ANÁLISE MULTIVARIADA. Seropédica, UFRRJ, 2014. 176 p. Tese de doutorado em Química, Química de Produtos Naturais.

O mel tem sido apreciado como um alimento e medicamento valiosos desde os tempos antigos. As suas propriedades medicinais e nutritivas têm sido objeto de interesse crescente e de muitos estudos científicos nas últimas décadas. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização química de quarenta e cinco amostras de méis brasileiro de *Apis mellifera*, considerando os parâmetros físico-químicos, as substâncias bioativas e atividade antioxidante. Além disso, a cromatografia líquida de alta eficiência e a ressonância magnética nuclear de hidrogênio associados à quimiometria foram utilizados como métodos analíticos alternativos para classificação dos méis. Nesse trabalho foram estudados doze amostras de mel de eucalipto, nove de morrão de candeia, nove de assa-peixe, nove de laranjeira e seis de silvestres do sudeste do Brasil. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram: teor de HMF e a cor utilizando método espectrofotométrico, acidez livre e pH. A capacidade antioxidante dos méis e de seus extratos foi avaliada através do conteúdo de fenólicos total pelo método de Folin-Denis, e de flavonoides total pelo método de complexação com cloreto de alumínio. A atividade antioxidante dos extratos foi realizada pela captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), captura do radical livre ABTS+, além do método de redução do íon férrico (FRAP), enquanto a atividade antiradicalar do mel foi realizado apenas pelo método com DPPH. Os méis foram classificados inicialmente através da melissopalínologia. O perfil químico dos extratos em acetato de etila foi analisado por RMN de  $^1\text{H}$ , e a identificação e quantificação das substâncias polifenólicas desses extratos foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Através da análise por CLAE-DAD foi possível confirmar o flavonoide hesperidina como biomarcador do mel de laranjeira, e os ácidos vanílico e protocatecuico como os marcadores químicos do mel de eucalipto. O uso das técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  e CLAE-DAD associados as análises multivariadas (PCA e HCA) possibilitou distinguir os méis de eucalipto, morrão de candeia, assa-peixe, laranjeira, e silvestre produzidos pela abelha *Apis mellifera*. Assim, essas técnicas combinadas com a quimiometria podem servir como uma ferramenta alternativa para auxiliar na classificação da origem floral, visto que, a melissopalínologia apresenta limitações para análise de polens como aqueles de *Croton*, *Citrus* e *Vernonia* que são sub-representados no espectro polínico do mel.

Palavras chaves: Mel, melissopalínologia, ABA, biomarcadores, Quimiometria.

## ABSTRACT

**LIRA, Aline Figueira.** SOUTHEASTERN BRAZILIAN HONEYS: EVALUATION OF PHYSICO-CHEMICAL PARAMETERS AND CLASSIFICATION THROUGH HPLC, NMR AND MULTIVARIATE ANALYSIS. Seropédica, UFRRJ, 2014. 176 Ph.D. Thesis in Chemistry, Natural Product Chemistry.

Honey has been enjoyed as a valuable nourishment and medicine for along time. Its medicinal properties have been a source of interest and of many scientific investigations in the last decades. Thus, the aim of this work was to carry out the chemical characterization of 45 samples of brazilian honeys from *Apis mellifera*, focusing on physico-chemical parameters, possible bioactive substances present and antioxidant activity. Furthermore, high performance liquid chromatography and  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance associated with chemometrics were employed as alternative analytical methods for the classification of these honey samples. This work evaluated 12 samples of eucalyptus honeys, nine of morrão de candeia, nine of assa-peixe, nine of orange and 6 wild honeys from southeastern Brazil. The physico-chemical parameters analyzed were: color, HMF content, free acidity and pH. The antioxidant capacity of the honeys and their extracts was evaluated through the total phenolic content by the Folin-Denis method, and total flavonoid content was carried out by complexation with aluminium chloride. Antioxidant activity of extracts was determined by trapping of the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl radical (DPPH), and also by trapping of the ABTS.+ free radical and ferric ion reduction (FRAP). The anti radical activity of the honeys was evaluated only by the DPPH method. The honeys were initially classified by melissopalinalogy. The chemical profile of the ethyl acetate extracts was determined with  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and the identification and quantitation of polyphenolic substances was by carried out using high performance liquid chromatography with diode array detection (DAD-HPLC). This analysis allowed the confirmation of the flavonoid hesperidine as a biomarker for orange honeys and also vanillic and protocatechuic acids as markers for eucalyptus honeys. The use of HPLC and NMR associated with multivariate analysis (PCA and HCA) allowed the distinction between eucalyptus, morrão de candeia, assa-peixe, orange and wild honeys produced by *Apis mellifera* bees. Therefore, these techniques associated with chemometrics may be useful as an alternative tool for the classification of floral origin, since melissopalinalogy is not well suited for *Croton*, *Citrus* and *Vernonia* pollens, which become in this case, under represented.

Key words: honey, melissopalinalogy, ABA, biomarkers , chemometrics.

## 1 – INTRODUÇÃO

O mel tem sido apreciado como um alimento e medicamento valiosos desde os tempos antigos. As suas propriedades medicinais e nutritivas têm sido objeto de interesse crescente e de muitos estudos científicos nas últimas décadas (NATIONAL HONEY BOARD, 2002). É um alimento rico em carboidratos e por isso tem alto potencial energético, além das conhecidas propriedades terapêuticas, destacando-se sua ação antimicrobiana e antioxidante (MONTENEGRO *et al.*, 2013;.CHUA *et al.*, 2013). A composição e qualidade do mel variam em função da florada a partir do qual foi elaborado, bem como dependem das condições do clima, do solo da região e/ou do apiário.

O uso terapêutico do mel foi descrito há mais de 8000 anos atrás, sendo representado por pinturas da idade da pedra (BANSAL *et al.*, 2005). Os antigos egípcios, assírios, chineses, gregos e romanos utilizavam o mel para curar feridas e doenças do intestino (AL-JABRI *et al.*, 2005). O mel foi considerado pelos egípcios o medicamento mais popular sendo mencionado 500 vezes em 900 remédios (AL-JABRI *et al.*, 2005).

Das 16.000 a 20.000 espécies de abelha existentes no mundo, apenas cerca de 2% são produtoras de mel, como por exemplo, *Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis floria* e *Apis mellifera*, sendo a última mais conhecida como abelha produtora de mel (READICKER-HENDERSON & MCCARTY, 2009).

Embora os principais componentes do mel sejam os açúcares e a água, são os componentes químicos minoritários que na verdade determinam o seu valor ou tipo, estando à presença de tais substâncias fortemente relacionada à origem floral/botânica ou da planta nectarífera visita pela abelha (Yao *et al.*, 2004 a e b). Algumas destas substâncias tais como, os ácidos fenólicos e flavonoides, têm sido sugeridas como biomarcadores na caracterização de um mel específico (TOMAS-BARBERAN *et al.*, 2001; YAO *et al.*, 2003; KAŠKONIENE' & VENSKUTONIS, 2010; JERKOVIC' *et al.*, 2014).

Em geral, os méis monoflorais são mais valorizados do que os multiflorais, por possuírem fontes botânicas definidas, gosto e aromas destacados (ANDRADE *et al.*, 1999), e muitas vezes apresentam preços superiores aos méis de fontes botânicas misturadas (silvestres). No mercado, a qualidade do mel e, conseqüentemente, os preços são determinados por sua origem botânica, portanto, o aumento do preço de alguns tipos de mel estimula a adulteração de certas origens botânicas.

Muitos parâmetros, incluindo pH, cor, teor de HMF, conteúdo de açúcares, e análise melissopalínológica tem sido propostos na literatura para classificar e qualificar os

méis (CONSONNI *et al.*, 2013; KAHRAMAN *et al.*, 2010; SAXENA *et al.*, 2010; TERRAB *et al.*, 2004).

Recentemente, métodos de controle de qualidade associados às análises multivariadas têm sido aplicados para classificar os méis quanto a sua origem botânica ou geográfica, bem como para detectar adulteração (CORDELLA *et al.*, 2012), além do uso dos parâmetros físico-químicos (SERRANO *et al.*, 2004; LAZAREVIC *et al.*, 2012) e da análise do perfil fitoquímico por diferentes técnicas cromatográficas e espectroscópicas (PUSCAS *et al.*, 2013; SERGIEL *et al.*, 2014a).

O objetivo geral deste trabalho foi realizar a caracterização química de quarenta e cinco méis produzidos por abelhas melíferas do sudeste brasileiro, considerando os parâmetros físico-químicos, a identificação das substâncias bioativas e atividade antioxidante, além de utilizar as técnicas de cromatografia líquida e de ressonância magnética nuclear associadas à quimiometria como métodos alternativos para auxiliarem na tipificação do mel brasileiro.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. O Mel: Definição, Composição e Classificação**

Em 2000, a Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro, aprovou o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. A Instrução estabelece a definição, a classificação, a designação, a composição, e os requisitos quanto às características físico-químicas, sensoriais, condições de acondicionamento, aditivos, contaminantes, condições higiênicas, critérios macroscópicos e microscópicos, pesos e medidas, rotulagem, amostragem e definição dos métodos de análises que deverão ser seguidos para o controle e fiscalização do mel (BRASIL, 2000).

De acordo com a essa legislação, entende-se por mel, o produto alimentício produzido por abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou de secreções de árvores e plantas para a produção de mel de néctar ou mel de melato (“honeydew”), respectivamente (BRASIL, 2000).

A composição do mel é bastante variável, dependendo principalmente da origem floral. No entanto, outros fatores externos tais como solo e clima, o tipo de processamento e de manuseio pode ser também determinante.

O mel é considerado um produto natural produzido e processado pelas abelhas melíferas, contendo, majoritariamente açúcares, além de enzimas, minerais, vitaminas



essenciais à saúde e antioxidantes como flavonoides e ácidos fenólicos. Na composição do mel de *Apis*, os monossacarídeos (glicose e frutose) correspondem cerca de 70%, os dissacarídeos, incluindo sacarose, estão em torno de 10%, e a água é o segundo componente em quantidade, variando de 15 a 21%, dependendo do clima, origem floral, estágio de maturação (MARCHINI *et al* 2004; MENDES *et al.*, 2009) e teor de umidade da planta (KAHRAMAN *et al.*, 2010; NUNES *et al.*, 2013).

Além dos açúcares, o mel contém minoritariamente (cerca de 3%) de outras substâncias, incluindo os aminoácidos, as vitaminas, os minerais, as enzimas, ácidos orgânicos, ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides, responsáveis pelo seu sabor, aroma e por suas propriedades biológicas (CRANE, 1996; WHITE, 1979; MOUNDOI *et al.*, 2001; EZZ EL-ARAB *et al.*, 2006).

Os ácidos orgânicos constituem 0,57 % do mel e incluem ácido glucônico, que é um subproduto de digestão enzimática da glicose. Estes são responsáveis pela acidez do mel e contribuem em grande parte para seu sabor característico (OLAITAN *et al.*, 2007).

A concentração dos minerais no mel varia de 0,1 % a 1,0 %, sendo o potássio o principal elemento, seguido por cálcio, magnésio, sódio, enxofre e fósforo. Além desses minerais essenciais, apresenta também os oligoelementos representados pelo ferro, cobre, zinco e manganês (SAMPATH KUMAR *et al.*, 2010; RASHED *et al.*, 2004; LACHMAN *et al.*, 2007).

As principais vitaminas encontradas no mel são vitaminas C, B<sub>1</sub> e do complexo B<sub>2</sub>, como riboflavina, ácido nicotínico, B<sub>6</sub> e ácido pantoténico (OLAITAN *et al.*, 2007).

Uma pequena parte das proteínas do mel são enzimas, nas quais se incluem a invertase, diastase, glicose oxidase, catalase,  $\alpha$ -glicosidase,  $\beta$ -glicosidase e amilase que têm um papel importante na formação de mel (OLAITAN *et al.*, 2007). No entanto, as principais enzimas no mel são invertase (sacarase), diastase (amilase) e glicose oxidase.

A enzima glicose oxidase produz peróxido de hidrogénio (com propriedades antimicrobianas) que junto com o ácido glucônico, ajudam na absorção do cálcio. A enzima invertase converte sacarose em frutose e glicose. Dextrina e maltose são produzidas a partir de longas cadeias de amido pela atividade da enzima amilase. Catalase ajuda na produção de oxigênio e água a partir de peróxido de hidrogénio (BANSAL *et al.*, 2005).

Além das proteínas, o mel contém ainda aminoácidos livres (aa). Estes estão presentes em pequena quantidade, cerca de 1%, mas em grande diversidade, existindo cerca de vinte e seis aminoácidos. A prolina é predominante, correspondendo entre 50 a

85% do total de aa presentes nesta matriz, e é muito importante para verificar a autenticidade do mel (ALVAREZ-SUAREZ *et al*, 2010b)

Segundo Campos (1987) a composição básica do mel, em termos gerais, pode ser resumida em três componentes principais: açúcares, água e substâncias diversas. Do ponto de vista químico é um dos produtos biológicos mais complexos e ainda pouco conhecido. A **Tabela 1** apresenta a composição básica do mel (ETERAF-OSKOU EI & NAJAFI, 2013).

**Tabela 1:** Composição básica do mel (ETERAF-OSKOU EI & NAJAFI, 2013)

<b>Mel (Valor nutricional para 100 g)</b>	
<b>Componentes</b>	<b>Média</b>
Carboidratos	82,4g
Frutose	38,5g
Glicose	31g
Sacarose	1g
Outros açúcares	11,7g
Fibra dietética	0,2g
Gordura	0g
Proteína	0,3g
Água	17,1g
Riboflavina (Vit. B2)	0,038mg
Niacina (Vit. B3)	0,121mg
Ácido pantotênico (Vit. B5)	0,068mg
Piridoxina (Vit. B6)	0,024mg
Folato (Vit. B9)	0,002mg
Vitamina C	0,5mg
Cálcio	6mg
Ferro	0,42mg
Magnésio	2mg
Fósforo	4mg
Potássio	52mg
Sódio	4mg
Zinco	0,22mg

Embora a composição básica do mel, geralmente, seja a mesma e independente da origem, seu aroma, sabor, coloração, viscosidade e propriedades medicinais apresentam variação regional devido à fonte de néctar que o originou, a espécie de abelha que o produziu e as diferentes condições climáticas (CRANE, 1990).

A flora melífera no Brasil é muito rica e diversa, e por isso dá origem a méis de diferentes sabores, aromas, cristalizações e colorações. Na **Tabela 2 estão** apresentadas algumas floras brasileiras e as principais características dos méis originários da fonte florística.

**Tabela 2:** Exemplos de flora brasileira e as características dos seus méis (KISS, 2008)

Flora	Local	Descrição do mel
Angico	Semi-árido e serrado	muito claro
Assa Peixe	Sudeste e Serrado	branco e de difícil cristalização
Bracatinga	Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul	escuro e de rápida cristalização
Caju	Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte	dourado
Capixingui	São Paulo, Minas Gerais, Paraná e Rio de Janeiro	dourado-claro e de rápida cristalização
Cipó-Uva	Sul do Ceará e Serrado	branco-claro
Eucalipto	São Paulo, Paraná e Bahia	dourado-claro
Marmeleiro	Semi-árido nordestino	branco e de difícil cristalização
Vassourinha	Sudeste	claro e de difícil cristalização

Quanto às características sensoriais, o mel pode conter cor variável (incolores a pardo-escuro); deve ter sabor e aroma característicos e, de acordo com o seu estado físico, sua consistência pode variar de fluída, viscosa ou cristalizada (BERTOLDI *et al.*, 2004). Estas características dependem do clima, da fonte floral, condições de armazenagem e de práticas de apicultura individuais (RACOWSKI *et al.*, 2007; ETERAF-OSKOU EI, T; & NAJAFI, 2013).

O mel pode ser classificado de acordo com sua origem (mel floral ou mel de melato), pelo procedimento de obtenção do favo e/ou pela sua apresentação.

O mel floral é aquele obtido dos néctares das flores, e pode ser classificado em mel unifloral ou multifloral. Já o mel de melato é obtido a partir da excreção de alguns insetos sugadores ou do exsudato de plantas (BRASIL, 2000).

O mel de origem floral pode ser subdividido em dois tipos: unifloral ou multifloral. O mel unifloral ou monofloral é originado do néctar produzido por flores de uma mesma família, gênero ou espécie e possui características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias. De forma geral, considera-se que se pelo menos 45% do pólen for de uma determinada origem então o mel é monofloral. Mel polifloral ou multifloral, também chamado de silvestre, é aquele proveniente do néctar de várias espécies de plantas. As propriedades desses méis são muito variáveis e estão diretamente relacionados com a espécie da abelha, com as origens botânicas e as condições climáticas (SAWYER, 1975).

De acordo com o procedimento de obtenção do favo, o mel pode ser classificado em: mel escorrido, obtido por escorrimento dos favos desoperculados; mel prensado, quando os favos são espremidos de modo artesanal, e por último, mel centrifugado, obtido pela centrifugação dos favos para uma produção em grande escala, sem a presença de larvas (CRANE, 1996).

Pode ser ainda classificado pela sua apresentação e/ou processamento, em mel, mel em favos, mel com pedaços de favos, mel cristalizado ou granulado, mel cremoso e mel filtrado.

Atualmente as análises físico-químicas do mel contribuem para a sua fiscalização e para o controle da qualidade do mel produzido. Em geral, os resultados são comparados com padrões definidos por órgãos oficiais internacionais, ou com aqueles estabelecidos pelo próprio país, protegendo o consumidor de adquirir um produto adulterado (MARCHINI, 2004).

## **2.2. Características físico-químicas do mel**

No Brasil, os requisitos de qualidade físico-químicas do mel foram estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), na Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, a qual constitui o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Esse órgão é quem estabelece os critérios mínimos de qualidade para que o mel possa ser comercializado, e também, possa proteger os consumidores de eventuais fraudes. Essa legislação define normas de padronização através das análises físico-químicas, indicando os métodos e os limites a serem empregados quanto à maturidade (açúcares redutores, umidade e sacarose aparente), pureza (sólidos insolúveis em água, minerais ou cinzas e pólen), e deterioração (acidez livre, atividade diastásica e HMF) (BRASIL, 2000).

Segundo a legislação vigente não é permitido qualquer tipo de adição de produtos estranhos ao mel, que possam alterar sua composição, excetuando-se a incorporação natural de grãos de pólen e cera provenientes do processo de colheita e extração. Para que um produto seja aceito no mercado nacional e internacional deve obedecer às normas e regulamentos estabelecidos pela legislação.

O estudo comparativo de parâmetros físico-químicos de diferentes tipos de mel tem sido amplamente apresentado na literatura por diversos autores como uma forma de classificar e qualificar esses produtos (AAZZA *et al.*, 2013; . KAMBOJ *et al.* , 2013.; MONIRUZZAMAN *et al.*, 2013 ; LAZAREVIC *et al.*, 2012). Esses trabalhos utilizam diversos parâmetros que podem ser comparados com padrões definidos por órgãos nacionais ou internacionais, normatizando a qualidade do mel produzido internamente e fornecendo subsídios para a sua fiscalização e minimizando os casos de adulteração.

As propriedades físico-químicas, tais como: pH, acidez livre, teor de açúcar, umidade, teor de cinzas, atividade diastásica, HMF e cor têm sido sugeridos como critérios para a caracterização de méis monofloral (THRASYVOULOU& MANIKIS 1995; BOUSETA *et al.* , 1996; MEDA *et al.*, 2005 ; BERTONCELJ *et al.* 2011), sendo usado no controle de qualidade e na sua fiscalização.

Atualmente, o pH não é uma análise obrigatória no controle de qualidade dos méis brasileiros, porem mostra-se útil como parâmetro auxiliar para avaliação da qualidade (SILVA *et al.*, 2004). O valor de pH do mel pode ser influenciado pela acidez do néctar, solo ou associação de vegetais para sua composição (CRANE, 1985). Este também pode ser alterado através de substâncias mandibulares da abelha acrescidas ao néctar quando do transporte até a colméia (EVANGELISTA-RODRIGUES *et al.*, 2005).

Em geral, o mel é naturalmente ácido e a sua acidez é devido à presença de ácidos orgânicos, causada pelas diferentes fontes de néctar, pela ação da enzima glicose oxidase que converte a glicose em ácido glucônico (NOGUEIRA–NETO, 1997), pela ação das bactérias durante a maturação do mel e ainda pela quantidade de minerais presentes no mel (EVANGELISTA-RODRIGUES *et al.*, 2005).

Os ácidos orgânicos do mel representam menos que 0,5% dos sólidos, podendo ser responsáveis, em parte, pela excelente estabilidade do mel frente aos microorganismos (PEREIRA, *et al.*, 2003). A acidez livre é considerada um parâmetro indicativo de deteriorização do mel, e o conteúdo preconizado pela legislação é de 50 mEq/Kg de mel (BRASIL, 2000).

A medida do teor de HMF (hidroximetilfurfural) é usada para avaliar a qualidade de mel uma vez que pode indicar a sua deterioração por aquecimento, processamento inadequado ou mesmo adulteração. O aquecimento do mel durante o processamento, o armazenamento por longo tempo de estocagem e variação no pH podem conduzir à formação de HMF através da desidratação de hexoses em meio ácido, ou via reação de Maillard (KÜÇÜK *et al.*, 2007; SAXENA *et al.*, 2010), e com isso levar a redução da sua qualidade. Segundo a legislação brasileira o teor de HMF não deve ultrapassar o valor de 60 mg/kg (BRASIL, 2000).

O Codex Alimentarius (2001) e a Comissão Internacional de mel (em setembro de 2002) definiram o valor máximo de HMF de 40 mg/kg de mel para regiões não-tropicais e 80 mg/kg para méis de regiões tropicais. Valores superiores demonstram adulteração com xarope de açúcar (Codex Alimentarius, 2001).

O conteúdo de HMF é praticamente inexistente ou muito baixa em mel fresco, porém é aumentado quando os méis sofrem aquecimento ou quando são armazenados em condições inadequadas ou adulterados com xarope de açúcar (NOZAL *et al.*, 2001). Propriedades químicas do mel tais como: pH, teor mineral e o teor de acidez, bem como a presença de ácidos orgânicos e água afetam a formação de HMF (KALABOVA *et al.*, 2003).

Os açúcares encontrados no mel são principalmente a glicose, sacarose, frutose, e maltose, influenciando diretamente na viscosidade, higroscopicidade, granulação e valor energético (ARAÚJO *et al.*, 2006; NUNES *et al.*, 2013). A glicose por ter pouca solubilidade, determina a tendência de cristalização e a frutose por ter elevada higroscopicidade, determina a sua doçura. A proporção média de frutose no mel é de 39%, enquanto de glicose é 32% sendo que um mel com altas taxas de frutose pode permanecer líquido por um longo período ou nunca cristalizar (OSACHLO, 2004; NUNES *et al.*, 2013).

Segundo a legislação brasileira a quantidade de açúcares redutores para mel floral é de no mínimo 65g/100g de mel, enquanto para o mel de melato o mínimo é de 60g/100g de mel (BRASIL, 2000). O conteúdo de sacarose é importante para sabermos se as abelhas foram alimentadas com açúcar no início da florada ou se houve adulteração do mel pela adição direta de sacarose (GARCIA-CRUZ *et al.*, 1999; NUNES *et al.*, 2013). Além disso, o teor elevado de sacarose no mel, que normalmente não ultrapassa 6%, significa na maioria das vezes, uma colheita prematura do mel, isto é, um produto em que a sacarose

ainda não foi totalmente transformada em glicose e frutose pela ação da enzima invertase (AZEREDO *et al.*, 1999; MENDES *et al.*, 2009).

A água é o segundo componente presente em maior quantidade no mel, geralmente variando de 15 a 21%. O teor de umidade não deve ultrapassar 20g/100g de mel (BRASIL, 2000), sendo uma característica influenciada pela origem floral, geográfica e condições climáticas. O mel é um alimento muito higroscópico, podendo facilmente absorver água, conforme as condições de armazenamento, manejo e a região.

O teor de umidade pode influenciar na maturidade, sabor, conservação, viscosidade, peso específico, cristalização e palatabilidade do mel. Além de contribuir para instabilidade quanto à fermentação, uma vez que o alto teor de umidade e altas temperaturas de estocagem aceleram o desenvolvimento de leveduras neste substrato, diminuindo a vida de prateleira do mel (ABRAMOVIC *et al.*, 2008; NUNES *et al.*, 2013).

Para satisfazer a condição de pureza, os méis precisam atender às especificações para os teores de sólidos insolúveis em água e minerais (cinzas).

A determinação do teor de sólidos insolúveis do mel representa a presença de substâncias insolúveis em água, como a cera e grãos de pólen, patas e asas de abelhas, além de outros elementos inerentes do mel ou do seu processamento, sendo assim uma importante medida de controle higiênico sanitário (SILVA *et al.*, 2006). O máximo permitido para a presença de sólidos insolúveis é de 0,1g/100g de mel, exceto para o mel prensado onde se tolera até 0,5 g/100g, unicamente para produtos acondicionados para venda direta ao público (BRASIL, 2000).

A porcentagem de cinzas expressa os minerais presentes no mel, esses elementos aparecem em baixa quantidade, mas influenciam na coloração e estão em maior concentração nos méis escuros. A sua proporção pode ser alterada em função de diversos fatores como a origem floral, região, espécie de abelhas e tipo de manejo (NUNES *et al.*, 2013).

O método de determinação de cinza é utilizado como uma alternativa na identificação de algumas irregularidades, como, por exemplo, a contaminação provocada pela falta de decantação ou filtração no final do processo de retirada do mel pelo apicultor (EVANGELISTA–RODRIGUES, 2005). Além disso, o máximo de cinzas permitido é de 0,6g/100g de mel, porém no mel de melato e suas misturas com mel floral tolera-se até 1,2g/100g de mel (BRASIL, 2000).

A cor do mel está relacionada com sua origem floral, mas também pode ser influenciada pelo tempo de estocagem, a luz, o calor e as possíveis reações enzimáticas (SMITH, 1967; SEEMANN & NEIRA, 1988)

No geral, a coloração do mel pode variar nas tonalidades de branco água, extra branco, branco âmbar, âmbar claro, âmbar e âmbar escuro, sendo o mel de cor clara o mais aceito mundialmente e com melhor preço (CRANE, 1983).

Os fatores que determinam a velocidade de escurecimento do mel estão relacionados à proporção de frutose, glicose, conteúdo de nitrogênio e aminoácidos livres, alto conteúdo de minerais, a reação de substâncias polifenólicas com metais, e a instabilidade da frutose em solução ácida (SMITH, 1967).

Uma variedade de enzimas tem importante papel na formação do mel. A diástase é uma das enzimas presente no mel, que degrada as moléculas de amido, sendo muito sensível ao calor, sendo importante para detectar o possível aquecimento que o mel possa ter sofrido ou o seu armazenamento indevido (WHITE JUNIOR, 1992; WHITE JÚNIOR, 1994). A atividade diastásica diminui devido à desnaturação parcial ou total das amilases (AROCHA *et al.*, 2008) que são instáveis às elevações de temperatura. Entretanto, deve-se considerar que a amilase deteriora-se à temperatura ambiente, quando o armazenamento for prolongado e, portanto, funciona como um indicativo da idade (período de validade) do mel. A legislação permite atividade diastásica como mínimo oito na escala Göthe. Porém, é permitido o conteúdo de atividade diastásica de no mínimo três na escala Göthe sempre que o conteúdo de HMF não exceder a 15mg/Kg para os méis com baixo conteúdo enzimático (BRASIL, 2000).

Nas legislações nacionais e internacionais vigentes, não há exigência da realização de análises microbiológicas para fiscalização e para o controle de qualidade do mel. São estabelecidas, apenas, práticas de higiene na manipulação do produto. No entanto, tem se observado a necessidade de estabelecer análises microbiológicas obrigatórias para o mel, no sentido de se garantir a qualidade do produto e assegurar a saúde do consumidor.

### **2.3. Propriedades Biológicas do Mel**

A crença de que o mel possui efeitos curativos e cicatrizantes é descrito desde os tempos antigos e persiste nos dias atuais, quando é utilizado nos tratamentos e cicatrização de feridas infectadas por microrganismos. Essa aplicação terapêutica do mel está baseada, principalmente, na sua atividade antimicrobiana, atribuída ao seu efeito osmótico por se



tratar de um alimento com alta concentração de açúcares (MOLAN, 1992 a e b; SHEIKH *et al.*, 1995).

De acordo com a literatura, o mel tem diversas propriedades, tais como: antimicrobiana (SHERLOCK *et al.*, 2010), anti-inflamatória (OTHMAN *et al.*, 2012), antioxidante (KÚS *et al.*, 2014, CHUA *et al.*, 2013), cicatrizante (SUKUR *et al.*, 2011), antitumoral (WANG *et al.*, 2002; OTHMAN *et al.*, 2012), antidiabética (EREJUWA *et al.*, 2010a; EREJUWA *et al.*, 2010b), antiviral contra o vírus da rubéola (ZEINA *et al.*, 1996) e o vírus da herpes (AL-WAILI, 2004).

A atividade antimicrobiana do mel deve-se à sua elevada osmolaridade, acidez, teor de peróxido de hidrogénio e presença de substâncias voláteis, ácidos orgânicos (MOLAN & RUSSELL, 1988) e substâncias fenólicas (DUSTMANN, 1971; DUSTMANN, 1979), bem como depende da origem botânica do mel (MOLAN, 1992a; MOLAN, 1992b; BOGDANOV, 1997; MOLAN, 1997). A alta concentração de açúcar de mel (MUNDO *et al.*, 2004) e baixos valores de pH (YATSUNAMI & ECHIGO, 1984) são também responsáveis por sua atividade antibacteriana.

O principal agente antibacteriano no mel é o peróxido de hidrogénio, produzido pela glicose oxidase, proveniente das glândulas hipofaríngeas das abelhas, e degradado pela catalase, com origem no pólen. O peróxido de hidrogénio é um agente antimicrobiano bastante importante pelas suas propriedades bactericidas e desinfectantes (AL-MAMARY *et al.*, 2002).

A maioria dos experimentos relatam diminuição do crescimento bacteriano depois de um certo tempo de ação de mel. A inibição completa do crescimento é importante para o controle de infecções (MOLAN, 1992b). O mel tem sido utilizado com eficiência no tratamento de feridas, por não ser irritante e nem tóxico, ter ação bactericida e nutritiva, além de ser de fácil aplicação e mais confortável do que outros curativos (BULMAN, 1953). Por isso foi utilizado em feridas de pacientes diabéticos (TOVEY, 1991).

O mel tem também atividade fungicida contra diferentes dermatófitos (MOLAN, 1997). Além disso, o mel tem mostrado ter um efeito prebiótico, e sua ingestão estimula o crescimento saudável de bactérias específicas como a *Bifidus* e *Lactobacillus* (SHIN e USTUNOL, 2005). Os oligossacarídeos presentes no mel de melato têm atividade prebiótica (SANZ *et al.*, 2005b). Teoricamente méis de melato, contendo mais oligossacarídeos deverão ter uma atividade prebiótica mais forte do que os méis florais (BOGDANOV, 2011).

Em trabalho relatado por Kandil e colaboradores (1987) pacientes com úlceras gástricas foram tratados com sucesso pela utilização de mel. O mel administrado por via subcutânea ou por via oral proporcionou proteção contra lesões gástricas (ESCOBAR & XAVIER, 2013).

As substâncias fenólicas presentes no mel têm sido relatadas apresentarem atividades em diferentes tipos de células leucêmicas (ABUBAKAR *et al.*, 2012). A atividade anticancerígena do mel foi comprovada contra vários tipos de câncer, como, por exemplo: mama (TOMASIN *et al.*, 2011; FUKUDA *et al.*, 2011; FAUZI *et al.*, 2011), colorretal (JAGANATHAN *et al.*, 2009), renal (SAMARGHANDIAN *et al.*, 2011), próstata (TSIAPARA *et al.*, 2009), endométrio (TSIAPARA *et al.*, 2009), colo do útero (FAUZI *et al.*, 2011) e oral (GHASHM *et al.*, 2010).

Além das propriedades biológicas citadas, a utilização do mel em cosméticos tem sido relacionada à sua propriedade antioxidante, devido à presença de flavonoides, polifenóis, vitaminas e ácidos carboxílicos (BOGDANOV, 2012).

As substâncias bioativas encontradas no mel com propriedades antioxidantes podem ser do tipo enzimático, como catalase, glicose oxidase e peroxidase, e não-enzimático, como flavonoides, ácidos fenólicos, ácido ascórbico, tocoferol, ácidos orgânicos, aminoácidos, carotenoides e produtos de Maillard (AL-MAMARY *et al.*, 2002; GHELDOLF *et al.*, 2002; TURKMEN *et al.*, 2005). Considerando que o mel possui substâncias antioxidantes com características lipofílicas e hidrofílicas, pode-se dizer que a interação sinérgica entre estas substâncias faz do mel um antioxidante natural ideal que pode agir em diferentes sítios celulares (ALJADI & KAMARUDDIN, 2004).

O mel apresenta na sua composição substâncias que lhe podem conferir propriedades antirradicais, tais como os polifenóis e os flavonoides. Diversos estudos têm comprovado a ação terapêutica do mel, existindo atualmente interesse em avaliar a sua capacidade antioxidante.

#### **2.4. Capacidade antioxidante do mel**

A capacidade antioxidante do mel é outra importante característica deste alimento que tem adquirido grande destaque, por ser essencial na inibição dos radicais livres que resultam do metabolismo celular.

Segundo SIES & STAHL (1995): “*Antioxidante é qualquer substância que, quando presente, em baixas concentrações, comparada à do substrato oxidável, atrasa significativamente ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz*” (SIES & STAHL, 1995).

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes ou antiradicalares, principalmente os naturais, devido às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais quando produzidos de forma desordenada e excessiva promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana, levando a patologias, tais como doenças do coração, catarata, artrite, choque hemorrágico, disfunções cognitivas e câncer (SIES, 1997). O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta.

A capacidade antioxidante é a capacidade de uma determinada substância em reduzir ou inibir as degradações oxidativas (por exemplo, peroxidação lipídica) dentro dos sistemas alimentares e na saúde humana. Notavelmente, estas reações oxidativas podem causar efeitos prejudiciais nos produtos alimentares (por exemplo, a oxidação lipídica na carne e o escurecimento enzimático em frutas e vegetal) e efeitos adversos à saúde, tais como doenças crônicas e degenerativas, bem como o seu envolvimento no processo de envelhecimento (GHELDOLF & ENGESETH, 2002; GHELDOLF *et al.*, 2003).

Os agentes antioxidantes podem ser classificados como antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, NADPH-quinona oxidoreductase, glutathione peroxidase e enzimas de reparo) ou não-enzimáticos ( $\alpha$ -tocoferol - vitamina E, curcumina,  $\beta$ -caroteno, ácido ascórbico-vitamina C, flavonoides, selênio, clorofila, glutathione, proteínas do plasma e L-cisteína). Dentre os aspectos preventivos dessas substâncias, é interessante ressaltar a correlação existente entre capacidade antioxidante de substâncias polares e capacidade de inibir ou retardar o aparecimento de células cancerígenas, além de retardar o envelhecimento das células do organismo (SIES, 1993; BARREIROS *et al.*, 2006).

Alguns diferentes alimentos como frutas, verduras e legumes (**Tabela 3**) contêm agentes antioxidantes, tais como as vitaminas C, E e A, clorofila, flavonoides, carotenoides e outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos radicais livres (STAVRIC, 1994; FOTSIS *et al.*, 1997; POOL-ZOBEL *et al.*, 1997).

**Tabela 3-** Algumas fontes de antioxidantes na dieta (adaptado de BIANCHI & ANTUNES, 1999)

Alimentos	Antioxidantes	Alimentos	Antioxidantes
Mamão	$\beta$ -caroteno	uva	ácido elágico
Brócolis	flavonoides	salsa	flavonoides
Laranja	vitamina C	morango	vitamina C
Chá	catequinas	curry	curcumina
Vinho	quercetina	noz	polifenóis
Cenoura	$\beta$ -caroteno	espinafre	clorofila
Tomate	carotenoides	repolho	taninos

O mel tem na sua composição várias substâncias que lhe confere propriedades antioxidantes, tais como os ácidos fenólicos e os flavonóides.

Atualmente vários estudos têm destacado o mel como um antioxidante natural (KÚS *et al.*, 2014; ESCUREDO *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2013). A sua capacidade antioxidante está relacionada com a ação de determinadas substâncias, tais como flavonoides (apigenina, pinocembrina, canferol, quercetina, galangina, crisina e hesperetina), ácidos fenólicos (ácidos elágico, caféico, *p*-cumárico e ferúlico), ácido ascórbico, tocoferóis, algumas enzimas (catalase, glicose oxidase, peroxidase), produtos de reação de Maillard e peptídeos. A maior parte dessas substâncias trabalha em conjunto para proporcionar um efeito antioxidante sinérgico (ETERAF-OSKOU EI & NAJAFI, 2013; ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010c; TURKMEN *et al.*, 2005), podendo ser utilizado como uma alternativa na indústria alimentícia no lugar de antioxidantes sintéticos (butil-hidroxitoluneo-BHT; *terc*-butil hidroquinona-TBHQ).

A origem botânica do mel tem uma maior influência sobre sua atividade antioxidante, enquanto o processamento, manuseio e armazenagem afetam a atividade em um menor grau (AL-MAMARY *et al.*, 2002, GHELD OF *et al.*, 2002; ETERAF-OSKOU EI & NAJAFI, 2013).

Relatos demonstram que a capacidade antioxidante do mel está fortemente correlacionada com o teor de substâncias fenólicas presentes (GHELD OF *et al.*, 2002; BERETTA *et al.*, 2005; ESTEVINHO *et al.*, 2008; D'ARCY, 2005; ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010a; SANT'ANA *et al.*, 2014). Além disso, tem sido encontrada uma forte

correlação entre a capacidade antioxidante e a cor de mel. Muitos pesquisadores descobriram que o mel escuro tem um conteúdo fenólico total maior e, conseqüentemente, uma capacidade antioxidante mais elevada (FRANKEL *et al.*, 1998; BERTONCELJ *et al.*, 2007; SANT'ANA *et al.*, 2014).

Vários ensaios têm sido aplicados para determinar capacidade antioxidante do mel (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2009.; FERREIRA *et al.*, 2009). Os mais comuns são os ensaios colorimétricos: DPPH, FRAP (poder redutor do íon férrico) e TEAC (capacidade antioxidante equivalente a Trolox) baseado na transferência de elétrons, o ensaio ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio) baseado na transferência do átomo de hidrogênio (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2009).

Os ensaios das atividades antioxidantes são avaliados em função do mecanismo de atuação, que são classificados em dois tipos: os que atuam pela transferência de hidrogênio e os que atuam pela transferência de elétrons.

Os métodos com transferência de hidrogênio tem se destacado e são os mais comuns, estes medem a habilidade de um antioxidante em doar um átomo de hidrogênio para um padrão, além de não depender do pH e do solvente, são reações rápidas (PRIOR *et al.*, 2005). Entretanto, a capacidade antioxidante não depende apenas da força de energia da ligação O-H. A estabilização das espécies cátion-radicalar e radicalar formadas também devem ser consideradas (WRIGHT *et al.*, 2001; CAO *et al.*, 2005).

Os métodos com transferência eletrônica medem a eficácia de um antioxidante em transferir um elétron para reduzir a substância, incluindo radicais, carbonilas e metais. (PRIOR *et al.*, 2005; QUIDEAU *et al.*, 2011).

As substâncias fenólicas são consideradas os principais componentes antioxidantes de alimentos. Enquanto em óleos vegetais e as gorduras são basicamente os monofenólicos, como tocoferóis (vitamina E), os polifenóis solúveis em água são mais típicos em produtos solúveis em água (frutas, legumes, chá, café, vinho). Embora a capacidade antioxidante dos polifenóis esteja associada com vários mecanismos, a elevada reatividade dessas substâncias em relação aos radicais livres ativos tem sido considerada como o principal mecanismo.

## 2.5. Métodos para Avaliar a Capacidade antioxidante(AA)

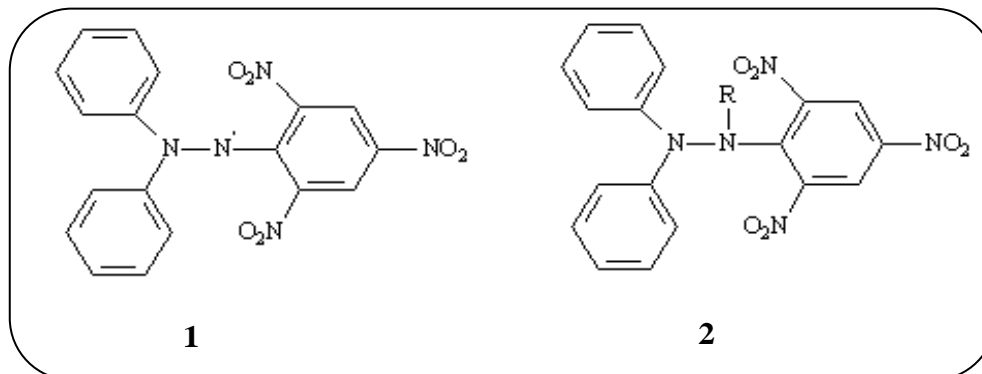
A capacidade antioxidante de uma substância não pode ser medida diretamente, mas sim através dos efeitos dessa substância em controlar a extensão de oxidação. As principais substâncias bioativas relatadas no mel com capacidade antioxidante são as substâncias fenólicas, cuja presença no mel e sua forte relação com a capacidade antioxidante já tem sido amplamente reportada na literatura através de diferentes métodos *in vitro* ou *in vivo* (AL-MAMARY *et al.*, 2002; GHELDOF *et al.*, 2002; ALJADI & KAMARUDDIN, 2004; BERETTA *et al.*, 2005; ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010b e c; LACHMAN *et al.*, 2010; SAXENA *et al.*, 2010; BERTONCELJ *et al.*, 2011; ISLA *et al.*, 2011; KAMBOJ *et al.*, 2013; MONIRUZZAMAN *et al.*, 2013; KUS *et al.*, 2014; GAŠIĆ *et al.*, 2014; ESCRICHE *et al.*, 2014). Os métodos para a determinação da atividade antioxidante, geralmente, envolvem a geração de espécies oxidativas, comumente radicais, cuja concentração é monitorada na presença de substâncias antioxidantes que atuam sobre eles (KÜÇÜK *et al.*, 2007).

Atualmente, não existe um método oficial disponível para a determinação da capacidade antioxidante em amostras de mel (BERTONCELJ *et al.*, 2007) e diversas metodologias tem sido aplicadas para a avaliação da atividade antiradicalar frente a diferentes substratos (ANTOLOVICH *et al.*, 2002). Os ensaios normalmente utilizados incluem DPPH (atividade sequestradora de radicais livres), FRAP (poder antioxidante de redução do íon ferrico), CUPRAC (poder antioxidante de redução do íon cúprico), ensaio do  $\beta$ -caroteno, ORAC (capacidade de absorção de oxigênio radicalar), AEAC (capacidade antioxidante do ácido ascórbico) e TEAC ou ABTS (capacidade antioxidante de equivalente em Trolox). Dentre estes ensaios DPPH, ABTS e FRAP são os mais usados atualmente na análise de alimentos (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2009; SANT'ANA *et al.*, 2014).

### 2.5.1. Ensaio com radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).

O DPPH é uma molécula caracterizada como um radical livre estável devido deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta molécula apresenta uma coloração violeta por apresentar uma banda de absorção em etanol em cerca de 517 nm. Este ensaio é baseado na medida da capacidade antioxidante de uma determinada

substância em sequestrar o radical DPPH (**Figura 1**), reduzindo-o a hidrazina. Quando uma determinada substância antioxidante, que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, obtém-se a hidrazina gerando uma mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo claro (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).



**Figura 1.** Estruturas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH

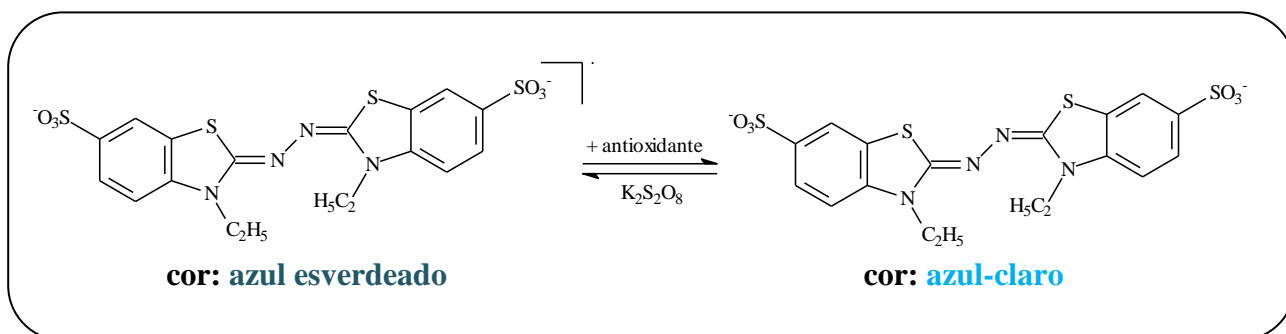
Este ensaio foi avaliado primeiramente por ressonância paramagnética eletrônica (EPR), uma vez que a intensidade do sinal do radical DPPH está inversamente relacionada com a concentração do antioxidante testado e o tempo de reação (CHEN *et al.*, 2000). Entretanto, o ensaio com DPPH radicalar é o mais utilizado, pois este método é considerado, do ponto de vista metodológico, um dos mais fáceis, precisos e reprodutivos na avaliação da capacidade antioxidante (LARSON, 1997).

Tem sido relatado que o ensaio com o radical livre DPPH pode ser afetado por certas reações laterais competitivas, tais como, ação de agentes quelantes de íons metálicos, inibição enzimática e presença de carotenóides, que absorvem por volta de 515 nm podendo assim, interferir nos resultados (AMAROWICZ *et al.*, 2004; ALVES *et al.*, 2010).

### 2.5.2. Ensaio com ABTS ou TEAC (Capacidade Antioxidante de Equivalente em Trolox).

O ensaio com ABTS (2,2-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato], sal de diamônio) ou TEAC foi inicialmente utilizado por Miller e colaboradores (1993) em amostras biológicas, e vem sendo utilizado até o momento em análise de alimentos (ESCRICHE *et al.*, 2014; GORJANOVIC *et al.*, 2013).

O método original baseia-se na ativação de metamioglobina como peroxidase, em presença de ABTS. Atualmente os ensaios utilizando o radical ABTS, entre eles o TEAC, são baseados na capacidade de compostos antioxidantes em sequestrar o cátion-radical (ABTS<sup>•+</sup>). Nesse ensaio, o ABTS é oxidado pela adição de persulfato de potássio, na qual o ânion (S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>-2</sup>) atua como uma espécie oxidante. O ABTS<sup>•+</sup> reage com diversos antioxidantes através da doação de um átomo de hidrogênio, promovendo o descoloramento da cor da solução, passando de azul esverdeado para azul claro, devido à forma não radicalar (ABTS) não apresentar cor (**Figura 2**). A medida de absorvância deste ensaio é realizada a 734 nm (ZULUETA *et al.*, 2009).



**Figura 2** - Estabilização do radical ABTS<sup>•+</sup> por um antioxidante (ZULUETA *et al.*, 2009)

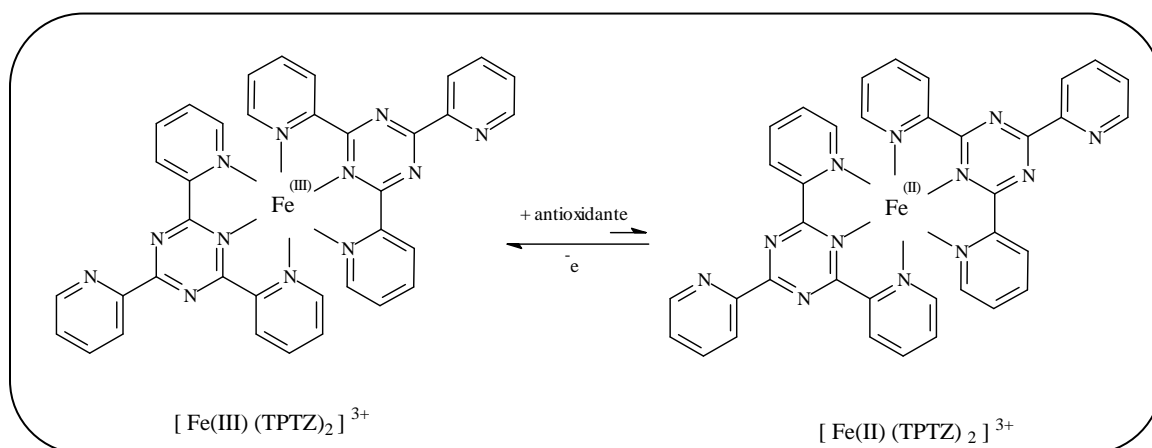
Esse método é aplicável para o estudo de antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis. O percentual de inibição de ABTS<sup>•+</sup> é determinado em função da concentração e do tempo. Quando a medida é relativa à reatividade do Trolox como padrão, sob as mesmas condições, o teste é denominado TEAC (“Trolox Equivalent Antioxidant Activity” ou Capacidade Antioxidante de Equivalente em Trolox), expresso como unidades equivalentes de Trolox que correspondem a 1,0 mmol/L (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; RE *et al.*, 1999).

### 2.5.3. Ensaio do FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Íon Férrico)

O método de FRAP foi inicialmente desenvolvido para medir poder redutor no plasma (BENZIE & STRAIN, 1996), mas o ensaio tem sido adaptado e utilizado para ensaios de atividade antioxidante. A reação mede a redução do complexo Fe<sup>3+</sup>-TPTZ (ferritripiridiltriazina) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina, C<sub>18</sub>H<sub>12</sub>N<sub>6</sub>] a ferroso-



tripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) por redutores, no caso, os antioxidantes. O complexo  $\text{Fe}^{2+}$  - TPTZ tem uma cor azul intensa e pode ser monitorado, a 593 nm, em espectrofotômetro (**Figura 3**). A reação detecta compostos com potencial redox  $< 0,7\text{V}$  (o potencial redox do complexo  $\text{Fe}^{+3}$ -TPTZ). O ensaio do FRAP mede somente os mecanismos de transferências de elétrons que em combinação com outros métodos, pode ser útil na distinção de mecanismos dominantes com diferentes antioxidantes (PRIOR *et al.*, 2005).



**Figura 3** - Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com  $\text{Fe}^{3+}$ . (adaptado de RUFINO *et al.*, 2007).

O resultado final pode ser convertido a mmol de equivalentes em Trolox por litro. A atividade relativa do Trolox em FRAP é de 2,0 mmol/L, ou seja, a reação direta de  $\text{Fe}^{2+}$  proporciona uma mudança de absorvância que é a metade de 1 equivalente molar para o Trolox (PRIOR *et al.*, 2003).

Este método apresenta algumas limitações como, por exemplo: nem todo redutor que apresenta capacidade para reduzir  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  é antioxidante e nem todo antioxidante tem a habilidade específica para reduzir  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , como por exemplo, a glutathiona (PRIOR *et al.*, 2003). Além disso, a elevada quantidade de açúcares redutores ( $> 65\%$ ), tais como a glicose e frutose no mel, pode contribuir para uma maior redução da poder antioxidante no método FRAP, o que levaria a um erro na determinação de capacidade antioxidante (FERREIRA *et al.*, 2009).

Assim, cabe às micromoléculas, tais como tocoferóis, carotenoides, ácidos fenólicos e flavonoides entre outros, o papel de impedir o ataque de espécies radicalares ou regenerar os danos causados em sistemas biológicos essenciais. O estudo do mecanismo

complexo de atividade anti e pró-oxidante destas substâncias tem sido alvo de extensos trabalhos científicos.

## 2.6- Substâncias Fenólicas presentes no mel

As substâncias fenólicas são sintetizadas em plantas como uma resposta ao ataque de insetos, ferimento e da radiação UV (DIAZ NAPAL *et al.*, 2010; KENNEDY *et al.*, 2011; ZULAK *et al.*, 2006; CHUNG *et al.*, 2003). Nas plantas, os polifenóis mais comumente encontrados são: cumarinas, ligninas, lignanas, taninos condensados e hidrolisáveis, ácidos fenólicos e flavonoides (SOTO-VACA *et al.*, 2012).

Nesse trabalho serão destacados os ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóicos e cinâmicos) e flavonoides, em virtude de ser em alguns dos principais constituintes polares com propriedades biológicas que estão presentes nos méis florais, objeto de estudo desse trabalho.

A estrutura básica das substâncias fenólicas apresenta anel aromático que pode conter um ou mais grupos hidroxílicos. Os ácidos fenólicos são uma classe de substâncias presentes no reino vegetal, sendo encontrado na forma de ésteres, glicosídeos ou amidas, e algumas vezes na forma livre. Essas substâncias caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, que conferem propriedades antioxidantes. São classificadas como fenóis simples ou polifenóis, de acordo com o número de unidades de anéis aromáticos em sua estrutura (CHIRINOS *et al.*, 2009).

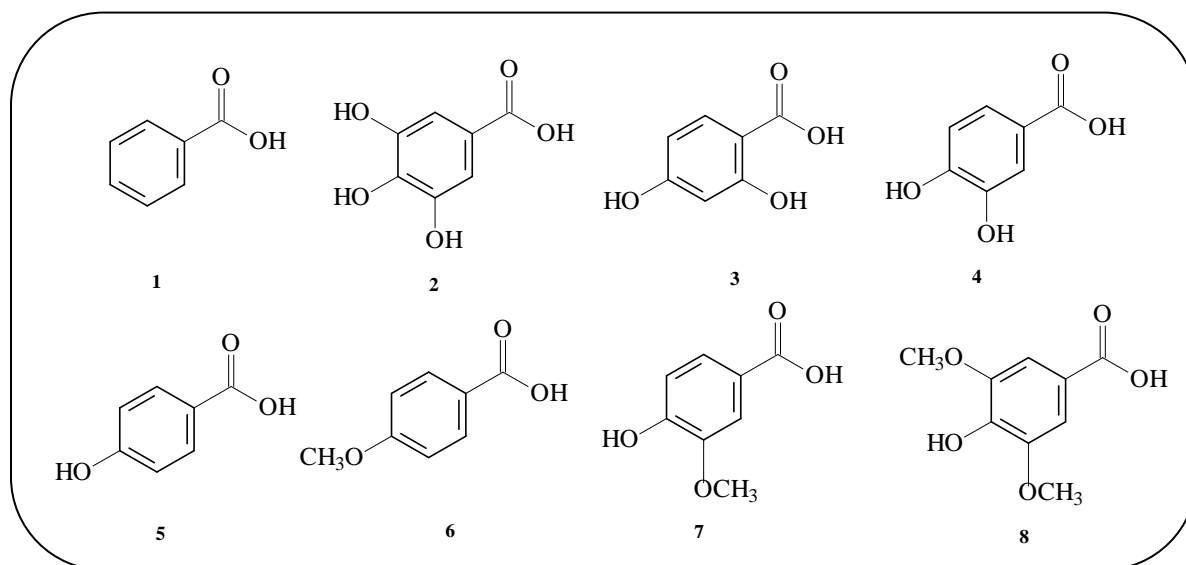
Os ácidos fenólicos estão divididos em dois grupos: os derivados do ácido benzóico e os derivados do ácido cinâmico (DEWICK, 2002). Os ácidos hidroxicinâmicos estão presentes na parede celular das plantas (VANHOLME *et al.*, 2010; BAUCHER *et al.*, 1998), tendo um importante durante o crescimento da planta, protegendo-a contra infecção, ferimento e radiação UV (NACZK & SHAHIDI, 2004). Derivados do ácido hidroxicinâmico incluem ferúlico, caféico, *para*-cumárico e sinápico, enquanto que os derivados do ácido hidroxibenzóico consistem os ácidos gálico, vanílico, siringico e protocatecuico (ALI-KHODDAMI *et al.*, 2013).

Na literatura são apresentados relatos que as substâncias fenólicas apresentam atividades anticancerígena, antiinflamatória, antiaterogênica, antitrombótica, imunomoduladora e atividade analgésica, entre outras, além de exercerem funções como antioxidantes (ESTEVINHO *et al.*, 2008; VINSON *et al.*, 1998). As substâncias fenólicas

do mel são os ácidos fenólicos e flavonoides, que são considerados potenciais marcadores da origem botânica (ALJADI & KAMARUDDIN, 2004; KÜÇÜK *et al.*, 2007). As atividades antioxidantes dessas substâncias estão relacionadas a uma série de diferentes mecanismos, tais como seqüestrantes de radical livre, doação de hidrogênio, extinção de oxigênio simpleto, quelação de íons metálicos, e atuando como um substrato para os radicais, tais como superóxido e hidroxila (KÜÇÜK *et al.*, 2007).

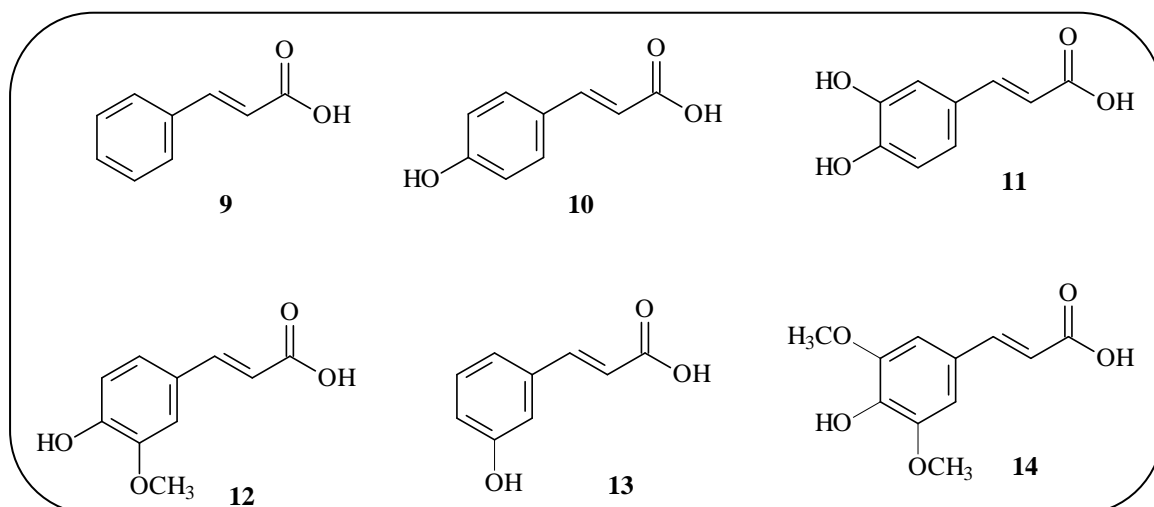
Os ácidos fenólicos presentes no mel alguns autores já identificaram os ácidos gálico, fenilacético, benzóico, hidroxibenzóico, cinâmico, vanílico, abscísico, *p*-cumárico, elágico, clorogênico, cafeico, ferúlico e sirínico (GHELDOLF *et al.*, 2002; STEPHENS *et al.*, 2010; KHALIL *et al.*, 2010, LIANDA *et al.*, 2012; CHUA *et al.*, 2013; MONTENEGRO *et al.*, 2013; ESCRICHE *et al.*, 2014; GAŠIĆ *et al.*, 2014; KUS' *et al.*, 2014; SANT'ANA *et al.*, 2014).

Na **Figura 4** encontram-se alguns exemplos de ácidos fenólicos, tais como o ácido benzóico (1), e seus derivados: ácidos gálico (2), 2,4-diidroxibenzóico (3), protocatecuíco (4), *para*-hidroxibenzóico (5), *para*-metoxibenzóico (6), vanílico (7) e sirínico (8) que foram encontrados em méis brasileiros (SALGUEIRO, 2012 e LIANDA *et al.*, 2012).



**Figura 4-** Principais derivados de ácido benzóico encontrados em méis brasileiros

Na **Figura 5** encontram-se exemplos do ácido cinâmico (9) e seus derivados, os ácidos *para*-cumárico (10), caféico (11), ferúlico (12), *meta*-cumárico (13) e sinápico (14).



**Figura 5-** Principais derivados de ácido cinâmico encontrados em méis brasileiros

A capacidade antioxidante dos ácidos fenólicos, esta ligada ao poder quelante de alguns desses compostos com metais agindo dessa forma tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SHAHIDI *et al.*, 1992). Além disso, os produtos intermediários formados são estáveis, devido à ressonância do anel aromático. A posição e o número de hidroxilas ligadas ao anel aromático são fatores que vão definir a eficiência das substâncias fenólicas como antioxidantes (NAWAR, 1985).

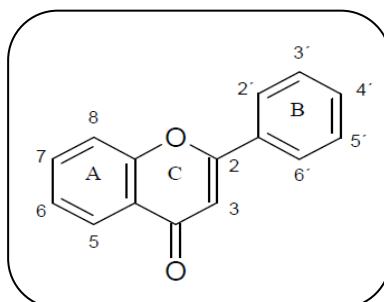
Com isso os ácidos fenólicos com dois (mais comum) ou três grupos hidroxilas ligados ao anel benzênico possuem maior capacidade antioxidante que os monohidroxilados (PANNALA *et al.*, 2001; CHENG *et al.*, 2003). Porém esta atividade é aumentada com a presença desses grupos na posição *orto* e/ou *para* no anel, por favorecer o efeito da ressonância.

Os ácidos fenólicos e os flavonoides são os principais antioxidantes encontrados no mel. Com isso, um crescente número de estudos tem sido realizado com o objetivo de quantificar essas substâncias e estimar sua relação com a capacidade antioxidante do mel. Muitos pesquisadores encontraram boas correlações entre os conteúdos fenólicos e a capacidade antioxidante do mel (ESCRICHE *et al.*, 2014; CHUA *et al.*, 2013; GORJANOVIC' *et al.*, 2013; KÚS *et al.*, 2013; SANT'ANA *et al.*, 2012 e 2014).

Os flavonoides são outra classe de substâncias fenólicas de considerável interesse científico e terapêutico. É um grupo de substâncias naturais com estrutura variável, amplamente distribuídas nas plantas, responsável juntamente com os carotenóides e

clorofilas, pelas cores azul, roxo, amarelo, laranja e vermelho das flores e frutos. Frutas, vegetais, mel, própolis, grãos, flores, chá e vinho são exemplos de fontes alimentares onde são encontradas essas substâncias.

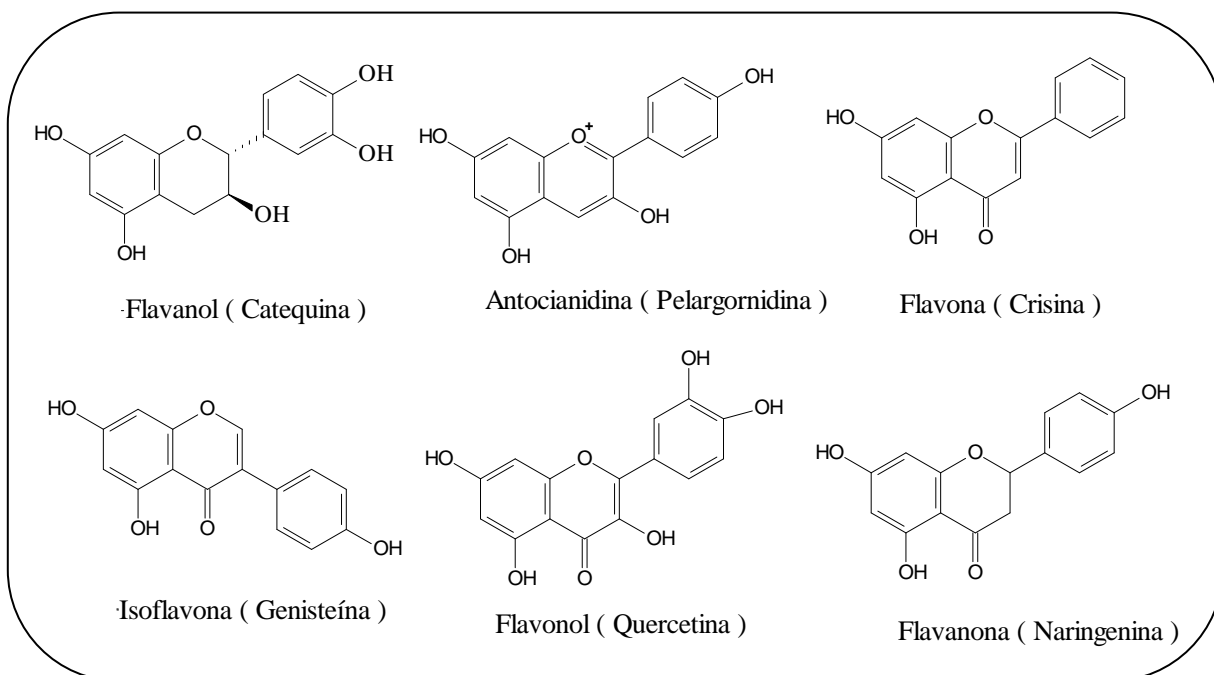
Os flavonoides consistem de uma estrutura básica com quinze átomos carbonos, do tipo difenil propano (C6-C3-C6), com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (**Figura 6**). Os flavonoides diferem nos números e posição dos grupos hidroxilas, átomos de oxigênio e de hidrogênios ligados aos anéis, e podem ser encontrados como agliconas ou como glicosídeos (ligados a diferentes açúcares (DEWICK, 2002).



**Figura 6:** Estrutura básica dos flavonoides

Os flavonoides estão estruturalmente subdivididos em seis principais classes: flavanóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas, catequinas e antocianidinaa (**Figura 7**).

Nestas classes há grandes variações estruturais, dependendo do nível de hidrogenação, hidroxilação, metilação e sulfonação das moléculas (SUN *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2012; RONG, 2010).



**Figura 7** –Alguns tipos de flavonoides.

Todos os flavonoides são derivados dos aminoácidos aromáticos, fenilalanina e tirosina, e apresentam em sua estrutura três anéis aromáticos (ROUTRAY & ORSAT, 2012). Variação na estrutura dos flavonoides surge a partir das reações de hidroxilação, prenilação, alcalinização e glicosilação que alteram a estrutura do seu esqueleto (STALIKAS, 2007).

Os flavonoides têm um papel importante na regulação do crescimento e desenvolvimento da planta (SHIRLEY, 1996), e apresentam importantes propriedades biológicas sobre a saúde humana, tais como antialérgica, antiinflamatória, antimicrobiana, antiviral, anti-câncer, atividades antitrombóticas e vasodilatadoras. (GHELDOLF *et al.*, 2002; PIER-GIORGIO, 2002; VINSON *et al.*, 1998). Vários estudos dos efeitos biológicos sobre a saúde, por exemplo, sugerem que flavonoides atuam como potentes quelantes de metais e sequestrantes de radicais livres exercendo assim ação antioxidante. Portanto, os flavonoides e suas fontes alimentares tem sido de crescente interesse dos pesquisadores nos últimos tempos (YAO *et al.*, 2004a).

Os flavonoides são antioxidantes efetivos devido à suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos, protegendo assim os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica. A propriedade antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) e o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), que são espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica (BEHLING *et al.*, 2004; KANDASWAMI & MIDDLETON, 1994). Essas substâncias têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (HARTMAN & SHANKEL, 1990; AURORA *et al.*, 1998).

Os flavonóides são outra classe de substâncias presentes no mel, sendo que alguns autores já identificaram a quercetina, luteolina, canferol, apigenina, crisina, galangina, morina, pinobanksina e pinocembrina como alguns dos biomarcadores do mel (LIANDA & CASTRO, 2008; ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010b; LIANDA *et al.*, 2012; CHAN *et al.*, 2013; GAŠIĆ *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2014a).

O perfil e a identificação das substâncias fenólicas presentes no mel são variáveis e dependem principalmente da origem botânica e geográfica do mel (ANKLAM, 1998; ALJADI & KAMARUDDIN, 2004; KÜÇÜK *et al.*, 2007). Assim, a presença de algumas substâncias individuais ou grupo de substâncias pode servir como biomarcadores, e dessa forma ser uma importante ferramenta na determinação da origem floral do mel

(FERRERES *et al.*, 1993; , ANDRADE *et al.*, 1997b; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2014b).

## 2.7. Metodologias usadas para caracterização do mel

Quando se discute a caracterização do mel, também descrita como autenticidade do mel, tem que se pensar em dois aspectos diferentes: autenticidade em relação à produção de mel, e autenticidade em relação à descrição da origem geográfica e botânica. Para identificar a autenticidade de méis várias abordagens têm sido usadas. Tradicionalmente, uma das mais antigas é a análise microscópica do pólen presente nesse produto (BOGDANOV *et al.*, 2002; ELKE, 1998). Além disso, as propriedades sensorias ou físico-químicas (por exemplo, condutividade elétrica, a relação frutose / glicose, atividade enzimática, acidez, etc) são também determinadas. No entanto, estes métodos infelizmente não são suficientes para concluir claramente a origem botânica e geográfica do mel.

Existem várias opiniões sobre essas diferentes questões de autenticidade do mel, mas a fim de fazer uma abordagem mais simples, serão apresentados aqui apenas alguns métodos usuais para auxiliar na caracterização da origem botânica e/ou geográfica do mel.

A caracterização do mel através de sua origem botânica é uma das prioridades do comércio apícola em virtude da grande importância econômica, pois alguns tipos de méis são mais apreciados pelos consumidores do que outros, e os seus valores de mercado variam em função da sua florada. Atualmente, percebe-se um crescente interesse comercial na produção de certas variedades de méis monoflorais, devido aos usos terapêuticos e gastronômicos (RIZELIO, 2011; LÉON-RUIZ *et al.*, 2011).

A avaliação da origem botânica dos méis uniflorais é de grande preocupação, no âmbito da defesa do consumidor e do controle de qualidade. No entanto, os métodos que estão disponíveis atualmente nem sempre são satisfatórios. A fim de encontrar alternativas para os métodos existentes, que às vezes são demorados e incertos, têm sido propostas novas abordagens analíticas que incluem metodologias instrumentais, algumas vezes associadas às análises multivariadas.

Em geral, a maior parte dos trabalhos que procuram provar a autenticidade do mel leva em conta, principalmente, métodos analíticos adequados para a detecção da origem geográfica e botânica do mel. Considerando que a determinação de alguns parâmetros individuais, tais como o teor de 5-hidroximetilfurfural (HMF), umidade, atividade enzimática, nitrogênio, mono- e dissacarídeos, não leva a qualquer informação sobre a

origem botânica e geográfica, tem sido desenvolvidos alguns métodos adequados que se baseiam na análise de componentes específicos (biomarcadores) ou na análise de multi-componentes. Esses métodos dão principalmente, indícios da origem botânica e/ou geográfica, através, por exemplo, da investigação da presença de flavonoides, ácidos fenólicos, aminoácidos, substâncias aromáticas, substâncias voláteis padrões, da distribuição de pólen (carga polínica) no mel, de biomarcadores especiais. Em particular, a combinação de métodos analíticos pode ser uma abordagem promissora para provar a autenticidade do mel, especialmente quando são aplicadas técnicas estatísticas modernas de avaliação de dados. No entanto, a técnica clássica que ainda tem sido utilizada para a determinação da origem floral do mel é a análise melissopalínológica.

### **2.7.1 Análise Melissopalínológica**

A curiosidade científica sobre a origem dos produtos elaborada pelas abelhas, bem como vantagens comerciais em determinação da sua qualidade, estimulou atividades de pesquisa que utilizam o conhecimento da morfologia dos grãos de pólen como uma ferramenta para sua investigação (BARTH, 2004).

A análise da microscopia do mel, melissopalínologia, surgiu inicialmente com o pesquisador Pfister em 1895, que sugeriu a possibilidade da determinação da origem fitogeográfica do mel através da contagem dos grãos de pólen (LOUVEAUX *et al.*, 1970; BARTH, 1989)

A melissopalínologia é uma das áreas da palinologia que estuda a morfologia dos grãos de pólen, principalmente, os aspectos estruturais da parede polínica em sedimentos de amostras de mel produzidos pelas abelhas. Sabe-se que as abelhas visitam apenas uma pequena parte da flora. O mel produzido pelas abelhas possui grãos de pólen devido à contaminação que ocorre quando a mesma coleta o néctar da flor, fazendo com que todo o seu corpo seja impregnado pelos grãos de pólen.

Os méis monoflorais, também chamado méis uniflorais, são, sem dúvida, o mais atraente. Eles são originados a partir de uma única espécie de plantas. No Brasil, eles são produzidos por abelhas *Apis mellifera*, ou por abelhas nativas sem ferrão, a Meliponina. Estes méis mantem sempre as mesmas características organolépticas, físico-químicas e são muito apreciadas pelo consumidor. Já os méis bifloral originados de duas espécies de plantas apícolas e os heteroflorais, também chamado méis multifloral, oriundos do néctar



de várias espécies de plantas podem ser produzidos por abelhas nativas, porém suas propriedades variam, em relação a espécies de abelhas, origem botânica e fatores climáticos (BARTH, 2004). A caracterização de um mel monofloral é baseada na identificação morfológica e quantificação dos grãos de pólen, os quais são carregados involuntariamente junto com o néctar, quando da visita das abelhas aos nectários florais. Na prática, não é possível se obter um mel 100% monofloral, ou seja, isento de grãos de pólen de outros espécimes.

A determinação da origem botânica pelo melissopalínologia está baseada na frequência relativa do pólen a partir das plantas secretoras de néctar. Entretanto, a viabilidade desta metodologia tem sido discutida por vários pesquisadores que apontam como fator crítico a necessidade de profissionais especializados e treinados, incluindo um extenso conhecimento da morfologia polínica pelos analistas, além da disponibilidade de grãos de pólen presentes no mel (MOREIRA & DE MARIA, 2001).

As análises palinológicas de amostras de mel, geralmente, se baseiam nas classes de frequência, aceitas internacionalmente. A partir do total estabelecido na contagem de grãos de pólen ou outros elementos (500 ou 1200 grãos) é realizada uma divisão em percentuais do espectro polínico em classes de frequências, tais como: as de pólen dominante quando representa mais de 45 % do total de grãos de pólen contidos no mel, pólen acessório quando ocorre de 16 a 45% do total; pólen isolado importante quando ocorre de 3 a 15% do total e pólen isolado ocasional de 1-3% do total. Os próximos passos da análise procuram identificar se os grãos de pólen são de plantas entomófilasnectaríferas, anemófilas ou entomófilas sem néctares, o que permite classificar os méis quanto a sua origem botânica e geográfica. Além de grãos de pólen, encontram-se no mel, durante sua análise, vários elementos figurados, tais como: esporos e hifas de fungos, células de algas, pêlos vegetais e de insetos, grãos de amido, células de levedo, partículas de fuligem, poeira, cera de abelhas e ráfides de oxalato de cálcio. Alguns destes elementos são de grande importância para classificar o mel como de melato (“honeydew”), o qual não é proveniente de néctar floral, mas sim de exsudações açucaradas de excreções de insetos, principalmente afídeos sugadores do floema de numerosas espécies vegetais (JUNIOR *et al.*, 2003).

A qualidade do mel depende de sua composição química (diferentes tipos de açúcares, sais minerais, proteínas e água) e dos grãos de pólen provenientes das plantas nectaríferas em sua maioria sendo as de maior importância, tendo uma percentagem de plantas poliníferas e anemófilas adicionais (BARTH, 2005).

A caracterização palinológica de méis com diferentes origens botânicas tem sido realizada por pesquisadores de diferentes países (ATANASSOVA & KONDOVA, 2004; DOBRE *et al*, 2012; DOWNEY *et al*, 2005; LA SERNA *et al*, 2002; LA SERNA & GÓMEZ-FERRERAS, 2006; PERSANO-ODDO & PIRO, 2004; SEIJO *et al*, 2011; TERRAB *et al*, 2003), embora diferentes opiniões podem ocorrer em relação ao uso de pólen presente no mel para a indicação da sua origem botânica. Por exemplo, MOLAN (1998) relatou como desvantagem deste método as possíveis alterações de conteúdo de pólen do mel pela ação das abelhas ou contaminação pelos apicultores. Juntamente a esse fato, alguns méis, por exemplo, obtidos a partir de plantas de algodão, rícino e árvores de borracha, não podem ser identificados pela melissopalínologia. De acordo com este autor, a melissopalínologia é válida apenas para a determinação da origem geográfica do mel, sendo menos válido para determinar a origem botânica de mel. Alissandrakis e colaboradores (2007) relataram que o mel grego de *Citrus* também era de difícil identificação pela análise do pólen. A justificativa para tal observação foi baseada no fato de que alguns grãos de pólen, tais como do gênero *Citrus* e membros da família *Lamiaceae*, são sub-representados no espectro polínico do mel. Para *Citrus* sp. o mínimo de 10% de pólen não era suficiente para considerar o mel como monofloral, enquanto outros gêneros, como *Eucalyptus*, *Castanea* e *Myosotis* são super-representados, sendo geralmente aceito um conteúdo mínimo de 70% de pólen *Eucalyptus* necessário para classificar esse mel como monofloral (OUCHEMOUKH *et al.*, 2007).

Em outro trabalho, Stephens e colaboradores (2010) observaram que a análise melissopalínológica não foi capaz de diferenciar méis de manuka (*Leptospermum scoparium*) e kanuka (*Kunzea ericoides*) da Nova Zelândia devido à similaridade dos grãos de pólen.

Em alguns casos, muito provavelmente devido às limitações acima mencionadas nas análises melissopalínológicas, os estudos sobre a composição química do mel foram realizados sem a análise do pólen. Em tais casos, a origem botânica do mel foi baseada nas informações fornecidas pelos apicultores locais, pela análise sensorial ou por considerar a flora predominante ao redor da colméia. Alguns pesquisadores apontam que a melissopalínologia é inadequada como uma análise rápida de rotina, sendo esta a principal desvantagem deste método (ARVANITOYANNIS *et al.*, 2005 ; TERRAB *et al.*, 2005).

Embora a análise do pólen tenha algumas desvantagens, é a única maneira de detectar a contribuição de um néctar. Apesar da limitação e desvantagens da melissopalínologia, Dimou e colaboradores (2006) demonstraram que a análise

microscópica foi adequada para a discriminação de méis *Abies sp.* (abeto) e de pinus (*Pinus sp.*).

Os métodos usuais recomendados (análise físico-química e melissopalínologia) para a caracterização do mel são tradicionais e amplamente reconhecidos, porém o desenvolvimento de novos métodos analíticos vem recebendo muita atenção da comunidade científica nos últimos anos, com especial destaque para metodologias instrumentais rápidas e econômicas, tanto do ponto de vista financeiro quanto ambiental.

### **2.7.2. Métodos Alternativos para determinação da origem botânica**

Segundo Anklam (1998) a identificação da origem floral de méis é uma tarefa difícil e não existe atualmente um método que forneça resultados precisos e inequívocos. Existem muitas fontes florais, e estas são influenciadas pelo clima, solo, temperatura e condições de crescimento.

A autenticação da origem botânica é uma das questões mais importantes no controle de qualidade do mel, uma vez que determina diretamente o preço de mercado. Autoridades reguladoras, a indústria de alimentos, varejistas e consumidores estão interessadas em conhecer a origem e a qualidade dos méis. Normalmente, a identificação da origem botânica do mel é realizada por o cálculo da percentagem de pólen. No entanto, esta análise não é a mais adequada para alguns tipos de mel, tais como laranjeira, uma vez que a quantidade de pólen presente é geralmente pequena e muito variável (FERRERES *et al.*, 1994b). Portanto, pode ser interessante para determinar a origem botânica do mel considerar a presença de substâncias químicas específicas, que possam estar presentes em néctares específicos (ou secreções de plantas, no caso de mel de melato) e, conseqüentemente, no mel correspondente.

Métodos outros que não a análise polínica de méis, que permitam a identificação da origem botânica de méis monoflorais, têm sido objeto de diversos estudos. Portanto, pode ser interessante para determinar a origem floral do mel, considerar a presença de substâncias químicas específicas (biomarcadores ou marcadores químicos), que possam estar presentes em nectários específicos (ou secreções de plantas, no caso de mel de melato) e, conseqüentemente, no mel correspondente.

Entre as diferentes possibilidades analíticas, análise de substâncias voláteis (ESCRICHE *et al.*, 2011), metais, proteínas, ácidos orgânicos (MATO, *et al.*, 2006), açúcares (CAVIA *et al.*, 2009), flavonoides e e ácidos fenólicos presentes em méis

monoflorais tem despertado muito interesse, notadamente nas pesquisas que visam definir biomarcadores para méis monoflorais (LACHMAN *et al.*, 2010; SCHRAMM *et al.*, 2003; YAO *et al.*, 2004a e b; ESCRICHE *et al.*, 2014).

O desenvolvimento de metodologias analíticas para a tipificação do mel vem recebendo muita atenção no meio científico nos últimos anos; e as técnicas analíticas instrumentais têm surgido como alternativas promissoras, muitas vezes por apresentar baixo consumo de reagentes e de amostra, rapidez e robustez nas análises e alta resolução na separação, identificação e quantificação de diversas substâncias (CUEVAS-GLORY *et al.*, 2007; KAŠKONIENE & VENSKUTONIS, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas, os métodos de controle de qualidade em conjunto com análise estatística multivariada, têm sido usados com sucesso para classificar o mel de diferentes regiões geográficas, detectarem adulteração e descreverem suas características químicas (CORDELLA *et al.*, 2003; SERRANO *et al.*, 2004; PUSCAS *et al.*, 2013). Embora tradicionalmente, as características microscópicas (DIMOU *et al.*, 2006) e propriedades físico-químicas (CORBELLA & COZZOLINO, 2006; LAZAREVIC *et al.*, 2012) continuam sendo empregadas para a determinação da origem botânica e geográfica de mel.

Portanto, a busca de métodos que possam ser mais rápidos e adequados para a caracterização do mel nas análises de rotina, particularmente quando estão envolvidas muitas amostras em um curto período de tempo, estão sendo realizados com o auxílio de novas técnicas instrumentais, tais como espectroscopia de absorção atômica (AAS) (HERNÁNDEZ *et al.*, 2005), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ANDRADE *et al.*, 1997a; YAO *et al.*, 2004a; ZHOU *et al.*, 2014a), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) (SANZ *et al.*, 2005a; ALISSANDRAKIS *et al.*, 2007; ALIFERIS *et al.*, 2010, KUS´ *et al.*, 2014), Espectrometria de Massas com Ionização por "Electrospray" (EM-ESI) (BERETTA *et al.*, 2007), Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) (TERRAB *et al.*, 2005), Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (REZIC *et al.*, 2005) Cromatografia Líquida de Troca Aniônica com Detecção Amperométrica Pulsada (HPAED-PAD) (NOZAL *et al.*, 2005), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (TUBEROSO *et al.*, 2010), Raman com Transformada de Fourier (FT-Raman) (PARADKAR e IRUDAYARAJ, 2002), Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (ETZOLD & LICHTENBERG-KRAAG, 2008) e Espectroscopia no Infravermelho Próximo (NIR) (WOODCOCK *et al.*, 2007).

Um interesse crescente em se desenvolver métodos analíticos que possam vir a complementar a análise do pólen na determinação da origem floral do mel tem surgido na literatura. Nas últimas décadas, as propriedades químicas e físicas específicas do mel têm sido usadas para determinar a sua origem botânica e novas técnicas analíticas têm sido propostas com esse objetivo. Essas novas técnicas baseiam-se, por exemplo, na determinação de flavonoides (ESCRICHE *et al.*, 2014; SERGIELA *et al.*, 2014b), perfil de voláteis (JERKOVIC' *et al.*, 2011b; VERZERA *et al.*, 2014), aminoácido (TRUZZI *et al.*, 2014; SILICI & KARAMAN, 2014) e composição de carboidratos (ZHOU *et al.*, 2014a).

Nesse trabalho ênfase será dado apenas aos métodos para a caracterização química baseada na determinação das substâncias voláteis, e de compostos específicos, tais como os ácidos fenólicos e flavonoides, maiores grupos de substâncias fenólicas que ocorrem no mel.

#### **2.7.2.1. Análise do perfil de substâncias voláteis no mel**

Tradicionalmente, a origem botânica do mel monofloral é baseada na técnica de identificação microscópica e quantificação dos grãos de pólen, os quais são carreados involuntariamente junto com o néctar, quando da visita das abelhas aos nectários florais. Essa técnica, conhecida como melissopalínologia, é considerada cara, demorada, depende muito da qualificação e julgamento do analista, além da necessidade de uma biblioteca de pólen (MANYI-LOH *et al.*, 2011).

Na prática, não é possível se obter um mel 100% monofloral, ou seja, isento de outros tipos grãos de pólen. Além disso, há uma grande variação na contribuição do néctar de uma flor em comparação com a quantidade de seu pólen encontrado no mel. Apesar do fato de um pólen específico poder estar presente no mel, a sua presença pode ser baixa em alguns tipos de mel (por exemplo, cítricos, lavanda e alecrim), conseqüentemente, torna-se inevitável a busca por uma maior quantidade de marcadores químicos para comprovar a origem do mel.

Guyot e colaboradores (1999) apontaram que em alguns casos a análise do pólen pode ser de pouco uso, especialmente quando os méis são derivados de plantas estéreis. castro-várquez e colaboradores (2006) relataram que é mais difícil determinar a origem floral de mel de melato porque a análise palinológica não pode ser realizada considerando a sua fonte de produção. Portanto, existe uma tendência para substituir a análise de pólen por perfil analítico e/ou físico-químico de marcadores para a discriminação de mel.

Na literatura tem sido abordados aspectos sobre composição da fração volátil de méis monoflorais, o seu uso como indicador de origem geográfica e botânica e, também, na qualidade odorífera e o seu impacto para o aroma do mel (DE MARIA & MOREIRA, 2003).

Normalmente, méis monoflorais por serem originados a partir de uma única espécie de plantas possuem componentes voláteis específicos gerando um aroma característico, em comparação com méis poliflorais, oriundos de varias espécies de plantas (ROWLAND *et al.*, 1995; ALISSANDRAKIS *et al.*, 2003 ; MOREIRA & DE MARIA, 2005).

As substâncias orgânicas voláteis de mel são obtidas a partir de diversas vias biossintéticas e extraídas usando métodos variados associados á diferentes graus de seletividade e eficácia. Em geral, estas substâncias são agrupadas em classes químicas, tais como aldeído, cetona, ácido, álcool, hidrocarboneto, norisoprenoides, terpenos e substâncias aromáticas, derivados de furano e pirano. Nos últimos anos a investigação dessas classes de substâncias voláteis tem sido um tema que tem despertado muito interesse de pesquisadores no que diz respeito aos marcadores químicos que podem contribuir com a "impressão digital" do mel e, conseqüentemente, serem úteis para a identificação rápida e confiável da sua origem botânica (BONVEHÍ & COLL, 2003; SORIA *et al.*, 2003, CUEVAS-GLORY *et al.*, 2007; ALIFERIS *et al.*, 2010; STANIMIROVA *et al.*, 2010; ESCRICHE *et al.*, 2009 e 2011; JERKOVIC *et al.*, 2011a e b; KUS *et al.*, 2014).

Em geral, o aroma do mel de abelha depende da composição da fração volátil, que é influenciada pela origem do néctar floral ou do melato coletado pelas abelhas, ou pelo seu estado de maturação. O perfil de compostos voláteis representativos desse aroma serviria como método complementar para atestar a autenticidade do mel monofloral, que geralmente agregam maior valor comercial, bem como auxiliaria no monitoramento da qualidade básica do produto. Este tipo de avaliação refere-se às investigações feitas sobre a fração volátil de mel de abelha através da cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa, como o principal método analítico (CUEVAS-GLORY *et al.*, 2007).

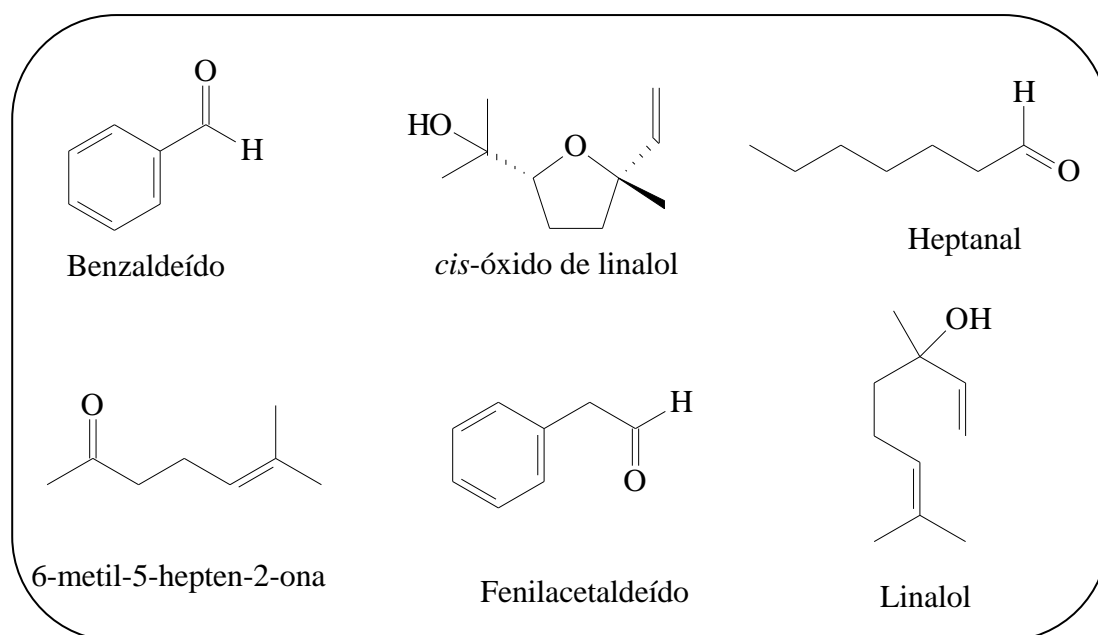
Provavelmente, o número de substâncias voláteis sugeridas como marcadores de determinadas amostras de mel pode aumentar com criação ou evolução de novas técnicas de isolamento, visto que, devido à alta concentração de carboidratos é necessário o pré-tratamento do mel antes do isolamento dessas substâncias, exceto o método de *headspace* (SORIA *et al.*, 2004 ; JERKOVIC *et al.*, 2009a , 2009b ). No entanto, existem pelo menos quatro técnicas diferentes de extração de compostos voláteis de mel, que são usadas

frequentemente: destilação e extração simultânea com diclorometano, pelo método modificado de Likens & Nickerson (BOUSETA & COLLIN 1995; DE MARIA & MOREIRA, 2003; CASTRO-VÁZQUEZ *et al.*, 2009), técnica de purga e armadilha (“purge and trap”; RADOVIC *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2002), extração com ultrassom e solventes (JERKOVIC & MARIJANOVIC, 2009; JERKOVIC *et al.*, 2009b) e a técnica de microextração em fase sólida (SPME), sendo esta a mais utilizada (KAŠKONIENÈ *et al.*, 2008 ; SENYUVA *et al.*, 2009 ).

O estudo do perfil de substâncias voláteis de méis brasileiro é muito recente e, portanto, os resultados ainda são escassos. O primeiro trabalho foi realizado com méis de eucalipto e laranja do Estado de São Paulo (BASTOS, 1996). Foi usado um método de “headspace dinâmico” e um total de cinco e oito substâncias voláteis foram identificadas por CG-EM nos méis de eucalipto e laranja, respectivamente. E um outro trabalho realizado por Bastos e colaboradores (2002), foi estudado as diferenças químicas entre os substâncias voláteis presentes em amostras de mel de eucalipto e laranja recém-colhidas nos estados de São Paulo e de Minas Gerais. O isolamento dos voláteis foi realizado empregando-se também a técnica de “headspace” dinâmico, a separação foi efetuada por cromatografia gasosa de alta resolução e a identificação por espectrometria de massas. Foram identificados no mel de laranja o benzaldeído, o *cis*- óxido de linalol (furanóide), *n*-heptanal, 6-metil-5-hepten-2-ona, octanal e fenilacetaldéido, e em mel de eucalipto, o nonanal, 2-heptanona, 2-heptanol, octanol e nonanol.

Moreira *et al.*(2003) estudaram as substâncias do aroma de méis monoflorais de *Anacardium occidentale* (caju) e *Croton* sp. (marmeleiro), ambos oriundos do Nordeste brasileiro. Esses autores isolaram a fração volátil dos méis de caju e marmeleiro através de extração em fase sólida do extrato aquoso com o adsorvente “Porapak Q” e a identificação foi realizada através de CG-EM. As principais classes de substâncias identificadas no mel de caju foram hidrocarbonetos, alcoóis, ácidos e substâncias aromáticas; já no mel de marmeleiro foram alcoóis, ácidos, ésteres e substâncias aromáticas.

Exemplos de algumas substâncias voláteis encontrados no mel estão apresentadas na **Figura 8**.



**Figura 8.** Exemplos de substâncias voláteis identificadas no mel

Radovic e colaboradores (2001) definiram o perfil de substâncias voláteis de 43 amostras de méis de diferentes origens botânicas e geográficas utilizando cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa (CG-EM), e através desse estudo conseguiram classificar diferentes méis de acordo com a origem geográfica. Nesse trabalho foi sugerido que amostras de méis ingleses podiam se diferenciadas pela presença do 1-penteno-3-ol; enquanto o mel da Dinamarca foi diferenciado pela ausência do 3-metilbutanal, e as substâncias 2,2,6-trimetil cicloexano, 2-hidroxiopropanoato de etila e formiato de 3-hexila foram considerados possíveis marcadores de méis portugueses. Já as substâncias: 1-octen-3-ol e 2,6,6-trimetil-2,4-cicloheptadien-1-ona foram sugeridas como possíveis marcadores de méis espanhóis.

No trabalho de Castro-Vázquez e colaboradores (2007) os isômeros do sinensal (*cis* e *trans*-2,6-dimetil-10-metileno-2,6,11-dodecatrienal) foram apontados como os melhores marcadores florais para méis de *Citrus* sp., sendo os responsáveis pelo aroma "doce". Mais tarde, os mesmos autores estenderam seus estudos através da aplicação de análise multivariada, e, além desses isômeros foram encontrados também linalol e óxido de linalol como outros componentes envolvidos na a formação do aroma do mel citros (CASTRO-VÁZQUEZ *et al.*, 2009). Foram identificados antranilato de metila e sinensal somente em amostras de mel de *Citrus*, enquanto, por exemplo, fenilacetaldéido foi atribuído como um composto característico de meis de castanha, eucalipto, lavanda; heptanal foi encontrado



em méis de lavanda e de acácia e nonanal foi determinado em quatro méis diferentes: rododendros, espinho de Cristo, eucalipto e melato.

Recentemente Verzera e colaboradores (2014) propuseram uma nova abordagem analítica baseada na investigação da razão enantiomérica dos constituintes voláteis quirais que eram originários das plantas visitadas pelas abelhas. O método foi aplicado para os méis de laranja e a fração volátil do mel de laranja e das flores foi avaliada por microextração em fase sólida acoplada a cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massas (SPME-CG-EM). Nos méis de laranja um grande número de componentes foi identificado, enquanto o linalool prevaleceu como constituinte volátil principal da flor. As relações enantioméricas do linalol e dos seus óxidos foram determinados resultando em valores análogos entre o mel e flores. Segundo os autores, mesmo se ocorresse uma grande variação na quantidade dos constituintes voláteis típicos dos méis de laranja, as razões enantioméricas do linalool e seus óxidos permaneceriam estável e, portanto, menos influenciada pelo período de produção, de armazenamento, embalagem, estocagem do mel. Como esses resultados, os pesquisadores concluíram que a distribuição enantiomérica dos constituintes voláteis do mel que vêm diretamente das flores pode representar um método rápido e fácil para autenticidade da sua origem floral (VERZERA *et al.*, 2014).

Possivelmente, o aprimoramento do desenvolvimento de novas técnicas permitirá identificar e quantificar mais especificamente os constituintes voláteis do mel que podem estar presentes em baixas concentrações, podendo assim, fornecer informações mais confiáveis sobre a fonte floral de mel (KASKONIEN & VENSKUTONIS, 2010).

O estudo das substâncias voláteis presentes em méis monoflorais é um tema que tem despertado muito interesse e mais de 300 substâncias diferentes já foram identificados em diferentes tipos de mel (JERKOVIC *et al.*, 2010, 2011a e 2014 ; KUS *et al.*, 2013). Levando em conta que a composição do aroma de alguns tipos de mel ainda não foi estudada e que a sensibilidade das análises realizadas por CG-EM e CG-DIC (cromatografia gasosa com detector de ionização de chama), que são as mais utilizadas, vem melhorando a cada dia, o número de substâncias identificadas irão aumentar ainda mais.

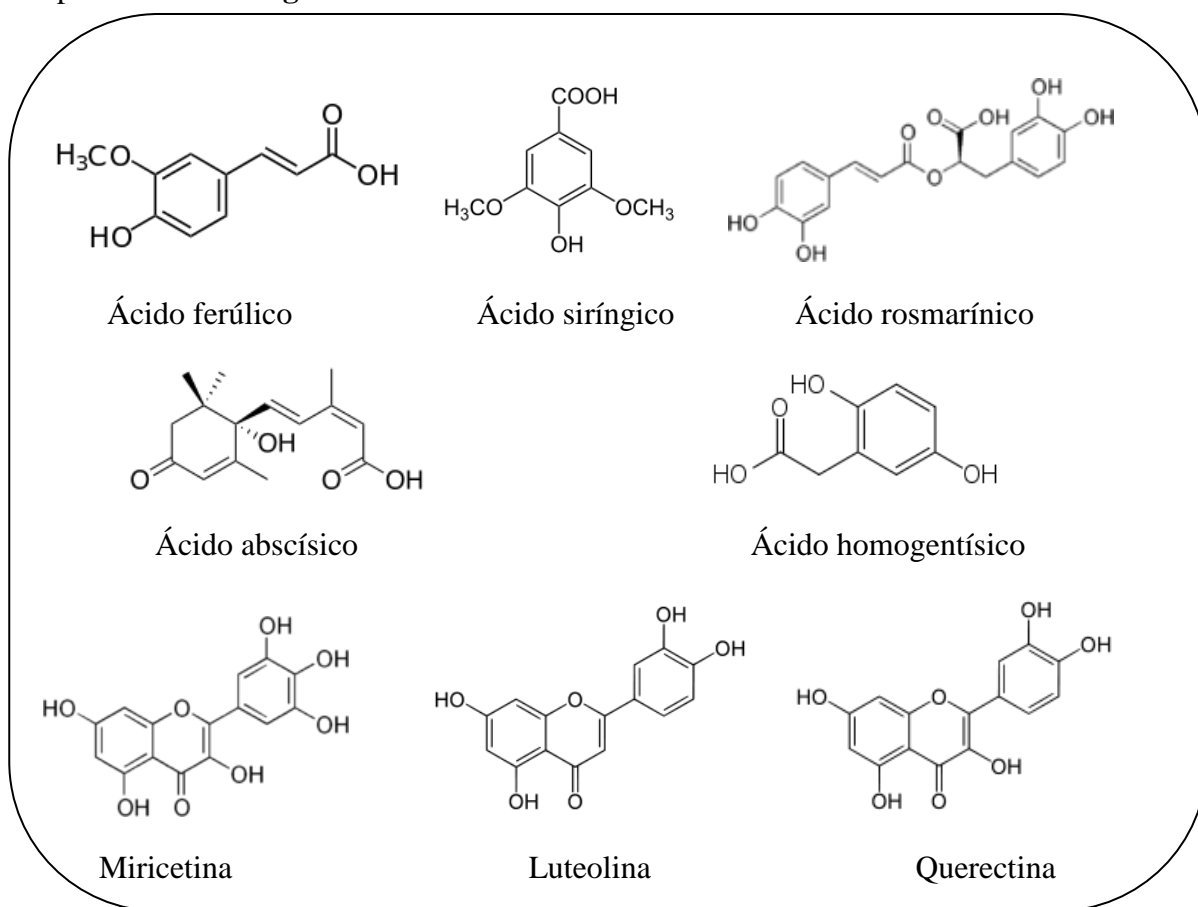
#### **2.7.2.2. Análise do perfil de substâncias fenólicas no mel**

As principais fontes das substâncias fenólicas presentes nos méis são as plantas. Essas substâncias bioativas podem ser transferidas para o mel a partir do néctar das plantas

conferindo ao mel diferentes características e propriedades. Isto é devido ao fato de que estas substâncias são metabólitos secundários não voláteis e estáveis, que parecem ser relativamente pouco afetadas por fatores ambientais (FERRERES, *et al.*, 1994a). Por esta razão, algumas destas substâncias têm sido sugeridas como “marcadores” na determinação de um mel específico: canferol em mel de rosmaninho (TOMÁS-BARBERÁN, *et al.*, 2001), ácido abscísico em mel de urze (FERRERES *et al.*, 1996b), hesperetina em mel citros (FERRERES *et al.*, 1993), luteolina em lavanda, quercetina no mel de girassol (YAO *et al.*, 2003).

Um grande número de substâncias orgânicas tem sido determinado como constituintes de diferentes tipos de mel, mas as pesquisas são em sua maioria voltadas para encontrar biomarcadores específicos ou não-específicos. Entre os componentes detectados por cromatografia líquida, o mais comum são as substâncias fenólicas (KAŠKONIENE & VENSKUTONIS DE, 2010; TUBEROSO *et al.*, 2011b; TUBEROSO *et al.*, 2011a).

As estruturas de algumas substâncias fenólicas presentes em méis estão apresentadas na **Figura 9**.



**Figura 9.** Substâncias fenólicas identificadas no mel

Tem sido relatado que a composição do mel depende da fonte floral, no entanto, fatores sazonais e ambientais, bem como o processamento, também podem ter um efeito sobre a composição das substâncias fenólicas presentes no mel (FRANKEL *et al.*, 1998; GHELDOF & ENGESETH 2002; GHELDOF *et al.*, 2002 ; SCHRAMM *et al.*, 2003 ; YAO *et al.*, 2003 ). Alguns estudos têm sugerido possíveis correlações entre a origem floral e perfis de flavonoides (ANKLAM 1998; YAO *et al.*, 2004a).

Segundo TOMÁS-BARBERÁN e colaboradores (2001) a quercetina foi sugerida como um marcador para o mel de girassol; o 8-metoxi canferol foi o principal componente do mel de alecrim (FERRERES *et al.*, 1994a); a hesperitina como marcador de mel citrus (FERRERES *et al.*, 1993); a naringenina (ANDRADE *et al.*, 1997b) e luteolina ( FERRERES *et al.*, 1994a) foram sugeridos como marcadores de mel de lavanda.

A origem geográfica do mel é outro fator importante que inflênciia a composição dos constituintes fenólicos, por exemplo, méis de castanheiros e citros coletados em diferentes regiões da Europa foram caracterizados por diferentes substâncias (FERRERES *et al.*, 1993,1994b; DIMITROVA *et al.*,2007; HADJMOHAMMADI *et al.*, 2009) .

Assim, há grande espaço para o desenvolvimento de métodos de quantificação de acordo com o perfil de substâncias fenólicas estudadas (LIU *et al.*, 2008). Têm sido propostos vários métodos analíticos para a separação, determinação e quantificação de substâncias fenólicas, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia em fase gasosa (CG), ou suas combinações, com espectrometria de massa (ZUO *et al.*, 2002), geralmente, os dois métodos mais aplicados na quantificação e identificação dessas substâncias (HERTOG *et al.*, 1992; JUSTESEN *et al.*, 1998; MERKEN & BEECHER , 2000).

Muitos autores têm demonstrado que a CLAE-DAD e CG-EM têm sido úteis para a caracterização da origem botânica do mel (CUEVAS-GLÓRIA *et al.*, 2007; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 2001).

A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica mais utilizada para separação e quantificação dos constituintes fenólicos (NACZK & SHAHIDI, 2004). Vários fatores afetam a análise por CLAE, incluindo a purificação da amostra, a fase móvel, os tipos de colunas e os detectores usados (STALIKAS, 2007). Em geral, as análises das substâncias fenólicas no mel são realizadas por cromatografia líquida com coluna de fase reversa (octadesil- C18), detector de arranjo de fotodiodos (DAD) e solventes orgânicos polares misturados a água acidificada (IGNAT *et al.*, 2011). Vários estudos estão disponíveis destacando a aplicação de CLAE na quantificação de substâncias fenólicas (STALIKAS,

2007; ROBBINS, 2003; KALILI & VILLIERS, 2011; FLAMINI, 2003; MERKEN & BEECHER, 2000, ZHOU *et al.*, 2014a; KUS *et al.*, 2014; ESCRICHE *et al.*, 2014).

Alem dessas técnicas, a espectrometria de massa (EM) com ionização por eletrospray (ESI) ou ionização química a pressão atmosférica (APCI) tem sido empregada para análise quantitativa e confirmação estrutural, como por exemplo, na determinação da massa molecular de flavonoides (EDENHARDER *et al.*, 2001).

O nosso grupo de pesquisa vem estudando méis brasileiros de *Apis mellifera* e caracterizando a composição e o perfil das substâncias fenólicas nessas amostras por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD). Até o momento, foram estudados méis de eucalipto e silvestre dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo (DA SILVA, 2004; **Tabela 4**), méis de assa-peixe, silvestre e macieira de Mato Grosso, Paraná, Pernambuco, São Paulo e Minas Gerais (MONTAGNI, 2005; **Tabela 5**), méis de laranjeira, silvestre e eucalipto do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (LIANDA, 2004 e 2009, **Tabelas 6 e 7**), méis de assa-peixe e eucalipto de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santos (VIANNA, 2010; **Tabela 8**) e méis assa peixe, cambará e morrão de candeia (SALGUEIRO, 2012; **Tabela 9**).

**Tabela 4** - Substâncias fenólicas identificadas nos méis de eucalipto e silvestre (DA SILVA, 2004).

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
<b>Eucalipto</b>	<b>Ácidos:</b> gálico, vanílico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico e cinâmico.
<b>Silvestres</b>	<b>Ácidos:</b> gálico, vanílico, clorogênico, <i>o</i> -cumárico, cinâmico e <i>o</i> -metoxi-cinâmico.

**Tabela 5** - Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestre, assa-peixe e macieira (MONTAGNI, 2005).

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
Silvestre	<p><b>Ácidos:</b> gálico, protocatecuico, vanílico, clorogênico, <i>m</i>-cumárico, <i>p</i>-cumárico, cinâmico, <i>p</i>-metoxi-benzóico, <i>p</i>-metoxicinâmico e <i>p</i>-hidroxibenzóico,</p> <p><b>Flavonoides:</b> quercetina, hesperidina e rutina</p>
Assa-peixe	<p><b>Ácidos:</b> gálico, protocatecuico, vanílico, <i>m</i>-cumárico, cinâmico, <i>p</i>-metoxi-benzóico, <i>m</i>-metoxi-cinâmico, <i>p</i>-hidroxi-benzóico,</p> <p><b>Flavonoides:</b> quercetina e rutina</p>
Macieira	<p><b>Ácidos:</b> <i>p</i>-hidroxi-benzóico, <i>p</i>-cumárico e <i>p</i>-metoxi-benzóico.</p> <p><b>Flavonoide:</b> quercetina</p>

**Tabela 6** - Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres e laranjeira (LIANDA, 2004).

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
Silvestre	<p><b>Ácidos:</b> <i>p</i>-metoxi-benzóico, <i>m</i>-metoxi-cinâmico, <i>p</i>-hidroxi-benzóico, protocatecuico, gálico, vanílico, sinápico e <i>p</i>-cumárico</p> <p><b>Flavonoides:</b> morina e quercetina</p>
Laranjeira	<p><b>Ácidos:</b> <i>p</i>-hidroxi-benzóico, vanílico, <i>p</i>-cumárico, gálico, sinápico, siríngico, protocatecuico, <i>p</i>-cumárico, cinâmico e <i>m</i>-metoxi-cinâmico.</p> <p><b>Flavonoides:</b> morina, quercetina e rutina</p>

**Tabela 7** - Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, laranjeira e eucalipto (LIANDA, 2009).

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
<b>Silvestre</b>	<b>Ácidos:</b> protocatecuico, <i>p</i> -hidroxi-benzóico, <i>p</i> -cumárico, <i>p</i> -metoxi-benzóico, vanílico e cinâmico. <b>Flavonoides:</b> quercetina, morina, isoquercetina e canferol.
<b>Laranjeira</b>	<b>Ácidos:</b> <i>p</i> -hidroxi-benzóico, protocatecuico, vanílico, <i>p</i> -cumárico e cinâmico. <b>Flavonoides:</b> isoquercetina e quercetina.
<b>Eucalipto</b>	<b>Ácidos:</b> protocatecuico, <i>p</i> -hidroxibenzóico, siríngico, vanílico e cinâmico. <b>Flavonoide:</b> tricetina.

**Tabela 8** - Substâncias fenólicas identificadas nos méis assa-peixe e eucalipto (VIANNA, 2010).

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
<b>Assa peixe</b>	<b>Ácidos:</b> <i>p</i> -hidroxi-benzóico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico <i>p</i> -metoxi-benzóico, cinâmico, gálico, protocatecuico, caféico e cinâmico <b>Flavonoides:</b> narigenina, tricetina e apigenina
<b>Eucalipto</b>	<b>Ácidos:</b> gálico, <i>p</i> -hidroxi-benzóico, vanílico, <i>p</i> -cumárico, ferúlico, <i>p</i> -metoxi-benzóico, cinâmico, protocatecuico e caféico. <b>Flavonoides:</b> tricetina, narigenina, canferol, miricetina e apigenina.

**Tabela 9** - Substâncias fenólicas identificadas nos méis assa-peixe, camarão e morrão de candeia (SALGUEIRO, 2012).

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
Assa peixe	<b>Ácidos:</b> gálico, protocatecuico, ferúlico, <i>p</i> -cumárico, benzóico, <i>p</i> -metoxi-benzóico e cinâmico. <b>Flavonoides:</b> naringerina e crisina.
Cambará	<b>Ácidos:</b> gálico, siríngico, <i>m</i> -cumárico, ácido benzóico, cinâmico e <i>m</i> -metoxi-cinâmico, <b>Flavonoides:</b> naringerina, crisina e galangina
Morrão de candeia	<b>Ácidos:</b> gálico, <i>p</i> -hidroxi-benzóico, 2,4 diidroxibenzóico, siríngico, <i>p</i> -cumárico, <i>m</i> -cumárico e benzóico. <b>Flavonoides:</b> naringerina e galangina

### 2.7.2.3. Análise Multivariada em dados de Ressonância Magnética Nuclear

Entre os métodos analíticos utilizados para caracterizar alimentos, nas últimas décadas a ressonância magnética nuclear (RMN) alcançou aceitação geral como um poderoso método devido às suas características não invasivas, alta reprodutibilidade e sensibilidade, rapidez, o preparo da amostra é quase insignificante e pela possibilidade de fornecer informações sobre uma gama de metabólitos em um único experimento (LOLLI *et al.*, 2008; BOFFO *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2014).

A ressonância magnética nuclear é uma técnica poderosa usada para obter informação estrutural (SCHIEVANO *et al.*, 2010; BOFFO *et al.*, 2012), e, portanto, pode ajudar a compreender a estrutura das substâncias presentes em matrizes complexas como a de alimentos. Essa técnica tem sido amplamente aplicada para identificar substâncias orgânicas em amostras de alimentos, tais como sucos de frutas, vinhos e mel (CAZOR *et al.*, 2006; LOLLI *et al.*, 2008; BERTELLI *et al.*, 2010; KOSIR & KIDRIC, 2011; CONSONNI *et al.*, 2012).

Em geral, essa técnica tem sido frequentemente aplicada no controle de qualidade de alimentos sendo estes analisados na forma bruta, no caso de amostras líquidas ou solubilizados (BELTON *et al.*, 1996), porém procedimentos de extração podem ser utilizados (SCHIEVANO *et al.*, 2008; SCHIEVANO *et al.*, 2013). Recentemente, a técnica de RMN foi proposta para identificar e classificar méis de diferentes fontes florais (BERETTA *et al.*, 2008; LOLLI *et al.*, 2008; SCHIEVANO *et al.*, 2010) ou origens geográficas (DONARSKI *et al.*, 2008; CONSONNI & CAGLIANI, 2008) e verificar

possíveis adulterações (COTTE *et al.*, 2007; MAZZONI *et al.*, 1997). Uma das principais vantagens desta técnica é que a informação estrutural e quantitativa pode ser obtida para uma variedade de espécies químicas em uma única experiência de RMN. No caso do mel, a diferenciação botânica ou geográfica foi baseada na composição dos carboidratos. Consonni e Cagliani (2008) mostraram que este parâmetro pode ser usado para distinguir méis de diferentes origens geográficas e sugeriram a possibilidade de separar mel de acácia e mel polifloral. Segundo que para esses autores o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  foi sugerido ser o melhor núcleo para análise da composição dos carboidratos presentes.

Lolli e colaboradores (2008) classificaram amostras de diferentes origens botânicas, utilizando experimentos bidimensional (2D-HMBC) juntamente com análise estatística multivariada, através da dissolução das amostras em água ou DMSO.

Em outro estudo de RMN, conduzido a 300 MHz, um procedimento de extração em fase sólida, acoplados a RMN de  $^1\text{H}$ , com a análise quimiométrica, foi aplicado a extratos metanólicos de mel, como tentativa de buscar marcadores confiáveis para a origem botânica. Neste trabalho, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos orgânicos puderam ser utilizados como uma "impressão digital" para diferenciar a origem botânica do mel (BERETTA *et al.*, 2008). O uso de campo magnético elevado também permitiu a identificação e caracterização de alguns desses compostos como marcadores botânicos.

Apesar do aumento crescente de trabalhos utilizando essa técnica na última década, o número de méis de diferentes origens florais e o número total de amostras investigadas têm sido insuficientes para construir um modelo de discriminação para análises de rotina.

Em virtude da espectroscopia de RMN fornecer uma riqueza de informação sobre a composição de uma matriz, tornando muitas vezes o espectro obtido complexo para ser analisado diretamente, a análise multivariada tem sido aplicado diretamente sobre os dados espectrais para extrair informações úteis. Dados de RMN combinados com análise quimiométrica vem sendo utilizados para verificação da autenticidade de diversos alimentos, incluindo o controle de qualidade do mel (LOLLI *et al.*, 2008; BERETTA *et al.*, 2008; BOFFO *et al.*, 2009a; BOFFO *et al.*, 2009b; BOFFO *et al.*, 2012; CONSONNI & CAGLIANI, 2008; PRESTES *et al.*, 2007; SCHIEVANO *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2014).

Na literatura tem sido proposto por diversos pesquisadores muitos parâmetros, incluindo pH, teor de cinzas, cor, teor de prolina, aminoácidos, análise de sacarídeos, e análise melissopalínológica para a classificação de méis (CONSONNI *et al.*, 2013; KAHRAMAN *et al.*, 2010; SAXENA *et al.*, 2010; TERRAB *et al.*, 2004). Recentemente,



no entanto, os métodos de controle de qualidade, em conjunto com a análise estatística multivariada, têm sido utilizados com sucesso para classificar o mel de diferentes origens geográficas, detectar adulteração, e descrever suas características fitoquímicas (SANDUSKY & RAFTERY, 2005; CORBELLA & COZZOLINO, 2006; PUSCAS *et al.*, 2013; SERRANO *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2014).

Méis italianos foram classificados com base em seus espectros de RMN e análise multivariada. Foi sugerido que o perfil dos açúcares pode ser usado para caracterizar amostras de mel específico. A espectroscopia de RMN juntamente com análise de componentes principais (PCA) foi aplicada a análise de sacarídeos para a construção de uma “impressão digital” para cada fonte floral. A ideia do uso de PCA nesses trabalhos reduziu os conjuntos de dados originais (espectros de RMN bruto) para um número menor de variáveis independentes. PCA pode identificar tendências ou características dentro dos dados de RMN (LOLLI *et al.*, 2008; CONSONI *et al.*, 2012; JAMROZ *et al.*, 2013)

Em trabalho descrito por Ohmenhaeuser e colaboradores (2013) foi utilizada a espectroscopia de RMN associada à quimiometria como ferramenta na identificação da origem botânica e na quantificação dos constituintes majoritários para 328 amostras de méis da Alemanha.

No trabalho descrito por Schievano e colaboradores (2010) foi apresentado um estudo de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos de clorofórmio associado à análise quimiométrica para 118 amostras de mel de quatro origens botânicas diferentes (castanha, acácia, tília, e silvestre).

Recentemente, Ribeiro e colaboradores (2014) investigaram as mudanças na distribuição de água, por meio de medidas do tempo de relaxamento em RMN de  $^1\text{H}$  em campo baixo (LF  $^1\text{H}$  NMR), associado com medidas físicas e químicas de pH, atividade de água, cor e água, açúcar e teor de cinzas para classificar méis brasileiros de diferentes origens florais.

Além disso, nos últimos anos, a redução da produção e consequente aumento nos preços de mercado têm incentivado práticas de adulteração do mel. Geralmente, o processo de adulteração/falsificação é feito com a adição de açúcares comerciais, como glicose comercial, solução ou xarope de sacarose, melado e solução de sacarose invertida (DEVILLERS *et al.*, 2004). Este procedimento falsificação / adulteração é muitas vezes difícil de ser detectado, devido ao fato da composição dos açúcares destes xaropes apresentarem um perfil próximo do mel autêntico. Nesse caso, a técnica de RMN pode ser utilizado na determinação da autenticidade dos alimentos, através das medidas de razão

isotópica,  $^2\text{H}/^1\text{H}$ , em abundância natural, para sítios moleculares específicos. Esta verificação é feita utilizando a técnica de SNIF-RMN. Estudos realizados por Boffo (2009a) utilizou essa técnica para determinar a autenticidade de méis e aguardentes do estado de SP, mostrando ser uma técnica promissora na determinação da autenticidade dos alimentos.

### 2.7.3 Análise Multivariada de dados

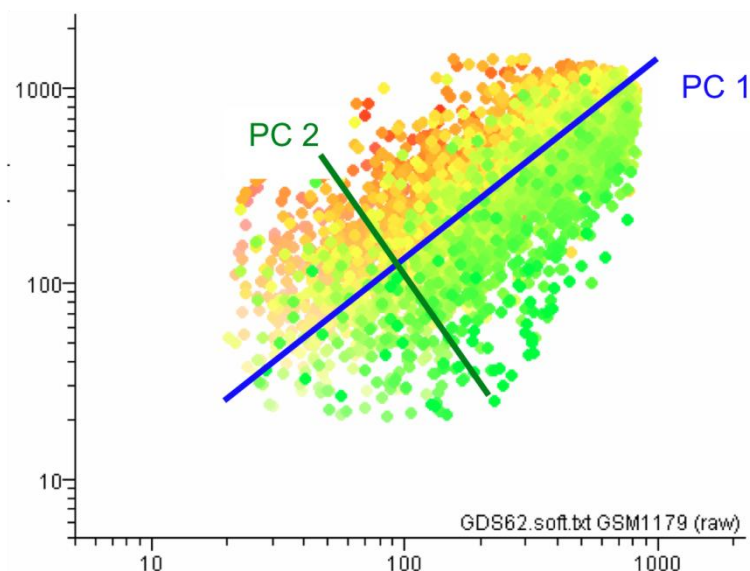
A quimiometria é um modelo matemático multivariado baseado na álgebra linear que pode ser aplicado a análise de alimentos através da correlação de variáveis.

Na literatura encontram-se diversos trabalhos relacionados ao mel, que utilizaram a quimiometria como ferramenta para tratamento dos dados. Os objetivos desses trabalhos foram relacionar características físico-químicas e a composição química das amostras de méis com a origem botânica e/ou geográfica. Além disso, alguns desses tratamentos matemáticos foram aplicados como ferramentas para avaliar a autenticidade do mel (ARVANITOYANNIS *et al.*, 2005; ROSHAN *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2014b; KARABAGIASA *et al.*, 2014). A aplicação de análise multivariada de dados e, em particular, análise de componentes principais (PCA) (TERRAB *et al.*, 2001; SIVAKESAVA & IRUDAYARAJ, 2002), análise de variáveis canônicas (CLA) (GILBERT *et al.*, 1981; PARADKAR *et al.*, 2002), método dos mínimos quadrados parciais (PLS) (DVASH *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2010; GALLARDO-VELÁZQUEZ *et al.*, 2009), regressão por componentes principais (PCR) (DVASH *et al.*, 2002), análise discriminante linear (LDA) (SIVAKESAVA & IRUDAYARAJ, 2002), e modelagem independente e flexível por analogia de classe (SIMCA) (GALLARDO-VELÁZQUEZ *et al.*, 2009) revelaram ser extremamente úteis para agrupar e detectar méis de diferentes origens.

A análise dos componentes principais (*principal component analysis* - PCA) é definida matematicamente como uma transformação linear ortogonal que modifica o sistema de coordenadas de um sistema de dados de forma que a maior variância de qualquer projeção dos dados se encontra na primeira coordenada (primeiro componente principal), a segunda maior variância na segunda coordenada, e assim por diante. (PIROUETTE, 2008).

A análise por PCA identifica as direções nas quais a nuvem de dados mais se estende. Se a nuvem possuir uma forma elipsóide (**Figura 10**), a principal direção seria ao

longo do eixo principal e esta direção (um dos novos eixos do sistema de coordenadas) é chamada de primeiro componente, ou componente principal. A próxima direção a ser selecionada deve ser ortogonal a primeira e conter a maior extensão da nuvem possível. Os dados são então representados neste sistema bidimensional de coordenadas e, desta forma, surgem padrões e correlações que não eram aparentes no espaço  $n$ -dimensional (**Figuras 10**)



**Figura 10:** Nuvem de dados com formato elipsóide e seus dois componentes principais (PC1 e PC2). Fonte: Agilent Technologies, Inc. 2005.

A análise de agrupamento hierárquicos (Análise de *cluster*) é uma ferramenta excelente para análise preliminar de dados, sendo útil para determinar a semelhança entre as amostras.

Este método relaciona as amostras de forma que as mais semelhantes são agrupadas entre si com relação às variáveis usadas no processo de agrupamento. Cada amostra é representada como um ponto no espaço  $m$  variáveis e, portanto, a questão fundamental reside em transformar a informação de um espaço  $m$ -dimensional para um espaço bidimensional. O parâmetro usado neste processo é a medida entre as amostras. Estas distâncias, quando visualizadas através de diagramas conhecidos por dendogramas, indicam as amostras mais semelhantes entre as mesmas (PIROUETTE, 2008).

Em trabalho desenvolvido por Domínguez e colaboradores (2014) foi proposta uma classificação da origem geográfica de amostras de mel da Argentina usando um sistema de fluxo de lotes com base em imagem digital. Para isso os autores empregaram uma “webcam” simples para captar imagens. Nesta metodologia, a informação analítica foi

gerada a partir de histogramas de cor obtidos a partir das imagens digitais empregando diferentes modelos de cores (vermelho-verde-azul, matiz-saturação-brilho e tons de cinza). Três ferramentas quimiométricas foram empregados para a classificação da origem geográfica: SPA-LDA (análises de projeções sucessivas - algoritmo discriminante linear), modelo SIMCA (“Soft independent modeling by class analogy”) e PLS-DA (análise de quadrados mínimos parciais-discriminantes). O método proposto foi uma boa opção para ser usado em laboratórios de controle de qualidade para a classificação das amostras de mel de acordo com sua origem geográfica.

Assim, além dos métodos usuais, a combinação de dados de RMN e análise quimiométrica também pode dar resultados interessantes para fins de autenticação relacionadas ao produto mel, tal como já foi demonstrado em trabalhos da literatura (BERETTA *et al.*, 2008; BOFFO *et al.*, 2009a; CONSONNI & CAGLIANI, 2008; SCHIEVANO *et al.*, 2010; OHMENHAEUSER *et al.*, 2013). A quimiometria associado à espectroscopia FTIR (KELLY *et al.*, 2004; SIVAKESAVA & IRUDAYARAJ, 2001; ESCUREDO *et al.*, 2013) e a HPLC (COTTE *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2014a) também têm sido aplicados com sucesso para o estudo de mel.

### 3. OBJETIVO GERAL

Avaliar os parâmetros físico-químicos, a origem botânica, as substâncias bioativas e capacidade antioxidante de quarenta e cinco méis de *Apis mellifera* provenientes de diferentes regiões do sudeste brasileiro.

#### 3.1. Objetivos específicos

- Identificar os tipos polínicos e a origem botânica dos méis.
- Analisar as amostras de mel quanto aos seguintes parâmetros físico-químicas: teor de HMF e a cor utilizando método espectrofotométrico, pH e acidez livre.
- Determinar o conteúdo de fenólicos totais pelo método colorimétrico de Folin Denis e o conteúdo de flavonoides totais, através do método de complexação com cloreto de alumínio para as amostras de méis *in natura* e seus extratos.
- Avaliar o potencial antioxidante dos méis *in natura* através do método de captura de radicais livres (DPPH), e para os extratos através de três métodos: DPPH, ABTS e FRAP.

- Determinar a composição química dos extratos de mel através da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD).
- Aplicar os métodos de análise exploratória, PCA e HCA, aos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e CLAE-DAD para verificar quais substâncias são responsáveis pela diferenciação dos méis.
- Discriminar os tipos de méis quanto à origem floral e/ou geográfica aplicando-se a quimiometria aos resultados de RMN e CLAE-DAD.

#### 4- PARTE EXPERIMENTAL:

##### 4.1 - Material e Métodos

Os solventes utilizados para os ensaios espectrofotométricos e análises cromatográficas foram metanol de grau espectroscópico (VETEC-RJ) e água ultrapura (purificador Milli-Q -Millipore).

Reagentes, sais, ácidos minerais e bases foram obtidos da Vetec e usados sem purificação prévia.

Os reagentes: carbonato de sódio anidro, cloreto de alumínio hexaidratado, tungstato de sódio diidratado, ácido fosfomolibdico, ácido fosfórico, ferrocianeto de potássio, acetato de zinco, bissulfito de sódio foram comprados da VETEC (RJ, Brasil). Enquanto os reagentes 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)[ABTS] e Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich (USA).

A separação cromatográfica em coluna aberta utilizou resina Amberlite XAD-2 (copolímero de estireno e divinilbenzeno, com poro 9 nm e partícula 0,3–1,2 mm), obtida comercialmente da Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

Os padrões de ácido gálico, quercetina, ácido vanílico, HMF, ácido protocatecuico, ácido *p*-hidroxi-benzóico, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-metoxi-benzóico, ácido cinâmico, naringerina, ácido abscísico, canferol, luteolina, hesperidina e galangina utilizados para a comparação dos dados por CLAE-DAD foram obtidos pela Sigma-Aldrich (USA).

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  foram registrados em um espectrômetro Bruker Avance 500 MHz (Bruker Biospin GmbH Rheinstetten, Karlsruhe, Alemanha) equipado com uma sonda 5 mm e gradiente. Os extratos foram solubilizados em 600  $\mu\text{L}$  de metanol deuterado (Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 99,9 átomo% D, Andover, Estados Unidos). Todos os espectros foram registrados a  $298 \pm 0.1$  K, com 10330 Hz de largura espectral, 32 k pontos de dados, 16 transientes e ganho do receptor constante. Todos os espectros obtidos foram processados em grupo utilizando o software ACD / Spec Manager (ACD Laboratories, versão 12.0, Toronto, Canadá).

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Shimadzu constituído por duas bombas série LC-20AT, detector de arranjo de diodos (série SPD-M20A) e injetor Rheodyne 7125i com loop de 20  $\mu\text{L}$ . O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito através do software LCSolution (Shimadzu).

A fase móvel utilizada na análise por CLAE foi composta de água ultrapura, metanol e ácido acético graus espectroscópicos (VETEC, RJ, Brasil). A fase móvel foi filtrada através de uma membrana de nylon 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius) para remover todas as impurezas

As leituras de absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (NOVA 2000UV, Novainstruments, São Paulo) e as determinações de pH foram realizadas em pHmêtro (Analyser pH 300, Fisatom, São Paulo). Os ensaios com DDPH foram determinados em leitor de microplacas ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay), modelo 680 Microplate Reader (Bio-Rad, São Paulo, Brasil).

As frações contendo as substâncias fenólicas foram separadas por cromatografia em coluna usando resina Amberlite XAD-2 (copolímero de estireno e divinilbenzeno, com poro 9 nm e partícula 0,3–1,2 mm), obtida comercialmente da Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

#### **4.2 - Amostras de Méis**

As amostras de méis de abelhas *Apis mellifera* de diferentes origens florais foram obtidas do comércio e/ou diretamente de apicultores de diferentes regiões do sudeste do Brasil. (**Tabela 10**). Os méis analisados foram obtidos na forma centrifugada.

**Tabela 10** - Amostras de méis de silvestres(S), assa-peixe(AS), Laranjeira(L), eucalipto(E) e morrão de candeia(M) estudadas neste trabalho.

<b>Código da Amostra</b>	<b>Tipo de mel</b>	<b>Origem Floral</b>	<b>Data da coleta</b>	<b>Origem Geográfica</b>
S1	silvestre	<i>Heterofloral</i>	1/2008	Rio Preto -MG
S2	silvestre	<i>Heterofloral</i>	3/2010	P do Sul-RJ
S3	silvestre	<i>Heterofloral</i>	1/2009	Maricá -RJ
S4	silvestre	<i>Heterofloral</i>	11/2011	MG
S5	silvestre	<i>Heterofloral</i>	07/2011	RJ
S6	silvestre	<i>Heterofloral</i>	09/2011	Espírito Santo
AS1	assa-peixe	<i>Vernonia</i>	10/2011	Pinheral-RJ
AS2	assa-peixe	<i>Vernonia</i>	09/2011	Volta Redonda-RJ
AS3	assa-peixe	<i>Vernonia</i>	08/2009	MG
AS4	assa-peixe	<i>Vernonia</i>	10/2011	RJ
AS5	assa-peixe	<i>Vernonia</i>	10/2011	MG
AS6	assa-peixe	<i>Vernonia</i>	11/2011	MG
AS7	assa-peixe	<i>Vernonia</i>	11/2011	MG
AS8	assa-peixe	<i>Vernonia</i>	09/2011	MG
AS9	assa-peixe	<i>Vernonia</i>	09/2011	MG
L1	Laranjeira	<i>Citrus</i>	10/2011	MG
L2	Laranjeira	<i>Citrus</i>	09/2011	RJ
L3	Laranjeira	<i>Citrus</i>	08/2011	MG
L4	Laranjeira	<i>Citrus</i>	07/2011	MG
L5	Laranjeira	<i>Citrus</i>	09/2011	MG
L6	Laranjeira	<i>Citrus</i>	03/2012	MG
L7	Laranjeira	<i>Citrus</i>	05/2012*	SP
L8	Laranjeira	<i>Citrus</i>	04/2012	MG
L9	Laranjeira	<i>Citrus</i>	04/2012	SP
E1	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	9/2011	RJ
E2	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	04/2009	Paracambi-RJ
E3	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	02/2009	M Pereira-RJ
E4	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	07/2009	P Alferes-RJ
E5	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	08/2009	B Pirai-RJ
E6	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	07/2009	Campos-RJ
E7	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	12/2009	P Alferes-RJ
E8	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	07/2012*	P Alferes-RJ
E9	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	04/2009	Itaipava, Petrópolis
E10	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	02/2011	Sapucaia-RJ
E11	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	06/2012*	P Alferes-RJ
E12	eucalipto	<i>Eucalyptus</i>	09/2011	Valença-RJ
M1	Morrão de candeia	<i>Croton</i>	01/2009	P Alferes-RJ
M2	Morrão de candeia	<i>Croton</i>	01/2009	P do Sul-RJ
M3	Morrão de candeia	<i>Croton</i>	01/2010	P do Sul-RJ
M4	Morrão de candeia	<i>Croton</i>	01/2009	P do Sul-RJ
M5	Morrão de candeia	<i>Croton</i>	01/2009	P do Sul-RJ
M6	Morrão de candeia	<i>Croton</i>	11/2009	P Alferes
M7	Morrão de candeia	<i>Croton</i>	12/2009	Sapucaia-RJ
M8	Morrão de candeia	<i>Croton</i>	12/2009	Sapucaia-RJ
M9	Morrão de candeia	<i>Croton</i>	01/2009	P Alferes

\* data de recebimento

### 4.3 Análise Melissopalínológica

#### 4.3.1.Preparo das lâminas

Cada amostra de mel (cerca de 10 g) foi dissolvida em 20 mL de água destilada em um béquer. Essa solução foi dividida em dois tubos de centrífuga, os quais foram centrifugados por 15 minutos (1500 a 2000 rpm). Desprezar o sobrenadante e completar

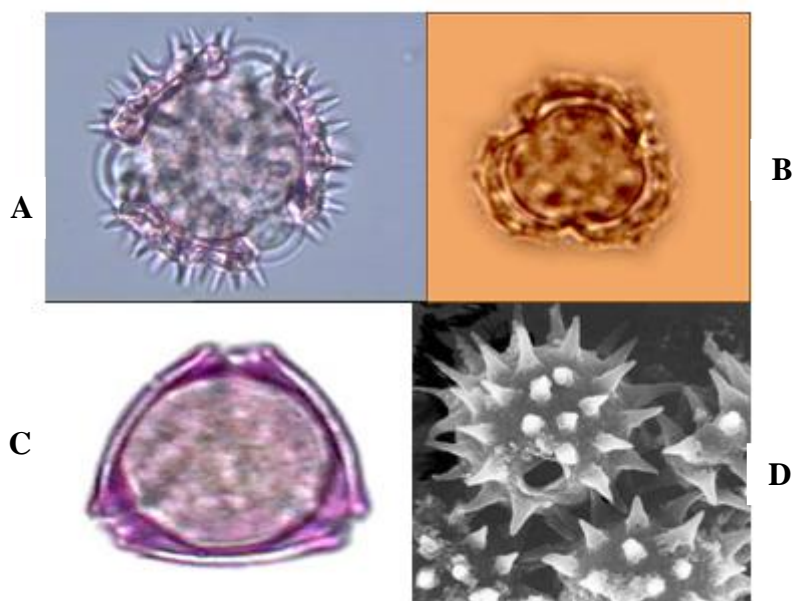
com 5mL de água destilada (em cada tubo); e submetido à centrifugação por mais 15 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante de cada tubo (virando o tubo de uma vez), adicionou-se, a cada tubo, 5 mL de solução aquosa de glicerol 50% e após repouso por 30 minutos, centrifugou-se por 15 minutos e descartou-se o sobrenadante novamente. Os tubos são deixados virados para baixo para secagem da solução de glicerol (quanto mais seco estiver o pólen extraído, mais facilmente será manuseado e melhor ficará também a lâmina para leitura). O resíduo polínico que fica no fundo do tubo, foi retirado com gelatina glicerinada, que foi espetada com alça de ponta de platina esterilizada, para ser aplicado à lâmina de microscópio. A lâmina foi colocada sobre uma placa de aquecimento a mais ou menos 40°C para derreter a gelatina contendo o pólen, em seguida, a lâmina foi vedada com lamínula e parafina. Cada amostra de mel foi preparada em três repetições. (AFIK *et al.*, 2006).

#### 4.3.2 Identificação dos tipos polínicos

A identificação do tipo polínico neste trabalho foi realizado em colaboração com a Dra. Leila Nunes Morgado e da aluna Beatriz de Oliveira Rodrigues do Laboratório (IC-Zootecnia/UFRRJ) no Laboratório ABELHA-NATUREZA, no Instituto de Zootecnia da UFRRJ, orientada pela Dra. Maria Cristina Affonso Lorenzon.

As lâminas foram observadas em microscópio para a identificação dos grãos de pólen através de sua morfologia. De acordo com a recomendação de Saá-Otero *et al.* (1993), no mínimo 300 grãos de pólen por amostra, devem ser contados e identificados para determinar a composição polínica percentual do mel (**Figura 11**). Em resumo, levando-se em consideração na análise polínica de amostras de mel a participação de pólen anemófilo e polinífero, bem como a relação quantitativa entre o pólen das plantas nectaríferas e suas propriedades de sub- e super-representação, obtêm-se um diagnóstico mais próximo à verdadeira procedência do mel (BARTH, 2004). Buscou-se verificar a dominância de no mínimo 45% de algum tipo polínico, de *Eucalyptus* (Myrtaceae), de *Citrus* (Rutaceae), assa-peixe (*Vernonia*) e Cambará (*Gochnatia*) para determinar a florada do mel; em caso contrário, classificá-lo como mel silvestre (heterofloral).





**Figura 11:** Foto de grãos de pólen de diferentes espécies vegetais( A e D: *Vernonia* , B: *Citrus*, C:*Eucalipto*)(<http://rge.fmrp.usp.br/pólen/>)

#### 4.4.Determinação espectrofotométrica da cor do mel

Para determinação da cor do mel foi utilizado o método descrito por NAAB *et al.* (2008). Este método consiste na medida de uma solução 50% (m/v) de mel em água em um espectrofotômetro a 635 nm. A amostra é diluída e homogeneizada em banho de ultrassom e os testes realizados em triplicada. As médias das absorvâncias foram convertidas para a escala Pfund pela equação  $Pfund = -38,7 + 371,39 \times Abs$ , e as amostras foram classificadas conforme a **Tabela 11**.

**Tabela 11** – Relação da cor do mel com escala de Pfund (NAAB *et al.*, 2008)

Coloração	mm Pfund	
	Mínimo	Máximo
Branco d'água	0	8
Extra branco	8,1	16,5
Branco	16,6	34
Extra âmbar claro	34,1	50
Âmbar-claro	50,1	85
Âmbar	85,1	114
Âmbar escuro	114,1	-

#### 4.5 - Determinação do teor 5-hidroximetilfurfural (HMF) no mel

Para determinação de HMF foi utilizado o método quantitativo segundo a metodologia descrita na Instrução Normativa recomendado pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 2000). Esta metodologia baseia-se no preparo da amostra para leitura espectrofotométrica feita a 284 nm e 336 nm.

##### 4.5.1 - Preparo dos Reagentes

- Solução de Carrez I: 15 g de  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  diluídos em água destilada e o volume completado para 100 mL em balão volumétrico.

- Solução de Carrez II: 30 g de  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  diluídos em água destilada e o volume completado para 100 mL em balão volumétrico.

- Solução de bissulfito de sódio 0,2% (m/v): 0,2 g de  $NaHSO_3$  diluídos em água destilada e o volume completado para 100 mL em balão volumétrico.

##### 4.5.2 – Procedimento experimental

Em um béquer, foram pesados 5,00 g do mel e adicionados cerca de 25 mL de água destilada para solubilizar, e solução foi transferida para balão volumétrico de 50 mL. Foram adicionados 500  $\mu$ L da solução de Carrez I, homogeneizando, e depois 500  $\mu$ L de solução de Carrez II, homogeneizando e completa-se o volume com água destilada. A solução foi então filtrada em papel filtro, descartando-se os primeiros 10 mL do filtrado.

Da solução filtrada, foram pipetados 5 mL para dois tubos de ensaio. No primeiro tubo foram adicionados 5 mL de solução de bissulfito de sódio 0,2% (tubo referência), no segundo foram adicionados 5 mL de água (solução teste).

As soluções foram homogeneizadas e as leituras determinadas no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 284 e 336 nm em cubeta de quartzo de 1 cm. Antes das análises realizadas em três repetições, o aparelho foi calibrado com a solução referência correspondente.

O método indica se as absorvâncias forem superiores a 0,6, deve-se diluir a solução teste (amostra) com água e a solução referência com solução de bissulfito de sódio 0,20%, na mesma proporção, e repetir a leitura.

O teor de HMF no mel, expresso em mg/Kg, é calculado pela seguinte fórmula:equação

$$\text{HMF mg/Kg} = \frac{(\text{Abs}_{284} - \text{Abs}_{336}) \times 149,7 \times 5}{P}$$

Onde:

$A_{284}$  = leitura da absorvância a 284 nm

$A_{336}$  = leitura da absorvância a 336 nm

P = massa da amostra de mel em g

Com  $F = 149,7$ , calculado através da seguinte equação:

$$F = \frac{126 \times 1000 \times 1000}{16830 \times 10 \times 5}$$

Onde: 126 = peso molecular do HMF

16830 = absortividade molar do HMF a 284nm

1000 = mg/g

10 = centilitro/litro

1000= g/Kg

5= gramas de mel

#### 4.6 - Determinação do pH e Acidez Livre

Em um béquer foram pesados 10g de mel e diluídos em água destilada até o volume de 75mL. Em seguida, o pH da solução foi determinado com o auxílio de um pHmetro previamente calibrado (pH= 4,0 e pH=7,0).

Essa mesma solução foi usada na detreminação da acidez, sendo adicionadas 2 gotas de fenolftaleína 1% e titulando-se com uma solução de hidróxido de sódio 0,05M (padronizada com biftalato de potássio) em bureta de 25 mL, até o ponto de viragem (solução levemente rósea que persiste por 10 segundos; pH 8,5) (AOAC, 2003).

A determinação da acidez livre é calculada pela aplicação da equação abaixo:

Equação: 
$$M \times V \times 100 = \text{Acidez livre meq/Kg}$$

Onde:

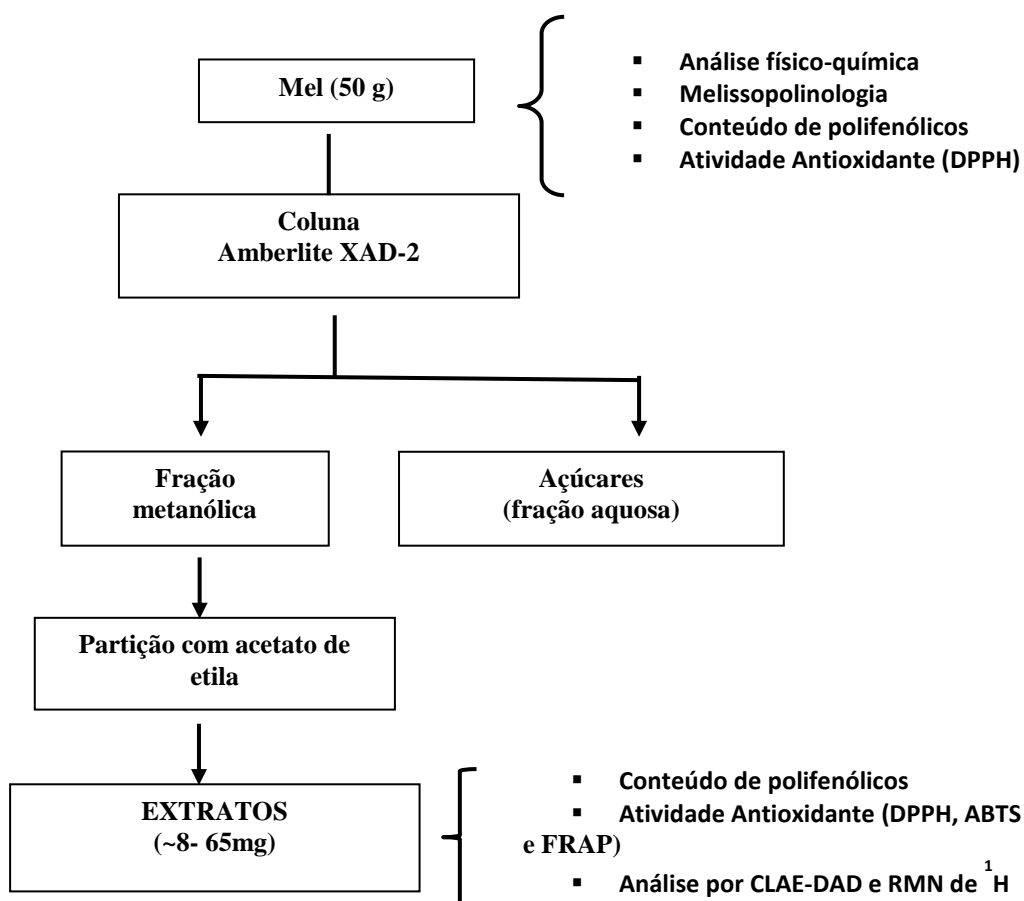
M = molaridade exata da solução de NaOH após padronização.

V = volume de solução de NaOH utilizado na titulação.

#### 4.7 Preparo dos Extratos de Mel

As substâncias fenólicas foram extraídas do mel segundo metodologia descrita previamente na literatura (FERRERES *et al*, 1994a; MARTOS *et al*, 2000; TOMÁS-BARBERÁN, *et al*, 2001) com algumas modificações (LIANDA, 2004). A amostra de mel (50 g) foi misturada com 250 mL de água destilada (ajustada a pH = 2 com ácido clorídrico concentrado) e agitada com agitador magnético, a temperatura ambiente, até completa dissolução. Em seguida, a amostra fluida foi filtrada através de algodão para eliminar possíveis partículas sólidas. O filtrado foi então misturado com 75 gramas de Amberlite XAD-2 (tamanho de poro 9 nm e de partícula 0,3-1,2 mm) e agitado por 10 minutos com agitador magnético para adsorver as substâncias fenólicas. As partículas de Amberlite em suspensão foram empacotadas em uma coluna de vidro (3,5 x 65 cm) e a coluna foi lavada com 150 mL de água acidificada (pH = 2 com HCl concentrado), e depois rinsada com 100 mL de água destilada. As substâncias fenólicas ficaram retidas na coluna enquanto os açúcares e os outros constituintes polares do mel foram eluídos. A fração fenólica adsorvida na coluna foi então eluída com 350 mL de metanol e evaporado à pressão reduzida em evaporador rotatório a 40° C (Figura 12).

O resíduo metanólico foi solubilizado em água destilada, e em seguida fez-se a extração líquido-líquido com acetato de etila (5 x 10 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, concentradas até secura em rotavapor a 40°C e pesadas para obtenção dos extratos de acetato de etila. (DA SILVA, 2004; LIANDA, 2009; MONTAGNI, 2005). O extarto foi ressolvido em metanol grau espectroscópico para ser analisado por CLAE-DAD.



**Figura 12** - Modelo esquemático do preparo dos extratos do mel.

#### 4.8 - Determinação do teor em fenólicos totais com reagente de Folin-Denis

A determinação do teor de fenólicos totais presentes nas amostras de méis e nos seus extratos foi realizada por método espectrofotométrico, utilizando o reagente de Folin-Dennis (FOLIN e DENIS, 1992), tendo o ácido gálico como substância padrão para a construção da curva analítica.

#### 4.8.1 – Preparo do reagente de Folin-Denis

Foram adicionados 20g de tungstato de sódio diidratado ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 4g de ácido fosfomolibdico ( $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4] \cdot x \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), 10 mL de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e 152 mL de água ultrapura em um balão de 250 mL e este acoplado a um condensador de refluxo. A mistura reacional ficou sob refluxo por duas horas e posteriormente seu volume foi completado com água ultrapura até 200 mL. A solução apresentou coloração esverdeada e foi armazenada em frasco âmbar, sob refrigeração até o momento do uso (LIANDA, 2009).

#### 4.8.2 - Procedimento Experimental

Para cada amostra de mel *in natura* foram preparadas soluções na concentração de 100 mg/mL em água ultrapura e para determinação do teor nos extratos de mel foram preparadas soluções na concentração de 2 mg/mL em metanol espectroscópico.

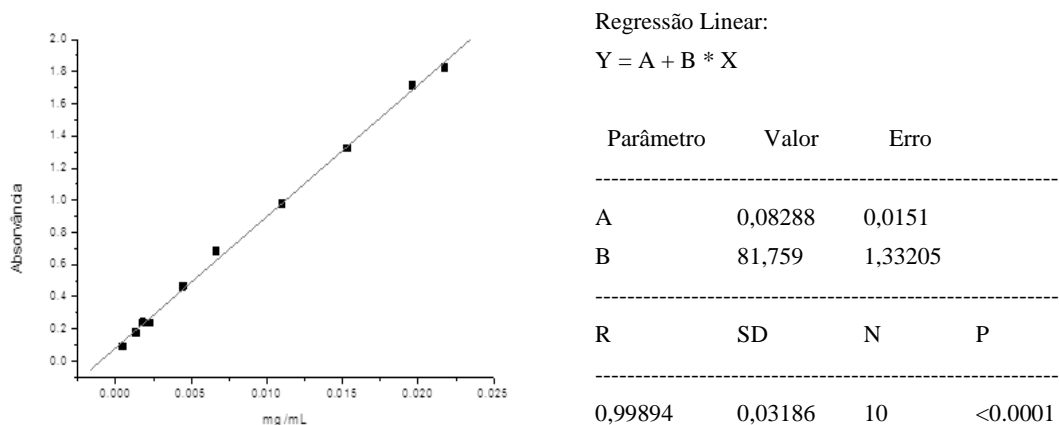
A uma alíquota de 0,5 mL dessa solução adicionou-se 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de uma solução aquosa 14% de carbonato de sódio, recém-preparada. A mistura reacional ficou em repouso por 2h, e onde se observou a mudança da coloração da solução de esverdeada para azul. Em seguida, fez-se a leitura da sua absorvância a 760 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e água ultrapura como branco (PÉREZ *et al.*, 2007).

Uma solução de ácido gálico foi utilizada para construção da curva de calibração e o teor de fenólicos totais foram calculados e expressos como mg de equivalentes em ácido gálico por 100 g de mel (mg EAG/100 g). As análises foram realizadas em três repetições.

#### 4.8.3 - Construção da curva analítica do ácido gálico

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução metanólica do padrão de ácido gálico (100  $\mu\text{L}/\text{ml}$ ). Alíquotas de 2, 6, 8, 10, 20, 30, 50, 75 e 100  $\mu\text{L}$  desta solução mãe foram misturadas com 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução aquosa 14% de carbonato de sódio, recém-preparada. As leituras foram feitas a 760 nm, utilizando-se água ultrapura como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0, e sua equação foi definida como  $Y = 0,083 + 81,759 \cdot X$ , onde Y é a absorvância a 760 nm, X é a concentração de ácido gálico. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,999 (**Figura 13**). Através dessa equação

determinou-se indiretamente o teor de fenóis totais nas amostras (concentração X), substituindo Y pela média das absorvâncias de cada amostra de mel. Todas as análises foram realizadas em três repetições.



**Figura 13** - Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico versus as absorvâncias (760 nm) para os ensaios de Folin-Denis.

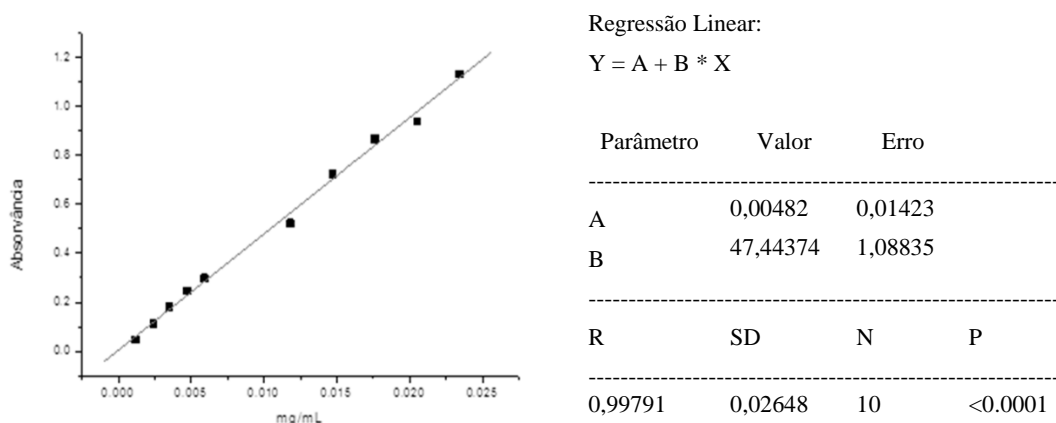
#### 4.9 - Determinação do teor em flavonoides totais com cloreto de alumínio

Para a determinação do conteúdo de flavonoides totais nos méis e nos seus extratos foi empregado o método colorimétrico com cloreto de alumínio, com algumas modificações (MEDA *et al.*, 2005; AHN *et al.*, 2007). Foram preparadas as soluções de mel a 100 mg/ mL com metanol grau espectroscópico: água ultrapura (1:1), enquanto para os extratos de mel foram preparadas soluções na concentração de 2 mg/mL em metanol grau espectroscópico.

A 2,0 mL da solução de mel foram adicionados 2,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso os valores de absorvâncias foram lidos em espectrofotômetro a 415 nm, utilizando metanol como branco. A quercetina foi utilizada para a construção da curva de calibração e o teor de flavonoides totais foi calculado e expressos como mg de equivalentes em quercetina por 100g de mel (mg EQ/100g). As análises foram realizadas em três repetições.

#### 4.9.1 – Construção da curva analítica da quercetina

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução metanólica do padrão de quercetina em metanol (40 µL/ml). Em seguida, alíquotas de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 µL desta solução padrão foram misturadas a 2,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso, foi realizada a leitura espectrofotométrica em 415nm, utilizando metanol como branco. A curva analítica foi feita a partir do programa Origin 6.0, sendo obtida a equação da reta  $Y = 0,00482 + 47,44374 \cdot X$ , onde Y é a absorbância a 415nm e X é a concentração de quercetina. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,998 (**Figura 14**). Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de flavonóides totais nas amostras, onde se substituiu Y pela média da absorbância de cada amostra de mel. Todas as análises foram realizadas em três repetições.



**Figura 14** - Curva analítica das médias das concentrações da solução de quercetina versus as leituras de absorbâncias (415 nm), após o ensaio com cloreto de alumínio.

#### 4.10 – Determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH

A determinação quantitativa da capacidade antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura por PÉREZ *et al.*, (2007), com pequenas modificações, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras de méis e extratos, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. A percentagem de capacidade antioxidante foi calculada usando a seguinte equação

$$\% AA = \frac{100 - (Abs amostra - Abs branco) \times 100}{Abs controle}$$

Onde:



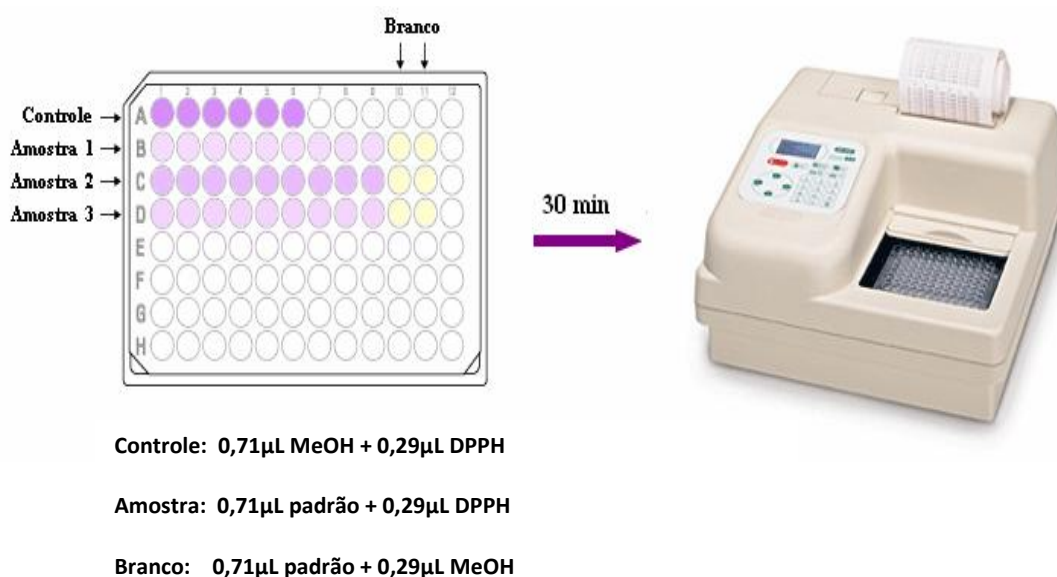
Abs amostra = absorvância da amostra com a solução de DPPH

Abs branco = absorvância da amostra com metanol

Abs controle = absorvância do metanol com a solução de DPPH

#### 4.10.1 -Determinação do $CE_{50}$ para amostra de mel *in natura* e extratos

Para a determinação do  $CE_{50}$  das amostras de mel, foram preparadas soluções de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg/mL em MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1), partindo de uma solução inicial de 100 mg/mL e para a determinação do  $CE_{50}$  dos extratos de mel, foram preparadas soluções de 500, 600, 700, 800, 900 e 1000  $\mu$ g/mL em metanol, partindo de uma solução inicial de 1000  $\mu$ g/mL. Os ensaios foram realizados utilizando duas microplacas com 96 poços para cada amostra, com três concentrações em cada linha e em ordem crescente de diluição, onde foram pipetados 0,71 $\mu$ L das soluções de mel (fileiras B, C e D, da coluna 1 a 11). Como controle, nos seis primeiros poços (fileira A) foram pipetados 0,71 $\mu$ L de metanol, e para o branco foram pipetados 0,29 $\mu$ L de metanol e 0,71 $\mu$ L da solução de mel (colunas 10 e 11 da microplaca). Em seguida foram pipetados 0,29 $\mu$ L da solução de DPPH e adicionados em cada poço utilizado, exceto nos relativos aos brancos. Após 30 minutos de incubação no escuro, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro ELISA a 520nm (Figura 15). Todos os ensaios foram realizados em três repetições.



**Figura 15** - Esquema do ensaio de capacidade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA.

Foram utilizadas para a construção das curvas, as concentrações iniciais presentes nos poços a partir das diluições que foram feitas a 71%.

A concentração efetiva, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% ( $CE_{50}$ ), foi determinada para as amostras usando o programa Origin 6.0, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando na abscissa as concentrações da amostra (mg/mL) ou do controle positivo ( $\mu\text{g/mL}$ ) e na ordenada, a porcentagem de capacidade antioxidante(% AA).

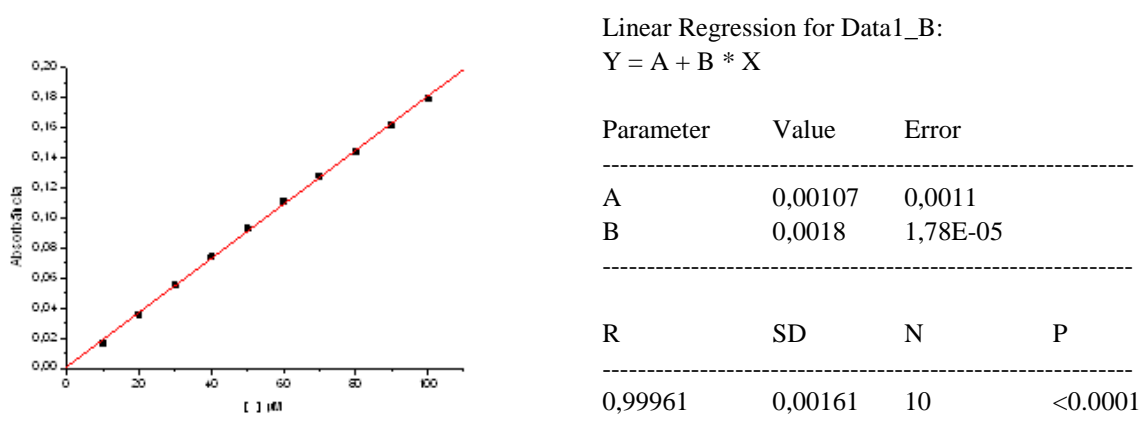
#### **4.11 – Detreminação da Capacidade antioxidantedo mel pelo Método de Redução do Íon Férrico (FRAP)**

O teste de FRAP foi realizado segundo a metodologia descrita por Bertoneclj *et al.* (2007). Este método testa a força antioxidante das substâncias, via avaliação da redução do complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ (ferritripiridiltriazina) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] a ferrosotripiridiltriazina ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ), um complexo de cor mais intensa, na presença de antioxidantes. O reagente FRAP é obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M (pH 3.6), 2,5 mL de uma solução de 40 mM de HCl de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina ) à 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, devendo ser usado imediatamente após sua preparação. Soluções de extratos de méis em metanol grau espectroscópico na concentração de 2 mg/mL foram preparadas. A uma alíquota de 0,5mL dessa solução adicionou-se 4,5mL de Reagente de FRAP. Manteve-se a mistura aquecida a 37°C por 10 minutos, onde a coloração da solução passou de azul claro para azul escuro. Em seguida, fez-se a leitura da sua absorbância a 593nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e a solução de mel artificial como branco. Todos os ensaios foram efetuados em triplicada. Uma solução aquosa de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (100-1000 $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como curva analítica e os resultados foram expressos em valores de FRAP ( $\mu\text{mol Fe(II)}/100 \text{ g}$ ).

##### **4.11.1 - Construção da curva analítica com sulfato ferroso**

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução aquosa do padrão de sulfato ferroso heptaidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Alíquotas de 0,5 mL de soluções de concentrações variando de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100  $\mu\text{M}$  foram transferidas para tubos de ensaio, na qual foi acrescentado 4,5 mL do reagente de FRAP. Os tubos de ensaio foram

mantidos em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. As leituras foram feitas a 593nm, utilizando a solução reacional sem o padrão como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0, e sua equação foi definida como  $Y = 0,00107 + 0,0018 \cdot X$ , onde Y é a absorbância a 593 nm, X é a concentração de sulfato ferroso heptaidradato. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,99961 (**Figura 16**). Através dessa equação determinou-se a concentração equivalente de Fe (II) nas amostras (concentração X), substituindo Y pela média das absorbâncias de cada amostra de mel. Todas as análises foram realizadas em três repetições.



**Figura 16-** Curva analítica das médias das concentrações da solução aquosa de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  versus as leituras de absorbâncias (593 nm), após o ensaio com reagente de FRAP.

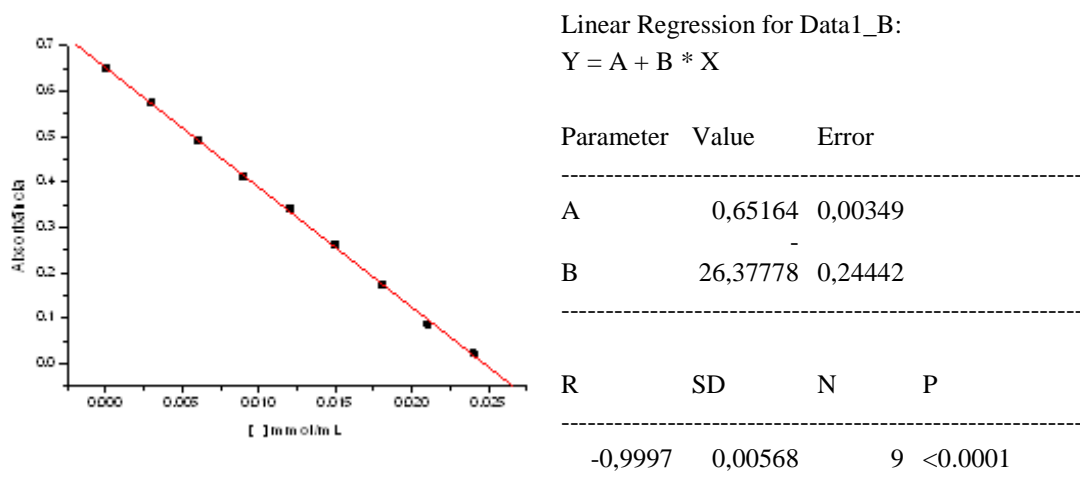
#### 4.12 - Determinação da Capacidade antioxidante pela Captura do Radical-Cátion ( $\text{ABTS}^{\cdot+}$ )

O ensaio de descoloração cátion radical baseou-se no método descrito por Rufino *et al.*(2007). O método consiste em medir a capacidade antioxidante através da captura do radical-cátion  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ . O ABTS foi dissolvido em água para dar uma concentração final de 7 mM. O cátion radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88  $\mu\text{L}$  da solução 140 mM de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas antes da utilização. Após esse tempo, diluir 1 mL desta mistura em álcool etílico até obter uma absorbância de 0,700 nm  $\pm$  0,05 nm a 734 nm. Preparar e usar apenas no dia da análise. Soluções de méis em água na concentração de 100 mg  $\text{mL}^{-1}$  foram preparadas. A uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  dessa solução

adicionou-se 5,0mL do reagente de ABTS. Após 6 minutos foi feita a leitura da absorbância a 734nm, utilizando-se o álcool etílico como o branco. Para a determinação da capacidade antioxidante em extratos de mel pelo método ABTS foram preparadas soluções na concentração de 2 mg/mL em metanol espectroscópico. Uma solução de Trolox (100-2000  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada para a construção da curva de calibração e os resultados foram expressos como  $\mu\text{g}$  de equivalentes de Trolox por 100g de mel ( $\mu\text{molTE } 100\text{g}^{-1}$ ). Todas as análises foram realizadas em três repetições.

#### 4.12.1 - Construção da curva analítica com Trolox

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução etanólica do padrão de Trolox. Em alíquotas de 50 $\mu\text{L}$  de concentrações variando de 0,0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1 e 2,4 mmol/L, adicionou-se 5,0 mL do reagente de ABTS. A leitura da sua absorbância a 734nm foi realizada após 6 minutos, utilizando a solução reacional sem o padrão como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0 e sua equação foi definida como  $Y = -26.37778 \cdot X + 0.65164$ , onde Y é a absorbância a 760 nm, X é a concentração de Trolox. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de -0.9997 (Figura 17). Através dessa equação determinou-se a concentração equivalente em Trolox nas amostras (concentração X), substituindo Y pela média das absorbâncias de cada amostra de mel. Todas as análises foram realizadas em três repetições.



**Figura 17** - Curva analítica das médias das concentrações da solução etanólica de Trolox versus as leituras de absorbâncias (760 nm), após o ensaio com reagente de ABTS.

#### 4.13 - Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

As análises dos extratos de mel foram realizadas por CLAE-DAD e as separações feitas em coluna analítica de fase reversa C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm de partícula, Betasil, Thermo), mantida a 30 °C. A fase móvel foi constituída por uma mistura de água: ácido acético (99:1, solvente A) e metanol (solvente B), velocidade de fluxo constante (1,0 mL/min ) e o volume injeção de 20µL. O seguinte gradiente de eluição foi usado: 35 a 80% de B em 20 minutos; 80 a 92% B em 25 minutos e 100% B em 30 minutos, após 3 min nessa concentração retornou a 35% de B. Os cromatogramas foram monitorados a 280 e 340 nm, visto que a maioria das substâncias fenólicas encontradas nos méis mostram seus máximos de absorção no ultravioleta, próximos a esses comprimentos de onda (MARTOS et al, 1997). Todas as análises foram realizadas em três repetições.

##### 4.13.1 - Construção das Curvas Analíticas com os padrões

As soluções analíticas de referência foram preparadas por sucessivas diluições a partir de uma solução metonólica de 100 µg/mL de cada um dos padrões: ácido gálico, HMF, ácido protocatecuico, ácido *p*-hidroxi-benzóico, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-metoxi-benzóico, ácido vanílico, ácido cinâmico, naringerina, ABA, luteolina, canferol, hesperidina e galangina (todos ~99,0% de pureza). As curvas analíticas foram construídas utilizando a padronização externa, a partir de 4 pontos das soluções dos padrões em metanol nas concentrações de 5, 10, 20 e 50 µg/mL, preparadas no mesmo dia em que se realizaram as análises.

A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0 (UFRRJ), onde foi efetuada a regressão linear e obtida a equação da reta [ $y = a + b.x$ ], relacionando a concentração de cada solução injetada com a respectiva área obtida no cromatograma. Através das equações (**Tabela 12**) determinou-se a concentração de cada padrão identificado nos extratos analisados.

**Tabela 12** - Resultados obtidos a partir da curva analítica preparada com diferentes padrões

Amostras	R	Equação da reta: $Y = A + B * X$
Ácido gálico	0,99964	$Y = 11556,62 + 44450,01 * X$
HMF	0,99885	$Y = 194010,03 + 157223,41 * X$
Ácido protocatecuico	0,99720	$Y = 12753,45 + 17216,47 * X$
Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico	0,99834	$Y = -11348,77 + 22136,51 * X$
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,99578	$Y = -2349,12 + 50163,03 * X$
Ácido <i>p</i> -metoxi-benzoico	0,99918	$Y = -346,09 + 20685,06 * X$
Ácido vanílico	0,99878	$Y = 2074,08 + 26381,13 * X$
Ácido cinâmico	0,99917	$Y = -85331,90 + 159435,89 * X$
Naringenina	0,99959	$Y = 41490,02 + 54282,26 * X$
ABA	0,99983	$Y = -50281,13 + 86725,43 * X$
Luteolina	0,99968	$Y = -14209,03 + 42241,03 * X$
Canferol	0,99952	$Y = -3696,92 + 21314,97 * X$
Hesperidina	0,99874	$Y = 15825,69 + 14674,21 * X$
Galangina	0,99950	$Y = -11557,35 + 44110,33 * X$

#### 4.14 - Tratamento Quimiométrico

Todos os experimentos foram realizados em três repetições. Os valores foram expressos como a média  $\pm$  desvio padrão. Os desvios padrão foram calculados usando o Microsoft Excel 2010.

Os dados obtidos de RMN e CLAE foram convertidos em uma matriz ( $m \times n$ ) em planilha usando o Microsoft Excel 2010 e importado para The Unscrambler® 10.1 para análise estatística multivariada.

Para o perfil cromatográfico dos extratos estudados foi aplicado o tratamento estatístico através da ausência e presença das substâncias encontradas.

Para interpretação dos dados foi utilizando a análise dos componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (análise de *cluster*) Na análise de agrupamento foi utilizada a técnica de análise de cluster que se baseia na partição de uma população heterogênea em vários grupos homogêneos. No agrupamento não há classes pré-definidas, os elementos são agrupados de acordo com a semelhança. A medida de similaridade usada foi a distância Euclidiana quadrática e método hierárquico aglomerativo usado foi o método de Ward.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análise Melissopalínológica

Um dos aspectos fundamentais que influenciam o valor comercial do mel é a informação de sua origem botânica e geográfica (ESTEVINHO *et al.*, 2012). Em geral, a análise palinológica é o método freqüentemente utilizado para a identificação do mel (LOUVEAUX *et al.*, 1978; ANKLAM, 1998; VON der OHE *et al.*, 2004). Identificação do pólen não é uma determinação simples, porque requer pessoal profissional especializado e treinado com um extenso conhecimento da morfologia polínica. A caracterização palinológica de méis de diferentes origens botânicas tem sido realizada por pesquisadores de diferentes países (ATANASSOVA & KONDOVA, 2004; DOBRE *et al.* 2012;. DOWNEY *et al.*, 2005;. LA SERNA *et al.*, 2002; LA SERNA & GÓMEZ-FERRERAS, 2006; PERSANO-ODDO & PIRO, 2004; SEIJO *et al.*, 2011; TERRAB *et al.*, 2003). Mesmo que este método possa ser uma medida subjetiva, demorado e muitas das vezes difícil de estabelecer com exatidão os tipos de pólen floral do mel (HERMOSIN *et al.*, 2003; ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2013), é uma ferramenta importante para a determinação da origem botânica do mel.

Do ponto de vista comercial, o aumento do preço do mel torna-o mais suscetível a adulteração, sendo necessário além da análise palinológica, análises organolépticas e físico-químicas para a correta rotulagem.

Embora a análise química do mel possa dar informações sobre a adulteração do mel, para a determinação da origem botânica, normalmente, a análise melissopalínológica deve ser realizada.

No Brasil, mais de uma centena de espécies botânicas pode dar origem a mel monofloral. Além disso, os consumidores preferem méis monoflorais, o que significa que eles também têm um maior valor comercial para os produtores. Mesmo que os próprios apicultores de acordo com o seu conhecimento e informação da localização das colméias declarrem a origem florística das amostras de mel, todas as amostras devem ser submetidas à análise de pólen. Assim, nesse trabalho, a percentagem de pólen específica foi determinada de maneira a avaliar a fonte florística declarada nas amostras de mel estudadas.

A fim de conseguir realizar uma avaliação objetiva quanto à procedência /origem botânica das amostras de mel, avaliou-se os dados obtidos pela simples contagem dos grãos de pólen que estão apresentados a seguir. A classificação dos tipos polínicos encontradas nas amostras de mel conforme suas frequências estão nas **Tabelas 13 a 17**.

De acordo com a análise de pólen específico de cada amostra de cada tipo de mel, pode-se perceber que os tipos polínicos presentes podem estar super-representados (por exemplo, mel de eucalipto) ou sub-representados (por exemplo, mel de laranja).

A flora visitada pela abelha *Apis mellifera* das regiões em estudo foi representada por doze tipos polínicos distribuídos nas diferentes classes de ocorrência e pertencentes a diferentes famílias vegetais (**Tabelas 13-17**). Os tipos polínicos mais constantes nas amostras foram: *Eucalyptus*, *Citrus*, *Vernonia*, e *Croton*.

Na **Tabela 13** estão apresentados os resultados das análises polínicas realizadas para as doze amostras de méis denominadas de eucalipto. Espécies do gênero *Eucalyptus*, amplamente cultivada em diferentes regiões do Brasil, têm produção variável de pólen. Assim, a técnica melissopolinologia classifica o pólen de *Eucalyptus* como super-representados, sendo geralmente aceito um conteúdo mínimo de 70% de pólen para classificar um mel eucalipto como monofloral (OUCHEMOUKH *et al.*, 2007). Contudo, o mel **E10 (Tabela 13)** não apresentou pólen específico de *Eucalyptus*, mas mesmo assim foi classificado como mel de eucalipto por ser oriundo de uma região onde a presença de árvores de eucalipto, na época da colheita, era predominante.

**Tabela 13.** Resultados obtidos pelas análises dos tipos polínicos dos méis de eucalipto

Amostras	Soma polínica/ pólen nectarífero	Tipos Polínicos	Resultado Final
E1	444/273	<i>Eucalyptus</i> (61,48%), <i>Citrus</i> (34,90%), <i>Croton</i> (3,62%).	<i>Eucalyptus</i>
E2	303/245	<i>Eucalyptus</i> (80,85%), <i>Myrcia</i> (22,4%)	<i>Eucalyptus</i>
E3	345/304	<i>Eucalyptus</i> (88,11%), <i>M. tipo invisá</i> (4%)	<i>Eucalyptus</i>
E4	300/294	<i>Eucalyptus</i> (98%)	<i>Eucalyptus</i>
E5	304/271	<i>Eucalyptus</i> (89,14%)	<i>Eucalyptus</i>
E6	373/353	<i>Eucalyptus</i> (94,63%)	<i>Eucalyptus</i>
E7	353/345	<i>Eucalyptus</i> (97,73%)	<i>Eucalyptus</i>
E8	374/329	<i>Eucalyptus</i> (87,96%)	<i>Eucalyptus</i>
E9	304/280	<i>Eucalyptus</i> (92,10%)	<i>Eucalyptus</i>
E10	8/5	<i>Croton</i> (62,5%), <i>Citrus</i> (37,5)	*
E11	346/302	<i>Eucalyptus</i> (87,28%), <i>Eupatorium</i> (12,71%)	<i>Eucalyptus</i>
E12	218/167	<i>Eucalyptus</i> (76,60%), <i>Citrus</i> (11,92%), <i>Vernonia</i> (11,48%).	<i>Eucalyptus</i>



\*baixo teor de pólen

Os méis de morrão de candeia, laranjeira e assa-peixe (**Tabelas 14-16**) são representados pelos pólenes: *Croton*, *Citrus* e *Vernonia*, respectivamente, que são sub-representados no espectro polínico do mel, sendo suficientes no mínimo de 10% de pólen para considerar o mel como monofloral de morrão de candeia, laranjeira e assa-peixe (OUCHEMOUKH *et al.*, 2007).

Todos os méis de morrão de candeia (**Tabela 14**) apresentaram menos de 50% de frequência polínica para o pólen de *Croton* e, mesmo assim, foram classificados como monofloral de morrão de candeia, pois este é um pólen sub-representado (OUCHEMOUKH *et al.*, 2007).

**Tabela 14.** Resultados obtidos pelas análises dos tipos polínicos dos méis de morrão de candeia.

Amostras	Soma polínica/ pólen nectarífero	Tipos Polínicos	Resultado Final
M1	115/59	<i>Eucalyptus</i> (51,3%), <i>Croton</i> (31%), <i>Bauhinia</i> (18%)	Morrão de candeia*
M2	300/90	<i>Croton</i> (30%), <i>Ricinus</i> (29,2%), Asteraceae (10,3%), <i>Myrcia</i> (10%), outros (17,2)	Morrão de candeia
M3	310/124	<i>Croton</i> (40,0%), <i>Desmodium</i> (15%), <i>Eucalyptus</i> (14,5%) Tipo Acácia (12%), Outros(30%)	Morrão de candeia
M4	115/77	<i>Myrcia</i> (66,9%), <i>Croton</i> (21,6%), <i>Eucalyptus</i> (11,5%)	Morrão de candeia*
M5	200/124	<i>Myrcia</i> (62,0%), <i>Croton</i> (38%)	Morrão de candeia*
M6	100/49	<i>Piptadenia</i> (49%), <i>Croton</i> (30%) e outros (21%)	Morrão de candeia*
M7	210/125	<i>Eupatorium</i> (59,52%), <i>Croton</i> (40,48%)	Morrão de candeia*
M8	376/106	<i>Croton</i> (28,1%), <i>Arecaceae</i> (25%), <i>Vernonia</i> (16,5%), <i>Schizolobium</i> (15,3%), Asteraceae	Morrão de candeia
M9	250/144	<i>Eucalyptus</i> (57,6%), <i>Croton</i> (42,40%)	Morrão de candeia*

\*baixo teor de pólen

Os méis L2 e L3 (**Tabela 15**) apesar de apresentaram baixo teor de pólen, abaixo do mínimo de 300 grãos de pólen foram classificados como méis de laranjeira, visto que o mel

de laranja são sub-representados sendo difícil de classificá-lo por melissopalínologia (OUCHEMOUKH *et al.*, 2007).

**Tabela 15** Resultados obtidos pelas análises dos tipos polínicos dos méis de laranja.

Amostras	Soma polínica/ pólen nectarífero	Tipos Polínicos	Resultado Final
L1	571/538	<i>Citrus</i> (94,22%), <i>Eucalyptus</i> (5,42%), <i>Vernonia</i> (0,35%).	<i>Citrus</i>
L2	205/194	<i>Citrus</i> (94,63%), <i>Eucalyptus</i> (4,39%), <i>Vernonia</i> (0,98%).	<i>Citrus</i> *
L3	158/152	<i>Citrus</i> (96,20%), <i>Eucalyptus</i> (1,89%).	<i>Citrus</i> *
L4	302/275	<i>Citrus</i> (91,39%), <i>Eucalyptus</i> (8,60%),	<i>Citrus</i>
L5	321/182	<i>Citrus</i> (56,69%), <i>Eucalyptus</i> (35,51%), <i>Vernonia</i> (7,8%).	<i>Citrus</i>
L6	300/210	<i>Citrus</i> (70%), <i>Eucalyptus</i> (8,60%), pólen desconhecido (21,40%)	<i>Citrus</i>
L7	311/264	<i>Citrus</i> (85%), <i>Eucalyptus</i> (0,8%), pólen desconhecido (14,2%)	<i>Citrus</i>
L8	305/201	<i>Citrus</i> (66%), <i>Eucalyptus</i> (25%), pólen desconhecido (9%)	<i>Citrus</i>
L9	320/208	<i>Citrus</i> (65%), <i>Eucalyptus</i> (17%), pólen desconhecido (18%)	<i>Citrus</i>

De acordo com os resultados obtidos na **Tabela 16** para mel de assa-peixe, observou-se que os quatro méis: **AS1**, **AS7**, **AS8**, **AS9** apresentaram pólen insuficiente, porém todos foram classificados como méis de assa-peixe, por serem oriundos de São Lourenço, região onde a presença de assa-peixe, na época da colheita, era predominante. Entretanto, esses resultados podem ser decorrentes de complexas variações ambientais em que na época de floração do assa-peixe pode ter havido um período variável de produção de néctar. Desta maneira, ora pode-se encontrar pouco pólen, em virtude de haver muito néctar disponível, ora a quantidade de néctar pode estar mais reduzida.

**Tabela 16** Resultados obtidos pelas análises dos tipos polínicos dos méis de assa-peixe

Amostras	Soma polínica/ pólen nectarífero	Tipos Polínicos	Resultado Final
AS1	223/97	<i>Vernonia</i> (43,50%), <i>Eucalyptus</i> (31,39%), <i>Citrus</i> (25,11%),	Assa-Peixe*
AS2	368/222	<i>Vernonia</i> (60,33%), <i>Eucalyptus</i> (9,2%), <i>Citrus</i> (30,47%)	Assa-Peixe
AS3	104/52	<i>Vernonia</i> (50%), <i>Eucalyptus</i> (11,11%) .	Assa-Peixe*
AS4	589/289	<i>Vernonia</i> (49,06%), <i>Citrus</i> (42,79%), <i>Eucalyptus</i> (8,15%)	Assa-Peixe
AS5	329/174	<i>Vernonia</i> (52,88), <i>Citrus</i> (29,47%), <i>Eucalyptus</i> (17,62%).	Assa-Peixe
AS6	306/266	<i>Vernonia</i> (86,92%), pólen desconhecido(13,08%)	Assa-Peixe
AS7	24/11	Pólen insuficiente	Assa-Peixe*
AS8	32/13	Pólen insuficiente	Assa-Peixe*
AS9	20/13	Pólen insuficiente	Assa-Peixe*

\*baixo teor de pólen

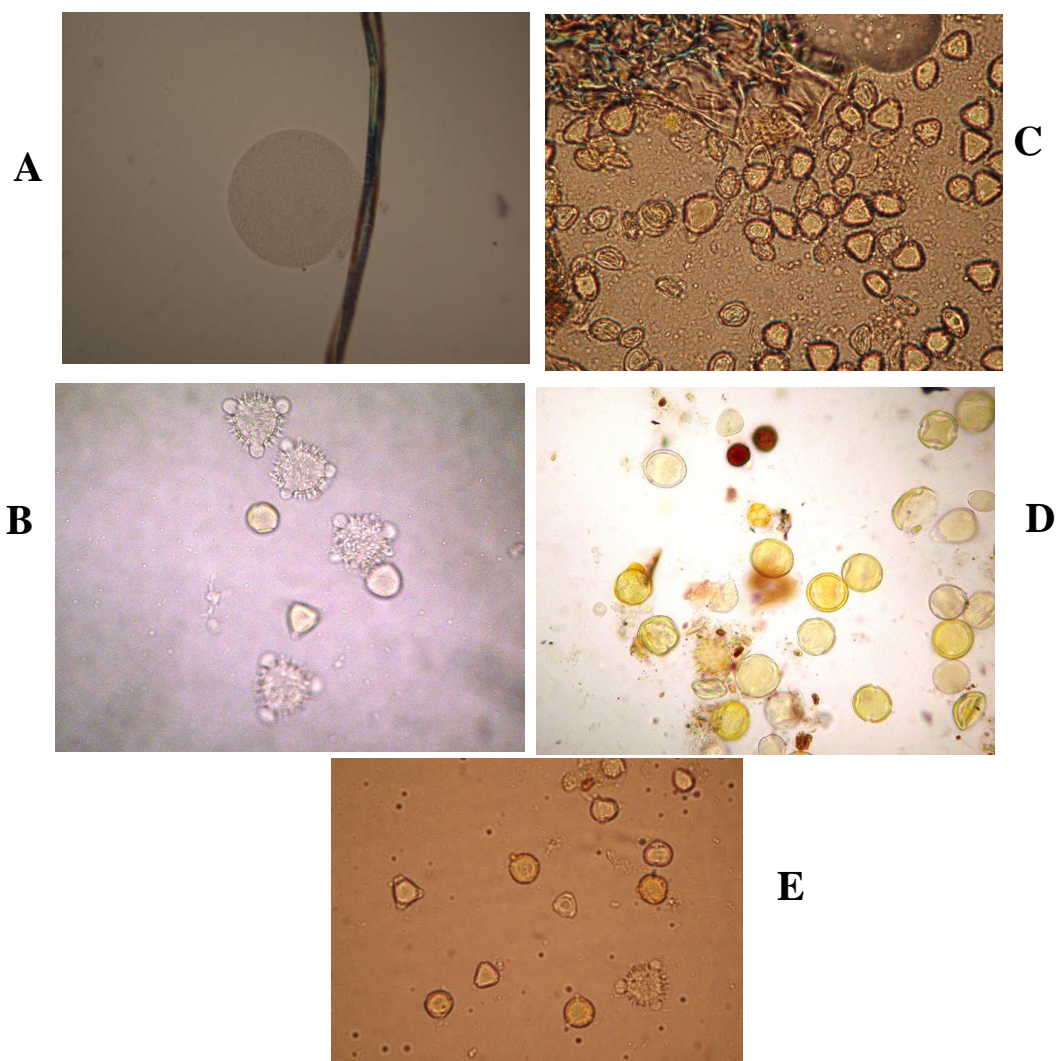
Os méis **S1-S6** (Tabela 17) foram classificados como silvestre devido à ausência de um pólen dominante no qual deviria ter frequência polínica 50%.

**Tabela 17** Resultados obtidos pelas análises dos tipos polínicos dos méis Silvestre

Amostras	Soma polínica/ pólen nectarífero	Tipos Polínicos	Resultado Final
S1	378/162	<i>Eucalyptus</i> (43%), <i>Myrcia</i> (36,6%), Asteraceae (10,5%), <i>Vernonia</i> (9,9%)	Silvestre
S2	321/134	Tipo polinico desconhecido (41,7%), <i>Eupatoriun</i> (26,5%), <i>Croton</i> (15,6%), <i>Eucalyptus</i> (11%), <i>Anadenanthera</i> (5,2%)	Silvestre
S3	456/183	<i>Eucalyptus</i> (40,13%), <i>Myrcia</i> (39,6%), e outros	Silvestre
S4	301/134	<i>M. verrucosa</i> (44,5%), <i>Eucalyptus</i> (6,7%), Asteraceae (5%), <i>Myrcia</i> (6,4%), Arecaceae (9%), <i>Loranthaceae</i> (6,9%), <i>Gochmathia</i> (15,3%), <i>Piptadenia</i> (6,4%)	Silvestre
S5	227/73	<i>Myrcia</i> (32,15%), Asteraceae (20,25%), <i>Citrus</i> (20,13%) e outros	Silvestre*
S6	339/10	<i>Myrcia</i> (40,11%), <i>Eucalyptus</i> (40%), Asteraceae (19,8%)	Silvestres

\*baixo teor de pólen

Na **Figura 18**, a seguir, estão exemplificadas as fotografias referentes a 5 lâminas avaliadas por microscopia, para amostras de morrão de candeia, eucalipto, assa-peixe, laranjeira e silvestre, respectivamente, analisadas nesse trabalho.



**Figura 18.** Fotografias das lâminas avaliadas ao microscópio contendo grãos de pólen (A) *Cróton*; (B) *Vernonia* (C) *Eucalyptus*; (D) *Citrus* e (E) Silvestre.

Em virtude do grande número de espécies vegetais, especialmente de plantas melíferas, torna-se freqüentemente muito difícil a determinação taxonômica exata de tipos polínicos de méis. Como pode ser observada pelos resultados da melissopaliniologia a flora da região continua sendo um fator determinante tanto da composição polínica do mel como das propriedades que lhe são atribuídas. De acordo com Barth (2005), a qualidade do mel depende de um lado de sua composição química, principalmente quanto aos diferentes tipos de açúcares, sais minerais, proteínas e água. De outro lado, fazem parte do mel os

grãos de pólen provenientes, na sua maior parte, das plantas fornecedoras de néctar, as chamadas plantas nectaríferas. Entretanto o clima e o regime das águas que modificam a paisagem são transformadores também das floradas e, conseqüentemente dos méis.

## 5.2 - Caracterização físico-química das amostras de mel

A realização das análises físico-químicas de quarenta e cinco amostras de mel de diferentes origens botânicas utilizando metodologias estabelecidas pela Legislação Brasileira possibilitou avaliar sua qualidade. Os resultados obtidos para os parâmetros analisados (cor, pH, acidez total e HMF) dos 45 méis de *Apis mellifera* estão apresentados na Tabelas 18.

**Tabela 18**– Valores médios e os desvios padrões dos parâmetros físico-químicos para os méis de eucalipto(E), morrão de candeia(M), assa-peixe(AS), laranjeira(L) e silvestre(S) estudados.

Amostras	Escala Pfund	Cor	pH	Acidez total (mEq/Kg)	HMF (mg/Kg)
E1	74,40±0,00	Âmbar claro	3,43±0,06	17,90±0,72	45,25±0,72
E2	146,50±0,00	Âmbar escuro	4,55±0,02	34,79±0,31	7,32±0,94
E3	81,60±0,00	Âmbar claro	4,83±0,01	32,09±0,82	2,75±0,25
E4	92,60±0,00	Âmbar	4,68±0,01	36,95±0,32	1,00±0,43
E5	72,80±0,00	Âmbar claro	4,31±0,01	36,90±0,10	8,42±0,26
E6	78,60±0,00	Âmbar claro	3,95±0,01	62,53±0,28	130,34±3,04
E7	68,30±0,00	Âmbar claro	4,42±0,04	25,30±1,26	90,35±0,78
E8	80,00±0,00	Âmbar claro	4,32±0,02	26,73±0,48	56,96±0,43
E9	34,80±0,00	Extra âmbar claro	3,76±0,02	38,03±0,55	12,28±0,64
E10	62,52±0,00	Âmbar claro	3,38±0,02	35,38±0,64	52,40±0,75
E11	50,30±0,00	Âmbar claro	3,74±0,01	33,89±0,48	1,30±0,61
E12	45,06±0,00	Extra âmbar claro	4,34±0,03	14,15±0,42	25,30±0,30
<b>Média</b>	<b>73,95±0,00</b>	<b>Âmbar claro</b>	<b>4,14±0,02</b>	<b>32,89±0,63</b>	<b>35,01±0,98</b>
M1	31,70±0,00	Branco	3,50±0,02	32,27±1,12	5,94±0,38
M2	32,60±0,00	Branco	3,58±0,08	31,73±0,62	6,34±0,53
M3	30,30±0,00	Branco	3,56±0,01	30,11±0,62	0,85±0,48
M4	35,30±0,00	Extra âmbar claro	3,55±0,02	31,55±0,62	12,70±0,42
M5	30,90±0,00	Branco	3,67±0,01	30,23±0,28	4,74±2,10
M6	61,80±0,00	Âmbar claro	3,70±0,01	43,12±1,10	11,63±0,53
M7	62,50±0,00	Âmbar claro	3,61±0,02	43,91±0,95	43,90±3,03
M8	54,80±0,00	Âmbar claro	4,09±0,01	33,89±1,26	2,89±0,38
M9	25,50±0,00	Branco	3,51±0,02	31,66±0,99	17,73±0,23
<b>Média</b>	<b>40,60±0,00</b>	<b>Âmbar extra claro</b>	<b>3,64±0,02</b>	<b>34,27±0,88</b>	<b>11,01±1,20</b>
AS1	43,95±0,00	Extra âmbar- claro	3,93±0,02	19,98±0,64	80,09±0,43
AS2	48,41±0,00	Extra âmbar- claro	3,85±0,02	21,64±0,64	55,58±0,22
AS3	41,35±0,00	Extra âmbar- claro	3,77±0,02	22,06±0,64	43,41±0,86
AS4	53,23±0,00	Âmbar claro	3,37±0,04	30,38±0,87	60,63±4,51

**Tabela 18**– Continuação

Amostras	Escala Pfund	Cor	pH	Acidez total (mEq/Kg)	HMF (mg/Kg)
AS5	31,69±0,00	Branco	3,66±0,03	17,90±1,73	48,65±1,73
AS6	48,78±0,00	Extra âmbar- claro	3,90±0,03	17,90±2,40	21,69±10,48
AS7	30,95±0,00	Branco	3,67±0,02	17,90±0,87	56,14±2,14
AS8	35,41±0,00	Extra âmbar- claro	3,88±0,09	14,98±0,24	54,64±2,41
AS9	38,01±0,00	Extra âmbar- claro	3,79±0,02	15,82±0,42	47,16±1,56
<b>Média</b>	<b>41,31±0,00</b>	<b>Extra âmbar- claro</b>	<b>3,76±0,02</b>	<b>19,84±0,08</b>	<b>52,00±1,21</b>
L1	38,01±0,00	Extra âmbar- claro	4,73±0,02	39,54±0,87	56,89±0,43
L2	38,01±0,00	Extra âmbar- claro	3,79±0,02	17,90±0,24	54,49±0,00
L3	35,78±0,00	Extra âmbar- claro	4,00±0,06	16,65±0,42	17,96±1,88
L4	29,84±0,00	Branco	4,09±0,04	13,74±0,87	7,49±2,29
L5	72,17±0,00	Âmbar claro	3,72±0,03	45,37±1,05	18,46±1,14
L6	58,06±0,00	Âmbar claro	3,63±0,01	21,23±0,42	53,64±1,56
L7	47,29±0,00	Extra âmbar- claro	3,51±0,02	19,56±0,83	17,96±3,74
L8	61,40±0,00	Âmbar claro	3,62±0,02	23,72±1,05	10,48±1,88
L9	63,26±0,00	Âmbar claro	3,42±0,02	23,72±0,87	22,21±1,98
<b>Média</b>	<b>49,31±0,00</b>	<b>Extra âmbar- claro</b>	<b>3,83±0,02</b>	<b>24,60±0,79</b>	<b>28,84±1,09</b>
S1	130,90±0,00	Âmbar escuro	4,08±0,02	31,19±0,31	165,17±0,43
S2	26,10±0,00	Branco	3,60±0,00	22,34±0,48	11,92±0,63
S3	78,10±0,00	Âmbar claro	3,62±0,05	88,75±1,82	18,46±0,43
S4	67,00±0,00	Âmbar claro	3,62±0,02	123,84±1,08	9,36±0,53
S5	59,55±0,00	Âmbar escuro	4,39±0,04	19,15±0,64	80,25±1,15
S6	58,80±0,00	Âmbar escuro	3,79±0,03	32,46±0,64	60,50±1,01
<b>Média</b>	<b>70,08±0,00</b>	<b>Âmbar claro</b>	<b>3,85±0,01</b>	<b>52,96±0,86</b>	<b>57,61±0,64</b>

As classificações de coloração do mel foram feitas utilizando a escala Pfund e segundo o método descrito por Naab *et al.* (2008). A coloração do mel depende quase que, exclusivamente, da origem da flor, podendo ser claro, vermelho, dourado ou escuro. A cor é a propriedade física percebida preliminarmente pelo consumidor. Em geral, o preço do mel depende em grande parte da sua coloração (BOGDANOV *et al.*, 2004).

Nos méis aqui estudados foi encontrada predominância da cor clara sobre a escura. As amostras analisadas de diferentes origens botânicas apresentaram predominância da cor âmbar claro (40,0%), seguida das cores extra âmbar-claro (28,8%) e branco (20%). Estas classificações de cores estão de acordo com a legislação, que considera aceitáveis variações de branco d'água a âmbar escuro (BRASIL 2000).

Barros e colaboradores (2010) analisando 13 amostras de méis monoflorais e heteroflorais produzidas por *A. mellifera* no estado do Rio de Janeiro encontraram resultados semelhantes, tendo predominância para cor âmbar clara (69, 2%).

Beretta e colaboradores (2005) investigaram 14 amostras de mel comerciais de diferentes origens florais e geográficas e encontraram cores variando de branco (mel de acácia) a âmbar escuro (amostra de mel medronheiro). De acordo com os autores isso pode ser devido a contaminantes específicos decorrentes do manuseio, processamento e armazenamento, e / ou das reações bioquímicas durante a maturação de mel.

Dados da literatura sugerem que a coloração do mel pode ser influenciada pela presença de pigmentos, tais como os carotenoides, flavonoides, derivados de taninos e polifenóis (JUSZCZAK *et al.*, 2009), bem como podem ser decorrentes de produtos da reação de Maillard (GHELDOLF *et al.*, 2002).

Normalmente, os méis mais escuros apresentam uma composição característica, com uma acidez mais elevada, e um teor superior de substâncias minerais (ferro, cobre e manganês), aminoácidos (sobretudo tirosina e triptofano) e ácidos fenólicos, do que os méis mais claros (BOGDANOV, 2009; BERTONCELJ *et al.*, 2007). A coloração, bem como o aroma e sabor do mel podem variar de acordo com a sua origem floral, podendo ser quase incolor (oriundo de flores como o assa peixe), âmbar (flores de laranjeiras), escuro (eucalipto, silvestre) e pardo escuro (trigo sarraceno). A cor pode alterar-se com o processamento e armazenamento, escurecendo devido a reações de Maillard (combinação aminoácido/aldeído) e à instabilidade da frutose em soluções ácida (BERTONCELJ *et al.*, 2007; GONZALEZ-MIRET *et al.*, 2005).

Os valores observados na **Tabela 18** para pH das amostras variaram de 3,37 a 4,83 , apresentando as seguintes media de acordo com tipo de flora estudada, 4,14 (méis de eucalipto), 3,64 (méis de morrão de candeia), 3,76 (méis de assa-peixe), 3,83 (méis de laranjeira) e 3,85 (méis silvestres). Onde os méis de morrão de candeia apresentaram a menor media de pH, logo sendo o mel mais ácido. O valores de pH das amostras de mel foram significativamente diferentes, devido provavelmente à diferença de origens botânicas e/ou geográficas.

Os valores observados neste estudo estão compatíveis com aqueles apresentados por Barros e colaboradores (2010) onde observaram em amostras de mel do estado do Rio de Janeiro, uma variação do pH de 3,41 a 4,23, e por Abadio Finco *et al.* (2010) que encontraram valores de pH entre 3,35 e 4,50 para méis de *A. mellifera*. Welke *et al.* (2008) apresentaram valores de pH entre 3,3 e 4,4 para amostras de mel da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. Santos *et al.* (2011) verificaram variação de pH entre 3,04 a

4,22 para méis comercializados no município de Aracati-CE, e Moreti e colaboradores (2009) encontraram pH apresentando valores variando de 3,4 a 5,3 para méis do Ceará.

Segundo Crane (1983), variações observadas no pH se devem, provavelmente, a características da composição florística nas áreas de coleta, uma vez que o pH do mel pode ser influenciado pelo pH do néctar. Já Noronha (1997) aponta que diferenças na composição do solo ou a associação de espécies vegetais para composição final do mel, podem também influenciar o pH deste produto.

Embora a legislação vigente não exija análise de pH como controle de qualidade, tem-se observado na literatura que este parâmetro vem sendo apresentado porque contribui como uma variável que auxilia no controle microbiológico do mel. Um baixo valor de pH (faixa de pH 3,37 – 4,83) inibe a presença e o crescimento de microorganismos (TERRAB *et al.*, 2002).

Assim, a determinação do valor de pH tem sido crucial, pois está fortemente relacionada com a estabilidade, tempo de estocagem do produto e processo de fermentação de mel devido ao armazenamento (SILVA *et al.*, 2013a; GOMES *et al.*, 2011).

Valores de pH baixos e de acidez altos indicam processos fermentativos do mel. De acordo com Araújo *et al.* (2006) a análise de pH não é obrigatória para avaliação da qualidade do mel, mas é um parâmetro auxiliar para avaliação da acidez total.

O resultado da acidez total observado na **Tabela 18** para os méis variou de 13,74-123,84 mEq/Kg, apresentando as seguintes médias de acordo com o tipo de florada estudada 32,89 mEq/Kg (méis de eucalipto), 34,27 mEq/Kg (méis de morrão de candeia), 19,84 mEq/kg (méis de assa-peixe), 24,60 mEq/Kg (méis de laranjeira) e 52,96 mEq/Kg (méis silvestres). Sendo que três amostras (**E6**, **S3** e **S4**) apresentaram valores médios superiores àqueles determinados pela legislação vigente, que determina o valor máximo de 50 mEq/Kg (BRASIL, 2000).

Resultados semelhantes foram encontrados por Sodré e colaboradores (2002) onde valores de acidez variaram de 13,00 a 43,00 mEq / Kg de mel para amostras do Nordeste do Brasil. Abadio Finco *et al.* (2010), estudando amostras de mel do sul do estado de Tocantins encontraram valores de acidez entre 35,00 a 59,00 mEq/kg e Liberato *et al.* (2013) observaram valores que variaram de 16,67 a 54,50 mEq/kg para 22 amostras de méis de diferentes localidades do Ceará.



Em trabalho realizado por Ahmed *et al.*(2013) foram encontrados os valores de acidez variando de 10-24 mEq/Kg para méis líbios, já Aazza *et al.*(2013) analisando méis portugueses observaram valores variando de 20,17- 42.17 mEq/Kg, sendo também esses valores estando na faixa aos encontrados neste trabalho.

Em geral, a acidez do mel deve-se a diversos fatores, tais como, à variação dos ácidos orgânicos e inorgânicos, pelas diferentes fontes de néctar, atividade enzimática da glicose-oxidase que origina o ácido glucônico, ação das bactérias durante a maturação e aos minerais presentes na sua composição (EVANGELISTA- RODRIGUES *et al.*, 2005). De acordo com Pamplona (1989), o teor de ácido glucônico, tende a aumentar durante o armazenamento de mel, porque esta enzima permanece na atividade depois processamento. Assim, aumenta a acidez de mel durante o armazenamento e, como resultado, o pH diminui. O baixo valor de acidez total indica a ausência de fermentações indesejáveis.

O HMF é um parâmetro de qualidade reconhecido e relacionado com o grau de frescor e de qualidade dos alimentos. Ele está praticamente ausente em alimentos frescos ou em alimentos não sujeitos ao processamento, no entanto, o aquecimento ou as condições de armazenamento prolongado podem promover o seu aumento (GASPAR & LUCENA, 2009; KHALIL *et al.*, 2010) . O mel como alimento, não é exceção, sendo que o seu limite máximo não deve ultrapassar 60 mg/Kg, conforme estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2000).

Os conteúdos de HMF observados na **Tabela 18** variaram de 0,85 a 165,17 mg/Kg, com valores médios de 35,01 mg/Kg (méis de eucalipto), 11,01 mg/Kg (méis de morrão de candeia), 52 mg/Kg (méis de assa peixe), 28,84 mg/Kg (méis de laranjeira) e 57,61 mg/kg (méis silvestres). Dentre as amostras analisadas apenas cinco méis (11,11%; **AS01, AS04, S01, S5 e S6**) estavam com valores acima do permitido pelas normas vigentes (60 mg/Kg; BRASIL, 2000), enquanto 88,88% das amostras analisadas puderam ser consideradas aprovadas.

Segundo a literatura, o mel produzido pela abelha *Apis* deve possuir pequena quantidade de HMF e o seu conteúdo pode fornecer uma indicação do grau de frescor do mel (OWAYSS, 2004; GOMES *et al.*, 2010). Quando são encontrados valores elevados de HMF, estes podem ser provenientes de armazenamento prolongado a altas temperaturas ambiente e/ou superaquecimento ou adulteração por adição de açúcar invertido (MENDES *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2010), estocagem em condições precárias (FALLICO *et al.*,

2006) ou desidratação catalítica ácida das hexoses (HANSE *et al.*, 1973; SINGH & BATH, 1997).

A variação da quantidade de HMF em méis florais armazenados à temperatura ambiente tem sido considerada como um parâmetro importante para indicar a qualidade dos méis disponíveis no mercado ou estimar sua estabilidade de prateleira (FALLICO *et al.*, 2008).

### **5.3 – Determinação do teor em substâncias polifenólicas e avaliação da Capacidade antioxidantedas amostras de mel**

As substâncias bioativas do mel, tais como os ácidos fenólicos e flavonoides constituem uma importante classe de substâncias capazes de influenciarem não só a aparência, mas também as propriedades funcionais, sendo considerados como um dos responsáveis pelo seu poder antioxidante e anti-radicalar (BURDA *et al.*, 2001; CIMPOIU *et al.*, 2013).

Os métodos clássicos para quantificação de polifenólicos em alimentos, incluindo mel, utilizam análises espectrofotométricas baseadas no método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI 1965) ou de Folin-Denis (FOLIN e DENIS, 1992).

No presente trabalho a determinação dos polifenóis do mel se baseou no método de Folin-Denis. Esse método caracteriza-se por uma reação de oxi-redução entre as substâncias polares e o reagente de Folin-Denis, onde o molibdênio ( $\text{Mo}^{+6}$ ) é reduzido a  $\text{Mo}^{+5}$  formando um complexo de coloração azul que absorver radiação a 760 nm e as substâncias fenólicas são oxidadas a ortoquinonas, permitindo assim a quantificação (MEDA, 2005; MÉDIC-ŠARIĆ, 2009; SANT'ANNA *et al.*, 2012).

Uma das limitações deste método é a sua não especificidade, pois determina todos os fenólicos presentes, além de outras substâncias redutoras que podem estar presentes e assim, interferirem nos resultados.

Em relação à quantificação de fenólicos totais pelo método de Folin-Denis, os resultados dos méis estudados foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mgEAG/100g de mel) através da construção de uma curva analítica obtida a partir de diferentes concentrações de ácido gálico (0- 0,025 mg/mL e R= 0,999; **Figura 13**, pg 57).

O teor em fenólicos totais (**TFT**) variou significativamente com o tipo de mel analisado (**Tabela 19**). Foram obtidos valores médios de TFT de 97,43 mgE<sub>AG</sub>/100g para

os méis de eucalipto, 80,60 mgE<sub>AG</sub>/100 g para os méis de morrão de candeia, 55,01 mg E<sub>AG</sub>/100 g para os méis de assa peixe, 55,05 mgE<sub>AG</sub>/100g para os méis de laranjeira , e 117,67 mgE<sub>AG</sub>/100g para os méis silvestres. Conforme pode ser observado aravés dos resultados obtidos, os méis de eucalipto e silvestre foram os que apresentaram as maiores médias para TFT, destacando-se as amostras **E2** (141,06 mgE<sub>AG</sub>/100 g) e a **S6** (188,60 mgE<sub>AG</sub>/100 g). Comparativamente com os outros méis, estes terão uma ação benéfica superior na alimentação humana pois apresentam maior atividade antioxidante, no entanto, nem todas as amostras de mel de eucalipto e silvestre obtiveram bons resultados.

**Tabela 19** – Valores médios e os desvios padrões dos teores em fenólicos e flavonoides totais e capacidade antioxidantedas amostras de méis de eucalipto(E), morrão de candeia(M), assa-peixe(AS), laranjeira(L) e silvestre(S) estudadas.

Amostras de mel	Teor em Fenólicos Total (mgEAG/100g) <sup>a</sup>	Teor em Flavonoides Total (mgEQ/100g) <sup>b</sup>	DPPH (CE <sub>50</sub> ) (mg/mL)
<b>E1</b>	88,92± 0,73	5,97±0,09	17,90±0,24
<b>E2</b>	141,06±0,31	10,89±0,02	14,66±0,11
<b>E3</b>	111,71±0,74	8,74±0,02	10,23±0,33
<b>E4</b>	117,99±1,16	9,36±0,04	12,75±0,39
<b>E5</b>	121,41±0,55	8,21±0,00	20,21±0,51
<b>E6</b>	105,76±0,28	7,60±0,02	13,04±0,19
<b>E7</b>	99,03±0,49	6,30± 0,03	14,85±0,30
<b>E8</b>	104,41±0,39	6,91±0,08	17,45±0,13
<b>E9</b>	87,94±0,24	3,96±0,04	30,64±2,39
<b>E10</b>	58,95±0,32	3,27±0,04	42,05±2,05
<b>E11</b>	71,84±0,43	3,06±0,02	41,25±0,97
<b>E12</b>	60,18±0,21	1,99±0,02	36,31±2,02
<b>Media</b>	<b>97,43±0,44</b>	<b>6,36±0,03</b>	<b>22,61±0,99</b>
<b>M1</b>	75,87±0,39	2,58±0,00	41,76±2,77
<b>M2</b>	76,12±0,58	2,55±0,02	37,61±2,83
<b>M3</b>	80,81±0,69	2,40±0,01	43,68±1,85
<b>M4</b>	81,05±0,46	2,35±0,00	36,21±2,90
<b>M5</b>	80,73±0,49	2,92±0,01	42,72±0,91
<b>M6</b>	95,08±0,49	4,25±0,02	36,26±1,40
<b>M7</b>	94,71±0,60	4,46±0,06	35,18±1,72
<b>M8</b>	91,69±0,58	5,14±0,03	29,37±0,75
<b>M9</b>	49,33±0,43	5,05±0,04	58,36±4,16
<b>Media</b>	<b>80,60±0,49</b>	<b>3,52±0,02</b>	<b>40,13±1,23</b>
<b>AS1</b>	61,48±0,46	4,33±0,02	19,76±1,23
<b>AS2</b>	57,49±1,00	3,37±0,03	46,47±0,63
<b>AS3</b>	56,79±1,35	3,89±0,05	46,06±1,42
<b>AS4</b>	61,69±0,46	3,91±0,01	38,8±0,92
<b>AS5</b>	52,31±0,25	3,19±0,03	58,72±1,45
<b>AS6</b>	39,63±0,32	1,61±0,03	63,77±0,59

**Tabela 19** –Continuação

Amostras de mel	Teor em Fenólicos Total (mgEAG/100g) <sup>a</sup>	Teor em Flavonoides Total (mgEQ/100g) <sup>b</sup>	DPPH (CE <sub>50</sub> ) (mg/mL)
AS7	60,71±0,31	2,36±0,08	48,96±1,35
AS8	52,06±0,19	2,11±0,08	44,3±0,64
AS9	52,92±0,74	2,44±0,09	32,31±1,8
<b>Media</b>	<b>55,01±0,05</b>	<b>3,02±0,05</b>	<b>44,35±1,03</b>
L1	48,31±0,21	2,59±0,04	57,01±0,58
L2	43,34±0,37	3,04±0,04	53,19±1,02
L3	44,64±0,24	2,80±0,02	45,00±0,59
L4	50,39±0,65	2,92±0,01	55,19±1,20
L5	73,71±0,49	6,73±0,03	21,79±0,09
L6	60,18±0,64	3,58±0,02	15,71±0,06
L7	43,58±0,78	2,97±0,07	22,72±0,08
L8	75,47±0,49	3,87±0,05	19,24±0,05
L9	55,81±1,23	3,34±0,03	32,17±0,05
<b>Media</b>	<b>55,05±0,62</b>	<b>3,54±0,04</b>	<b>35,78±0,32</b>
S1	132,05±0,35	10,07±0,01	21,74±0,49
S2	63,64±0,87	2,37±0,01	79,06±3,63
S3	125,04±0,56	5,98±0,01	15,10±0,92
S4	131,97±0,24	5,21±0,02	7,05±0,53
S5	64,70±1,22	6,07±0,05	27,53±0,89
S6	188,60±0,85	5,24±0,05	33,77±1,22
<b>Media</b>	<b>117,67±0,45</b>	<b>5,82±0,02</b>	<b>30,71±1,06</b>

a- mg de equivalentes de ácido gálico por 100 g de mel. b – mg de equivalentes de quercetina por 100 g de mel.

Através dos resultados obtidos verificou-se que os méis de laranja e os de assa peixe foram os que apresentaram menores concentrações de fenólicos totais. Estes resultados se assemelham com àqueles descritos anteriormente pelo nosso grupo para méis de laranja do Rio de Janeiro e São Paulo, onde os valores variaram de 34,00 a 53,02 mg mgEAG/100 g (LIANDA *et al.*, 2012); para oito méis de morrão de cadeia e oito méis de eucalipto do Rio de Janeiro e Minas Gerais, que apresentaram valores médios de 85,10mgQE/100 g e de 113,77 mgQE/100 g, respectivamente (SANT'ANA *et al.*, 2012); e para nove amostras de mel de eucalipto do Rio de Janeiro cuja média do TFT foi de 105,93 mgQE/100 g (SANT'ANA *et al.*, 2014).

Estudo descrito por Liberato e colaboradores (2011) mostrou que os valores de fenólicos totais variaram de 10,21 a 108,5 mgEAG/100 g para vinte uma amostras de méis florais do nordeste. Em outro estudo realizado para méis da Argélia, o TFT variou de 63,93 a 95,36 mgEAG/100 g (AHMED *et al.*, 2013) e para méis romenos variou de 23,0 a 125,0

mgEAG/ 100 g (AL *et al.*, 2009). Para cinquenta e oito amostras de mel polifloral de diferentes regiões da Sérvia os valores variam de 30- 139 mgEAG/100 g (GAŠIĆ *et al.*, 2014).

Em estudos realizados com vinte e oito amostras de méis Poloneses os teores médios de fenólicos totais variaram de 14,28-111,3 mgEAG/ 100 g (KUS *et al.*, 2014). Conteúdos em fenólicos semelhantes foram relatados para méis mexicanos (28,39 -114,29 mgEAG/ 100 g), entre os quais o mais alto TFT foi encontrado para méis multifloral, de laranja e de flores de sino (RODRÍGUEZ *et al.*, 2012). O conteúdo de fenólicos totais de méis da Croácia variou de 12,64 a 90,57 mgEAG/ 100 g (PILJAC-ZEGARAC *et al.*, 2009), apresentando valores mais altos para as amostras do méis multiflorais, o que foi comparável aos resultados descritos no nosso trabalho.

Em trabalho realizado por Rosa e colaboradores (2011) foi relatado que mel de medronheiro foi o mais rico em fenóis totais, quando comparado com os méis de citros, eucalipto e de urze. No entanto, o conteúdo de fenóis totais encontrados por Aazza e colaboradores (2013) para mel de urze português foi maior (117,59 mgEAG/100 g) do que o relatada por esses autores. Segundo Ayari e colaboradores (2013) os méis de eucalipto do norte da Tunísia apresentaram conteúdo de fenóis (85,77 mgEAG/100 g) superiores aos relatado para os méis portugueses (54,25 mgEAG/100 g ; AAZZA *et al.*, 2013).

Estes resultados, juntamente com os descritos por Rosa *et al.* (2011), revelam que o origem geográfica também é importante para a determinação do teor de fenólicos de méis de mesma origem floral.

Na literatura tem sido relatado que a concentração em polifenóis pode variar nos méis de diferentes origens botânicas (GHELDOLF *et al.*, 2002), e a presença dessas substâncias nos méis tem sido apontada como um dos fatores responsáveis pelas atividades biológicas, incluindo atividade antioxidante, antimicrobiana, antiviral e anticancerígena (AL-MAMARY *et al.*, 2002; ETERAF-OSKOU EI & NAJAFI, 2013).

Os flavonoides são um grupo pertencente à classe dos polifenóis, e além dos muitos efeitos benéficos para a saúde, o seu efeito mais importante está relacionado as suas características antioxidantes.

O teor em flavonoides totais foi determinado espectrofotometricamente utilizando como reagente um solução metanólica de cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ), e a quercetina como

padrão (SANT'ANA *et al.*, 2014). Neste método cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides em metanol, promovendo um desvio para maiores comprimentos de onda, chamado efeito batocrômico (MEDA *et al.*, 2005; AHN *et al.*, 2007). O teor em flavonoides totais do mel foi expresso em termos de concentração em quercetina, através da construção de uma curva analítica obtida a partir de diferentes concentrações desse padrão (0 – 1,78 mg/mL; **Figura 14**-pag.58).

Conforme se observa os resultados obtidos, o teor em flavonoides (**Tabela 19**) totais das amostras de mel estudadas variou de 6,36 mgEQ/100g para os méis de eucalipto, de 3,52 mgEQ/100g para os méis de morrão de candeia, de 3,02mg EQ/100g para os méis de assa peixe, de 3,54 mgEQ/100g para méis de laranjeira e de 5,82 mgEQ/100g para os méis silvestres. Assim como foi observado para o teor de fenólicos totais, ocorreu uma variação conforme a origem botânica, e os méis de eucalipto e silvestre foram os que apresentaram as maiores médias para o conteúdo em flavonoides totais, destacando-se as amostras **E2** (10,89 mgEQ/100g) e **S1** (10,07 mgEQ/100g). As variações nos teores de flavonoides podem estar relacionadas à planta visitada pela *Apis mellifera*, localização geográfica, bem como pelos fatores ambientais.

Os dados relatados aqui estão de acordo com trabalhos realizados pelo nosso grupo, onde nove amostras de méis do Rio de Janeiro e São Paulo, apresentaram valores em flavonóides totais que variam de 0,17 - 4,27 mgQE/100 g (LIANDA *et al.*, 2012), vinte e uma amostras de méis florais (morrão de cadeia, eucalipto e cambará) do Rio de Janeiro e Minas Gerais apresentaram valores que variaram de 2,93 – 7,62 mgQE/100 g (SANT'ANA *et al.*, 2012) e sessenta méis florais do Rio de Janeiro os valores variaram de 2,16 - 9,92 mgQE/100 g (SANT'ANA *et al.*, 2014).

Os dados observados nesse trabalho para as amostras de méis são semelhantes aos obtidos por Liberato *et al.*(2011) para os méis florais do nordeste do Brasil, com valores para teor em flavonoides que variaram de 0,25 - 8,38 mgQE/100 g. Além disso, foi encontrado valores similares para méis de outros países como em méis da Argélia onde o teor em flavonoides variou de 5,41 – 9,94 mgQE/ 100 g e para méis do Chile onde o teor variou de 0,014-13,8 mgQE/100 g de mel (MUÑOZ *et al.*, 2007) .

Os flavonoides presentes no mel podem ter origem no pólen, na própolis e no néctar sendo a própolis a fonte mais rica em flavonoides A variação do teor de flavonoides ao longo dos anos, e as diferenças de concentrações encontradas nos diversos tipos de mel

são influenciados pelas abelhas que colhem o mel, e o local e a flor do qual retiram o pólen será o principal responsável pelas variações desta substância.

Os estudos realizados por diversos pesquisadores demonstraram que a presença de determinados flavonóides ou ácidos fenólicos pode constituir uma importante ferramenta para a determinação da origem floral e/ou geográfica do mel (BERTONCELJ *et al.*, 2007; IURLINA *et al.*, 2009; LACHMAN *et al.*, 2010; ESCRICHE *et al.*, 2011; ESCRICHE *et al.*, 2014).

Os bons resultados apresentados para a quantificação das substâncias fenólicas nos méis são bastante interessante, pois é conhecida a boa correlação entre o conteúdo de fenóis e os efeitos antioxidantes.

Os polifenóis desempenham um papel muito importante como antioxidante, pois podem retradar ou inibir a ação dos radicais livres, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação que podem ser prejudiciais a saúde.

O desenvolvimento de novos métodos analíticos para determinação da capacidade antioxidante ou quantificação de antioxidantes específicos em matrizes complexas como extratos vegetais, frutas e alimentos em geral, pode ser justificado pela relevância comercial e farmacológica destes aditivos, bem como pela necessidade de metodologias mais simples e baratas (BORGES *et al.*, 2011). Estes métodos diferem entre si, relativamente aos mecanismos de reação, aos tipos de oxidantes e espécies alvo/marcadores, as condições de reação, assim como na maneira de expressar os resultados. A capacidade antioxidante é um parâmetro que quantifica a capacidade de uma determinada substância agir sobre radicais livres e inativá-los (ANTOLOVICH *et al.*, 2002; ROGINSKY & LISSI, 2005).

Atualmente vários estudos tem destacado o mel como uma antioxidante natural (KÚS *et al.*, 2014; ESCUREDO *et al.*, 2013; ALVES *et al.*, 2013), devido a presença de polifenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos), e também os não-fenólicos (ácido ascórbico, carotenoide, ácidos orgânicos, aminoácidos e as proteínas, incluindo certas enzimas, tais como glicose-oxidase e catalase) (PÉREZ *et al.*, 2007; VELA *et al.*, 2007; ESTEVINHO *et al.*, 2008; BERETTA *et al.*, 2005; D'ARCY, 2005).

Além das substâncias fenólicas, tem sido descrito na literatura uma forte correlação entre a capacidade antioxidante e a cor de mel. Muitos pesquisadores têm relatado que o mel escuro tem um maior conteúdo de fenólicos totais e, conseqüentemente, uma maior

capacidade antioxidante (FRANKEL *et al.*, 1998; BERETTA *et al.*, 2005; BERTONCELJ *et al.*, 2007; SANT'ANA *et al.* 2014).

Entre os métodos colorimétricos destacam-se aqueles que relacionados à habilidade dos antioxidantes em neutralizar radicais como DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) ou ABTS [sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico)] e o ensaio do poder redutor (FRAP). Esses métodos espectrofotométricos são relativamente simples baseando-se invariavelmente, na capacidade “descolorante” da amostra.

Apesar do estudo da capacidade de inibição de radicais poder ser realizado através de diversos métodos, no trabalho aqui realizado a capacidade antioxidante dos méis *in natura* foi determinada usando apenas o método de captura do radical orgânico DPPH<sup>•</sup>.

No ensaio com DPPH por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R<sup>•</sup>) presente no mel, o radical DPPH<sup>•</sup> (coloração roxa) foi reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, que foi monitorada espectrofotometricamente pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determinou-se a porcentagem de capacidade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH<sup>•</sup> remanescente no meio reacional.

A porcentagem de capacidade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração efetiva (CE<sub>50</sub>). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE<sub>50</sub> e maior a sua capacidade antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007; BORGES *et al.*, 2011).

Conforme pode ser observado os valores obtidos para a atividade antiradicalar dos méis estudados, expressos através do CE<sub>50</sub>, variaram de 7,05 a 79,06 mg de mel/mL e estão apresentados na **Tabela 19**). Assim como foi observado para o conteúdo das substâncias polifenólicas, ocorreu uma variação nos valores de CE<sub>50</sub> conforme o tipo de origem botânica, e os méis de eucalipto (CE<sub>50</sub>=22,61 mg/mL) e silvestre (CE<sub>50</sub>=30,71 mg/mL) foram novamente os que apresentaram as maiores médias para atividade antioxidante, destacando-se as amostras **E3** (CE<sub>50</sub>=10,23 mg/mL) e **S4** (7,05 mg/mL) (**Tabela 19**). Quanto mais baixo o valor de CE<sub>50</sub> maior a capacidade antioxidante do mel, porque requer menos quantidade do agente sequestrante para reduzir DPPH.

Já o mel de assa-peixe **AS6** (**Tabela 19**) com um dos maiores valores de CE<sub>50</sub> (63,77 mg/mL), mostrou ser um dos menos eficazes na inibição dos radicais, o que pode



estar relacionado ao seu baixo teor em fenólicos (39,66 mg EAG/100 g) e flavonóides (1,61 mg QE/100 g). Esses resultados se assemelham com dados da literatura que indicam que a atividade antiradicalar do mel está relacionada diretamente com a concentração das substâncias fenólicas presentes (BERETTA *et al.*, 2005).

Além disso, foi observado que o mel **E2** apresentou o maior conteúdo em fenólicos (141,06 mgE<sub>AG</sub>/100g) e flavonoides (10,89 mgEQ/100g), boa atividade antiradicalar (CE<sub>50</sub>=10,23 mg/mL) e a coloração âmbar escuro (145 mm Pfund; Tabela 18). Resultados semelhantes foram apresentados por Sant'Ana e colaboradores (2014) para méis brasileiro de diferentes regiões do Rio de Janeiro, onde nove amostras de méis de eucalipto, classificadas como âmbar escuro (117 mm Pfund) apresentou média de CE<sub>50</sub> = 23,46 mg/mL, teor em fenólicos 105,93 mgE<sub>AG</sub>/100g e flavonóides 9,17 mgEQ/100g.

Trabalhos descritos na literatura têm demonstrado uma relação linear entre as substâncias fenólicas e a coloração de mel com sua capacidade antioxidante (SOCHA *et al.*, 2009; ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010; SANT'ANA *et al.*, 2012; SANT'ANA *et al.*, 2014).

Em trabalho realizado por Estevinho e colaboradores (2008) com méis portugueses, foi observado que mel escuro revelou melhores propriedades antioxidantes do que o mel claro. A capacidade antioxidante do mel escuro (CE<sub>50</sub>= 27,24 mg/100 mL) foi maior do que a do mel claro (CE<sub>50</sub>= 68,17 mg/100 mL), que segundo os autores foi justificado pela diferença nos teores das substâncias fenólicas e, conseqüentemente das distintas fontes florais. O mesmo foi verificado por Aljadi e Kamaruddin (2004) e Al-Mamary *et al.* (2002) em seus trabalhos com mel.

Oliveira e colaboradores (2012) encontraram também valores semelhantes de CE<sub>50</sub>= 25,59 mg/100 mL para méis escuros, enquanto os méis claros apresentaram CE<sub>50</sub>= 55,60 mg/100 mL.

Os dados reportados aqui se assemelham aos realizados pelo nosso grupo, onde a atividade sequestradora de radicais livres para nove amostras de méis (silvestre e laranjeira) do Rio de Janeiro e São Paulo, expressa como CE<sub>50</sub>, variou de 10,81 a 52,64 mg/mL (LIANDA *et al.*, 2012). Em outro trabalho vinte e uma amostras de méis florais do Rio de Janeiro e Minas Gerais apresentaram valores de CE<sub>50</sub> que variaram de 10,19 – 83,01 mg/mL, sendo que os méis de eucalipto foram os que apresentaram as melhores atividades antiradicalar, CE<sub>50</sub>= 10,19-21,54 mg/mL (SANT'ANA *et al.*, 2012).

Salgueiro (2012) analisou onze amostras de méis monoflorais de abelhas *Apis mellifera* do Rio de Janeiro encontrando valores de  $CE_{50}$  similares aos encontrados neste trabalho variando de 16,14 - 67,69 mg/mL.

Os resultados da capacidade antioxidante para as amostras de mel neste estudo foram superiores aos valores relatados para mel monofloral da Malásia ( $CE_{50} = 72.75- 90.83$  mg/mL; A-RAHAMAN *et al.*, 2013) e semelhantes aos valores (15,68- 48,89 mg/mL) descrito por Chua e colaboradores (2013) para três tipos de méis da Malásia.

Os dados da literatura indicam que o conteúdo em fenólicos totais é muito diversificado e pode variar de 0,5 mg/100 g a 130,0 mg/100 g de mel (AL-MAMARY *et al.*, 2002; GHELDOF & ENGESETH, 2002; IGLESIAS *et al.*, 2004; MARTOS *et al.*, 1997; TOMAS-BARBERÁN *et al.*, 2001; PÉREZ-PÉREZ *et al.*, 2013; KÚS, *et al.*, 2014; GAŠIĆ *et al.*, 2014).

#### 5.4. Preparo dos extratos das amostras de mel

A escolha da técnica de extração de compostos de fenólicos pode gerar um perfil químico diferentes para o mesmo tipo de mel. A extração é geralmente influenciada pela natureza da amostra, tipo de solvente, bem como a técnica de extração empregada. Os métodos mais usuais para extração de substâncias fenólicas são: Soxhlet e a maceração (BIESAGA, 2011; CASTRO-VARGAS *et al.*, 2010)

Neste trabalho a separação das substâncias fenólicas da matriz do mel foi realizada pela combinação da cromatografia usando resina XAD-2 e a partição líquido-líquido com acetato de etila (LIANDA, 2004). Desta forma foram eliminados os açúcares que dificultam as análises das substâncias fenólicas por métodos cromatográficos e/ou espectrométricos. Ferreres *et al.* (1991) e Tomás-barberán *et al.*, (1992) foram os pioneiros na utilização de XAD-2 na separação de substâncias fenólicas do mel.

Os extratos fenólicos foram obtidos através de coluna aberta preenchida com resina XAD-2 pelo método descrito na item 4.7 (pag.54) para as 45 amostras de méis. A extração foi realizada em triplicada. Os resíduos secos resultantes foram pesados e não diferem mais do que 30% entre eles. Na **Tabela 20** estão apresentados os rendimentos obtidos para os extratos a partir de 50g de cada amostra de mel utilizando acetato de etila como o solvente de extração líquido-líquido.

**Tabela 20** – Rendimentos obtidos para os extratos dos méis estudados nesse trabalho.

<b>Amostras de Mel</b>	<b>Extratos</b>	<b>Resíduo seco (mg/50g de mel)</b>
<b>E1(Eucalipto)</b>	<b>EE1</b>	26
<b>E2</b>	<b>EE2</b>	20
<b>E3</b>	<b>EE3</b>	30
<b>E4</b>	<b>EE4</b>	22
<b>E5</b>	<b>EE5</b>	17
<b>E6</b>	<b>EE6</b>	16
<b>E7</b>	<b>EE7</b>	21
<b>E8</b>	<b>EE8</b>	22
<b>E9</b>	<b>EE9</b>	19
<b>E10</b>	<b>EE10</b>	10
<b>E11</b>	<b>EE11</b>	18
<b>E12</b>	<b>EE12</b>	17
<b>Média</b>	<b>-</b>	<b>19,83±5,07</b>
<b>M1(Morrão de Candeia)</b>	<b>EM1</b>	12
<b>M2</b>	<b>EM2</b>	14
<b>M3</b>	<b>EM3</b>	13
<b>M4</b>	<b>EM4</b>	16
<b>M5</b>	<b>EM5</b>	15
<b>M6</b>	<b>EM6</b>	15
<b>M7</b>	<b>EM7</b>	17
<b>M8</b>	<b>EM8</b>	15
<b>M9</b>	<b>EM9</b>	11
<b>Média</b>	<b>-</b>	<b>14,22±1,92</b>
<b>S1(silvestre)</b>	<b>ES1</b>	31
<b>S2</b>	<b>ES2</b>	20
<b>S3</b>	<b>ES3</b>	34
<b>S4</b>	<b>ES4</b>	25
<b>S5</b>	<b>ES5</b>	16
<b>S6</b>	<b>ES6</b>	24
<b>Média</b>	<b>-</b>	<b>25±6,69</b>
<b>AS1(Assa peixe)</b>	<b>EAS1</b>	18
<b>AS2</b>	<b>EAS2</b>	18
<b>AS3</b>	<b>EAS3</b>	15
<b>AS4</b>	<b>EAS4</b>	8
<b>AS5</b>	<b>EAS5</b>	30
<b>AS6</b>	<b>EAS6</b>	12
<b>AS7</b>	<b>EAS7</b>	11
<b>AS8</b>	<b>EAS8</b>	16
<b>AS9</b>	<b>EAS9</b>	15
<b>Média</b>	<b>-</b>	<b>15,88±6,23</b>
<b>L1(laranjeira)</b>	<b>EL1</b>	10
<b>L2</b>	<b>EL2</b>	10
<b>L3</b>	<b>EL3</b>	17
<b>L4</b>	<b>EL4</b>	20

**Tabela 20** – Continuação

<b>Amostras de Mel</b>	<b>Extratos</b>	<b>Resíduo seco (mg/50g de mel)</b>
<b>L5</b>	<b>EL5</b>	26
<b>L6</b>	<b>EL6</b>	15
<b>L7</b>	<b>EL7</b>	13
<b>L8</b>	<b>EL8</b>	32
<b>L9</b>	<b>EL9</b>	10
<b>Média</b>	<b>-</b>	<b>17±7,76</b>

Os extratos foram preparados com o objetivo de avaliar seu potencial antioxidante, bem como definir seu perfil por RMN de  $^1\text{H}$  e quantificar as substânciasfenólicas por CLAE-DAD. Posteriormente as substâncias identificadas foram correlacionadas à origem geográfica e/ou botânica do mel através de tratamento quimiométrico.

#### **5.4.1 - Identificações das Substâncias nos Extratos por CLAE-DAD**

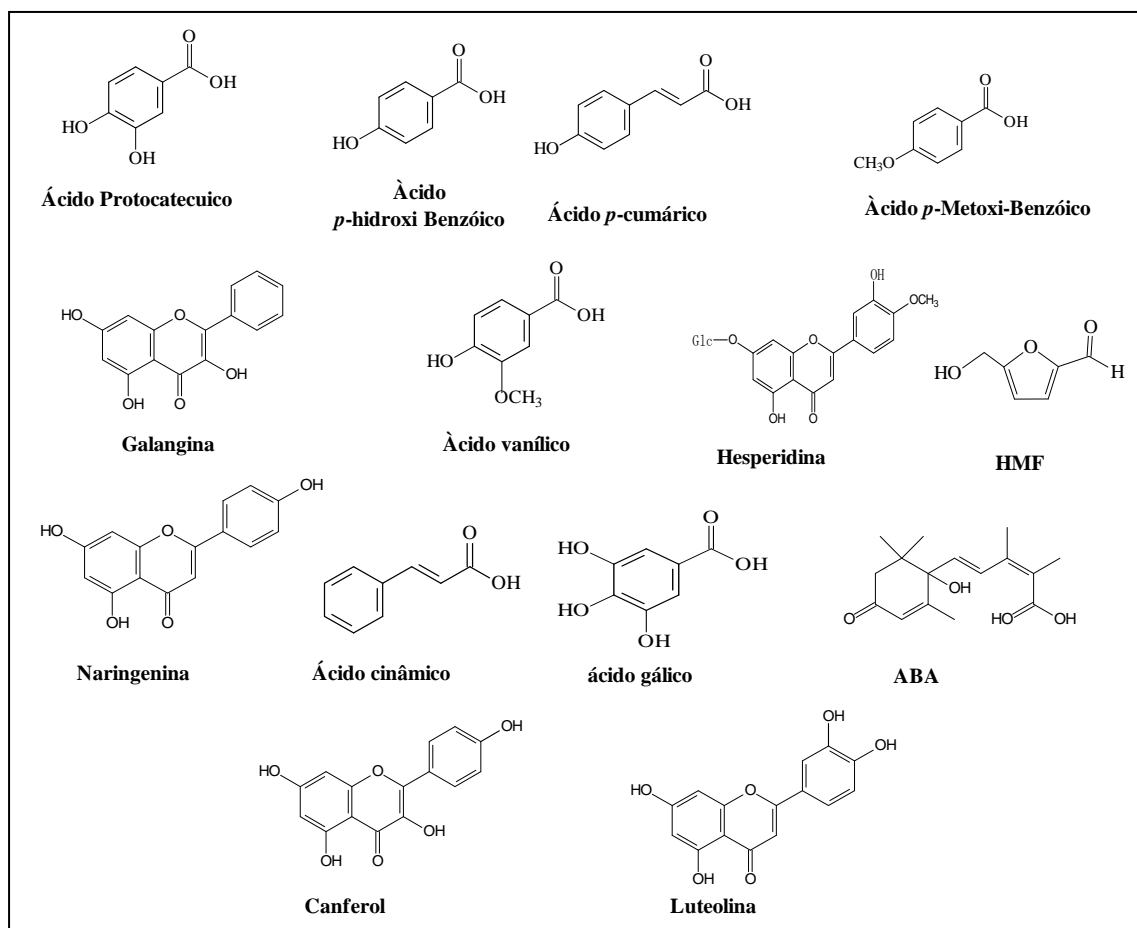
Apesar do grande número de trabalhos publicados, a quantificação e identificação das variadas substânciasfenólicas em mel ainda não foram completamente caracterizadas (IGNAT *et al.*, 2011; RONG & YANG, 2003). Assim, há grande espaço para o desenvolvimento de métodos de quantificação de acordo com o perfil das substânciaspolifenólicas presentes (LIU *et al.*, 2008).

Têm sido propostos vários métodos analíticos para a separação, identificação e quantificação das substânciasfenólicas, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna com fase reversa (C18 – octadecil), umas das técnicas analíticas mais utilizadas, visto que, a derivatização antes da análise não é necessária (HERTOG *et al.*, 1992; JUSTESEN *et al.*, 1998; MERKEN & BEECHER, 2000).

Vários trabalhos estão disponíveis tendo a CLAE como técnica para a quantificação de substânciasfenólicas (MERKEN & BEECHER, 2000; FLAMINI, 2003; ROBBINS, 2003; STALIKAS, 2007; KALILI & VILLIERS, 2011; CHEN *et al.*, 2011).

Para a determinação da composição dos extratos de mel foi utilizado a CLAE com detector de arranjo de fotodiodos. As análises por CLAE-DAD dos extratos de méis foram realizadas de acordo com o experimental descrito no item 4.13 (pag.63). As condições cromatográficas (fase móvel, velocidade de fluxo e tempo de análise) foram ajustadas de

forma a permitir a análise dos ácidos fenólicos (derivados benzóicos e cinâmicos) e flavonoides (aglicona e glicosilados) em uma mesma corrida. A identificação e quantificação das substâncias fenólicas foram realizadas por comparação dos seus tempos de retenção e espectros no UV com os dos padrões puros de referência e utilizando essas referências como padrões externos. Um total de 14 padrões foi utilizado neste trabalho (**Figura 19**).



**Figura 19-** Estruturas das substâncias usadas como padrões nas análises de CLAE-DAD

Na **Tabela 21** estão reunidos os tempos de retenção e os respectivos comprimentos de onda máximos obtidos pelos espectros no UV de cada padrão.

**Tabela 21**– Tempos de retenção e máximos de absorção no UV das substâncias utilizadas como padrão.

<b>Padrões utilizados</b>	<b>t<sub>R</sub>(min)</b>	<b>λ max (nm)</b>
Ácido gálico	2,96	271
HMF	3,42	282
Ácido protocatecuico	4,10	259; 294
Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico	5,75	254
Ácido vanílico	6,26	260;291
Ácido <i>p</i> -cumárico	8,03	310
Ácido <i>p</i> -metoxi-benzóico	12,14	254
ABA	13,01	232; 262
Naringenina	14,50	289
Luteolina	14,78	254; 342
Hesperidina	15,06	232; 287
Ácido cinâmico	15,07	279
Canferol	16,52	265; 365
Galangina	22,40	265; 354

Devido a possíveis interações entre as substâncias fenólicas na complexa matriz que constitui o extrato de mel, em alguns casos ocorreram coincidências ou pequenas variações nos tempos de retenção das substâncias fenólicas quando comparados aos padrões analisados individualmente.

Embora todos os extratos dos méis (doze de mel de eucalipto; nove de morrão de candeia; nove de assa-peixe; nove de laranjeira e seis de mel silvestre) tenham sido analisados por CLAE-DAD, para discutir o perfil cromatográfico das substâncias fenólicas será apresentado apenas um cromatograma (**Figura 20**) de cada extrato de mel, a saber: eucalipto-**EE9** , morrão de candeia- **EM 8** , assa-peixe-**EAS6** , laranjeira -**EL7** e silvestre - **ES1** , os demais estão apresentados no anexo 1 (pag.162). As condições de análise por CLAE para as amostras estão descritas na parte experimental no item 4.13 pag. 63.

As substâncias foram identificadas nos extratos com base na comparação dos tempos de retenção e as curvas de absorção no UV com a dos padrões autênticos. A análise por CLAE das substâncias presentes nas amostras revelou que apenas HMF foi comumente encontrada em todas as amostras de mel analisadas exceto no mel **ES6**. Um total de 14 substâncias foram identificadas (7 ácidos fenólicos, 5 flavonóides e duas outras classes de substâncias). O perfil fenólico do mel foi confirmado por conter ácido gálico, ácido cinâmico, ácido *p*-metoxi-benzóico e ácido *p*-hidroxi benzóico; além das substâncias *c,t*-ABA e HMF como os principais componentes presentes na maioria dos extratos.

Os níveis calculados para cada substância identificada individualmente nos méis analisados serão apresentados posteriormente.

Foi possível identificar os seguintes compostos nos doze extratos dos méis de eucalipto: sete ácidos- ácido gálico, ácido cinâmico, ácido vanílico, ácido *p*-metoxibenzóico, ácido protocatecuico, ácido *p*-hidroxi-benzoico, ácido *p*-cumárico; três flavonóides- canferol, galangina e luteolina, além de *c,t*-ABA e HMF. Sendo que o ácido gálico esteve presente na maioria dos extratos e o ácido vanílico foi encontrado apenas no mel de eucalipto, estando presente apenas nas amostras **EE8** e **EE9** (**Figuras 49 e 50-anexo** pag.163 e 164)

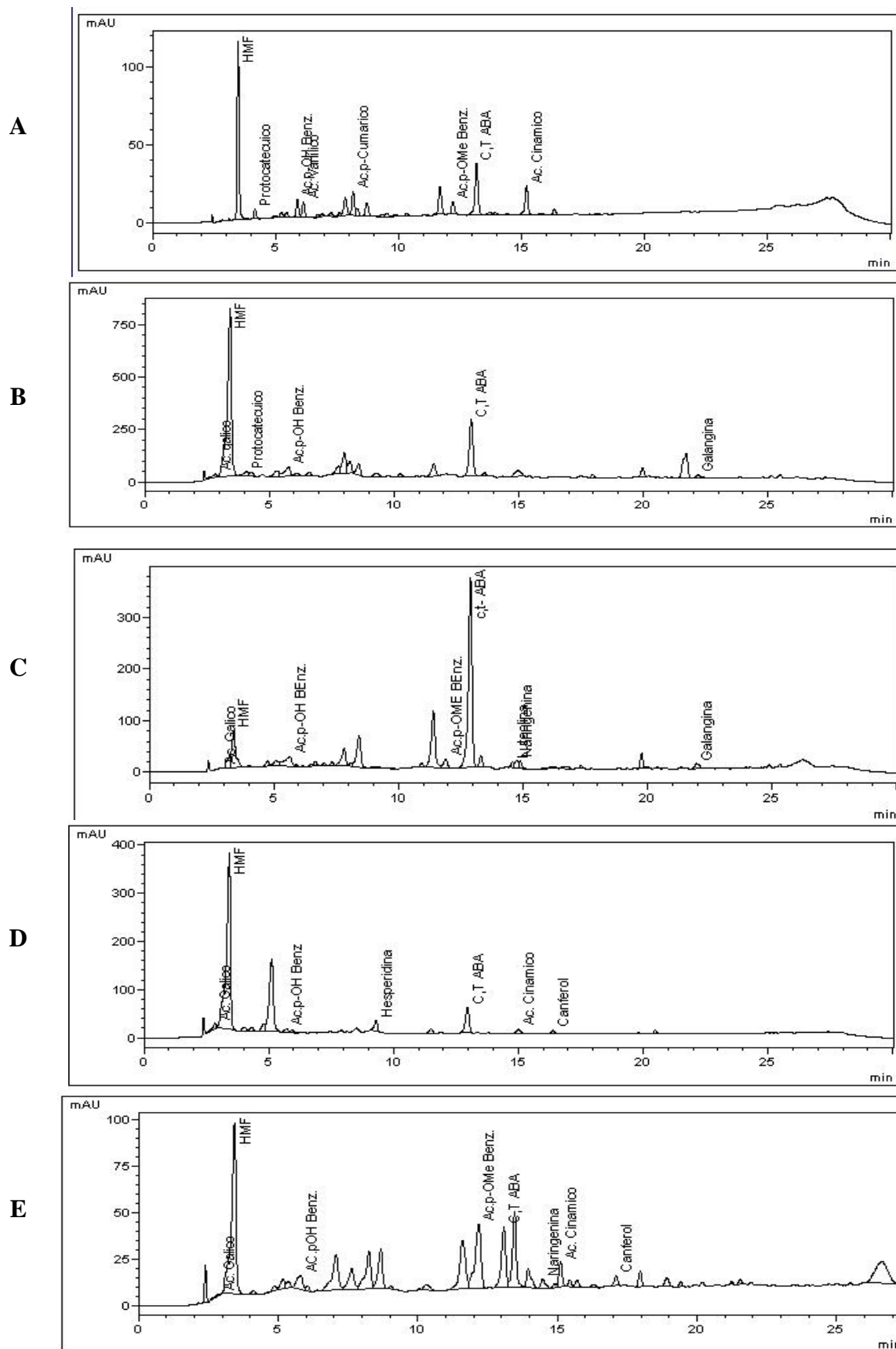
A presença do ácido gálico e do ácido *p*-cumárico já foi relatado em amostras de extratos de méis de eucalipto (RAMANAUSKIENE *et al.*, 2009; PERNA *et al.*, 2013).

Neste tipo de mel foi observado pequena presença de flavonoides, sendo encontrado em apenas três amostras. O canferol, presente na amostra **EE6**, a galangina presentes nas amostras **EE1**(**Figura 42-anexo** pag.162) e **EE7**(**Figura 48-anexo** pag.163) e luteolina presente na amostra **EE7**(**Figura 48-anexo** pag.164).

Nos nove extratos de morrão de candeia foi possível identificar ácido gálico, ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-metoxi-benzóico, ácido *p*-hidroxi benzoico, ácido protocatecuico, *c,t*-ABA, HMF, e a galangina.

O ácido *p*-hidroxi benzoico, HMF e *c,t*-ABA estiveram presentes nas nove amostras de mel de morrão de candeia. A galangina foi o único flavonoide encontrado, sendo identificado apenas nas amostras **EM4**, **EM5** e **EM8** (**Figuras 57, 58 e 61-anexo** pag.165 e 166). Nos nove extratos de assa-peixe foi identificado o ácido gálico, ácido cinâmico, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-metoxi-benzóico, ácido *p*-hidroxi benzoico, *c,t*-ABA e HMF, além dos quatro flavonoides: luteolina, naringenina, caferol e galangina. Sendo o mel com maior variedade de flavonoides encontrados.

O 5-hidrometilfurfural (HMF) foi à única substância encontrada em todos os méis de assa-peixe. A galangina esteve ausente apenas nas amostras **EAS1** e **EAS7**(**Figuras 63 e 69-** anexo pag.167 e 169), assim como o ácido *p*-metoxi benzóico em **EAS1**; e *c,t*-ABA na amostra **EAS4**(**Figura 66-anexo** pag.168).



**Figura 20-** Substâncias fenólicas identificadas no extrato: **A**-eucalypto **EE9**, **B**-morrão de candeia **EM8**, **C**- assa-peixe **EAS6**, **D**-laranja **EL7** e **E**-silvestre **ES6** por CLAE-DAD.



Em trabalhos anteriores realizados por Vianna (2010) e Salgueiro (2012) a naringenina também foi identificada em méis de assa-peixe.( VIANNA, 2010; SALGUEIRO, 2012 )

Para os nove extratos de laranjeira foi possível identificar ácido gálico, ácido cinâmico, ácido *p*-metoxi-benzóico, ácido *p*-hidroxi benzóico, *c,t*-ABA, HMF, e os flavonoides hesperidina, naringenina, caferol e galangina.

O ácido *p*-hidroxi benzóico e o HMF foram identificados em todas as amostras estudadas. O ácido abscísico (*c,t*-ABA) este ausente apenas na amostra **EL5(Figura 76-anexo pag.170)** e o ácido gálico na amostra **EL6(Figura 77-anexo pag.170)**.

Na literatura a hesperidina é descrita como um biomarcador para mel de laranjeira ( FERRERES *et al.* , 1993) e nesse trabalho foi identificada em três amostras de méis a **EL3, EL7 e EL8(Figuras 74,78 e 79-anexo pag.170 e 171)** .

Para os seis extratos de méis silvestres foi possível identificar ácido gálico, ácido cinâmico, ácido *p*-metoxi-benzóico, ácido *p*-hidroxi benzoico, ácido *p*-cumárico, *c,t*-ABA , HMF, e dois flavonoides: naringenina e caferol (**Figuras 81-86-anexo pag.171-173**).

Os méis silvestres apresentaram um perfil químico variado, no entanto, vale à pena destacar que a presença do ácido cinâmico foi comum a cinco amostras de mel silvestre das seis estudadas neste trabalho, estando ausente apenas na amostra **ES6**. Esta variedade pode ser justificada pelo perfil polínico diversificado (**Tabela 19** , pag. 77)

A comparação dos perfis cromatográficos dos méis monoflorais e heterofloral (eucalipto, morrão de candeia, assa peixe, laranjeira e silvestre) mostrou que as substâncias fenólicas encontradas não foram às mesmas na sua totalidade. Quando os cromatogramas e os respectivos espectros de absorção no UV foram analisados, pode-se verificar uma diferença bastante pronunciada, no que diz respeito às áreas relativas dos picos, bem como a existência de picos distintos para cada amostra de mel analisada.

Através da análise dos perfis cromatográficos verificou-se que a composição do mel pode variar de acordo com origem floral e/ou geográfica, bem como algumas variações climáticas. Levandos-se em conta os méis obtidos a partir de uma mesma região, estes podem fornecer um de perfil de CLAE como “impressão digital” e dessa forma ser

útil na caracterização da sua qualidade. No entanto, experimentos adicionais devem ser realizados.

Alvarez-Suarez *et al.* (2010c) identificaram por CLAE-DAD-ESI/MS catorze polifenólicos em amostras de mel cubano: os ácidos *p*-cumárico, siríngico, vanílico, caféico, ferúlico, e os flavonoides mirecetina, quercetina e canferol. Jaganathan *et al.* (2010) estudaram méis indianos e identificaram também por CLAE-DAD-ESI/MS os ácidos diidroxibenzóico, caféico, ferúlico e cinâmico como constituintes majoritários nas amostras de mel, e Jasicka-Misiak *et al.* (2012) identificaram por CLAE os ácidos 3-hidroxibenzóico, clorogênico, 4-hidroxibenzóico, vanílico, caféico, siríngico, ferúlico, *p*-cumárico, rosmarínico, elágico, miricetina, quercetina, canferol, crisina e galangina em méis poloneses. Perna e colaboradores (2013) estudaram noventa amostras de mel do sul da Itália e determinaram por CLAE-UV, os seguintes ácidos fenólicos: ácido gálico, ácido clorogênico, ácido caféico, ácido *p*-cumárico, ácido benzóico e ácido ferúlico, além dos flavonóides: rutina, miricetina e quercetina, sendo o ácido gálico e galocatequina as substâncias mais abundantes.

Os resultados da determinação quantitativa individual das substâncias fenólicas identificadas nos extratos de mel, expressos em mg por 100g de mel, estão apresentados nas **Tabela 22-26**.

A análise conjunta das substâncias presentes em todos os extratos por CLAE-DAD revelou uma concentração média maior em ácidos fenólicos (21,50 mg/100g mel) do que em flavonóides (2,05 mg/100g mel).

Através da quantificação das substâncias foi possível observar também, que entre as amostras estudadas, os méis de eucalipto apresentaram a maior média para a concentração de ácidos fenólicos (27,30 mg/100g mel) entre os méis monoflorais estudados, enquanto os méis de laranjeira foram mais ricos em flavonoides (5,63 mg/100g mel).

O ácido protocatecuico foi encontrado apenas nos méis de eucalipto e morrão de candeia, apresentando uma concentração média de 6,35mg/100g mel e 0,62mg/100g mel, respectivamente, foi observada na maioria das amostras de eucalipto analisadas (exceto **EE1** e **EE10**) com um percentual variando na faixa de 8,1% (**EE12**) a 81,8% (**EE6**), em relação aos ácidos fenólicos presentes nestas amostras e em apenas uma amostra de morrão de candeia (**EM8**).

Os ácido *p*-hidroxi benzóico e *p*-metoxi benzóico foram os ácidos fenólicos encontrados em maior quantidade nas amostras estudadas variando de 0 a 96,43% e 0 a 73,27% ,respectivamente.

**Tabela 22-** Conteúdo das substâncias fenólicas das amostras de extratos de méis de eucalipto (mg/100g de mel).

Substâncias fenólicas	EE1	EE2	EE3	EE4	EE5	EE6	EE7	EE8	EE9	EE10	EE11	EE12
Ácido gálico	0,85± 0,03	2,05± 0,01	1,30± 0,00	0,29± 0,05	-	4,69± 1,32	0,48± 0,77	-	-	-	-	0,48± 0,05
Ácido cinâmico	-	-	1,11± 0,06	0,57± 0,02	-	-	-	12,46± 0,02	0,71± 0,03	0,90± 0,02	-	0,60± 0,05
Ácido vanílico	-	-	-	-	-	-	-	1,26± 0,05	33,98±0,03	-	-	-
Canferol	-	-	-	-	-	0,47± 0,01	-	-	-	-	-	-
Galangina	0,89± 0,10	-	-	-	-	-	0,90± 0,09	-	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -metoxi benz.	4,13± 0,05	-	-	9,11± 0,08	0,43± 0,06	1,63± 0,01	-	12,31± 0,05	2,93± 0,01	2,03± 0,05	-	1,14± 0,03
Ácido protocatecuico	-	1,66± 0,02	10,81±0,06	5,63± 0,04	1,76± 0,02	31,34±0,06	7,39± 0,02	15,64± 0,03	0,73± 0,05	-	0,12± 0,08	1,36± 0,07
Ácido <i>p</i> -OH Benzóico	18,18±0,12	-	-	16,43± 0,09	8,26± 0,13	38,46±0,20	7,33± 0,08	-	1,87± 0,09	8,28± 0,11	1,20± 0,04	13,25±0,01
Ácido <i>p</i> -cumárico	-	-	-	-	-	-	-	42,71± 0,31	1,09± 0,02	-	-	-
<i>c,t</i> - ABA	26,22±0,44	18,49±0,56	-	4,68± 0,23	2,61± 0,12	10,14±0,06	5,05± 0,32	2,21± 0,09	1,91± 0,08	8,22± 0,27	5,23± 0,77	5,95± 0,42
HMF	16,87±0,12	9,50±0,64	1,00±0,01	0,17±0,00	3,45±0,03	ALD	ALD	ALD	1,29±0,06	0,19±0,00	26,71±2,56	0,56±0,02
Luteolina	-	-	-	-	-	-	0,05± 0,01	-	-	-	-	-

\* ALD – abaixo do limite de detecção.

**Tabela 23-** Conteúdo das substâncias fenólicas das amostras de extratos de méis de morrão de candeia (mg/100g de mel).

Substâncias fenólicas	EM1	EM2	EM3	EM4	EM5	EM6	EM7	EM8	EM9
Ácido gálico	1,67± 0,02	-	-	0,75± 0,06	-	-	-	1,39± 0,04	-
Ácido cinâmico	0,27± 0,03	-	-	1,02± 0,02	-	-	0,49± 0,06	-	-
Galangina	-	-	-	0,60± 0,03	0,47± 0,05	-	-	1,28± 0,08	-
Ácido <i>p</i> -metoxibenzóico	-	-	0,78± 0,05	-	1,96± 0,09	-	1,40± 0,02	5,65± 0,08	-
Ácido protocatecuico	-	-	-	-	-	-	-	5,65± 0,12	-
Ácido <i>p</i> -hidroxi benzóico	3,60± 0,12	6,91± 0,99	4,27± 0,09	10,87± 0,18	12,55± 0,35	3,26± 0,13	4,88± 0,09	12,04± 0,25	11,18± 0,09
Ácido <i>p</i> -cumárico	-	-	-	-	-	-	2,14± 0,05	-	3,32± 0,08
<i>c,t</i> -ABA	9,41± 0,23	4,62± 0,56	6,24± 0,32	23,06± 0,26	87,41± 0,54	0,91± 0,08	23,13± 0,06	12,12± 0,32	7,85± 0,05
HMF	51,04± 0,45	19,86± 0,15	10,20± 0,89	32,21± 0,35	29,92± 0,99	54,15± 0,57	53,28± 0,55	21,70± 0,29	0,10± 0,01

**Tabela 24-** Conteúdo das substâncias fenólicas das amostras de extratos de méis de assa-peixe (mg/100g de mel).

Substâncias fenólicas	EAS1	EAS2	EAS3	EAS4	EAS5	EAS6	EAS7	EAS8	EAS9
Ácido gálico	0,14±0,01	0,22±0,09	-	-	-	0,11±0,00	0,84±0,01	0,76±0,00	-
Ácido cinâmico	-	2,29±0,26	0,54±0,02	-	2,76±0,02	-	0,25±0,00	-	2,69±0,05
Naringenina	8,35±0,12	-	-	-	-	0,71±0,06	1,92±0,05	5,58±0,65	-
Canferol	-	-	-	1,17±0,05	-	-	-	-	-
Galangina	-	1,20±0,05	0,19±0,01	0,61±0,03	2,41±0,00	1,08±0,02	-	1,06±0,06	2,04±0,11
Ácido <i>p</i> -metoxi-benz.	-	5,48±0,15	1,36±0,05	4,24±0,25	3,47±0,05	3,80±0,10	1,42±0,00	5,97±0,01	5,65±0,29
Ácido <i>p</i> -OH benzóico	-	-	5,29±0,24	4,75±0,62	5,25±0,16	6,78±0,25	-	19,42±1,00	20,68±1,25
Ácido <i>p</i> -cumárico	-	-	-	2,44±0,06	5,09±0,18	-	-	-	-
<i>c,t</i> -ABA	7,71±0,23	7,04±0,06	2,35±0,23	-	42,76±1,68	1,98±0,07	8,58±0,29	17,88±1,54	19,83±1,58
HMF	16,23±0,32	0,57±0,08	10,02±0,54	20,76±0,45	5,80±0,89	1,48±0,03	0,43±0,07	4,04±0,59	3,08±0,01
Luteolina	-	-	-	5,77±0,02	-	1,02±0,04	-	-	-

**Tabela 25-** Conteúdo das substâncias fenólicas das amostras de extratos de méis de laranjeira (mg/100g de mel).

Substâncias fenólicas	EL1	EL2	EL3	EL4	EL5	EL6	EL7	EL8	EL9
Ácido gálico	0,83±0,01	0,27±0,00	0,06±0,12	0,73±0,01	0,91±0,23	-	2,29±0,16	2,56±0,05	1,26±0,07
Ácido cinâmico	-	-	-	-	1,25±0,03	-	1,52±0,06	-	0,80±0,00
Naringenina	0,55±0,01	0,97±0,01	-	1,49±0,04	-	ALD	-	-	-
Hesperidina	-	-	1,69±0,05	-	-	-	17,71±1,77	11,65±1,02	-
Canferol	-	1,42±0,12	0,30±0,01	-	-	3,18±0,25	3,17±0,03	4,22±0,98	1,56±0,01
Galangina	-	-	-	-	-	-	-	1,77±0,78	-
Ácido <i>p</i> -metoxi-benz.	-	-	0,14±0,00	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -OH benzóico	1,56±0,58	1,91±0,07	0,80±0,00	23,26±0,28	8,98±0,15	10,58±1,52	4,77±0,08	24,73±1,08	3,19±0,88
<i>c,t</i> -ABA	5,77±0,32	6,48±0,55	1,96±0,05	20,81±1,07	-	24,60±2,34	8,50±2,56	69,37±0,58	32,52±1,89
HMF	3,37±0,10	5,38±0,99	1,87±0,11	9,03±1,09	18,82±0,23	83,31±1,25	33,69±3,54	17,40±1,77	15,46±0,99

**Tabela 26-** Conteúdo das substâncias fenólicas das amostras de extratos de méis silvestre (mg/100g de mel).

Substâncias fenólicas	ES1	ES2	ES3	ES4	ES5	ES6
Ácido gálico	0,41±0,00	1,64±0,05	-	1,05±0,00	-	92,65±3,58
Ácido cinâmico	3,75±0,08	1,90±0,01	4,58±0,35	3,05±0,06	1,90±0,07	-
Naringenina	0,67±0,01	-	-	-	-	3,08±0,29
Canferol	7,17±0,12	-	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -metoxi-benzóico	78,01±0,35	-	-	-	9,07±0,56	-
Ácido <i>p</i> -hidroxi benzóico	16,46±0,89	-	123,83±5,09	-	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	-	-	-	-	7,39±0,36	-
<i>c,t</i> -ABA	14,20±0,78	-	-	-	45,33±2,05	-
HMF	17,11±0,56	10,05±0,88	85,18±1,72	12,04±1,05	4,61±0,04	-

A galangina foi encontrada na maioria dos méis monoflorais estudados variando de 0 a 13,06% do conteúdo de substâncias fenólicas identificadas, apresentado em maior percentual na amostra **EAS1**.

As amostras de laranjeira apresentaram maior percentagem de ABA variando de 0 a 73,10% , sendo a amostra **EL8** a de maior percentual . O conteúdo deste ácido na maioria das amostras de mel foi superior a 30%. A quantificação do ácido abscísico, para as amostras em estudo variou de 2,21 a 26,22 mg/100 g de mel para o mel de eucalipto; de 4,62 a 87, 41 mg/100 g de mel para o mel de morrão de candeia; de 1,98 a 42,76 mg/100 g de mel para o mel de assa-peixe; de 1,96 a 69,37 mg/100 g de mel para mel de laranjeira e 14,20 a 45,33 mg/100 g de mel para mel silvestre, sendo encontrado em maior media nos meis de morrão de candeia (19,42mg/100g mel).Assim, não poderia ser considerada como um dos importantes componentes fitoquímicos para autenticação do tipo de mel.

Em relação aos dados da literatura, o ácido abscísico, também tem sido encontrado em muitos outros méis em várias concentrações. Por exemplo, na Nova Zelândia nos méis monoflorais de urze (*C. vulgaris* L.) o ABA foi detectado em quantidades pequenas que variaram de 0,16-0,51 mg/ 100 g (TAN *et al.*, 1989). Entretanto, em méis Português de urze (*Erica* spp.) a quantidade de ácido abscísico foi significativamente mais elevado e variaram de 2,5mg/100 g a 16,6mg/100 g (FERRERES *et al.*, 1996a). Portanto, este isoprenóide foi proposto como um marcador floral.

O valor encontrado por Perna e colaboradores (2013) para o ácido gálico em méis de eucalipto e laranjeira (5,30 mg/100g mel e 1,19 mg/100g mel), respectivamente foram superiores. Entretanto as quantidades de acido *p*-cumárico foram inferiores para méis de eucalipto(0,34 mg/100g mel) e superiores em méis de laranjeira(0,15 mg/100g mel) comparados aos encontrados neste trabalho.

Em geral, o flavonoide predominante foi canferol onde seu nível variou de 0% a 31,08% do conteúdo de polifenólicos na maioria das substâncias estudadas. O canferol foi identificado nos méis de eucalipto (0,038mg/100g mel), assa-peixe (0,13mg/100gmel), laranjeira (1,53mg/100g mel) e silvestre (1,19mg/100g mel), sendo que a maior média foi encontrada para os méis de laranjeira (a amostra **EL7** a de maior percentual 31,08%).

Tanto o flavonoide naringenina (1,83mg/100g mel), quanto a galangina (0,95 mg/100g mel) foram encontrados em maiores quantidades nos méis de assa-peixe.

Os ácidos fenólicos representaram cerca de 82,38% enquanto os flavonoides representaram cerca de 17,61% do total de polifenólicos quantificados nas amostra de mel analisadas.

Além das substâncias fenólicas, um isoprenoide, o ácido abscísico (ABA) e um derivado furânico, o 5-hidroximetilfurfural (HMF) foram identificados na maioria das amostras analisadas como componentes importantes, variando de 0 a 66,36% e de 0 a 77,33%, respectivamente.

O ácido abscísico é um hormônio da planta e já foi previamente reconhecido como um marcador de mel urze (FERRERE *et al.*, 1996). Embora este ácido seja um isoprenoide, ele mostra forte absorção no UV a 280 nm, e assim como os ácidos fenólicos pode ser facilmente detectado por CLAE-DAD, como foi observado nos méis estudados nesse trabalho.

A presença de compostos heterocíclicos contendo oxigênio, tais como o 5-hidroximetilfurfural (HMF) são muitas das vezes oriundos da caramelização de açúcares, e são exemplos de artefatos produzidos no mel durante o processamento pós-colheita e/ou o armazenamento em temperaturas inadequadas.

#### **5.4.2 - Determinação do teor em substâncias polifenólicas e avaliação da Capacidade antioxidantedas amostras de extrato de mel.**

O conteúdo em fenólicos e flavonóides totais e os testes de capacidade antioxidante *in vitro* foram realizados para os quarenta e cinco extratos de mel a fim de comparar com aqueles realizados com o mel *in natura*. Para isto foram utilizadas condições experimentais semelhantes às descritas na parte experimental (itens 4.6 - 4.10) com apenas pequenas modificações.

Os resultados obtidos para a determinação dos fenólicos, flavonoides, FRAP, ABTS e DPPH totais para os quarenta e cinco extratos de mel estão apresnetados na **Tabela 27**. Além disso, os resultados serão correlacionados com o conteúdo das substância fenólicas determinadas por CLAE-DAD em cada tipo de mel.

O teor em fenólicos totais e flavonoides variaram significativamente entre os extratos conforme o tipo floral do mel que o originou. Para os extratos dos méis de



eucalipto os valores em fenólicos variam de 1,18 a 15,05 mgEAG/100g, enquanto o teor em flavonoide variou de 0,75 a 5,85 mgEQ/100g de mel (**Tabela 27**).

**Tabela 27-** Valores médios e os desvios padrões dos teores de fenólicos, flavonoides totais, FRAP, ABTS e DPPH, das amostras de extrato de méis de eucalipto(EE), morrão de candeia(EM), assa-peixe(EAS), laranjeira(EL) e silvestre(ES) estudadas.

Extratos	Fenólicos (mgEAG/100g) <sup>a</sup>	Flavonides (mgEQ/100g) <sup>b</sup>	FRAP (mmolFe(II) /100 g)	ABTS (mmolTE/100mg de extrato)	DPPH (CE <sub>50</sub> ) (µg/mL)
EE1	14,13±0,024	4,34±0,02	206,63±0,019	66,23±0,011	81,27±0,69
EE2	10,33±0,006	3,72±0,02	168,01±0,002	57,58±0,004	128,59±1,01
EE3	12,03±0,021	3,21±0,02	151,39±0,008	46,26±0,010	158,15±0,72
EE4	15,05±0,014	4,42±0,02	183,80±0,009	62,73±0,012	191,51±0,55
EE5	14,99±0,018	5,57±0,03	215,71±0,017	77,98±0,009	69,51±0,04
EE6	14,62±0,010	5,85±0,02	204,81±0,003	70,03±0,010	55,84±0,08
EE7	10,98±0,003	4,38±0,02	196,49±0,003	66,36±0,002	130,59±0,88
EE8	13,07±0,014	3,90±0,02	147,17±0,009	74,65±0,006	88,59±0,05
EE9	8,42±0,001	3,42±0,02	153,15±0,001	50,58±0,002	184,43±0,14
EE10	7,62±0,004	1,09±0,01	124,41±0,007	477,24±0,009	271,54±0,26
EE11	1,18±0,005	3,69±0,01	27,37±0,001	76,48±0,001	136,82±0,78
EE12	13,54±0,021	3,75±0,02	208,48±0,002	62,84±0,001	91,78±0,99
<b>Média</b>	<b>11,33±0,012</b>	<b>3,94±0,02</b>	<b>165,61±0,004</b>	<b>99,08±0,007</b>	<b>132,38±0,065</b>
EM1	2,26± 0,004	0,75± 0,006	64±0,001	196,45±0,008	144,85±0,87
EM2	10,14± 0,013	2,99± 0,016	130,92±0,008	39,35±0,004	151,91±0,02
EM3	8,61± 0,029	2,53± 0,005	125,87±0,007	43,55±0,004	103,53±0,77
EM4	12,22± 0,030	2,59± 0,003	128,68±0,004	62,84±0,009	160,22±0,45
EM5	11,79± 0,023	3,83± 0,005	144,16±0,004	53,91±0,009	115,32±0,63
EM6	9,16± 0,003	2,28± 0,005	105,97±0,006	39,71±0,001	200,67±0,29
EM7	12,07± 0,003	3,75± 0,016	148,33±0,015	68,59±0,013	139,73±1,06
EM8	11,87± 0,006	4,14± 0,011	132,63±0,005	57,53±0,005	227,21±1,12
EM9	14,35± 0,009	3,77± 0,013	206,52±0,008	61,11±0,002	274,33±0,96
<b>Média</b>	<b>10,27±0,009</b>	<b>2,95±0,008</b>	<b>132,39±0,009</b>	<b>69,22±0,006</b>	<b>168,64±0,007</b>
EA1	8,71±0,024	2,03±0,040	116,91±0,001	46,78±0,001	68,61±0,22
EA2	11,14±0,014	3,05±0,003	171,08±0,012	52,89±0,001	130,47±0,44
EA3	11,55±0,013	3,96±0,003	217,42±0,003	61,45±0,007	74,51±0,66
EA4	2,41±0,010	0,52±0,006	255,75±0,001	94,85±0,001	119,67±1,05
EA5	10,84±0,022	2,37±0,004	214,76±0,010	65,16±0,009	50,42±0,01
EA6	11,09±0,011	3,20±0,003	250,50±0,008	66,36±0,007	186,50±1,35
EA7	11,90±0,013	1,86±0,018	190,33±0,004	648,27±0,001	41,23±0,08
EA8	10,86±0,013	2,76±0,002	179,21±0,007	64,31±0,004	104,99±1,55
EA9	12,37±0,009	3,15±0,022	216,16±0,002	57,74±0,002	76,47±0,07
<b>Média</b>	<b>10,09±0,012</b>	<b>2,54±0,008</b>	<b>201,34±0,002</b>	<b>128,64±0,002</b>	<b>94,76±0,66</b>

Tabela 27-Continuação

Extratos	Fenólicos (mgEAG/100g) <sup>a</sup>	Flavonides (mgEQ/100g) <sup>b</sup>	FRAP (mmolFe(II)/100 g)	ABTS (mmolTE/100mg de extrato)	DPPH (CE <sub>50</sub> ) (µg/mL)
EL1	10,20±0,015	3,42±0,002	140,95±0,008	57,06±0,005	132,37±0,33
EL2	10,52±0,007	3,46±0,003	209,34±0,001	63,80±0,005	182,25±0,54
EL3	9,45±0,006	2,80±0,002	194,70±0,007	56,22±0,006	177,39±0,64
EL4	8,71±0,050	1,72±0,002	109,04±0,001	363,65±0,001	177,29±1,03
EL5	11,50±0,023	2,15±0,002	152,82±0,012	54,78±0,001	104,02±0,71
EL6	12,24±0,002	3,19±0,001	110,15±0,003	607,43±0,023	123,99±1,52
EL7	12,66±0,014	5,48±0,008	195,92±0,013	62,52±0,008	110,45±0,06
EL8	12,56±0,002	2,77±0,001	147,56±0,007	62,34±0,001	132,22±0,05
EL9	9,26±0,017	2,55±0,005	145,87±0,006	49,85±0,003	88,85±0,03
<b>Média</b>	<b>10,78±0,008</b>	<b>3,06±0,003</b>	<b>156,26±0,02</b>	<b>153,07±0,004</b>	<b>136,53±0,66</b>
ES1	8,11±0,013	4,61±0,021	101,26±0,001	509,15±0,008	250,46±1,66
ES2	16,61±0,009	4,47±0,005	99,31±0,005	75,21±0,019	186,11±1,07
ES3	10,79±0,016	2,61±0,004	84,07±0,006	57,78±0,003	180,22±1,02
ES4	18,57±0,010	4,21±0,013	171,81±0,008	556,38±0,004	55,19±0,02
ES5	5,94±0,004	1,40±0,004	102,55±0,012	227,08±0,001	116,43±0,57
ES6	10,89±0,011	2,61±0,005	215,23±0,001	47,85±0,013	100,26±1,09
<b>Média</b>	<b>11,81±0,033</b>	<b>3,31±0,009</b>	<b>129,03±0,003</b>	<b>245,57±0,004</b>	<b>148,11±0,08</b>

a - mg de equivalentes em ácido gálico por 100g de mel; b – mg de equivalentes em quercetina por 100g de mel.

Tanto o mel de eucalipto (97,43 mgEAG/100g, Tabela 19, pag. 77pag) quanto seus extratos (11,33 mgEAG/100g, Tabela 27) apresentaram os maiores conteúdos médios em substâncias fenólicas quando comparados aos outros méis. Dentre as amostras de eucalipto, a **EE4** apresentou maior teor em fenólicos e a amostra **EE11** apresentou o menor teor. Este resultado pode, em parte, ser explicado pelas análises realizadas por CLAE-DAD onde a amostra **EE4** apresentou uma das concentrações mais altas de ácidos fenólicos (72,78%) e a **EE11** a mais baixa concentração de ácidos fenólicos das amostras estudadas (**Tabela 22**). Esses dados vêm corroborar com o resultado da quantificação das substânciasfenólicas por CLAE-DAD, onde os méis de eucalipto apresentaram a maior concentração de ácidos fenólicos

Assim como o teor em fenólicos, o conteúdo de flavonóide para os méis ( 6,36 mgEAG/100g, **Tabela 19**, pag. 77) e os extratos de mel de eucalipto (3,94 mgEQ/100g, **Tabela 27**) também foi superior aos encontrados para outros méis aqui estudados. O resultado obtido para o teor em

flavonóides para as amostras de eucalipto parecem não estarem bem correlacionadas com os dados obtidos pela análise por CLAE-DAD onde somente dois flavonóis (canferol e galangina) e uma flavona (luteolina) foram identificados, porém

em baixas concentrações (0,47; 0,90 e 0,05 mg/100g, respectivamente, **Tabela 22**, pag. 94. Isto provavelmente pode ser justificado pelo fato que existem outros picos no cromatograma que não puderam ser identificados devido a ausência de padrões.

Os resultados obtidos para a determinação dos fenólicos e flavonoides totais para os nove extratos de mel de morrão de candeia estão apresentados na **Tabela 27**. O teor em fenólicos totais para os extratos variou de 2,26 a 14,35 mgEAG/100g, enquanto o teor em flavonoides variou de 0,75 a 4,09 mgEQ/100g de mel (**Tabela 27**).

O extrato **EM1** foi o que apresentou o menor teor em fenólicos (2,26 mgEAG/100g) e a amostra **EM9** o maior teor de fenólicos (14,35 mgEAG/100g) entre as nove amostras de extrato de morrão de candeia estudadas (**Tabela 27**). Esses dados estão de acordo com os resultados obtidos por CLAE-DAD, onde a amostra **EM9** apesar de apresentar somente dois ácidos (ácido *p*-OH benzóico= 11,18 mg/100g de mel e *p*-cumárico = 3,32 mg/100g de mel), estes estavam em concentrações superiores às encontradas para os três ácidos presentes na amostra **EM1** (ácido gálico= 1,67 mg/100g de mel; ácido cinâmico = 0,27 mg/100g de mel e ácido *p*-OH benzóico= 3,68 mg/100g de mel) (**Tabela 23**).

Em relação ao conteúdo de flavonóides totais a média encontrada para os extratos de morrão de candeia (2,95mgEQ/100g; **Tabela 27**) foi inferior aos extratos de mel de eucalipto (3,94mgEQ/100g, **Tabela 27**). Dentre as amostras de morrão de candeia, tanto a amostra de mel **M8** (5,14 mgEQ/100g, **Tabela 19**) quanto o seu extrato **EM8** (4,14 mgEQ/100g) foram os que apresentaram o maior teor em flavonoides. Novamente, esses dados corroboraram com a análise por CLAE-DAD onde apenas o flavonol galangina foi identificado na amostra **EM8** em moderada concentração 1,28 mg/100g de mel(**Tabela 23**).

Os resultados obtidos para a determinação dos fenólicos e flavonoides totais para os nove extratos de mel de assa-peixe estão apresentados na **Tabela 27**. O teor em fenólicos totais para os extratos variou de 2,41 a 12,37 mgEAG/100g, enquanto o teor em flavonoides variou de 0,52 a 3,96 mgEQ/100g de mel (**Tabela 27**).

A médias dos resultados para os nove extratos de assa-peixe em fenólicos totais (10,09 mgEAG/100g) e flavonoides (2,54 mgEQ/100g) foi semelhante a média dos nove extratos de morrão de candeia (10,27 mgEAG/100g e 2,95 mgEQ/100g, **Tabela 27**). O extrato **EAS4** foi o que apresentou o menor teor em fenólicos (2,41

mgEAG/100g ) e flavonoides (0,52mgEQ/100g) e a amostra **EAS9** o maior teor em fenólicos (12,37 mgEAG/100g) e flavonoides (3,15mgEQ/100g) entre as nove amostras de extrato de assa-peixe estudadas (**Tabela 27**). Os resultados encontrados para a amostra **EAS9** está de acordo com dados de quantificação obtidos por CLAE-DAD, onde a amostra **EAS9** apresentou três ácidos fenólicos em concentrações que variaram de moderada a alta (ácido cinâmico = 2,69 mg/100g; ácido *p*-MeO-benzóico = 5,65 mg/100g e *p*-OH benzóico = 20,68 mg/100g de mel; **Tabela 24**, pag. 95). Embora a amostra **EAS4** também tenha apresentado três ácidos fenólicos, estes estavam em concentrações muito inferiores (ácido *p*-MeO-benzóico = 4,24 mg/100g; ácido *p*-OH benzóico = 4,75mg/100g e ácido *p*-cumárico= 2,44 mg/100g mel; **Tabela 24**, pag. 95).

Os resultados obtidos para a determinação dos fenólicos e flavonoides totais para os nove extratos de mel de laranjeira estão apresentados na **Tabela 27**. O teor em fenólicos totais para os extratos variou de 8,71 a 12,66 mgEAG/100g, enquanto o teor em flavonoides variou de 1,72 a 5,48 mgEQ/100g de mel (**Tabela 27**).

Dentre os méis monoflorais estudados (eucalipto, morrão de candeia, assa-peixe e laranjeira), os dados obtidos para conteúdo em fenólicos (10,78 mgEAG/100g) e flavonoide (3,06 mgEQ/100g) foi o segundo melhor resultado. Entre os extratos a amostras **EL8** apresentou o maior teor em fenólicos (12,56 mgEAG/100g) e a amostra **EL7** o maior conteúdo em flavonoides (5,48mgEQ/100g). Esses valores podem ser justificados através dos resultados obtidos por CLAE-DAD, onde a amostra **EL8** foi a que apresentou a maior concentração de ácidos fenólicos, destacando-se o ácido gálico (2,26 mg/100g de mel) e o ácido *p*-OH benzóico (24,73 mg/100g de mel), enquanto a amostra **EL7** foi a que apresentou a maior quantidade de flavonoides, destacando-se a hesperidina (17,71 mg/100g de mel) e o canferol (3,17 mg/100g de mel, **Tabela 25**, pag. 96) .

Os resultados obtidos para a determinação dos fenólicos e flavonoides totais para os seis extratos de mel de silvestre estão apresentados na **Tabela 27**. O teor em fenólicos totais para os extratos variou de 5,94 a 16,61 mgEAG/100g, enquanto o teor em flavonoides variou de 1,40 a 4,61 mgEQ/100g de mel (**Tabela 27**).

Tanto o mel silvestre (117,67 mgEAG/100g, **Tabela 19**, pag. 77) quanto seu extrato (11,81 mgEAG/100g, **Tabela 27**) apresentaram a segunda maior média para

conteúdo em fenólicos totais, bem como para flavonoide (5,82 mgEAG/100g, **Tabela 19**, pag. 77) e para os extratos (3,31 mgEQ/100g, **Tabela 27**). Esse mel multifloral foi o segundo maior na concentração das substânciasfenólicas quando comparado aos quatro monoflorais avaliados nesse trabalho.

Entre os seis extratos analisados, as amostras **ES2** (16,61mgEAG/100g) e **ES4** (18,57mgEAG/100g; **Tabela 27**) apresentaram os maiores teores em fenólicos, embora a quantificação por CLAE-DAD não tenha justificado muito bem esses valores. A amostra **ES1**, embora não tenha apresentado um alto teor em fenólico (8,11 mgEAG/100g) apresnetou bom conteúdo em flavonóides (4,61 mgEQ/100g), e foi a que também apresentou maior número e concentração de substânciaspolifenólicas (quatro ácidos fenólicos e dois flavonoides) por CLAE-DAD. Na amostra **ES1** foram encontrados os ácidos *p*-metoxi-benóico (78,01 mg/100g) e *p*-OH benzóico (16,46 mg/100g) em altas concentrações, além dos flavonoides naringenina (0,67 mg/100g) e canferol (7,17 mg/100g de mel)(**Tabela 26**).

Os resultados de teor de fenólicos obtidos por Silva et al.(2013b) para seis extratos de méis de melípona (40,92 mgEAG/100 g de mel) foram superiores aos encontrados neste trabalho.

No entanto os valores do teor em fenólicos e flavonoides encontrados neste trabalho foram superiores aos encontrados por Salgueiro (2012) para onze extratos de méis assa-peixe, morrão de candeia e cambará (8,13 mgEAG/100 g de mel e 0,92 mgEQ/100g de mel).

Ao comparar os resultados dos conteúdos em fenólicos e flavonoides totais dos extratos com àqueles obtidos para as amostras de méis *in natura*, foi possível verificar que os valores encontrados para os extratos dos méis foram significativamente inferiores. Observações semelhantes já foram descritas para outros extratos de méis (LIANDA *et al.*, 2012; SALGUEIRO, 2012). Este fato pode estar relacionado a possíveis perdas das substânciaspolifenólicas na fase aquosa durante o processo de extração (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010).

Atualmente, não existe um método oficial disponível para a determinação da capacidade antioxidanteem amostras de mel (BERTONCELJ *et al.*, 2007). O estudo da capacidade de inibição de radicais pode ser realizado através de diversos métodos, entre

os quais se destacam os ensaios que utilizam os radicais DPPH e ABTS e o ensaio com FRAP que emprega a redução do íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (ALVAREZ-SUAREZ et al. , 2009) .

Apesar das inúmeras publicações que descrevem a capacidade antioxidante de mel *in natura* (FRANKEL et al., 1998;. ALJADI & KAMARUDDIN, 2004; AL-MAMARY et al., 2002), pouca informação está disponível sobre as propriedades antioxidantes dos extratos fenólicos de mel de *Apis mellifera*.

No presente estudo, o potencial antioxidante das substâncias fenólicas dos quarenta e cinco extratos de mel será determinado por três métodos diferentes: DPPH, ABTS e FRAP.

Para auxiliar a discussão dos resultados foi determinada também a capacidade antioxidante, apenas pelo ensaio com DPPH, de todos os padrões autênticos usados na CLAE-DAD para identificação das substâncias presentes nos extratos estudados (**Tabela 28**). A capacidade de sequestrar os radicais livres foi quantificada através do parâmetro  $\text{CE}_{50}$  que representa a concentração do material em análise necessária para inibir 50% de radicais livres.

**Tabela 28** – Avaliação da capacidade antioxidante( $\text{CE}_{50}$ ) das substâncias fenólicas utilizados como padrão pelo método DPPH.

Substâncias fenólicas	$\text{CE}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Ácido gálico	1,16±0,04
Ácido cinâmico	>1000
Ácido vanílico	338,82±0,52
Canferol	6,10±0,56
Galangina	91,19±2,50
Ácido <i>p</i> -metoxi-benzóico	242,74±18,55
Ácido protocatecuico	2,30±0,84
Ácido <i>p</i> -hidroxi benzóico	207,29±25,81
Ácido <i>p</i> -cumárico	39,31±2,78
<i>c,t</i> ABA	>1000
HMF	>1000
Luteolina	2,04±0,07
Hesperidina	106,55±1,25
Naringenina	>1000

No presente estudos a capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada por três ensaios diferentes: FRAP, ABTS e DPPH e os resultados estão apresentados nas **Tabelas 27**.

O método do DPPH e do ABTS é baseado no sequestro de radicais livres pelos antioxidantes presentes em uma amostra. Já análise de FRAP é importante na determinação direta da presença de antioxidantes e/ou redutores em uma amostra.

Entre os extratos estudados a capacidade antioxidante variou conforme o tipo floral do mel que o originou, apresentando valores médios de 165,61 mmolFe(II)/100 g, 99,08 mmolTE/100mg de extrato e  $CE_{50}=132,38 \mu\text{g/mL}$  (extratos de eucalipto-**Tabela 27**), 132,39mmolFe(II)/100g, 69,22mmolTE/100mg de extrato e  $CE_{50}=168,64$  (extratos de morrão de candeia- **Tabela 27**), 201,3461 mmolFe(II)/100g, 128,64 mmolTE/100mg de extrato e  $CE_{50}= 94,76$  (extratos de assa-peixe-**Tabela 27**), 156,26 mmolFe(II)/100 g, 153,07 mmolTE/100mg de extrato e  $CE_{50}=136,53$  (extratos de laranjeira-**Tabela 27**) e 129,03 mmolFe(II)/100 g, 245,57 mmolTE/100mg de extrato e  $CE_{50}=148,11$ (extratos silvestre-**Tabela 27**).

Entre os extratos dos méis de eucalipto, o extrato **EE5** e **EE6** foram as que apresentaram os melhores resultados (215,71 mmolFe(II)/100g; 77,98 mmolTE/100mg de extrato e  $CE_{50} = 69,51 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto resultados bem inferiores foi observado para o extrato **EE11**, com valores de 27,37 mmol Fe(II)/100g; 76,48 mmolTE/100mg de extrato e  $CE_{50} = 136,82 \mu\text{g/mL}$ . Estes valores estão compatíveis com resultados obtidos para os conteúdos em fenólicos e flavonóides totais para essas amostras, onde osvalores obtidos foram: **EE5** (14,99mgEAG/100g e 5,57mgEQ/100g); **EE6** (14,62 mgEAG/100g e 5,85 mgEQ/100g) e **EE11** (1,18 mgEAG/100g e 3,69 mgEQ/100g) (**Tabela 27**).

Entre os extratos de eucalipto, o **EE06** (**Tabela 27**) apresentou maior capacidade antiradicalar ( $CE_{50}= 55,84 \mu\text{g/mL}$ ), e isto pode estar relacionado com a presença do ácido gálico e ácido protocatecuico, e do flavonoide canferol que foram identificados por CLAE-DAD nesse extrato. Além disso, o ácido gálico ( $CE_{50}= 1,16 \mu\text{g/mL}$ ), o ácido protocatecuico ( $CE_{50}= 2,30 \mu\text{g/m}$ ) e o canferol ( $CE_{50}= 6,10 \mu\text{g/mL}$ ) foram os padrões que apresentam menores valores de  $CE_{50}$  entre os avaliados neste trabalho (**Tabela 28**).

Ao comparar a capacidade antioxidante, teor em fenólicos e flavonoides do mel de eucalipto e dos seus extratos não foram observados uma correlação direta, visto que, por exemplo, o mel **E2** (**Tabela 19**) apresentou melhor capacidade antioxidante, teor em fenólicos e flavonoides entre os méis estudados, mas o mesmo não foi observado para seu extrato **EE2** (**Tabela 27**).

Uma das explicações pode estar relacionada com as possíveis perdas das substâncias polifenólicas durante o processo de extração. (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010a).

Entre as amostras avaliadas, os extratos de morrão de candeio (**Tabela 27**) foram os que apresentaram menor atividade antioxidante para os três ensaios, sendo a amostra **EM9** a menos capaz de sequestrar os radicais livres.

Esses dados podem estar relacionados com os ácidos *p*-OH benzóico e *p*-cumárico que embora presentes em altas concentrações na amostra **EM9** (determinados por CLAE-DAD), apresentaram elevados valores de  $CE_{50}$  (207,29  $\mu\text{g/mL}$  e 39,31  $\mu\text{g/mL}$ ) sendo, portanto, menos eficazes na inibição dos radicais.

Entre os extratos dos méis monoflorais estudados, o extrato de assa-peixe foi o que apresentou a maior média para os valores da capacidade antioxidante para os três ensaios: FRAP= 201,34 mmolFe(II)/100g, ABTS=128,64 mmolTE/100mg de extrato e  $CE_{50}$ = 94,76  $\mu\text{g/mL}$  (**Tabela 27**).

A amostra **EA7** (**Tabela 27**) foi a que apresentou o maior potencial antioxidante entre todos os extratos estudados. Pode-se em parte, justificar este fato devido ao alto teor em fenólicos (**Tabela 27**) e a elevada concentração de ácido gálico encontrada para o extrato **EA7**. Além disso, o ácido gálico ( $CE_{50}$ = 1,16  $\mu\text{g/mL}$ ) foi o padrão que apresentou a maior atividade antiradicalar entre os padrões testados (**Tabela 28**).

Os resultados obtidos para capacidade antioxidante dos extratos de mel de laranjeira estão apresentados na **Tabela 27**. A amostra **EL9** foi a que melhor apresentou capacidade antiradicalar expressa através de  $CE_{50}$ = 88,85  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto, a amostra **EL7** apresentou moderada capacidade antioxidante para os três ensaios realizados (FRAP= 195,92 mmolFe(II)/100 g; ABTS= 62,52 mmolTE/100mg de extrato ;  $CE_{50}$ = 110,45  $\mu\text{g/mL}$ ). Esse resultado, pode em parte ser justificado pelo alto teor em fenólicos (12,66 mgEAG/100g) e flavonoides (5,48mgEQ/100g) determinados para o extrato **EL7** (**Tabela 27**). Além disso, o perfil cromatográfico desse extrato mostrou uma alta representatividade de ácidos fenólicos (ácido cinâmico e ácido *p*-OH-benzóico) e do flavonóide glicosilado hesperidina (**Tabela 25**), todos com baixa capacidade antioxidante (elevados valores de  $CE_{50}$ ; **Tabela 28**).



Os resultados obtidos para capacidade antioxidante dos extratos de mel silvestre estão apresentados na **Tabela 27**. O extrato **ES5** foi o que apresentou os melhores resultados (171,81 mmolFe(II)/100g; 556,88 mmolTE/100mg de extrato e  $CE_{50} = 55,19$   $\mu\text{g/mL}$ ), enquanto resultados bem inferiores foi observado para o extrato **ES1**.

Os resultados obtidos nesse trabalho foram superiores aos descritos por Salgueiro (2012) para um total de onze extratos de mel de morrão de candeia e cambará, onde os valores variam para FRAP de 23,88 a 116,47 mmol Fe(II)/100 g, ABTS de 30,88 a 137,79 mmolTE/100g e  $CE_{50}$  de 278,61 a 1601,89  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto, os resultados obtidos por Lianda *et al.* (2012) para extrato de mel foram superiores aos descritos aqui, e as médias dos valores encontrados para FRAP, ABTS e  $CE_{50}$  foram 172,96 mmolFe(II)/100g; 159,65 mmolTE/100g; 31,96  $\mu\text{g/mL}$  (extratos de mel silvestres) e 305,92 mmolFe(II)/100g; 217,05 mmolTE/100g; 15,22  $\mu\text{g/mL}$  (extratos de mel laranjeira). Enquanto Vianna (2010) encontrou uma variação para  $CE_{50}$  de 9,01 a 80,5  $\mu\text{g/mL}$  para extratos de mel de assa peixe e eucalipto, resultados também superiores aos encontrados nos extratos analisados neste trabalho.

Os valores médios de FRAP encontrados neste trabalho variaram de 129,03 a 201,32 mmolFe(II)/100 g sendo inferiores (71,0 a 478,5 mol de Fe(II)/100g) aos encontrados por Beretta *et al.* (2005), porém foram superiores (61,75 a 124,5 mmolFe(II)/100g) aos encontrados por Blasa *et al.* (2006).

Ferreira e colaboradores (2009) encontraram valores de  $CE_{50}$  que variaram de 68,17 a 27,24 (mg/mL) para 20 extratos de méis portugueses e estes valores também foram inferiores aos encontrados neste trabalho (168,64 a 94,76  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 5.5 Análise quimiométrica dos dados de RMN para os extratos dos méis

A combinação da quimiometria com a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear e com técnicas cromatográficas tem se revelado um método bastante útil para a classificação de alimentos e bebidas (LOLLI *et al.*, 2008; COTTE *et al.*, 2007; MAZZONI *et al.*, 1997; CONSONNI & CAGLIANI, 2008; SCHIEVANO *et al.*, 2010; DONARSKI *et al.*, 2008).

Dado a riqueza de informações contidas no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de uma amostra, a quimiometria tem se mostrado uma ferramenta valiosa para determinar e

caracterizar méis, permitindo reconhecer as similaridades e diferenças na composição das amostras a partir de dados espectrais.

A técnica de RMN em conjunto com a quimiometria tem se mostrado uma ferramenta útil no controle de qualidade de mel. A análise multivariada é, portanto, aplicado diretamente sobre os dados espectrais para extrair informações úteis. Dados de RMN combinados com análise quimiométrica vem sendo utilizados na determinação da origem botânica como uma alternativa mais rápida que a melissopalínologia (BERETTA *et al.*, 2008; CONSONNI & CAGLIANI, 2008; SCHIEVANO *et al.*, 2010; DONARSKI *et al.*, 2008; BOFFO *et al.*, 2012; OHMENHAEUSER *et al.*, 2013)

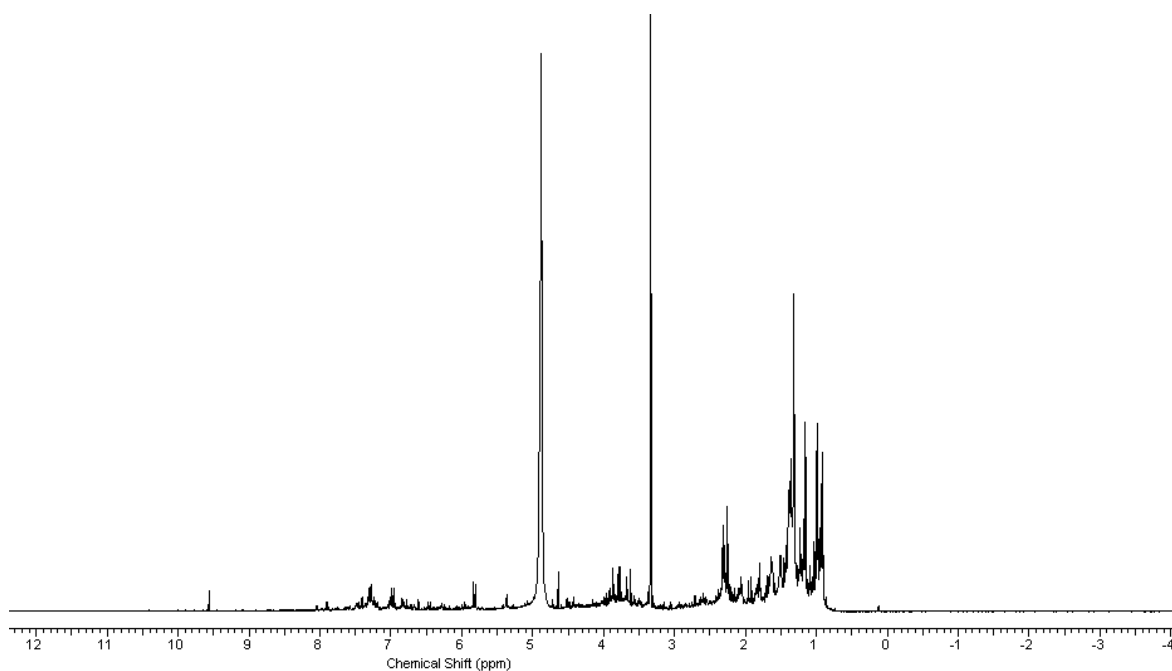
Nesse estudo buscou-se determinar a origem botânica dos quarenta e cinco extratos de méis, através de análises quimiométricas aplicada aos dados de RMN de  $^1\text{H}$ . As amostras foram previamente classificadas pela análise polínica em eucalipto, morrão de candeia, assa-peixe, laranjeira e silvestre ( item 5.1 , pag. 65)

Para se obter os melhores resultados na aplicação das análises exploratórias (PCA e HCA) aos dados de RMN de  $^1\text{H}$  foi necessário otimizar as condições experimentais e de processamento dos espectros. Para isso foram realizadas: aquisição dos espectros em três repetições e no mesmo dia; as amostras foram solubilizadas em metanol deuterado na mesma concentração; a fase do espectro foi ajustada manualmente e a linha de base corrigida automaticamente.

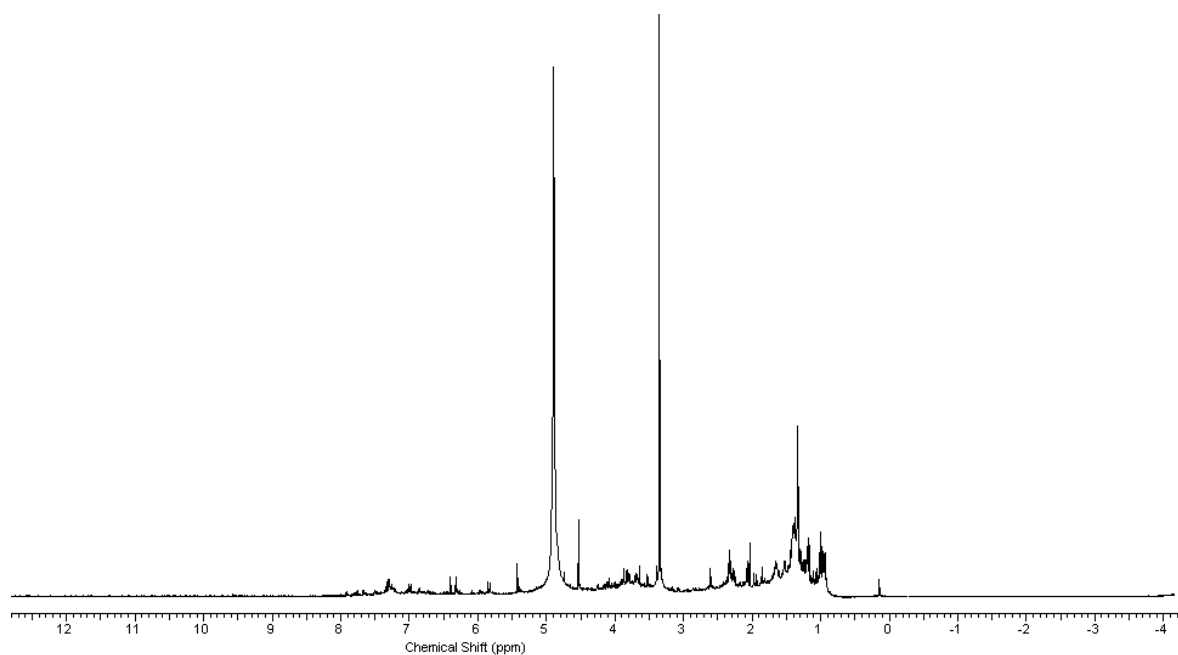
O estudo através do RMN providenciou um método simples, pois permitiu obter informações globais sobre uma amostra complexa através de um único experimento mantendo a razão natural das substâncias. O estudo da classificação dos méis foi iniciado pela análise visual dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos, com intuito de verificar as diferenças entre eles, que poderiam auxiliar na discriminação dos cinco tipos de méis. Nas **Figuras 21-25** estão apresentados os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para um extrato de cada tipo de mel analisado: **EE4**-eucalipto, **EM9**-morrão de candeia, **ES3**-silvestre, **EL**-laranjeira e **EA**-assa-peixe em metanol deuterado.

Analisando esses poucos espectros (**Figuras 21-25**), pode-se observar que os extratos apresentaram diferentes regiões espectrais, caracterizados por distintos deslocamentos químicos e intensidade dos sinais, o que auxiliaria na discriminação dos tipos de méis. No entanto, quando o número de amostras analisadas aumenta (nesse trabalho são 45 amostras), estas pequenas diferenças tornam-se insuficientes para serem

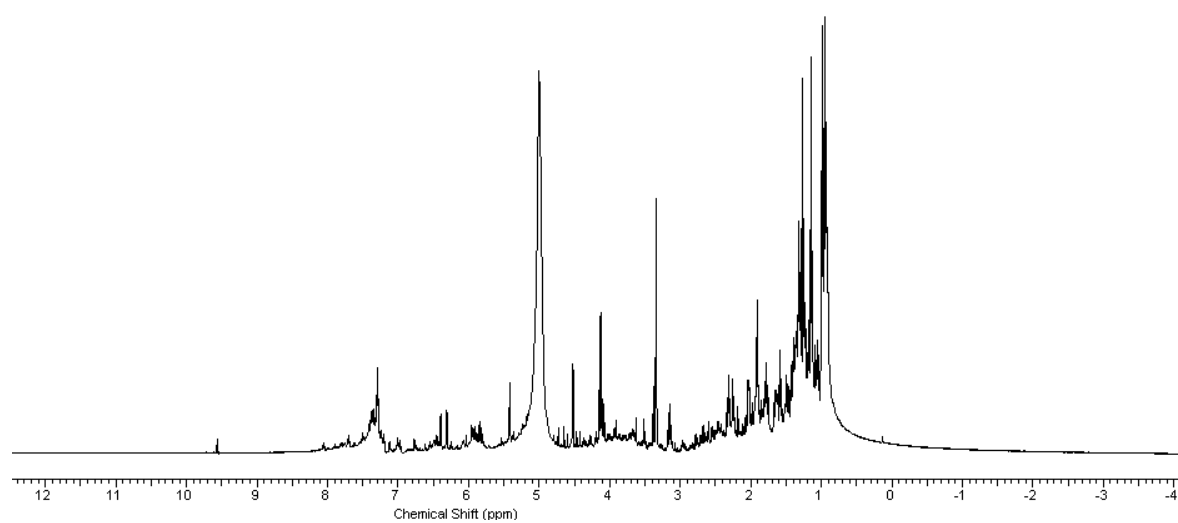
percebidas visualmente nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e permita a discriminação dos diferentes méis. Assim, o uso da quimiometria no tratamento dos dados é uma ferramenta importante.



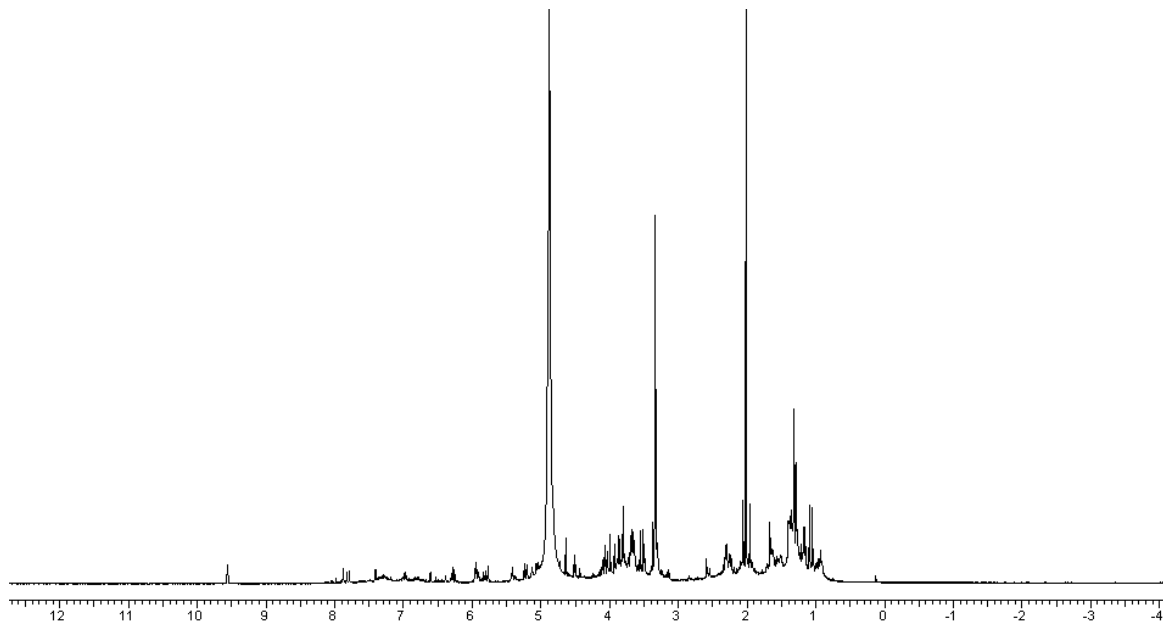
**Figura 21** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) do extrato EE4 (eucalipto em acetato de etila) em metanol deuterado (500MHz).



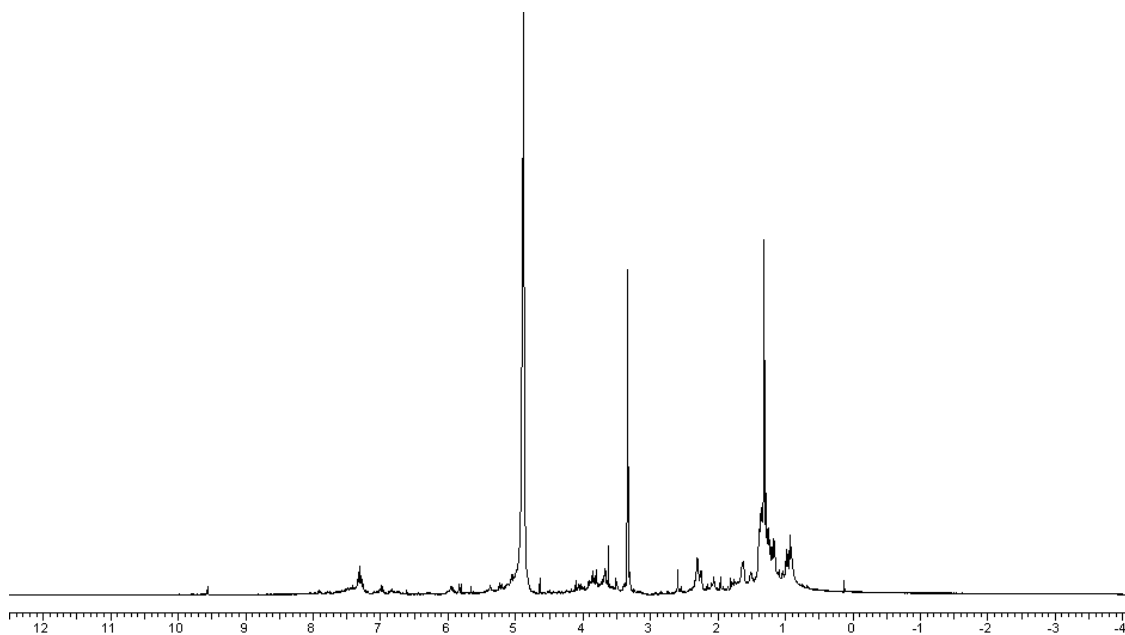
**Figura 22** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) do extrato EM9 (morrão de candeia em acetato de etila) em metanol deuterado (500MHz).



**Figura 23** - Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz) do extrato ES3 (silvestre em acetato de etila) em metanol deuterado (500MHz).



**Figura 24** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) do extrato AS 9 (assa-peixe em acetato de etila) em metanol deuterado (500MHz).



**Figura 25** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz) do extrato EL9 (laranjeira em acetato de etila) em metanol deuterado (500MHz).

Inicialmente, linha de base e a fase de todos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram ajustadas para todas as amostras o mais próximo possível, para não influenciarem na discriminação dos méis. Na quimiometria a linha de base deve ser a mesma para um conjunto de amostras para que não ocorra uma interpretação equivocada dos resultados.

Além disso, caso a fase dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  não seja adequadamente corrigida, acarretará alterações nas intensidades dos sinais que não serão em virtude da mudança de composição química das amostras, mas sim pela diferença na fase.

Dessa forma, os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos foram processados em grupo utilizando o software ACD / Spec Manager e integrados em regiões (*buckets*) de igual intervalo (0,04 ppm) na região espectral de 0,63 a 10,1 ppm. Foram atribuídas regiões de exclusão nos intervalos: -5 a 0; 3,31 a 3,44; 4,76 a 5,1; 8,21 a 9,44 e 9,78 a 20 ppm.

A partir dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  adequadamente tratados, foi construída uma matriz de dados na qual as amostras (extratos de méis) são transformadas em linhas e as variáveis (sinais dos espectros) correspondem às colunas (Excel 2010). A matriz de dados originais  $X$  é construída por  $n$  amostras e  $m$  variáveis ( $n \times m$ ). Em um conjunto de dados espectroscópicos, as variáveis são pontos utilizados no processamento do espectro.

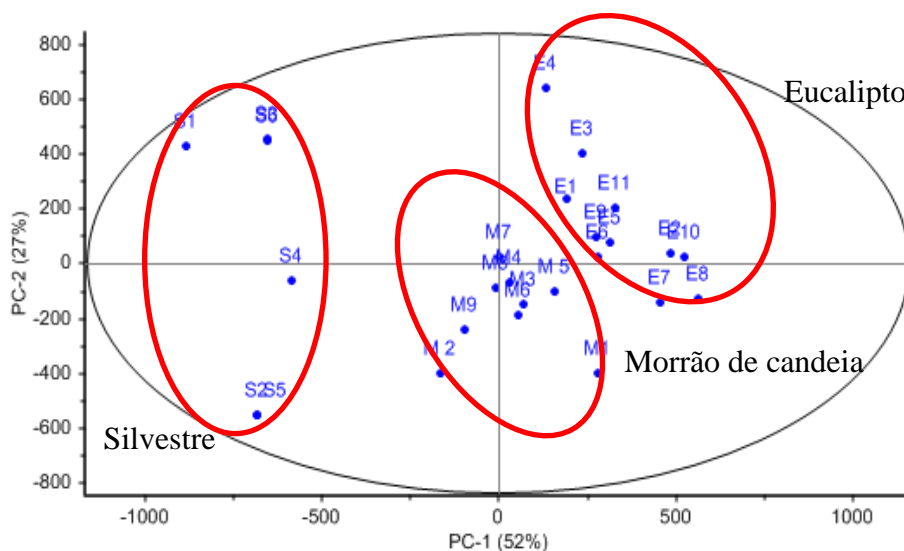
Geralmente, os métodos não supervisionados como a análise dos componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (análise de *cluster*- HCA) constituem a primeira etapa na análise de dados. Sem assumir qualquer conhecimento prévio da classe da amostra estudada, esses métodos permitem que os dados sejam visualizados em um espaço dimensional reduzido construído sobre as diferenças entre as classes de amostras no que diz respeito à sua composição química. Essas análises quimiométricas foram aplicadas diretamente aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos de mel. Duas análises foram realizadas separadamente, uma utilizou 11 extratos de eucalipto, 9 extratos de morrão de candeia e 6 extratos de méis silvestres (**Figuras 26 e 27**), e a segunda utilizou 9 extratos de assa-peixe e 9 de laranja (**Figuras 28 e 29**).

A análise quimiométrica dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos de mel iniciou-se pela análise do componente principal (PCA). Nesse sentido, os espectros de onze amostras de eucalipto, nove de morrão de candeia e seis de silvestre foram analisados (**Figura 26**).

A **Figura 26** mostra o gráfico de *scores* obtido da análise por PCA dos extratos de eucalipto, morrão de candeia e silvestre. A partir dos dados de variância determinou-se o número de PCs. Nessa análise foram escolhidos os dois primeiros PCs, sendo que a

PC-1 descreveu 52% de variância do conjunto de dados, enquanto que PC-2 descreveu 27%, e as duas PCs juntas descreveram 79% da variância total. Esta primeira avaliação mostrou que foi possível discriminar um conjunto de dados complexo.

De acordo com a análise da **Figura 26** as similaridades ou diferenças entre as amostras podem ser observadas, sendo que as similares tendem a formar grupos e as diferenças apresentam grandes distâncias entre si. Assim, ao modelar cada classe separadamente através de PCA, pode-se observar que cada tipo de mel está bem agrupado entre si (indicados pelas letras E, M e S). Embora duas classes (E e M) estejam mais agrupadas, foi possível discriminar as amostras em três grupos distintos, ou seja, em méis de laranjeira, morrão de candeia e silvestre. Esta discriminação se deu provavelmente devido às diferenças em sua composição química observada no espectro de ressonância magnética de hidrogênio.



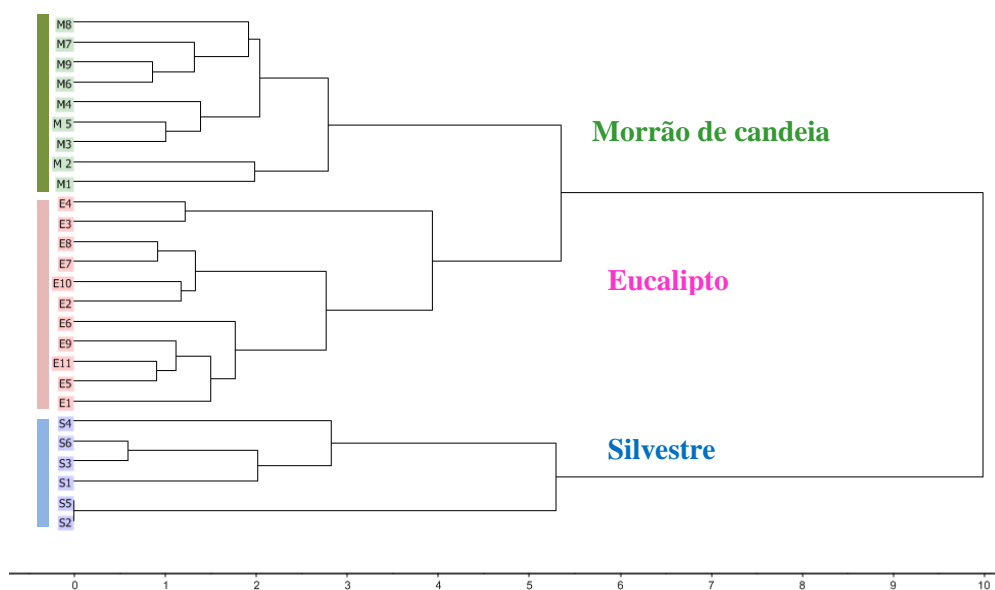
**Figura 26** - Gráfico de scores de PC-1 x PC-2 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos vinte e sete extratos divididos em 3 diferentes origens florais: extrato de eucalipto (**E**) e extrato morrão de candeia (**M**) e silvestre (**S**).

Sendo assim, esta análise pode ser uma ferramenta para auxiliar a melissopalínologia, pois permitiu diferenciar méis de morrão de candeia, que tem baixo teor de pólen e é de difícil identificação pela análise microscópica.

Na análise dos extratos dos méis por HCA (análise de *cluster*) foram usadas a mesma matriz gerada para o PCA. O cálculo da distância entre as amostras foi feito

usando a distância Euclidiana quadrática, e foi usado o método hierárquico aglomerativo (Método de Ward). O dendrograma resultante está mostrado na **Figura 27**.

O dendrograma obtido a partir de HCA (**Figura 27**) também diferenciou os três grupos estudados, estando de acordo com os resultados obtidos com a análise de PCA (**Figura 26**).

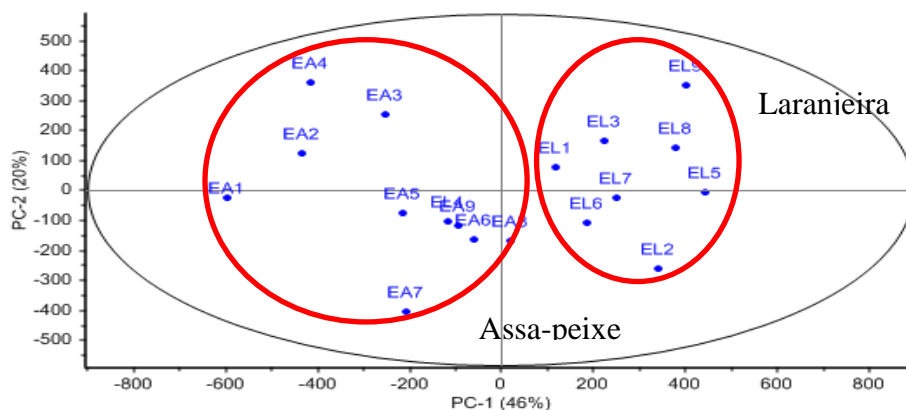


**Figura 27-** Dendrograma dos dados dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos dos méis de morrão de candeia; eucalipto e silvestre.

A **Figura 28** mostra o gráfico de *scores* obtido da análise por PCA dos nove extratos de laranjeira e nove assa peixe. Nessa análise foram escolhidos os dois primeiros PCs, sendo que a PC-1 descreveu 46% de variância do conjunto de dados, enquanto que PC-2 descreveu 20%, e as duas PCs juntas descreveram 66% da variância total.

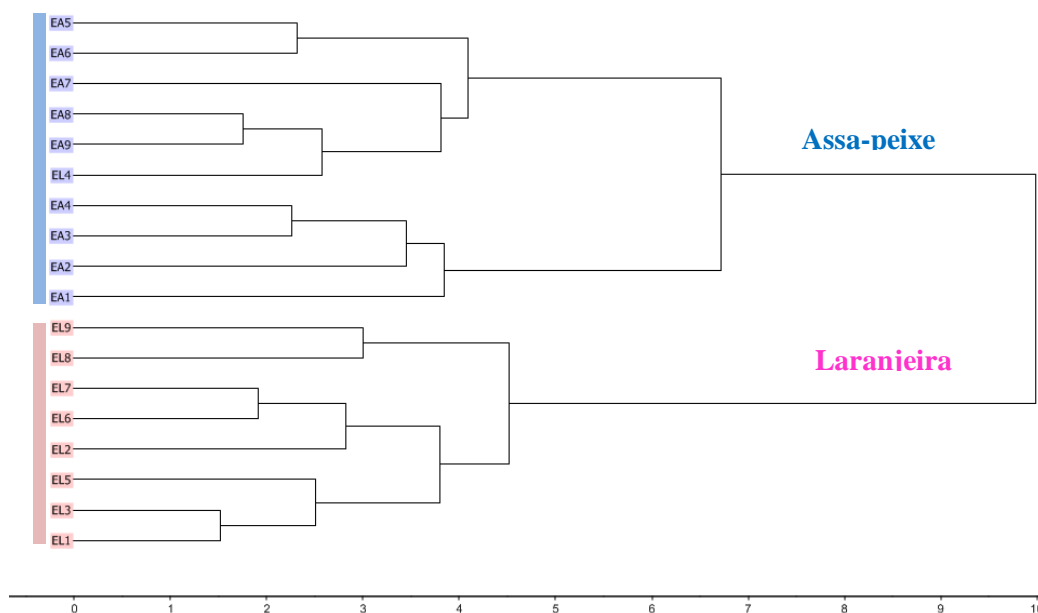
Assim, ao modelar cada classe separadamente através de PCA, pode-se observar que cada tipo de mel foi agrupado entre si (indicados pelas letras EL e EA). Embora EA (extrato assa-peixe) esteja menos agrupada, ainda assim, foi possível discriminar as amostras em dois grupos distintos, ou seja, em méis de laranjeira e assa-peixe





**Figura 28** - Gráfico *de scores* de PC-1 x PC-2 dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos dezoito extratos divididos em 2 diferentes origens florais: extrato de laranjeira (EL) e extrato assa-peixe(EA).

Uma discriminação semelhante à observada no PCA foi obtida na análise dos extratos dos méis por HCA (**Figura 29**), realizada com os mesmos parâmetros do PCA, incluindo a distância Euclidiana quadrática e o método hierárquico aglomerativo (Método de Ward). A partir do agrupamento por similaridade pode ser observado que houve a discriminação dos méis em dois grupos: méis de assa-peixe e de laranjeira. Com isso mais uma vez essa técnica auxiliaria a análise da microscopia do pólen de *Citrus* (mel de laranja), visto que membro da família *Lamiaceae*, o gênero *Citrus* são sub-representados no espectro polínico do mel, sendo suficiente o mínimo de 10% de pólen para considerar o mel como monofloral, podendo gerar um erro quando esses méis são analisados pela melissopalínologia. Além disso, similaridade dos grãos de pólen podem também gerar um erro na identificação da origem botânica do mel (STEPHENS *et al.* 2010).



**Figura 29**- Dendrograma dos dados dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extratos dos méis de assa-peixe e laranjeira.

## 5.6. Análise Quimiométrica dos dados de CLAE-DAD para os extratos de mel

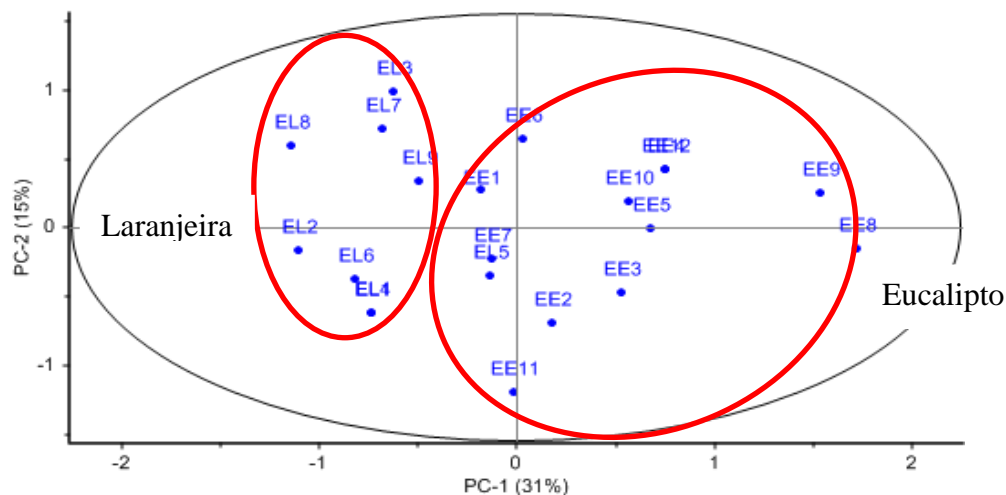
Na tentativa de estabelecer uma nova técnica de classificação das amostras, os métodos de análise exploratória (PCA e HCA) também foram aplicados aos dados de composição química obtidos através dos perfis cromatográficos dos extratos de méis. Buscou-se através dessas análises agrupar as amostras de mel que possuíssem substâncias comuns a um determinado grupo e assim, distinguí-las daquelas com componentes diferentes.

Inicialmente, foi criada uma tabela de dados (Excel 2010) com todos os 45 extratos de mel, na qual constava apenas a indicação de ausência ou presença das substâncias fenólicas, HMF e ABA identificadas em cada extrato por CLAE-DAD.

Para facilitar a aplicação dos métodos de classificação para avaliar as amostras dos méis estudados, os méis foram divididos em quatro grupos: laranja e eucalipto; laranja e assa-peixe, laranja e morrão de candeia e laranja e silvestre.

Os estudos foram otimizados a partir das análises exploratórias dos dados de CLAE-DAD por PCA e, em seguida, foram utilizados nas análises por HCA.

A **Figura 30** mostra o gráfico de *scores* obtido da análise por PCA aplicada aos dados cromatográficos dos nove extratos de laranja (**EL**) e doze extratos de eucalipto (**EE**). A partir dos dados de variância determinou-se o número de PCs. Nessa análise foram escolhidos os dois primeiros PCs, descrevendo 45% dos dados da variância total, sendo que 31% descreveu a PC-1, enquanto 15% descreveu a PC-2=15%.

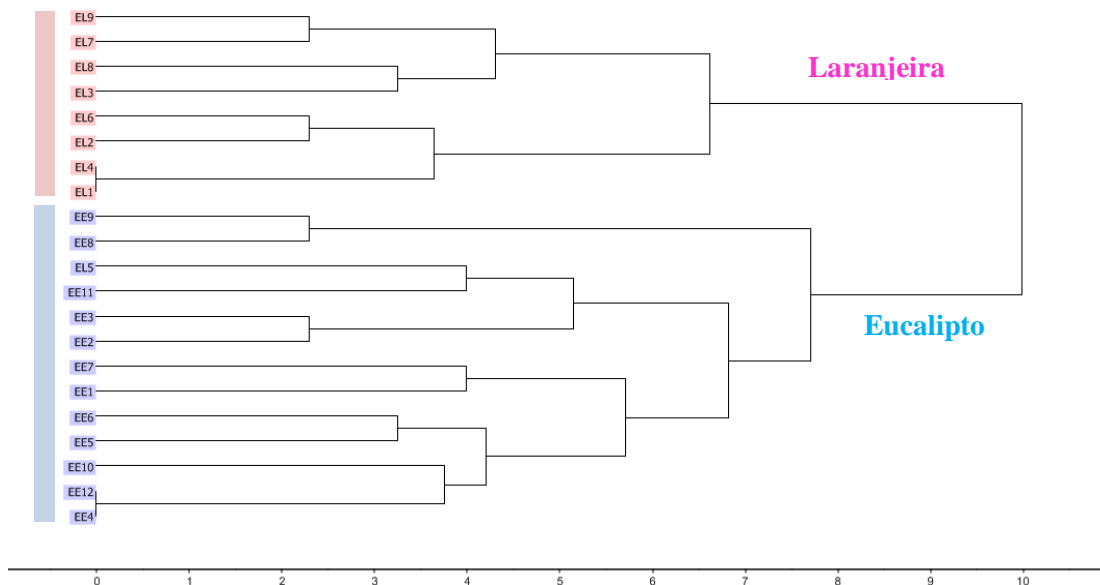


**Figura 30** - Gráfico de *scores* de PC-1 x PC-2 dos dados de CLAE-DAD dos vinte e um extratos divididos em 2 diferentes origens florais: extrato de laranjeira (**EL**) e extrato eucalipto(**EE**).

De acordo com a análise da **Figura 30** foi possível agrupar as amostras de acordo com suas similaridades. Embora os dois grupos (EL e EE) não estejam muito compactos foi possível discriminar as amostras em duas classes distintas, ou seja, em méis de laranjeira e de eucalipto.

Na análise dos extratos dos méis por HCA (análise de *cluster*) foram usadas a mesma matriz gerada para o PCA. O cálculo da distância entre as amostras foi feito usando a distância Euclidiana quadrática, e foi usado o método hierárquico aglomerativo (Método de Ward). O dendograma resultante está mostrado na **Figura 31**.

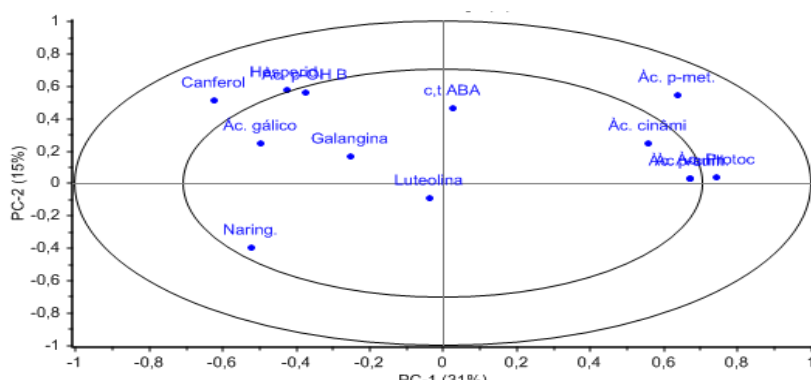
Uma discriminação semelhante à do PC foi obtida nas análises por HCA. A partir do agrupamento por similaridade pode ser observado que houve a discriminação dos méis em dois grupos: méis de laranjeira e eucalipto.



**Figura 31** – Dendrograma dos dados de CLAE-DAD dos extratos dos méis de laranja e eucalipto.

As variáveis responsáveis pela discriminação mostrada na **Figura 30** (gráfico de *scores*) foram identificadas analisando-se o gráfico de *loadings* (**Figura 32**) das substâncias identificadas por CLAE-DAD. No gráfico de *loadings* quanto mais afastado a variável (no caso aqui, substância identificada) estiver do centro, maior é a sua importância para a classificação da amostra.

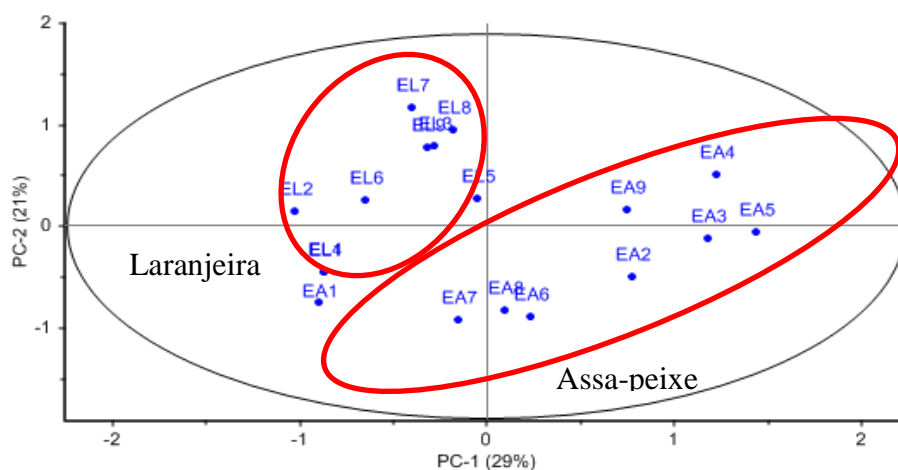
Com isso, o resultado observado no gráfico sugeriu que canferol, hesperidina e ácido *p*-hidroxi-benzóico foram as substâncias de maior importância para classificarem os extratos de laranja, enquanto os ácidos *p*-metoxi benzóico e protocatecuíco foram os de maior importância para classificarem os extratos de eucalipto, podendo ser considerado possíveis marcadores florais.



**Figura 32** - Gráfico de *loadings* das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de CLAE-DAD dos extratos de laranja e eucalipto.

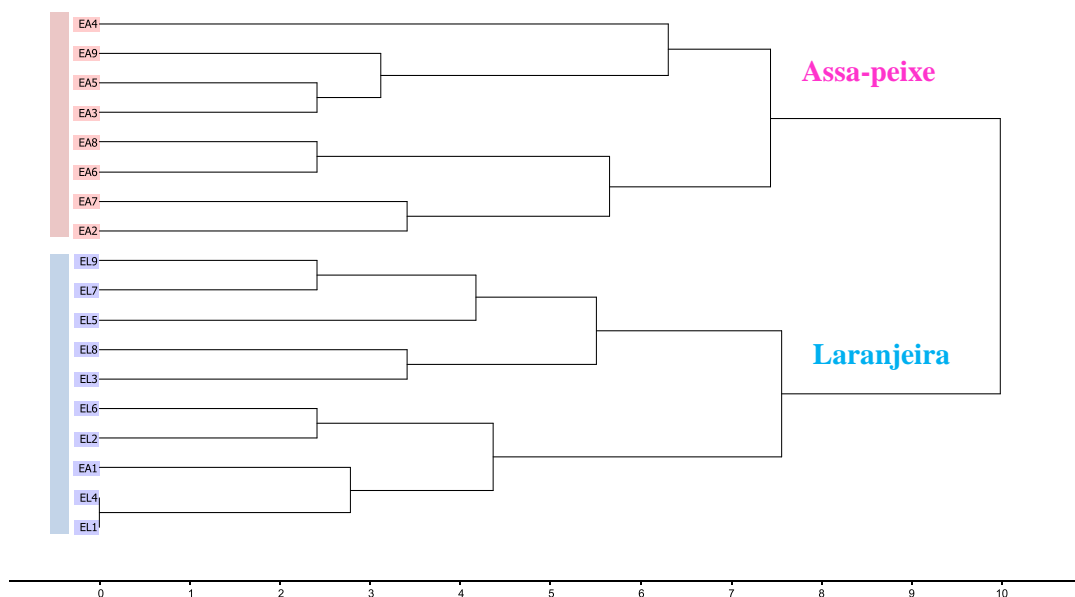
A **Figura 33** mostra o gráfico de *scores* obtido da análise por PCA aplicados aos dados cromatográficos obtidos por CLAE-DAD dos nove extratos de laranja (EL) e nove extratos de assa-peixe (EA). Nessa análise foram escolhidos os dois primeiros PCs descrevendo 50% dos dados da variância total (PC-1=29% e PC-2=21%).

Neste gráfico (**Figura 33**) observa-se discriminação entre as amostras avaliadas, embora os dois grupos (EL e EA) não estejam bem compactados entre si. No entanto, apesar da proximidade dos dois grupos, foi possível distinguir satisfatoriamente os méis de laranja e assa-peixe.



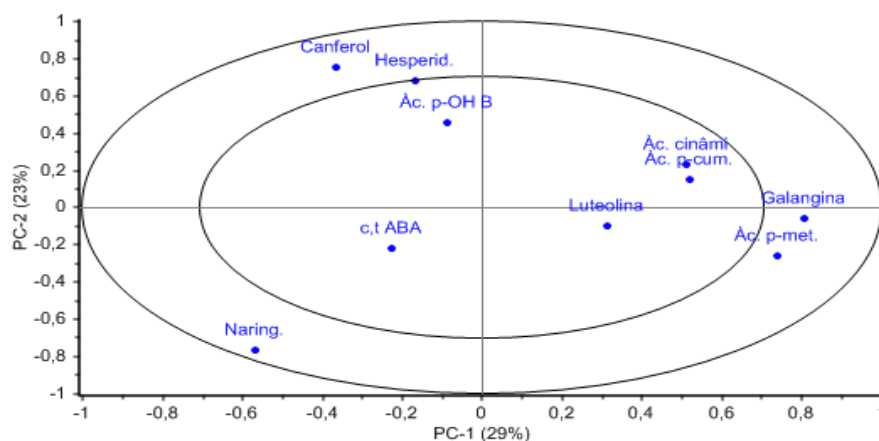
**Figura 33** - Gráfico de *scores* de PC-1 x PC-2 dos dados de CLAE-DAD dos dezoito extratos divididos em 2 diferentes origens florais: laranja (EL) e assa-peixe (EA).

Uma discriminação semelhante à observada no PCA foi obtida na análise dos extratos dos méis por HCA (**Figura 34**), realizada com os mesmos parâmetros do PCA, incluindo a distância Euclidiana quadrática e o método hierárquico aglomerativo (Método de Ward). A partir do agrupamento por similaridade pode ser observado que houve a discriminação dos méis em dois grupos: méis de laranja e de assa-peixe.



**Figura 34** - Dendrograma de análise de *cluster* dos dados de CLAE-DAD dos extratos laranjeira e assa-peixe.

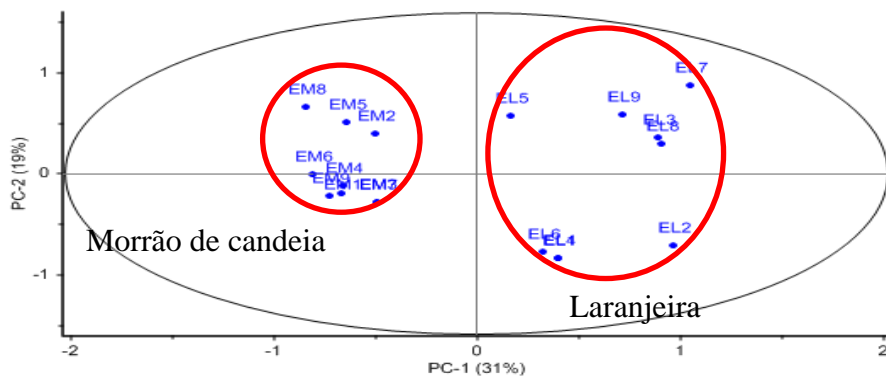
Pode ser observado através do gráfico de *loading* (**Figura 35**) quais foram as substâncias responsáveis pela discriminação mostrada no gráfico de *scores* (**Figura 33**). Assim, os flavonoides canferol, hesperidina e narigenina foram as substâncias responsáveis pela classificação dos extratos de laranjeira, enquanto galangina e ácido *p*-metoxi-benzóico aquelas responsáveis pela discriminação dos extratos de assa-peixe.



**Figura 35**- Gráfico de *loadings* das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de CLAE-DAD dos extratos de laranjeira e assa-peixe.

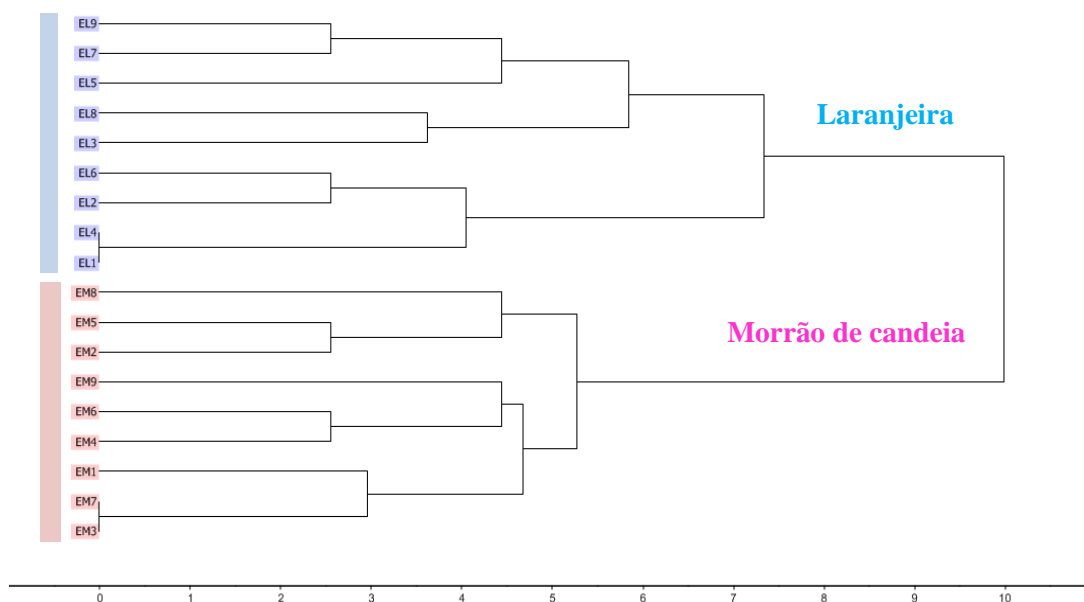
A **Figura 36** mostra o gráfico de *scores* obtido da análise por PCA aplicados aos dados cromatográficos obtidos por CLAE-DAD dos nove extratos de laranjeira (**EL**) e nove extratos de morrão de candeia (**EM**). Nessa análise foram escolhidos os dois primeiros PCs descrevendo 50% dos dados da variância total (PC-1=31% e PC-2=19%).

Neste gráfico (**Figura 36**) observa-se a separação entre os dois grupos avaliados, embora os extratos de morrão de candeia (EM) estejam bem mais compactados entre si, do que os de laranjeira (EL). A boa discriminação entre os dois grupos permitiu distinguir satisfatoriamente os méis de laranjeira e os de morrão de candeia.



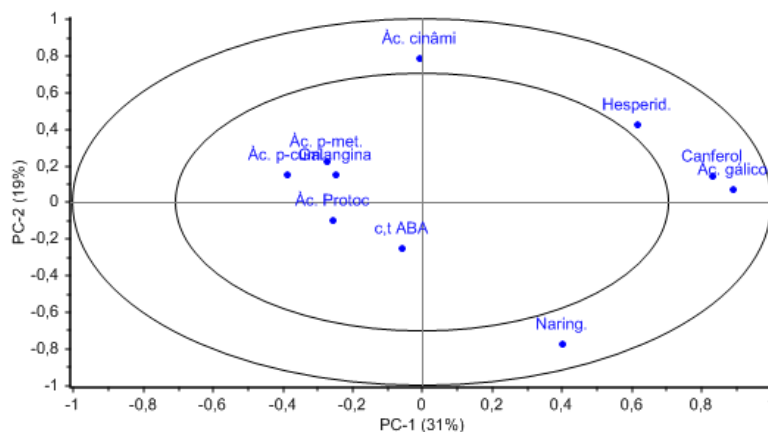
**Figura 36** - Gráfico de scores de PC-1 x PC-2 dos dados de CLAE-DAD dos dezoito extratos divididos em 2 diferentes origens florais: laranjeira (EL) e morrão de candeia (EM).

Novamente, uma discriminação semelhante à observada no PCA também foi obtida na análise dos extratos dos méis por HCA (**Figura 37**). A partir do agrupamento por similaridade pode ser observado que houve a discriminação dos méis em dois grupos: méis de laranjeira e de morrão de candeia.



**Figura 37** – Dendrograma de análise de *cluster* dos dados de CLAE-DAD dos extratos laranjeira e morrão de candeia.

Através da análise do gráfico de *loadings* (**Figura 38**) pode ser observado que os méis de morrão de candeia não apresentaram nenhuma substância com importância significativa para sua classificação, visto que esses extratos, diferentes dos demais estudados, tiveram poucas substâncias identificadas por CLAE-DAD (**Tabela 23**, pag. 95). No entanto, os flavonoides canferol, hesperidina e narigenina foram novamente as substâncias responsáveis pela classificação dos extratos de laranja.

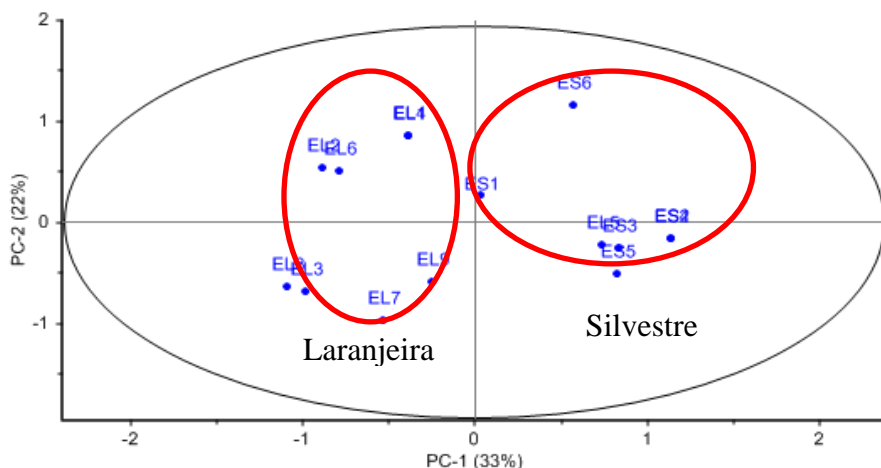


**Figura 38** - Gráfico de *loadings* das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de CLAE-DAD.

A **Figura 39** mostra o gráfico de *scores* obtido da análise por PCA aplicados aos dados cromatográficos obtidos por CLAE-DAD dos nove extratos de laranja (**EL**) e seis extratos silvestres (**ES**). Nessa análise foram escolhidos os dois primeiros PCs descrevendo 55% dos dados da variância total (PC-1=33% e PC-2=22%).

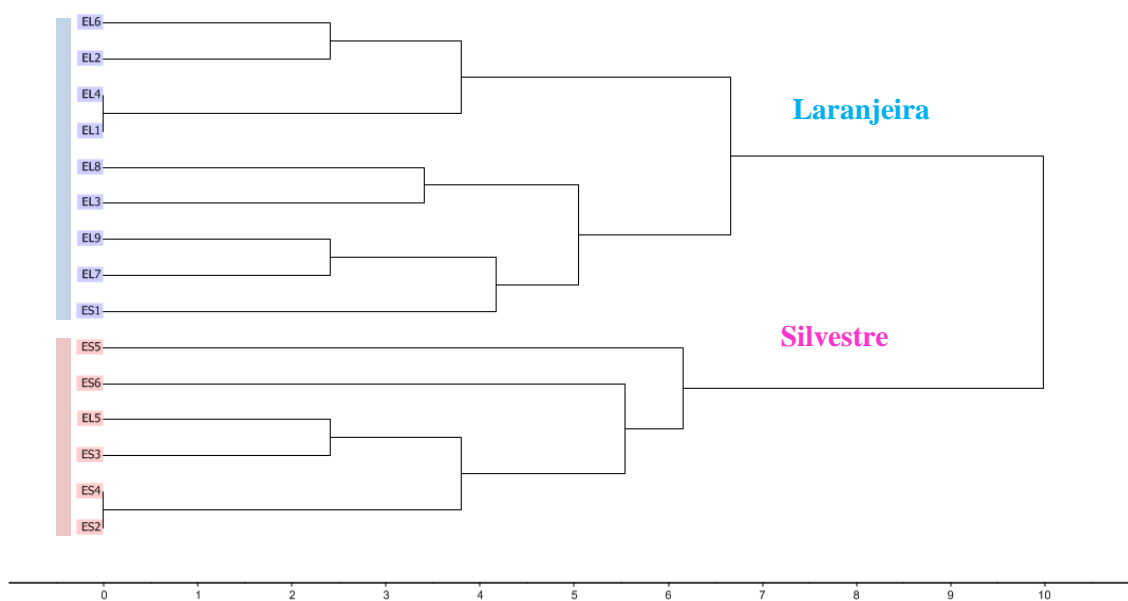
Neste gráfico (**Figura 39**) observa-se a separação entre os dois grupos avaliados, embora os extratos de silvestre (**ES**) estejam bem menos compactados entre si, do que os de laranja (**EL**). No entanto, a discriminação entre os dois grupos permitiu distinguir satisfatoriamente os méis de laranja e os de silvestre.





**Figura 39** - Gráfico de scores de PC-1 x PC-2 dos dados de CLAE-DAD dos dezoito extratos divididos em 2 diferentes origens florais: laranjeira (EL) e silvestre (ES).

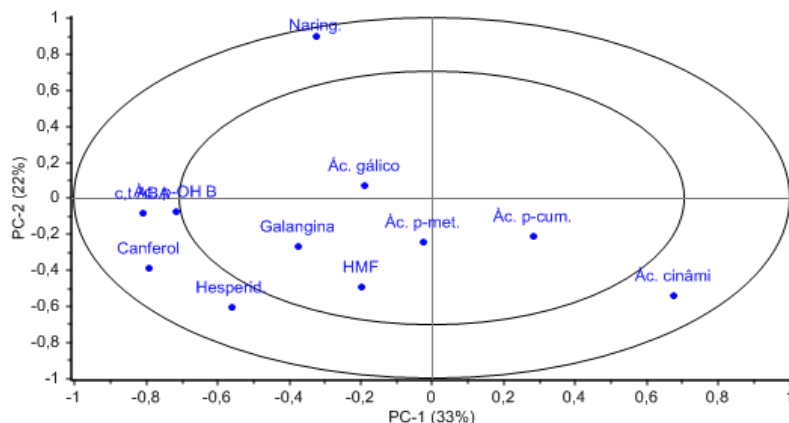
Novamente, uma discriminação semelhante à observada no PCA também foi obtida na análise dos extratos dos méis por HCA (**Figura 40**). A partir do agrupamento por similaridade pode ser observado que houve a discriminação dos méis em dois grupos: méis de laranjeira e de silvestre.



**Figura 40** – Dendrograma de análise de *cluster* dos dados de CLAE-DAD dos extratos laranjeira e silvestre.

Através do gráfico de *loadings* (**Figura 41**) pode ser observado que apenas o ácido cinâmico foi importante para classificação dos extratos silvestre, isto pode ser em parte justificado pelo fato desses méis não apresentarem nenhum pólen dominante para

a sua origem floral, e conseqüentemente, não apresentarem nenhum marcador químico que auxilie a sua discriminação. Semelhante ao observado nas análises anteriores, os flavonoides canferol, hesperidina e narigenina foram novamente as substâncias responsáveis pela classificação dos extratos de laranjeira



**Figura 41** - Gráfico de *loadings* das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de CLAE-DAD dos extratos de laranjeira e silvestre.

Os resultados obtidos pelas análises exploratórias (PCA e HCA) aos dados de CLAE-DAD e aos dados de RMN mostraram que a maioria dos méis coletados na região sudeste do Brasil apresentou uma boa discriminação no que diz respeito às suas composições químicas. A separação dos méis de diferentes tipos foi associada às substâncias presentes em seus extratos. Assim, o uso dessas técnicas, juntas ou separadamente, aliadas à quimiometria pode ser considerada uma ferramenta promissora para ser usada na tipificação de mel, pois permitiu agrupar diferentemente as classes de amostras estudadas. Conseqüentemente pode ser uma técnica alternativa a melissopalínologia, principalmente para os méis que apresentam em sua microscopia poléns sub-representados, como no caso do mel de laranjeira, de morrão de candeia e de assa-peixe.

Com base nesses resultados, pode-se dizer que as duas técnicas (RMN de  $^1\text{H}$  e CLAE-DAD) apresentaram uma boa capacidade de classificar os cinco diferentes tipos de méis estudados da região sudeste. No entanto, quando comparamos os gráficos de *scores* dos dados de RMN  $^1\text{H}$  com aqueles de CLAE-DAD pode se observar que a variância total foi melhor quando se usou dos dados de RMN para a discriminação das amostras.

## 6. CONCLUSÃO

Dentre as amostras analisadas apenas 11,11% (**AS01**, **AS04**, **S01**, **S5** e **S6**) estavam com valores de HMF acima do permitido pelas normas vigentes (60 mg/Kg; BRASIL, 2000), enquanto 88,88% das amostras analisadas puderam ser consideradas aprovadas.

Os valores de pH dos méis analisados variam de 3,37- 4,83, apresentando um caráter ácido, o que é satisfatório, visto que, valores baixo de pH (faixa de pH 3,0 – 4,0) inibe a presença e o crescimento de microorganismos.

Das quarenta e cinco amostras de méis analisadas de diferentes origens botânicas ocorreu a predominância da cor âmbar claro (40,0%), seguida das cores extra âmbar-claro (28,8%) e branco (20%).

Através dos resultados da melissopaliniologia observou-se que a flora da região continua sendo um fator determinante tanto para a composição polínica do mel, como para as propriedades biológicas que lhe são atribuídas. Entretanto, a origem geográfica também influencia a composição química e as propriedades dos méis.

De um modo geral, os méis e os extratos que apresentaram uma satisfatória capacidade antioxidante foram também aqueles que tiveram os melhores conteúdos em fenólicos e flavonoides. Isso vem corroborar com a ação terapêutica do mel.

Dos méis monoflorais analisados, o de eucalipto apresentou o mais alto teor em fenólicos e flavonoides quando comparado aos demais, assim como uma boa atividade antioxidante. Destacando-se a amostra **E2** a que apresentou o maior teor em fenólicos total (141,06 mgEAG/100g) e em flavonoides total (10,89 mgEQ/100g), melhor atividade antiradicalar ( $CE_{50}=10,23$  mg/mL) e a coloração âmbar escuro (145 mm Pfund).

Em geral, os méis de morrão de candeia foram os que apresentaram os valores mais baixos para fenólicos e flavonoides totais, bem como a mais baixa atividade antioxidante.

Assim como para os méis de eucalipto, os seus extratos também apresentaram os maiores valores para o conteúdo de fenólicos (11,33 mgEAG/100g) e flavonoides (3,94 mgEQ/100g) quando comparado aos demais extratos de méis. Estes valores estão

compatíveis com resultados obtidos para atividade antioxidante, onde os extratos **EE5** ( $CE_{50}= 69,51 \mu\text{g/mL}$ ) e **EE6** ( $CE_{50}=55,84 \mu\text{g/mL}$ ) se destacam. Esses dados vêm corroborar com o resultado da quantificação das substâncias fenólicas por CLAE-DAD, onde os méis de eucalipto apresentaram um percentual de 99,07% de ácidos fenólicos nesta florada. Entretanto, foi observada uma baixa concentração de flavonoides (0,93%)

Através da análise por CLAE-DAD foi possível identificar alguns possíveis biomarcadores das floradas estudadas. O flavonoide hesperidina já havia sido descrito na literatura como biomarcador de mel de laranjeira e foi encontrado em três amostras (**EL3**, **EL7** e **EL8**) das nove amostras estudadas. Além disso, o ácido vanílico e o protocatecuico foram encontrados apenas nas amostras de eucalipto podendo ser considerados possíveis biomarcadores desta florada.

A análise por PCA e HCA dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e dos dados de CLAE-DAD para os extratos foi capaz de distinguir os diferentes tipos de méis, uma vez que conseguiu evidenciar as substâncias mais importante para a classificação dos méis de eucalipto, morrão de candeia, assa-peixe, laranjeira, e silvestre produzidos no sudeste do Brasil.

As técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  e de CLAE-DAD combinados à análise multivariada podem ser utilizadas como uma ferramenta alternativa para auxiliarem na identificação da origem floral, visto que, a melissopalínologia apresenta limitações para análise de polens como aqueles de *Croton*, *Citrus* e *Vernonia* que são sub-representados no espectro polínico do mel.

## 7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

A-RAHAMAN, N.L.; CHUA, L.S.; SARMIDI, M.R.; AZIZ, R. Physicochemical and radical scavenging activities of honey samples from Malaysia. **Agricultural Sciences**. 4, 46-51, 2013

AAZZA, S.; LYOUSSI, B.; ANTUNES, D.; MIGUEL, G.M. Physicochemical characterization and antioxidant activity of commercial Portuguese honeys. **Journal of Food Science**. 8, 59-65, 2013

ABADIO FINCO F.D.B.; MOURA L.L.; SILVA I.G. Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 30, 706-712, 2010

ABRAMOVIC, H.; JAMNIK, M.; BURKAN, L.; KAC, M. Water activity and water content in Slovenian honeys. **Food Control**. 19, 1086-1090, 2008

ABUBAKAR, M.B.; ABDULLAH, Z.W.; SULAIMAN, A.S.; SUEN B.A. A review of molecular mechanisms of the anti-leukemic effects of phenolic compounds in honey. **International Journal of Molecular Sciences**. 13, 15054-15073, 2012

AFIK, O.; DAG, A.; KEREM, Z.; SHAFIR, S. Analyses of avocado (*Persea americana*) nectar properties and their perception by honey bees (*Apis mellifera*). **Journal of Chemical Ecology**. 32, 1949-1963, 2006

AHMED, M.; DJEBLI, N.; AISSAT, S.; ZERROUKI, K.; BOURABEH, A. In Vitro synergistic antibacterial activity of natural honey combined with curcuma starch and their correlation with diastase number, flavonoid and polyphenol content. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**. 4, 1, 2013

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**. 101, 1383-392, 2007

AL, M.L.; DANIEL, D.; MOISE, A.; BOBIS, O.; LASLO, L.; BOGDANOV, S. Physicochemical bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. **Food Chemistry**. 112, 863-867, 2009

ALJADI, A.M.; KAMARUDDIN, M.Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. **Food Chemistry**. 85, 513-518, 2004

AL-JABRI, A.A.; AL HOSNI, S.A.; NZEAKO, B.C.; AL MAHROOQI, Z.H.; NSANZE, H. Antibacterial activity of Omani honey alone and in combination with gentamicin. **Saudi Medical Journal**. 26, 767-771, 2005.

ALI-KHODDAMI, WILKES, A.M.; ROBERTS H.T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. **Molecules**., 18, 2328-2375, 2013.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**. 22, 1041-1047, 2002

AL-WAILI, N.S. Topical honey applications vs. acyclovir for the treatment of recurrent herpes simplex lesions. **Medical Science Monitor**. 10, 94-98, 2004

ALI, A.T. Prevention of ethanol-induced gastric lesions in rats by natural honey and its possible mechanism of action. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. 26, 281-288, 1991

ALIFERIS, K.A.; TARANTILIS, P.A.; HARIZANIS, P.C.; ALISSANDRAKIS, E. Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds. **Food Chemistry**. 121, 856-862, 2010

ALISSANDRAKIS, E.; DAFERERA, D., TARANTILIS, P.A.; POLISSIOU, M.; HARIZANIS, P.C. Ultrasound-assisted extraction of volatile compounds from citrus flowers and citrus honey. **Food Chemistry**. 82, 575-582, 2003

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

ALMEIDA-MURADIAN, L.B.; STRAMM, K.M.; HORITA, A.; BARTH, M.O.; FREITAS, A.S.; ESTEVINHO, L.M. Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. **International Journal of Food Science and Technology**. 48, 1698-1706, 2013

ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; TULIPANI, S.; ROMANDINI, S.; VIDAL, A.; BATTINO, M. Methodological aspects about determination of phenolic compounds and in vitro evaluation of antioxidant capacity in the honey: a review. **Current Analytical Chemistry**. 5, 293-302, 2009

ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; TULIPANI, S.; DIAZ, D.; ESTEVEZ, Y.; ROMANDINI, S.; GIAMPIERI, F.; DAMIANI, E.; ASTOLF, P.; BOMPADRE, S.; BATTINO, M. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food Chemical Toxicology**. 48, 2490-2499, 2010a

ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; TULIPANI, S.; ROMANDINI, S.; BERTOLI, E.; BATTINO, M. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. **The Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**. 3, 15-23, 2010b

ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; GONZALEZ- PARAMA, A.M.; SANTOS-BUELGA, C.; BATTINO, M. Antioxidant characterization of native monofloral Cuban honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58, 9817-9824, 2010c.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; ROSANE M. AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**. 33, 2202-2210, 2010

ALVES, A.; RAMOS, A.; GONÇALVES, M.M.; BERNARDO, M.; MENDES, B. Antioxidant activity, quality parameters and mineral content of Portuguese monofloral honeys. **Journal of Food Composition and Analysis**. 30, 130-138, 2013

AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**. 84, 551-562, 2004

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**. 63, 549-562, 1998

ANDRADE, P.; FERRERES, F.; AMARAL, M.T. . Analysis of honey phenolic acids by HPLC, its application to honey botanical characterization. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. 20, 2281–2288, 1997a.

ANDRADE, P.; FERRERES, F.; GIL, M.I.; TOMAS-BARBERAN, F.A. Determination of phenolic compounds in honeys with different floral origin by capillary zone electrophoresis. **Food Chemistry**. 60, 79-84, 1997b

ANDRADE, P., AMARAL, M., ISABEL, P., CARVALHO, J., SEABRA, R., CUNHA, A. Physicochemical attributes and pollen spectrum of Portuguese heather honeys. **Food Chemistry**. 66, 503-510, 1999

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S. ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**. 127, 183-198, 2002

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Internacional. 17. ed. Gaithersburg - EUA, 2003.

ARAÚJO, D.R.; SILVA, R.H.D.; SANTOS, J.S. Avaliação da qualidade físico-química do mel comercializado na cidade de Crato, CE. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. 6, 51- 55, 2006

AURORA, A.; MURALEEDHARAN, G.N.; STRASBURG, G.M. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. **Free Radical Biology and Medicine**. 24, 1355-1363, 1998

AROCHA, E.M.M.; OLIVEIRA, A.J.F.; NUNES, G.H.S.; MARACAJÁ, P.B.; Qualidade do mel de abelha produzidos pelos incubados da iagram e comercializado no Município de Mossoró/RN. *Revista Caatinga*. 21, 211-217, 2008. Disponível em: <<http://caatinga.ufersa.edu.br/index.php/sistema/article/viewFile/629/286>>. Acesso em: 16/06/2008.

ARVANITOYANNIS, I.S.; CHALHOUB, C.; GOTSIOU, P.; LYDAKIS-SIMANTIRIS, N.; KEFALAS, P. Novel quality control methods in conjunction with chemometrics (multivariate analysis) for detecting honey authenticity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 45, 193-203, 2005

ATANASSOVA, J.; V. KONDOVA. Pollen and chemicalphysical analysis of unifloral honeys from different regions of Bulgaria. **Phytologia Balcanica**. 10, 45-50, 2004

AYARI, B.; ABBASSI, F.; HAMMAMI, M.A.; LANDOULS, A. Physicochemical and antimicrobial properties of Tunisian honeys: Honey inhibited the motility of bacter **African Journal of Microbiology Research**. 7, 4138-4145, 2013

AZEREDO, M.A.A.; AZEREDO, L.C.; DAMASCENO, J.G. Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis - RJ. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 19, 3-7, 1999

BALTRUSAITYTĖ, V.; VENSKUTONIS, P. R.; CEKSTERYTĖ, V. Antibacterial activity of honey and beebread of different origin against *S. aureus* and *S. epidermidis*. **Food Technology and Biotechnology**. 45, 201-208, 2007a.

BALTRUSAITYTĖ, V.; VENSKUTONIS, P.R.; CEKSTERYTĖ, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. **Food Chemistry**. 101, 502-514, 2007b.

BANSAL, V.; MEDHI, B.; PANDHI, P. Honey - A remedy rediscovered and its therapeutic utility. **Kathmandu University Medical Journal**. 3, 305-309, 2005

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. 29, 113-123, 2006

BARROS, L.B.; TORRES, F.R.; AZEREDO, L.C.; BARTH, M.B.; FREITAS, M.Q. Caracterização físico-química de mel produzido por *Apis mellifera* no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. 17, 117-120, 2010

BARTH, O.M. Definição da origem botânica de amostras de mel através de seus espectros polínicos. **O Apiário**, 14, 37-38, 1989.

BARTH, O.M. Melissopalynology in Brazil: a review of pollen analysis of honeys, propolis and pollen loads of bees. **Scientia Agrícola**. 61. 342-350, 2004

BARTH, O.M. Análise polínica de mel: Avaliação de dados e seu significado. **Mensagem Doce**. 81, 2-6, 2005

BASTOS, D.H.M. *Tese de Doutorado*. Compostos voláteis de méis de eucalipto e laranja. UNICAMP, 1996.



BASTOS, D.H.M.; FRANCO, M.R.B.; DA SILVA, M.A.A.P.; JANZANTTI, N.S.; MARQUES, M.O.M. Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 22, 122-129, 2002

BAUCHER, M.; MONTIES, B.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 17, 125-197, 1998

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**. 15, 285-292, 2004

BELTON, P.S.; DELGADILLO, I.; GIL, A.M.; HOLMES, E.; NICHOLLS, A.; NICHOLSON, J.K.; SPRAUL, M. Use of high-field  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy for the analysis of liquid foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 44, 1483-1487, 1996

BENZIE, I.F.; STRAIN, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**. 239, 70-6, 1996.

BERETTA, G.; GRANATA, P.; FERRERO, M.; ORIOLI, M.; FACINO, R.M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**. 533, 185-191, 2005

BERETTA, G.; CANEVA, E.; FACINO, R.M. Kynurenic acid in honey from arboreal plants: MS and NMR evidence. **Planta Medica**. 73, 1592-1595, 2007

BERETTA, G.; CANEVA, E.; REGAZZONI, L.; BAKHTYARI, N.G.; FACINO, R.M. A solid-phase extraction procedure coupled to  $^1\text{H}$  NMR, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey. **Analytica Chimica Acta**. 620, 176-182, 2008

BERTELLI, D.; LOLLI, M.; PAPOTTI, G.; BORTOLOTTI, L.; SERRA, G.; PLESSI, J.M. Detection of honey adulteration by sugar syrups using one-dimensional and two-dimensional high-resolution nuclear magnetic resonance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58, 8495-8501, 2010

BERTOLDI, F.C.; GONZAGA, L.; REIS, V. D. A. Características físico-químicas do mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera scutellata*), com florada predominante de hortelã-do-campo (*Hyptis crenata*), produzido no Pantanal. In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONOMICOS DO PANTANAL, 4., 2004, Corumbá, **Anais...** Corumbá: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, 2004. p.1-4.

BERTONCELJ, J.; DOBERŠEK, U.; JAMNIK, M.; GOLOB, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and color of Slovenian honey. **Food Chemistry**. 105, 822-828, 2007

BERTONCELJ, J.; GOLOB, T.; KROPF, U.; KOROSˆEC, M. Characterization of Slovenian honeys on the basis of sensory and physico-chemical analysis with a chemometric approach. **International Journal of Food Science and Technology**. 46, 1661-1671, 2011

BIANCHI, P.L.M.; ANTUNES, G.M.L. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutriˆao**. 12, 123-130, 1999

BIESAGA, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**. 2011, 1218, 2505-2512.

BLASA, M.; CANDIRACCI, M.; ACCORSI, A.; PIACENTINI, M. P.; ALBERTINI, M. C.; PIATTI, E. Raw *Millefiori* honey is packed full of antioxidants. **Food Chemistry**. 97, 217-222, 2006

BORGES, L.L.; LUCIO, T.C.; GIL, E.S.; BARBOSA, E.F. Uma abordagem sobre metodos analiticos para determinaˆo da atividade antioxidante em produtos naturais. 2011. **Enciclopedia Biosfera, Centro Cientifico Conhecer**. 7, 1-20, 2011

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**. 28, 25-30, 1995

BOUSETA, A.; SCHEIRMAN, V.; COLLIN, S. Flavor and free amino acid composition of lavender and Eucalyptus honeys. **Journal of Food Science**, 61, 683-687, 1996

BOGDANOV, S. Charakterisierung von schweizer sortenhonigen. **Agrarforschung**. 4, 427-430, 1997

BOGDANOV, S.; MARTIN, P. Honey Authenticity: a Review. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**. 93, 1-20, 2002

BOGDANOV, S.; RUOFF, K.; PERSANO ODDO, L. Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review. **Apidologie**. 35, 4-17, 2004

BOGDANOV, S. A Short History of Honey. The Book of Honey, capıtulo 5, **Honey Composition**, 2009. Disponıvel em: <<http://www.bee-exagon.net/files/file/fileE/Honey/HistoryHoney.pdf>>. Acesso em 07/06/2010.

BOGDANOV, S. Functional and Biological Properties of the Bee Products: a Review, Bee Product Science, 2011. Disponıvel em: <<http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/Health/BeeProductsFunctional.pdf>> Acesso em: 20/03/2014

BOGDANOV, S. Bee Product Science. Honey in medicine. 2012. Disponıvel em: <<http://www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/HealthHoney/9HoneyMedicineReview.pdf>> Acesso em 20/03/2014

BOFFO, E.F.; FERREIRA, M.M.C.; FERREIRA, A.G. SNIF-NMR and chemometric

methods applied to  $^1\text{H}$  NMR in the study of Brazilian brandy authenticity. In: GUOJONSDOTTIR, M.; BELTON, P.; WEBB, G. Magnetic resonance in food science: challenges in a changing world. Cambridge: Royal Society of Chemistry, **2009a**. p. 143-150

BOFFO, E.F. *Tese Doutorado*. Utilização de RMN aliada a Métodos Quimiométricos na análise de mel e aguardentes.. São Carlos - UFSCar, **2009b**.

BOFFO, E.F.; TAVARES, L.A.; TOBIAS, A.C.T.; FERREIRA, M.M.C.; FERREIRA, A.G.. Identification of components of Brazilian honey by  $\text{H}^1$  NMR and classification of its botanical origin by chemometric methods. **Food Science and Technology**. 49, 55-63, 2012

BONVEHÍ, J.S.; COLL, F.V. Flavour index and aroma profiles of fresh and processed honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 83, 275-282, 2003

BOUSETA, A.; COLLIN, S. Optimized Likens–Nickerson methodology for quantifying honey flavors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 43, 1890-1897, 1995

BRASIL. **Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel (Anexo), 2000. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1690>>. Acesso em 01/11/2013.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49, 2774-2779, 2001

BULMAN, M.W. Honey as a surgical dressing. **The Middlesex Hospital Journal**. 55, 188-189, 1953

CABRAS, P.; ANGIONI, A.; TUBEROSO, C.; FLORIS, I.; RENIERO, F.; GUILLOU, C.; GHELLI, S. Homogentisic acid: a phenolic acid as a marker of strawberry-tree (*Arbutus unedo*) honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 47, 4064-4067, 1999

CAMARGO, R. C. R.; LOPES, M. T. R.; PEREIRA, F. M.; VILELA, S. L. O. Produção de Mel. Piauí: julho de 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/index.htm>>. Acesso em 31/12/2013.

CAO, H.; CHENG, W-X.; LI, C.; PAN, X-L.; XIE, X-G.; LI, T-H. DFT study on the antioxidant activity of rosmarinic acid. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**. 719, 177-183, 2005

CAMPOS, M.G.R. Contribuição para o estudo do mel, pólen, geleia real e própolis. **Boletim da Faculdade de Farmácia de Coimbra**. 11, 17-47, 1987

CASTRO-VÁRQUEZ, L.M.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; PÉREZ-COELLO, M.S. Volatile composition and contribution to the aroma of Spanish honeydew honeys.

Identification of a new chemical marker. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54, 4809-4813, 2006

CASTRO-VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; PÉREZ-COELLO, M.S. Aroma composition and new chemical markers of Spanish citrus honeys. **Food Chemistry**. 103, 601-606, 2007

CASTRO-VÁZQUEZ, L.; DÍAZ-MAROTO, M.C.; GONZÁLEZ-VINAS, M.A.; PÉREZ-COELLO, M.S. Differentiation of monofloral citrus, rosemary, eucalyptus, lavender, thyme and heather honeys based on volatile composition and sensory descriptive analysis. **Food Chemistry**. 112, 1022-1030, 2009

CASTRO-VARGAS, H.I.; RODRÍGUEZ-VARELA, L.I.; FERREIRA, S.R.S.; PARADA-ALFONSO, F. Extraction of phenolic fraction from guava seeds (*Psidium guajava*L.) using supercritical carbon dioxide and co-solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**. 51, 319-324, 2010

CAVIA, M. M.; FERNANDEZ-MUINO, M. A.; HUIDOBRO, J. F.; ALVAREZ, C.; SANCHO, T. Evolution of monosaccharides of honey over 3 years: Influence of induced granulation. **International Journal of Food Science and Technology**. 44, 623-628, 2009

CAZOR, A.; DEBORDE, C.; MOING, A.; ROLIN, D.; THIS, H. Sucrose, glucose, and fructose extraction in aqueous carrot root extracts prepared at different temperatures by means of direct NMR measurements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54, 4681-4686, 2006

CHEN, C.; TANG, H.; SUTCLIFFE, L.H.; BELTON, P.S. Green tea polyphenols react with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl free radicals in the bilayer of liposomes: direct evidence from electron spin resonance studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48, 5710-5714, 2000

CHEN, M.H.W.; ZHANG, C.; FANG, Y. High performance liquid chromatography for the determination of flavonoids. **Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences**. 20, 313-324, 2011

CHENG, Z.; REN, J.; YAN, G.; LI, Y.; CHANG, W.; CHEN, Z. Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds. **Bioorganic Chemistry**. 31, 149-162, 2003

CHIRINOS, R.; BETALLELUZ-PALLARDEL, I.; HUAMÁN, A.; ARBIZU, C.; PEDRESCHI, R.; CAMPOS, D. HPLC-DAD characterisation of phenolic compounds from Andean oca (*Oxalis tuberosa*Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. **Food Chemistry**. 113, 1243-1251, 2009

CHOW, J. Probiotics and prebiotics: a brief overview. **Journal of Renal Nutrition**. 12, 76-86, 2002

CHUA, S.L.; RAHAMAN, A.L.N.; ADNAN, A.N.; TAN, E.T.T. Antioxidant activity of three honey samples in relation with their biochemical components. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**. 2013, 313798, 2013

CHUNG, I.M.; PARK, M.R.; CHUN, J.C.; YUN, S.J. Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. **Plant Science**. 164, 103-109, 2003

CIMPOIU, C.; HOSU, A.; MICLAUS, V.; PUSCAS, A. Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. 100, 149-154, 2013

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Revised Codex Standard for honey. Codex Standard 12-1981. 2001. Disponível em: < <http://www.ihc-platform.net/codex2001.pdf>> Acesso em 20/03/2014

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L.R. Geographical characterization of polyfloral and acacia honeys by nuclear magnetic resonance and chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56, 6873-6880, 2008

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L.R.; COGLIATI, C. NMR characterization of saccharides in Italian honeys of different floral sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 60, 4526-4534, 2012

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L.R.; COGLIATI, C. Geographical discrimination of honeys by saccharides analysis. **Food Control**. 32, 543-548, 2013

CORBELLA, E.; COZZOLINO, D. Classification of the floral origin of Uruguayan honeys by chemical and physical characteristics combined with chemometrics. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**. 39, 534-539, 2006

CORDELLA, C.; MILITÃO, J.S.L.T.; CLÉMENT, M.C.; DRAJNUDEL, P.; CABROL-BASS, D. Detection and quantification of honey adulteration via direct incorporation of sugar syrups or bee-feeding: preliminary study using high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD) and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**. 531, 239-248, 2012

CORDELLA, C.; MILITAO, J.S.; CLEMENT, M.C.; CABROL-BASS, D. Honey characterization and adulteration detection by pattern recognition on HPAEC-PAD profiles. Honey Floral Species Characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 3234- 3242, 2003

COTTE, J. F.; CASABIANCA, H.; GIROUD, B.; ALBERT, M.; LHERITIER, J.; GRENIER-LOUSTALOT, M.F. Characterization of honey amino acid profiles using high-pressure liquid chromatography to control authenticity. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. 378, 1342-1350. 2004

COTTE, J.F.; CASABIANCA, H.; LHERITIER, J.; PERRUCCHIETTI, C.; SANGLAR, C.; WATON, H.; GRENIER-LOUSTALOT, M.F. Study and validity of  $^{13}\text{C}$  stable carbon isotopic ratio analysis by mass spectrometry and  $^2\text{H}$  site-specific natural isotopic fractionation by nuclear magnetic resonance isotopic measurements to characterize and control the authenticity of honey. **Analytica Chimica Acta**. 582, 125-136, 2007

CRANE, E. O livro do mel. São Paulo: Nobel, **1983**.

CRANE, E. O livro do mel. São Paulo: Nobel, **1985**.

CRANE, E. Bees and beekeeping-science, practice and world resources. London: Neinemann Newnes, **1990**.

CRANE, E. O livro do mel. São Paulo: Nobel, **1996**.

CRANE, E. The World History of Beekeeping and Honey Hunting. Taylor & Francis, New York, **1999**.

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

D'ARCY, B.R. Antioxidants in Australian floral honeys – Identification of health enhancing nutrient components. **Rural Industries Research and Development Corporation Publication**. N° 05/040, 2005

DA SILVA, R.F. *Dissertação de Mestrado*. Investigação de ácidos fenólicos em amostra de mel por cromatografia líquida de alta eficiência e sua aplicação na caracterização da origem floral. PPGQO-UFRRJ. **2004**.

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

DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A.M. Compostos voláteis em méis florais. **Química Nova**. 26, 90-96, 2003

DEVILLERS, J.; MORLOT, M.; PHARM-DELEGUE, M.H.; DORÉ, J.C. Classification of monofloral honeys based on their quality control data. **Food Chemistry**. 86, 305-312, 2004

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2° ed. Jhon Wiley & Sons, LTD, **2002**.

DIAZ NAPAL, G.N.; DEFAGO, M.; VALLADARES, G.; PALACIOS, S. Response of *Epilachna paenulatata* two flavonoids: pinocembrin and quercetin, in a comparative study. **Journal of Chemical Ecology**. 36, 898-904, 2010

DIMITROVA, B.; GEVRENOVA, R.; ANKLAM, E. Analysis of phenolic acids in honeys of different floral origin by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**. 18, 24-32, 2007

DIMOU, M.; KATSAROS, J.; TZAVELLA-KLONARI, K.; THRASYVOULOU, A. Discriminating pine and fir honeydew honeys by microscopic characteristics. **Journal of Apicultural Research**. 45, 16-21, 2006

DOBRE, I.; ALEXE, P.; ESCUREDO, O.; SEIJO, C.M. Palynological evaluation of selected honeys from Romania. **Grana**. 52, 113-121, 2012

DOMÍNGUEZ, M.A.; DINIZ, P.H.G.D.; DI NEZIO, M.S.; ARAÚJO, M.C.U.; CENTURIÓN, M.E. Geographical origin classification of Argentinean honeys using a digital image-based flow-batch system. **Microchemical Journal**. 112, 104–108, 2014

DONARSKI, J.A.; JONES, S.A.; CHARLTON, A.J. Application of cryoprobe  $H^1$  nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the verification of corsican honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56, 5451-5456, 2008

DOWNEY, G.; HUSSEY, K.; KELLY, D.J.; WALSH, F.T.; MARTIN, P.G. Preliminary contribution to the characterization of artisanal honey produced on the island of Ireland by palynological and physico-chemical data. **Food Chemistry**. 91, 347-354, 2005

DUSTMANN, J. H. Über die Katalaseaktivitet in Bienenhonig aus der Tracht der Heidekrautgewächse (Ericaceae). **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und – Forschung**. 145, 294-295, 1971

DUSTMANN, J. H. Antibacterial effect of honey. **Apiacta**. 14, 7-11, 1979

DVASH, L.; AFIK, O.; SHAFIR, S.; SCHAFFER, A.; YESELSON, Y.; DAG, A.; LANDAU, S. Determination by near-infrared spectroscopy of perseitol used as a marker for the botanical origin of avocado (*Persea americana* Mill.) honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50, 5283-5287, 2002

EDENHARDER, R.; KELLER, G.; PLATT, K. L.; UNGER, K. K. Isolation and characterization of structurally novel antimutagenic flavonoids from spinach (*Spinaciaoleracea*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49, 2767-2773, 2001

ELKE, A. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**. 63, 549-562, 1998

EREJUWA, O.O.; SULAIMAN, S.A.; WAHAB, M.S.; SIRAJUDEEN, K.N.; SALLEH, M.S.; GURTU, S. Antioxidant protection of Malaysian tualang honey in

pancreas of normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Ann Endocrinol (Paris)**. 71, 291-296, 2010a.

EREJUWA, O.O.; SULAIMAN, S.A.; WAHAB, M.S.; SIRAJUDEEN, K.N.; SALLEH, M.S. Hypoglycemic and antioxidant effects of honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**. 80, 74-82, 2010b.

ESCOBAR, A.L.S.; XAVIER, F.B. Propriedades fitoterápicas do mel de abelhas. **Revista UNINGÁ**. 37, 159-172, 2013

ESCRICHE, I.; KADAR, M.; JUAN-BORRAS, M. DOMENECH, E. Suitability of antioxidant capacity, flavonoids and phenolic acids for floral authentication of honey. Impact of industrial thermal treatment. **Food Chemistry**. 142, 135–143, 2014.

ESCRICHE, I.; VISQUERT, M.; JUAN-BORRÁS, M.; FITO, P. Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. **Food Chemistry**. 112, 329–338, 2009

ESCRICHE, I.; KADAR, M.; JUAN-BORRAS, M.; DOMENECH, E. Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys. **Food Research International**. 44, 1504-1513, 2011

ESCUREDO, O.; SEIJO, M.C.; SALVADOR, J.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M.I. Near infrared spectroscopy for prediction of antioxidant compounds in the honey. **Food Chemistry**. 141, 3409-3414, 2013

ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A.P.; MOREIRA, L.G.; DIAS, L.; PEREIRA, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology**. 46, 3774-3779, 2008

ESTEVINHO, L.M.; FEÁS, X.; EIJAS, J.A.; VÁZQUEZ-TATO, M.P. Organic honey from Trás-Os-Montes region (Portugal):chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. **Food and Chemical Toxicology**. 50, 258-264, 2012

ETERAF-OSKOU EI, T; NAJAFI, M. Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**. 16, 731-742, 2013

ETZOLD, E.; LICHTENBERG-KRAAG, B. Determination of the botanical origin of honey by Fourier-transformed infrared spectroscopy: an approach for routine analysis. **European Food Research and Technology**. 227, 579-586, 2008

EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E.M.S.; BESERRA, M.F.; RODRIGUES, M. L. Análise físico-química de méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melípona Scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. **Ciência Rural**. 35, 1166-1171, 2005



EZZ EL-ARAB, A.M.; GIRGIS, S.M.; HEGAZY, M.E.; ABD EL-KHALEK, A.B. Effect of dietary honey on intestinal microflora and toxicity of mycotoxins in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 6, 1-13, 2006

FALLICO, B.; ARENA, E.; VERZERA, A.; ZAPPALA, M. The European Food Legislation and its impact on honey sector. **Accreditation and Quality Assurance**. 11, 49-54, 2006

FALLICO, B.; ARENA, E.; ZAPPALA, M. Degradation of 5 Hydroxymethylfurfural in Honey. **Journal of Food Science**. 73, 625-631, 2008

FAUZI, A. N.; NORAZMI N.M.; YAACOB, S.N. Tualang honey induces apoptosis and disrupts the mitochondrial membrane potential of human breast and cervical cancer cell lines. **Food and Chemical Toxicology**. 49, 871-878, 2011

FERREIRA, I.C.F.R.; AIRES, E.; BARREIRA, J.C.M.; ESTEVINHO, L.M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: different contributions of the entire honey and phenolic extract. **Food Chemistry**. 114, 1438-1443, 2009

FERREIRA, O.; PINHO, S.P. Solubility of flavonoids in pure solvents. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. 51, 6586-6590, 2012

FERRERES, F., TÓMAS-BARBERÁN, F.A., GIL, M.I., TOMÁS-LORENTE, F. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 56, 49-56, 1991

FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Hesperetin: a marker of the floral origin of citrus honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 61, 121-123, 1993

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; SOLER, C.; GARCIA-VIGUERA, C.; ORTIZ, A.; TOMÁS-LORENTE, F. A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. **Apidologie**. 25, 21-30, 1994a.

FERRERES, F.; GINER, J.M.; TOMAS-BARBERAN, F.A. A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 65, 371-372, 1994b

FERRERES, F., ANDRADE, P., GIL, M. I., & TOMAS-BARBERAN, F. A. Floral néctar phenolics as biochemical markers for the botanical origin of heather honey. **Zeitschrift fur Lebensmittel -Untersuchung und -Forschung**. 202, 40-44, 1996a.

FERRERES, F.; ANDRADE, P.; TOMAS-BARBERAN, F.A. Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 44, 2053-2056, 1996b.

FLAMINI, R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. **Mass Spectrometry Reviews**. 22, 218-250, 2003

FRANKEL, S.; ROBINSON, G.E.; BERENBAUM, M.R. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. **Journal of Apicultural Research**. 37, 27-31, 1998

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**. 12, 239-243, 1992

FOTSIS, T.; PEPPER, M.S.; AKTAS, E.; BREIT, S.; RASKU, S.; ADLERCREUTZ, H.; WÄHÄLÄ, K.; MONTESANO, R.; SCHWEIGERER, L. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. **Cancer Research, Baltimore**. 57, 2916-2921, 1997

FUKUDA, M.; KOBAYASHI, K.; HIRONO, Y.; MIYAGAWA, M.; ISHIDA, T.; EJIJOGU, E.C.; SAWAI, M.; PINKERTON, K.E.; TAKEUCHI, M. Jungle honey enhances immune function and antitumor activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2011, 908743, 2011

GALLARDO-VELÁZQUEZ, T.; OSORIO-REVILLA, G.; LOA, M.Z.D.; RIVERA-ESPINOZA, Y. Application of FTIR-HATR spectroscopy and multivariate analysis to the quantification of adulterants in Mexican honeys. **Food Research International**. 42, 313-318, 2009

GASPAR, E.M.S.M.; LUCENA, A.F.F. Improved HPLC methodology for food control - furfurals and patulin as markers of quality. **Food Chemistry**. 114, 1576-1582, 2009

GARCIA-CRUZ, C.H.; HOFFMANN, C.F.L.; SAKANAKA, L.S.; VINTURIM, T.M. Determinação da qualidade do mel. **Alimentos e Nutrição**. 10, 23-25, 1999

GAŠIĆ, U.; KECKES, S. K.; DABIC, D.; TRIFKOVIC, J.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D.; NATIC, M.; TEŠIĆ, Z. Phenolic profile and antioxidant activity of Serbian polyfloral honeys. **Food Chemistry**. 145, 599-607, 2014.

GHASHM, A. A.; KHATTAK M. N.; ISMAIL, N. M.; SAINI, R. Antiproliferative effect of Tualang honey on oral squamous cell carcinoma and osteosarcoma cell lines. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 10, 49, 2010

GHELDOLF, N.; ENGESETH, N.J. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50, 3050-3055, 2002.

GHELDOLF, N.; WANG, X. H.; ENGESETH, N. J.; Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50, 5870-5877, 2002.

GHELDOLF, N.; WANG, X.H.; ENGESETH, N.J. Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 1500-1505, 2003.

GILBERT, J.; SHEPHERD, M.J.; WALLWORK, M.A.; HARRIS, R.G. Determination of the geographical origin of honeys by multivariate-analysis of gas-chromatographic data on their free amino-acid content. **Journal of Apicultural Research**. 20, 125-135, 1981

GOMES, S.; DIAS, L.G.; MOREIRA, L.L.; RODRIGUES, P.; ESTEVINHO, L. Physicochemical microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**. 48, 544-548, 2010.

GOMES, T.; FEÁS, X.; IGLESIAS, A.; ESTEVINHO, L.M. Study of organic honey from the Northeast Portugal. **Molecules**. 16, 5374-5386, 2011.

GONZALEZ-MIRET, M.L.; TERRAB, A.; HERNANZ, D.; FERNANDEZ-RECAMALES, M.A.; HEREDIA, F.J. Multivariate correlation between color and mineral composition of honeys and by their botanical origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53, 2574-2580, 2005

GORJANOVIC, S.Z.; ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; NOVAKOVIC, M.M.; PASTOR, F.T.; PEZO, L.; BATTINO, M.; SUZnjevic, D.Z. Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. **Journal of Food Composition and Analysis**. 30, 13-18, 2013

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

HADJMOHAMMADI, M.R.; NAZARI, S.; KAMEL, K. Determination of flavonoid markers in honey with SPE and LC using experimental design. **Chromatographia**. 69, 1291-1297, 2009

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radical in Biology and Medicine. Oxford University Press: Oxford, 2007.

HANSE, S.; SUZUKI, O.; ODATE, M.; SUZUKI, S. Change in quality of honey on heating and storage in changes in hydroxymethyl furfural (HMF) content of honey. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Technology**. 20, 248-256, 1973

HARTMAN, P.E.; SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 15, 145-182, 1990.

HERMOSIN, I.; CHICON, R.M.; CABEZUDO, M.D.. Free amino acid composition and botanical origin of honey. **Food Chemistry**. 83, 263-268, 2003

HERNÁNDEZ, O.M.; FRAGA, J.M.G.; JIMENEZ, A.I.; JIMENEZ, F.; ARIAS, J.J. Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. **Food Chemistry**. 93, 449-458, 2005

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; VENEMA, D.P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 40, 1591-1598, 1992

IGLESIAS, M. T.; LORENZO DE, C.; CARMEN-POLO, DEL M., MARTIN-ALVAREZ, P.J.; PUEYO, E. Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52, 84-89, 2004

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**. 126, 1821-1835, 2011

ISLA, M.I.; CRAIG, A.; ORDONEZ, R.; ZAMPINI, C.; SAYAGO, J.; BEDASCARRASBURE, E.; ALVAREZ, A.; SALOMON, V.; MALDONADO, L. Physicochemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. **LWT- Food Science and Technology**. 44, 1922-1930, 2011

IURLINA, M.; SAIZ, A.; FRITZ, R.; MANRIQUE, G. D. Major flavonoids of Argentinean honeys. Optimisation of the extraction method and analysis of their content in relationship to the geographical source of honeys. **Food Chemistry**. 115, 1141-1149, 2009

JAGANATHAN, K.S.; MANDAL, M. Honey constituents and their apoptotic effect in colon cancer cells. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**. 1, 29-36, 2009

JAGANATHANA, S.K.; MANDALB, S.M.; JANAA, S.K.; DASA, S.; MANDALA, M. Studies on the phenolic profiling, anti-oxidant and cytotoxic activity of Indian honey: in vitro evaluation. **Natural Product Research**. 24, 1295-1306, 2010.

JASICKA-MISIAK, I.; POLIWODA, A.; DEREN, M.; KAFARSKI, P. Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys. **Food Chemistry**. 131, 1149-1156, 2012.

JAMROZ, M.K.; PARADOWSKA, K.; ZAWADA, K.; MAKAROVA, K.; KAZMIERSKIA, S.; WAWER, I. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR-based sugar profiling with chemometric analysis and antioxidant activity of herbhoneys and honeys. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 94, 246-255, 2013

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

JERKOVIC, I.; MARIJANOVIC, Z.; KEZIC, J.; GIGIC, M. Headspace, volatile and semi-volatile organic compounds diversity and radical scavenging activity of ultrasonic solvent extracts from *Amorpha fruticosa* honey samples. **Molecules**. 14, 2717-2728, 2009b

JERKOVIC, I.; MARIJANOVIC, Z. A short review of headspace extraction and ultrasonic solvent extraction for honey volatiles fingerprinting. Croatia. **Journal of Food Science and Technology** 1, 28-34, 2009.

JERKOVIC, I.; MARIJANOVIC, Z.; TUBEROSO, C.I.G.; BUBALO, D., KEZIC, N. Molecular diversity of volatile compounds in rare willow (*Salix* spp.) honeydew honey: Identification of chemical biomarkers. **Molecular Diversity**. 14, 237-248, 2010.

JERKOVIC, I.; KASUM, A.; MARIJANOVIC, Z.; TUBEROSO, C.I.G. Contribution to the characterisation of honey-based Sardinian product *abbamele*: Volatile aroma composition, honey marker compounds and antioxidant activity. **Food Chemistry**. 124, 401-410, 2011a.

JERKOVIC, I.; MARIJANOVIC, Z.; MALENICA-STAVER, M.; Screening of natural organic volatiles from *Prunus mahaleb* L. honey: coumarin and vomifoliol as nonspecific biomarkers. **Molecules**. 16, 2507-2518, 2011b.

JERKOVIC, I.; KUS, P. M.; TUBEROSO, C. I. G.; ŠAROLIC, M. Phytochemical and physical-chemical analysis of Polish willow (*Salix* spp.) honey: Identification of the marker compounds. **Food Chemistry**. 145, 8-14, 2014.

JUNIOR, M.C.S.; SANTOS, F.A.R. Espectro polínico de amostras de méis coletadas na microrregião do Paraguassu, Bahia. **Magistra**. 15, 79-82, 2003

JUSTESEN, U.; KNUTHSEN, P.; LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**. 799, 101-110, 1998

JUSZCZAK, L., SOCHA, R., ROZNOWSKI, J., FORTUNA, T.; NALEPKA, K. Physicochemical properties and quality parameters of herb honeys. **Food Chemistry**. 113, 538-542, 2009

KAHRAMAN, T.; BUYUKUNAL, S.K.; VURAL, A.; ALTUNATMAZ, S.S. Physicochemical properties in honey from different regions of Turkey. **Food Chemistry**. 123, 41-44, 2010

KALABOVA, K.; BORKOVCOVA, I.; SMUTNA, M.; VECEREK, V. Hydroxymethylfurfural in Czech honeys. *Czech Journal of Animal Science*. 48, 551-557, 2003

KALILI, K.M.; DE VILLIERS, A. Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. **Journal of Separation Science**. 34, 854-876, 2011

KALPANA, K.; KAPIL, S.; HARSH, P.S.; BIKRAM, S. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56, 10129-10134, 2008

KAMBOJ, R.; BERA, B.M; NANDA, V. Evaluation of physico-chemical properties, trace metal content and antioxidant activity of Indian honeys. **International Journal of Food Science and Technology**. 48, 578-587, 2013

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E.JR. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. 366, 351-376, 1994

KANDIL, A.; EL-BANBY, M.; ABDEL-WAHED, G. K.; ABDEL-GAWWAD, M.; Fayez M Curative properties of true floral and false non-floral honeys on induced gastric ulcers. **Journal of Drug Research**. 17, 103-106, 1987

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

KAŠKONIENE, V.; VENSKUTONIS, R.P. Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 9, 620-634, 2010

KAŠKONIENĖ, V.; VENSKUTONIS, P.R.; CEKSTERYTĖ, V. Composition of volatile compounds of honey of various floral origin and beebread collected in Lithuania. **Food Chemistry**. 111, 988-997, 2008

KELLY, J.F.D.; DOWNEY, G.; FOURATIER, V. Initial study of honey adulteration by sugar solutions using mid-infrared (MID) spectroscopy and chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52, 33-39, 2004

KENNEDY, D.O.; WIGHTMAN, E.L. Herbal extracts and phytochemicals: Plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. **Advances in Nutrition**. 2, 32-50, 2011

KHALIL, M.I.; SULAIMAN, S.A.; GAN, S.H. High 5-hydroxymethylfurfural concentrations are found in Malaysian honey samples stored for more than one year. **Food and Chemical Toxicology**. 48, 2388-2392, 2010

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T.H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**. 18, 2328-2375, 2013

KISS, J. Mel Viajante. *Revista Globo Rural*, 2008. Disponível em: <[http://globorural.globo.com/edic/278/mel\\_11.jpg](http://globorural.globo.com/edic/278/mel_11.jpg)>. Acesso em 06/08/2012.

KOSIR, I.J.; KIDRIC, J. Identification of amino acids in wines by one- and two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49, 50-56, 2001

KÚS, P.M.; CONGIU, F.; TEPER, D.; ZBIGNIEW SROKA, Z.; JERKOVIC, I.; TUBEROSO, C.I.G. Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. **LWT - Food Science and Technology**. 55, 124-130, 1998

KÚS, P.M.; JERKOVIC, I.; TUBEROSO, C.I.G., ŠAROLIC, M. The volatile profiles of a rare apple (*Malus domestica* Borkh.) honey: Shikimic pathway derivatives, terpenes and others. **Chemistry and Biodiversity**. 10, 1638-1652, 2013

KÚS, P.M.; CONGIU, F.; TEPER, D.; SROKA, Z.; JERKOVIC, I.; IGNAZIO, C.; TUBEROSO, G. Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. **Food Science and Technology**. 55, 124-130, 2014.

KÚS, P. A.; JERKOVIC, I.; TUBEROSO, C.I.G.; MARIJANOVIC, Z.; CONGIU, F. Cornflower (*Centaurea cyanus* L.) honey quality parameters: Chromatographic fingerprints, chemical biomarkers, antioxidant capacity and others. **Food Chemistry**. 142, 12-18, 2014.

KÜÇÜK, M.; KOLAYLIA, S.; KARAOĞLUB, S.; ULUSOYA, E.; BALTACIA, C.; CANDANC, F. Biological activities and chemical composition of three honeys of different typed from Anatolia. **Food Chemistry**. 100, 526-534, 2007

LA SERNA, I. R.; MÉNDEZ-PÉREZ, B.; GÓMEZ FERRERA, S.C. Pollen spectra of different unifloral honeys from La Palma (Canary Islands, Spain). **Grana**. 41, 48-57, 2002

LA SERNA, I.; GÓMEZ FERRERAS, C. Pollen and sensorial characterization of different honeys from El Hierro (Canary Islands). **Grana**. 45, 146-159, 2006

LACHMAN, J.; KOLIHOVÁ, D.; MIHOLOVÁ, D.; KOŠATA, J.; TITĚRA, D.; KULT, K. Analysis of minority honey components: Possible use for the evaluation of honey quality. **Food Chemistry**. 101, 973-979, 2007

LACHMAN, J.; HEJTMANKOVA, A.; SYKORA, J.; KARBAN, J.; ORSAK, M.; RYGEROVA, B. Content of major phenolic and flavonoid antioxidants in selected Czech honeys. **LWT Czech Journal of Food Sciences**. 28, 412-426, 2010

LARSON, R.A. Naturally Occurring Antioxidants. Lewis Publishers: New York, 1997.

LAZAREVIC, K.B.; ANDRIC, F.; TRIFKOVIC, J.; TESIK, Z.; MILOJKOVIC-OPSENICA, D. Characterization of Serbian unifloral honeys according to their physicochemical parameters. **Food Chemistry**. 132, 2060-2064, 2012

LÉON-RUIZ, V.; VERA, S.; GONZÁLEZ-PORTO, A. V.; ANDRÉS, M.P. S. Vitamin C and sugar levels as simple markers for discriminating Spanish honey sources. **Journal of Food Science**. 76, 356-361, 2011.

LIANDA, R.L.P. *Dissertação de Mestrado*. Caracterização de mel de *Apis mellifera* pelo seu perfil em substâncias fenólicas por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação da atividade biológica. PPGQO-UFRRJ. **2004**

LIANDA, R.L.P.; CASTRO, R.N. Isolamento e identificação da Morina em Mel Brasileiro de *Apis mellifera*. **Química Nova**. 31, 1472-1475, 2008

LIANDA, R.L.P. *Tese de doutorado*. Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência. UFRRJ, Seropédica, **2009**.

LIANDA, R.L.P.; SANT'ANA, L.D'O.; ECHEVARRIA, A.; CASTRO, R.N.; Antioxidant activity and phenolic composition of Brazilian honeys and their extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 23, 618-627, 2012

LIBERATO, M.C.T.C.; MORAIS, S.M.; SIQUEIRA, S.M.C.; MENEZES, J.E.S.A.; RAMOS, D.N.; MACHADO, L.K.A.; MAGALHÃES, I.L. Phenolic content and antioxidant and antiacetylcholinesterase properties of honeys from different floral origins. **Journal of Medicinal Food**. 14, 658-663, 2011

LIBERATO, M.C.T.C.; MORAIS, S.M.; MAGALHÃES, C.E.C.; MAGALHÃES, I.L.; CAVALCANTI, D.B.; SILVA, M.M.O. Physicochemical properties and mineral and protein content of honey samples from Ceará State, Northeastern Brazil. **Food Science and Technology**. 33, 38-46, 2013

LIU, Q.; CAI, W.; SHAO, X. Determination of seven polyphenols in water by high performance liquid chromatography combined with preconcentration. **Talanta**. 77, 679-683, 2008

LOLLI, M.; BERTELLI, D.; PLESSI, M.; SABATINI, A.G.; RESTANI, C. Classification of Italian honeys by 2D HR-NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56, 1298-1304, 2008

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Commission Internationale de Botanique Apicole de l'U.I.S.B. Les méthodes de melisso-palynologie. **Apidologie**. 1, 211-227, 1970

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of Melissopalynology, **Bee World**. 59, 139-157, 1978



MARTOS, I.; COSSENTINI, M.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 45, 2824-2829, 1997

MARTOS, I.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F.A. Identification of flavonoid markers for the botanical origin of Eucalyptus honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48, 1498-1502, 2000

MANYI-LOH, C.E.; NDIP, R. N.; CLARKE, A. M. Volatile Compounds in Honey: A Review on Their Involvement in Aroma, Botanical Origin Determination and Potential Biomedical Activities. **International Journal of Molecular Sciences**. 12, 9514-9532, 2011

MARCHINI, L.C.; GENI, S.S.; MORETI, A.C.C.C. Mel Brasileiro: Composição e normas. Ribeirão Preto: A. S. Pinto, **2004**.

MAZZONI, V.; BRADESI, P.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Direct qualitative and quantitative analysis of carbohydrate mixtures using C-13 NMR spectroscopy: application to honey. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 35, 81-90, 1997

MEDA, A.; LAMIEN, C.; ROMITO, M.; MILLAGO, J.; NACOUлма, O. Determination of total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**. 91, 571-577, 2005

MEDIĆ-ŠARIĆ, M.; RASTIJA, V.; BOJIĆ, M.; MALEŠ, Z. From functional food to medicinal product: Systematic approach in analysis of polyphenolics from propolis and wine. **Nutrition Journal**. 8, 1-18, 2009

MENDES, C. G.; SILVA, J. B.A.; MESQUITA, L.X.; MARACAJÁ, P.B. As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**. 22, 7-14, 2009

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48, 577-599, 2000

MILLER, N.J.; RICE-EVANS, C.; DAVIES, M.J.; COPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonants. **Clinical Science**. 26, 265-277, 1993

MONIRUZZAMAN, M.; SULAIMAN, S.M.; AZLAN, S. A. M.; GAN, S.H. Two-year variations of phenolics, flavonoids and antioxidant contents in Acacia honey. **Molecules**. 18, 14694-14710, 2013

MONTENEGRO, G.; SANTANDER, F.; JARA, C.; NUÑEZ, G.; FREDES, C. Actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles monoflorales de plantas nativas chilenas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. 12, 257-268, 2013

- MOHAMED, H.S.A.; ELWERFALI, S.; AGHA, A.; ELAGORI, M.; NAGWA H.S.A. Physicochemical, heavy metals and phenolic compounds analysis of Libyan honey samples collected from Benghazi during 2009-2010. **Food and Nutrition Sciences**. 4, 33-40, 2013
- MOREIRA, R.F.A.; DE MARIA, C.A.B. Glicídios no Mel, **Química Nova**. 24, 516-525, 2001
- MORETI A.C.C.C.; SODRÉ G.S.; MARCHINI L.C; OTSUK I.P. Características físico-químicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L. do Estado do Ceará, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**. 33, 191-199, 2009
- MOUNDOI, M.A.; PADILA-ZAKOUR, O.I.; WOROBO, R.W. Antimicrobial activity of honey against food pathogens and food spoilage microorganisms. **New York State Agricultural Experiment Station**. 1, 61-71, 2001
- MOLAN, P C; RUSSELL, K M. Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. **Journal of Apicultural Research**. 27, 62-67, 1988
- MOLAN, P.C. The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. **Bee World**. 73, 5-28, 1992a.
- MOLAN, P.C. The antibacterial activity of honey: 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. **Bee World**. 73, 59-76, 1992b.
- MOLAN, P.C. Honey as an antimicrobial agent, Bee Products.Properties, Applications, and Apitherapy. Symposium Tel Aviv, **1997**.
- MOLAN, P.C. The limitations of the methods of identifying the floral source of honeys. **Bee World**. 79, 59-68, **1998**.
- MONIRUZZAMAN, M.; KHALIL, I.M.; SULAIMAN, A.S.; GAN, H.S. Physicochemical and antioxidant properties of Malaysian honeys produced by *Apis cerana*, *Apis dorsata* and *Apis mellifera*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 13, 43, 2013
- MONTAGNI, S.M.S. *Dissertação de Mestrado*. Identificação de substâncias fenólicas em mel e pólen apícola de diferentes origens botânicas e geográficas. PPGQO-UFRRJ. **2005**.
- MOREIRA, R.F.A.; TRUGO, L.C.; PIETROLUONGO, M.; DE MARIA, C.A.B. Flavor composition of cashew (*Anacardium occidentale*) and marmeleiro (*Croton* species) honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50, 7616-7621, 2002
- MOREIRA, R.F.A.; DE MARIA C.A.B. Investigation of the aroma compounds from headspace and aqueous solution from the cambara (*Gochnatia velutina*) honey. **Flavour and Fragrance Journal**. 20, 13-17, 2005

MUÑOZ, O.; COPAJA, S.; SPEISKY, H.; PEÑA, R.; MONTENEGRO, G. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. **Química Nova**. 30, 848-851, 2007

NAAB, O.A.; TAMAMEM, M.A.; CACCAVARI, A. Palynological and physicochemical characteristics of three unifloral honey types from central Argentina. **Spanish Journal of Agricultural Research**. 6, 566-576, 2008

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**. 1054, 95-111, 2004

NATIONAL HONEY BOARD. Honey-health and therapeutic qualities. **American National Honey Board**, 2002. Disponível em < <http://www.biologiq.nl/UserFiles/Compendium%20Honey%202002.pdf>>. Acessado em 10/01/2014.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O. R., Marcel Dekker: New York, **1985**. p. 139

NOGUEIRA-NETO, P. Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis, 1997.

NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L.; TORIBIO, L.; JIMENEZ, J.J.; MARTIN, M.T. High-performance liquid chromatography determination of methylanthranilate, hydroxymethylfurfural and related compounds in honey. **Journal of Chromatography A**. 917, 95-103, 2001

NOZAL, M.J.; BERNAL, J.L.; TORIBIO, L.; ALAMO, M.; DIEGO, J.C.; TAPIA, J. The use of carbohydrate profiles and chemometrics in the characterization of natural honeys of identical geographical origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53, 3095-3100, 2005

NUNES, G.S.; ROSA, I.G.; SILVA, J.M.; VIANA, K.D.A.L.; TAVARES, C.P.; LIMA, S.L.S. Controle de Qualidade para méis de *Apis mellifera*: Revisão Bibliográfica. **Acta Brazilian Science**. 1, 108-113, 2013

OHMENHAEUSER, M.; MONAKHOVA, Y.B.; KUBALLA, T.; LACHENMEIER, D.W. Qualitative and quantitative control of honeys using NMR spectroscopy and chemometrics. **Analytical Chemistry**. 2013, 825318, 2013

OLAITAN, P.B.; ADELEKE, E.O.; OLA O.I. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **African Health Sciences**. 7, 159-165, 2007

OLIVEIRA, S.P.; MÜLLER, S.C.R.; DANTAS, F.G.K.; ALVES, N.C.; VASCONCELOS, M.A.M.; VENTURIERI, C.G. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**. 35, 1728-1732, 2012

OSACHLO, L. *Monografia*. Aplicação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle no processamento industrial de mel de abelhas (*Apis mellifera*). CET – UnB, **2004**.

OTHMAN, N.H. Honey and Cancer: Sustainable Inverse Relationship Particularly for Developing Nations: A Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2012, 410406, 2012

OUCHEMOUKH, S.; LOUAILECHE, H.; SCHWEITZER, P. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. **Food Control**. 18, 52-58, 2007

OWAYSS, A. Physicochemical analysis for standardizing quality criteria of Libyan Eucalyptus honey. **Egyptian Journal of Applied Science**. 20, 247-255, 2004

PAMPLONA, B.C. *Dissertação de Mestrado*. Exame dos elementos químicos inorgânicos encontrados em méis brasileiros de *Apis mellifera* e suas relações físico-biológicas. IB – USP, **1989**.

PANNALA, A.S.; CHAN, S.T.; O'BRIEN, J.P.; RICE-EVANS, A.C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. 282, 1161-1168, 2001

PARADKAR, M.M.; IRUDAYARAJ, J.; SAKHAMURI, S. Discrimination and classification of beet and cane sugars and their inverts in maple syrup by FT-Raman. **Applied Engineering in Agriculture**. 18, 379-383, 2002

PARADKAR, M.M.; IRUDAYARAJ, J. Discrimination and classification of beet and cane inverts in honey by FT-Raman spectroscopy. **Food Chemistry**, 76, 231-329, 2002

PEREIRA, F. de M.; LOPES, M. T. do R.; CAMARGO, R. C. R. de; VILELA, S. L. de O. Produção de mel. Embrapa Meio-Norte, versão virtual. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/index.htm>>. Acesso em: 23/11/2013.

PÉREZ, A.R.; IGLESIAS, M.T.; PUEYO E.; GONZALEZ, M.; DE LORENZO, C. Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55, 360-365, 2007

PÉREZ-PÉREZ, E.; PATRICIA VIT, P.; HUQ, F. Flavonoids and polyphenols in studies of honey antioxidant activity. **International Journal of Medicinal Plant and Alternative Medicine**. 1, 063-072, 2013

PERNA, A.; INTAGLIETTA, I.; SIMONETTI, A.; GAMBACORTA, E. A comparative study on phenolic profile, vitamin C content and antioxidant activity of Italian honeys of different botanical origin. **International Journal of Food Science and Technology**. 48, 1899-1908, 2013

PERSANO-ODDO, L.; PIRO R. Main European unifloral honeys: Descriptive sheets. **Apidologie**. 35, 38-81, 2004

PIER-GIORGIO, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**. 63,1035-1042, 2002

PILJAC-ZEGARAC, L.; STIPCEVIC, T.; BELSCAK, A. Antioxidant properties and phenolic content of different floral origin honeys. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**. 1, 43-50, 2009

PIROUETTE Multivariate Data Analysis Version 4.0 Infometrix, Inc. 2008

PRESTES, R.A.; COLNAGO, L.A.; FORATO, L.A.; VIZZOTTO, L.; NOVOTNY, E.H.; CARRILHO, E. A rapid and automated low resolution NMR method to analyze oil quality in intact oilseeds. **Analytica Chimica Acta**. 596, 325-329, 2007

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 3273-3279, 2003

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53, 4290-4302, 2005

POOL-ZOBEL, B.L.; BUB, A.; MÜLLER, H.; WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid rich foods. **Carcinogenesis**. 18, 1847-1850, 1997

PUSCAS, A., HOSU, A., CIMPOIU, C. Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. **Journal of Chromatography A**. 1272, 132-135, 2013

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSGU, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**. 50, 586-621, 2011

RAMANAUSKIENE, K.; SAVICKAS, A.; INKENIENE, A.; VITKEVICIUS, K.; KASPARAVICIENE G, BRIEDIS V, AMSIEJUS A. Analysis of content of phenolic acids in Lithuanian propolis using high-performance liquid chromatography technique. **Medicina**. 45,712-717, 2009

RASHED, M.N.; SOLTAN, M.E. Major and trace elements in different types of Egyptian mono-floral and non-floral bee honeys. **Journal of Food Composition and Analysis**. 17, 725-735, 2004

- REZIC, I.; HORVAT, A.J.M.; BABI, C.S.; KASTELAN-MACAN, M. Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. **Ultrasonics Sonochemistry**. 12, 477-781, 2005
- RIBEIRO, R.O.R.; MÁRSICO, E.T.; CARNEIRO, C.S.; MONTEIRO, M.L.G.; JÚNIOR, C.A.C.; MANO, S.; JESUS, E.F.O. Classification of Brazilian honeys by physical and chemical analytical methods and low field nuclear magnetic resonance (LF  $^1\text{H}$  NMR). **LWT - Food Science and Technology**. 55, 90- 95, 2014
- RONG, T. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**. 2, 1231-1246, 2010.
- ROUTRAY, W.; ORSAT, V. Review: Microwave-assisted extraction of flavonoids. **Food and Bioprocess Technology**. 5, 409-424, 2012
- ROWLAND, C.Y.; BLACKMAN, A.J.; D'ARCY, B.R.; RINTOUL, G.B. Comparison of organic extractives found in leatherwood (*Eucryphia lucida*) honey and leatherwood flowers and leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 43, 753-763, 1995
- RADOVIC, B.S.; CARERI, M.; MANGIA, A.; MUSCI, M.; GERBOLES, M.; ANKLAM, E. Contribution of dynamic headspace GC-MS analysis of aroma compounds to authenticity testing of honey. **Food Chemistry**. 72, 511-520, 2001
- RACOWSKI, I.; SILVAS, F.P.C.; TAKUSHI, D.T.T.; SILVA, D.W.G.; MIRANDA, P.S. Ação antimicrobiana do mel em leite fermentado. **Revista Analytica**. 30, 115-117, 2007
- RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGENTTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**. 26, 1239-1251, 1999
- READICKER-HENDERSON, E.; MCCARTY, I. A Short History of the Honey Bee: Humans, Flowers, and Bees in the Eternal Chase for Honey. Timber Press: Portland, 2009.
- RIZELIO, V.M. *Dissertação de Mestrado*. Caracterização química do mel catarinense: composição, atividade antioxidante e o uso da eletroforese capilar como alternativa na avaliação da qualidade. PGCAL-UFSC. 2011
- ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 2866-2887, 2003
- RODRÍGUEZ, B. A.; MENDOZA, S.; ITURRIGA, M.H.; CASTAÑO-TOSTADO, E. Quality parameters and antioxidant and antibacterial properties of some Mexican honeys. **Journal of Food Science**. 71, 121-127, 2012
- ROGINSKY, V.; LISSI, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**. 92, 235-254, 2005

RONG, T.; YANG, R. Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: Towards a total phenolic index using high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. 1018, 29-40, 2003

ROSA A, TUBEROSO CIG, ATZERI A, MELIS MP, BIFULCO E, DESS'I MA. 2011. Antioxidant profile of strawberry tree honey and its marker homogentisic acid in several models of oxidative stress. **Food Chemistry**. 2011. 129:1045–53.2011

ROSHAN, A.A; GAD, H.A.; EL-AHMADY, S.H.; KHANBASH, M.S.; ABOU-SHOER, M.I.; AL-AZIZI, M.M. Authentication of monofloral Yemeni Sidr Honey using ultraviolet spectroscopy and chemometric analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 61, 7722-7729, 2013

RUFINO, M, S, M.; ALVES, R, E.; BRITO, E, S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS<sup>+</sup> *Comunicado técnico online* 128. ISSN 1679-6535, **2007**.

SALGUEIRO, B.F. *Dissertação de Mestrado*. Caracterização de méis brasileiros: físico-química, perfil de substâncias polares, atividade antioxidante e quimiometria. PPGQO-UFRRJ. **2012**.

SAMARGHANDIAN, S.; AFSHARI, J. T.; DAVOODI, S. Honey induces apoptosis in renal cell carcinoma. **Pharmacognosy Magazine**. 7, 46-52, 2011

SAMPATH KUMAR, K.P.; BHOWMIK, D.; CHANDIRA, M.R. Medicinal uses and health benefits of Honey: An overview. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. 2, 385-395, 2010

SANDUSKY, P.; RAFTERY, D. Use of selective TOCSY NMR experiments for quantifying minor components in complex mixtures: application to the metabonomics of amino acids in honey. **Analytical Chemistry**. 77, 2455-2463, 2005

SANT'ANA, L.D'O.; SOUSA, J.P.L.M.; SALGUEIRO, F.B.; LORENZON, M.C.A.; CASTRO, R.N. Characterization of monofloral honeys with multivariate analysis of their chemical profile and antioxidant activity. **Journal of Food Science**. 77, 135-40, 2012

SANT'ANA, L. D'O.; FERREIRA, A.B.B.; LORENZON, M.C.A.; BERBARA, R.L.B.; CASTRO, R.N. Correlation of total phenolic and flavonoid contents of Brazilian honeys with colour and antioxidant capacity. **International Journal of Food Properties**. 17, 65-76, 2014

SANTOS, D.C.; OLIVEIRA, E.N.A.; MARTINS, J.N. Caracterização físico-química de méis comercializados no município de Aracati-.CE. **Acta Veterinaria Brasilica**. 5, 158-162, 2011

SANZ, M.L.; GONZALEZ, M.; DE LORENZO, C.; SANZ, J.; MARTINEZ-CASTRO, I. A contribution to the differentiation between nectar honey and honeydew honey. **Food Chemistry**. 91, 313-317, 2005a.

SANZ, M.L.; POLEMIS, N.; MORALES, V.; CORZO, N.; DRAKOULARAKOU, A.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A. In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53, 2914-2921, 2005b.

SAWYER, R.W. Melissopalynology in the determination of the geographical and floral origin of honey. **Journal of the Association of Public Analysis**. 13, 64-71, 1975

SAXENA, S.; GAUTAM, S., SHARMA, A. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. **Food Chemistry**. 118, 391-397, 2010

SCHIEVANO, E.; PASINI, G.; COZZI, G.; MAMMI, S. Identification of the production chain of asiago d'alpevo cheese by nuclear magnetic resonance spectroscopy and principal component analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56, 7208-7214, 2008

SCHIEVANO, E.; PEGGION, E.; MAMMI, S.  $H^1$  nuclear magnetic resonance spectra of chloroform extracts of honey for chemometric determination of its botanical origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58, 57-65, 2010

SCHIEVANO, E.; MORELATO, E.; FACCHIN, C.; MAMMI, S. Characterization of markers of botanical origin and other compounds extracted from unifloral honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 61, 1747-1755, 2013

SCHRAMM, D.D.; KARIM, M.; SCHRADER, H.R.; HOLT, R.R.; CARDETTI, M.; KEEN, C.L. Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51, 1732-1735, 2003

SEEMANN, P.; NEIRA, M. **Tecnología de la producción apícola**. Valdivia: Universidad Austral de Chile / Facultad de Ciencias Agrarias Empaste, 1988

SEIJO, M.C.; ESCUREDO, O.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. Fungal diversity in honeys from northwest Spain and their relationship to the ecological origin of the product. **Grana**. 50, 55-62, 2011

SENYUVA, H.Z.; GILBERT, J.; SILICI, S.; CHARLTON, A.; DAL, C.; GUREL, N.; CIMEN, D. Profiling Turkish honeys to determine authenticity using physical and chemical characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 57, 3911-3919, 2009

SERGIEL, I.; POHL, P.; BIESAGA, M.; MIRONCZYK, A. Suitability of three-dimensional synchronous fluorescence spectroscopy for fingerprint analysis of honey samples with reference to their phenolic profiles. **Food Chemistry**. 145, 319-326, 2014a.



SERGIEL, I.; POHL, P.; BIESAGA, M. Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**. 145,404-408,2014b.

SERRANO, S., VILLAREJO, M., ESPEJO, R., JODRAL, M. Chemical and physical parameters of Andalusian honey: Classification of Citrus and Eucalyptus honeys by discriminant analysis. **Food Chemistry**. 87, 619-625, 2004

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 32, 67-103, 1992

SHEIKH, D.; ZAMAN, S. U.; NAQVI, S. B.; SHEIKH, M. R.; ALI, G. Studies on the antimicrobial activity of honey. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**. 8, 51-62, 1995

SHERLOCK, O.; DOLAN, A.; ATHMAN, R.; POWER, A.; GETHIN, G.; COWMAN, S.; HUMPHREYS, H. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 10, 47, 2010

SHIRLEY, B.W. Flavonoid biosynthesis: “New” functions for an “old” pathway. **Trends Plant Science**. 31, 377-382, 1996

SHIN, H.S.; USTUNOL, Z. Carbohydrate composition of honey from different floral sources and their influence on growth of selected intestinal bacteria: An in vitro comparison. **Food Research International**. 38, 721-728, 2005

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**. 215, 213-219, 1993

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**. 62, 1315-1321, 1995

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**. 82, 291-295, 1997

SILICI, S.; KARAMAN, K. Chemometric approaches for the characterization of Turkish *Rhododendron* and honeydew honeys depending on amino acid composition. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. 37, 864-867, 2014

SILVA, C.L.; QUEIROZ, A.J.M.; FIGUEIREDO, R.M.F. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. 8, 260-265, 2004

SILVA, R. A.; RODRIGUES, L.M.F.M.; LIMA, A.; CAMARGO, R.C.R. Avaliação da qualidade do mel de abelha *Apis mellifera* produzido no município de Picos, Estado do Piauí, Brasil. **Revista Higiene Alimentar**. 20, 90- 94, 2006

SILVA, I.A.A.; DA SILVA, T.M.S.; CAMARA, C.A.; QUEIROZ, N.; MAGNANI M.; DE NOVAIS, J.S.; SOLEDADE, L.E.B.; LIMA, E.O.; DE SOUZA, A.L.; DE SOUZA, A.G. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food Chemistry**. 141, 3552-3558, 2013a.

SILVA, T.M.S.; DOS SANTOS, F.P.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; DA SILVA, E.M.S.; DA SILVA, G.S.; DE NOVAIS, J.S.; DOS SANTOS.; F.D.A.R.; CAMARA, C.A. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**. 29, 10-18, 2013b.

SINGH, N.; BATH, P.K. Quality evaluation of different types of Indian honey. **Food Chemistry**. 58, 129-133, 1997

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A.Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. 16, 144-158, 1965

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Prediction of inverted cane sugar adulteration of honey by Fourier transform infrared spectroscopy. **Journal of Food Science**. 66, 972-978, 2001

SIVAKESAVA, S.; IRUDAYARAJ, J. Classification of simple and complex sugar adulterants in honey by mid-infrared spectroscopy. **International Journal of Food Science and Technology**. 37, 351-360, 2002

SMITH, F.G. Deterioration of the colour of honey. **Journal of Apicultural Research**. 6, 95-98, 1967

STALIKAS, C.D. Review: Extraction, Separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**. 30, 3268-3295, 2007

STAVRIC, B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. **Food Chemical Toxicology**. 32, 79-90, 1994

STEPHENS, J.M.; SCHLOTHAUER, R.C.; MORRIS, B.D.; YANG, D.; FEARNLEY, L.; GREENWOOD, D.R.; LOOMES, K.M. Phenolic compounds and methylglyoxal in some New Zealand manuka and kanuka honeys. **Food Chemistry**. 120, 78-86, 2010

SOCHA, R.; JUSZCZAK, L.; PIETRZYK, S.; FORTUNA, T. Antioxidant activity and phenolic composition of herb honeys. **Food Chemistry**. 113, 568-574, 2009

SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. Características físico-químicas de amostras de méis de abelha *Apis mellifera* da região litoral norte do estado da Bahia. **Revista Agrícola**. 77, 243-254, 2002

SORIA, A.C.; MARTÍNEZ-CASTRO, I.; SANZ, J. Analysis of volatile composition of honey by solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Separation Science**. 26, 793-801, 2003

SORIA, A.C.; GONZALEZ, M.; DE LORENZO, C.; MARTINEZ-CASTRO, I.; SANZ, J. Characterization of artisanal honeys from Madrid (Central Spain) on the basis of their melissopalynological, physicochemical and volatile composition data. **Food Chemistry**. 85, 121-130, 2004

SOTO-VACA, A.; LOSSO, J.N.; XU, Z.; FINLEY, J.W. Evolution of phenolic compounds from color and flavor problems to health benefits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 60, 6658-6677, 2012

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, M.V.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C. L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**. 30, 351-355, 2007

STANIMIROVA, I.; USTUN, B.; CAJKA, T.; RIDDELOVA, K.; HAJŠLOVA, J.; BUYDENS, L.M.C.; WALCZAK, B. Tracing the geographical origin of honeys based on volatile compounds profiles assessment using pattern recognition techniques. **Food Chemistry**. 118, 171-176, 2010

SUKUR, S.M.; HALIM, A.S.; SINGH, K.K. Evaluations of bacterial contaminated full thickness burn wound healing in Sprague Dawley rats Treated with Tualang honey. **Indian Journal of Plastic Surgery**.44, 112-117, 2011

SUN, A.Y.; SIMONYI, A.; SUN, G.Y. The “French paradox” and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. **Free Radical Biology and Medicine**. 32, 314-318, 2002

TAN, S. T., WILKINS, A. L., HOLLAND, P. T., & MCGHIE, T. K. Extractives from New Zealand unifloral honeys. 2. Degraded carotenoids and other substances from heather honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 1989, 37, 1217-1222

TERRAB, A.; CASTRILLON, B.V.; DAPENA, M.J.D. Pollen analysis of honeys from the Gharb region (NW Morocco). **Grana**. 40, 210-216, 2001

TERRAB, A.; DIEZ, M. J.; HEREDIA, F. J. Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. **Food Chemistry**. 79, 373-379, 2002.

TERRAB, A.; DÍEZ, M.J.; HEREDIA, F.J. Palynological, physico-chemical and colour characterization of Moroccan honeys: Other unifloral honey types. **International Journal of Food Science & Technology**. 38, 395-402, 2003

TERRAB, A., RECALAMES, A.F.; HERNANZ, D.; HEREDIA, F.J. Characterization of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents. **Food Chemistry**. 88, 537-542, 2004

TERRAB, A.; RECAMALES, A.F.; GONZALEZ-MIRET, M.L.; HEREDIA, F.J. Contribution to the study of avocado honeys by their mineral contents using inductively coupled plasma optical emission spectrometry. **Food Chemistry**. 92, 305-309, 2005

THRASYVOULOU, A. MANIKIS, J. Some physicochemical and microscopic characteristics of Greek unifloral honeys. **Apidologie**. 26, 441-452, 1995

TOMÁS-BARBERÁN, F.A., BLÁZQUEZ, M.A., GARCÍA-VIGUERA, C., FERRERES, F., TOMÁS-LORENTE, F.A. Comparative study of different Amberlite XAD resins in flavonoids analysis. **Phytochemical Analysis**. 3, 178-181, 1992

TOMAS-BARBERAN, F.A., MARTOS, I., FERRERER, F., RADOVIC, B. S., & ANKLAM, E. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 81, 485-496, 2001

TOMASIN, R.; GOMES-MARCONDES CINTRA, C.M. Oral administration of Aloe vera and honey reduces walker tumour growth by decreasing cell proliferation and increasing apoptosis in tumour tissue. **Phytotherapy Research**. 25, 619-623, 2011

TOVEY, F. I. Honey and healing. **Journal of the Royal Society of Medicine**. 84, 447, 1991

TRUZZI, C.; ANNIBALDI, A.; ILLUMINATI, S.; FINALE, C., SCARPONI, G. Determination of proline in honey: Comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. **Food Chemistry**. 150, 477-481, 2014

TSIAPARA, A.V.; JAAKKOLA, M.; CHINO, I.; GRAIKOUC, K.; TOLONENB, T.; VIRTANENB, V.; MOUTSATSO, P. Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: profile analysis of extracts. **Food Chemistry**. 116, 702-708, 2009

TUBEROSO, C.I.G.; BIFULCO, E.; CABONI, P.; COTTIGLIA, F.; CABRAS, P.; FLORIS, I. Floral markers of strawberry-tree (*Arbutus unedo*L.) honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58, 384-389, 2010

TUBEROSO, C. I. G.; BIFULCO, E.; CABONI, P.; SARAIS, G.; COTTIGLIA, F.; FLORIS, I. Lumichrome and phenyllactic acid as chemical markers of thistle (*Galactites tomentosa* Moench) honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, 364-369, 2011a

TUBEROSO, C. I. G.; JERKOVIC , I.; BIFULCO, E.; MARIJANOVIC, Z. Biodiversity of *Salix* spp. Honeydew and nectar honeys determined by RP-HPLC and evaluation of their antioxidant capacity. **Chemistry & Biodiversity**, 8, 872–879, 2011b

TURKMEN, N.; SARI, F.; POYRAZOGLU, E.S.; VELIOGLU, Y.S. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. **Food Chemistry**. 95, 653-657, 2005

VANHOLME, R.; DEMEDTS, B.; MORREEL, K.; RALPH, J.; BOERJARR, W. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**. 153, 895-905, 2010

VELA, L.; LORENZO, C.; PÉREZ, R.A. Antioxidant capacity of Spanish honeys and its correlation with polyphenol content and other physicochemical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 87, 1069-1075, 2007

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

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

VIANNA, C.A.F.J. *Dissertação de Mestrado*. Substâncias fenólicas e avaliação da atividade antioxidante em méis de *Apis mellifera*. PPGQO-UFRRJ. **2010**

VINSON, J. A.; HAO, Y.; SU, X.; ZUBIK, L. Phenol antioxidant in foods: Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46, 3630-3634, 1998

VON DER OHE, W.; PERSANO ODDO, L.; PIANA, L.; MORLOT, M.; MARTIN, P. Harmonized methods of melissopalynology. **Apidologie**. 35, 518–525, 2004

WANG, X.H.; ANDRAE, L.; ENGESETH, N.J. Antimutagenic effect of various honeys and sugars against Trp-p-1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50, 6923-6928, 2002

WANG, H.; LIU, Y.Q.; YANG, H.M.; GUO, Q.L.; SHI, H.L.; YAN, L.B. Determination of glucose, fructose, sucrose, maltose and lactose in sugar-free products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**. 38, 873-876, 2010

WELKE, J.E.; REGINATTO, S.; FERREIRA, D.; VICENZI, R.; SOARES, J.M. Caracterização físico-química de méis de *Apis mellifera* L. da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**. 38, 1737-1741, 2008

WHITE, J.W. Physical characteristics of honey. In: CRANE, E. Honey a comprehensive survey. London: Heinemann, **1975**. Cap.6, p.207-239.

WHITE, J.W. Composition of honey. In: CRANE, E. Honey. A comprehensive survey. London: Heinemann, **1979**. p. 157-207

WHITE JÚNIOR, J.W. Quality evaluation of honey: role of HMF and diastase assays. **American Bee Journal**.132, 792-794, 1992

WHITE JÚNIOR, J.W. The role of HMF and diastase assays in honey quality evaluation. **American Bee Journal**. 75, 104-107, 1994

WHITE, J.W.; BRYANT, V.M.JR. Assessing citrus honey quality: pollen and methyl anthranilate content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 44, 3423-3425, 1996

WRIGHT, J.S.; JOHNSON, E.R.; DiLABIO, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**. 123, 1173-1183, 2001

WOOD, B.; RADEMAKER, M.; MOLAN, P. C. Manuka honey, a low cost leg ulcer dressing. **New Zealand Medical Journal**, 110, 107, 1997.

WOODCOCK, T.; DOWNEY, G.; KELLY, J.D.; O'DONNELL, C. Geographical classification of honey samples by near-infrared spectroscopy: a feasibility study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55, 9128-9134, 2007

YAO, L. H., DATTA, N., TOMAS-BARBERAN, F. A., FERRERES, F., MARTOS, I., SINGANUSONG, R. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in australian and new Zealand leptospermum honeys. **Food Chemistry**. 81, 159-168, 2003

YAO, L.; JIANG, Y.; SINGANUSONG, R.; D'ARCY, B.; DATTA, N.; CAFFIN, N.; RAYMONT, K. Flavonoid in Australian Malaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksiaand Helianthus honeys and their potential for floral authentication. **Food Research International**. 37, 166-174, 2004a.

YAO, L.; JIANG, Y.; SINGANUSONG, R.; DATTA, N., RAYMONT, K. Phenolic acids and abscisic acid in Australian eucalyptus honeys and their potential for floral authentication. **Food Chemistry**. 86, 169-177, 2004

YATSUNAMI, K.; ECHIGO, T. Antibacterial action of honey and royal jelly (japanisch). **Honeybee Science**. 5, 125-130, 1984.

ZEINA, B.; OTHMAN, O.; AL-ASSAD, S. Effect of honey versus thyme on Rubella virus survival in vitro. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**. 2, 345-348, 1996

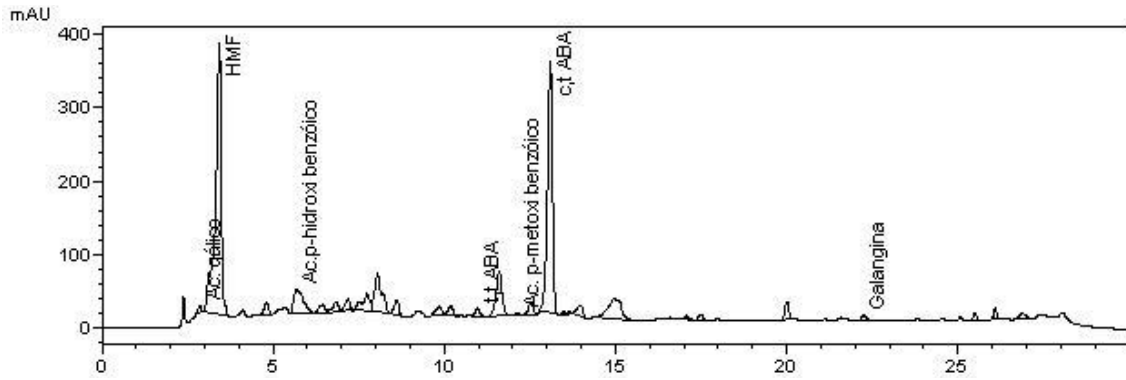
ZHOU, J.; QI, Y.; RITHO, J.; DUAN, L.; WU, L.; DIAO, Q. ; LI, Y.; ZHAO. J. Analysis of maltooligosaccharides in honey samples by ultra-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection **Food Research International** .. 56, 260-265, 2014a

ZHOU, J.; YAO, L.; LI, Y.; CHEN, L.; WUA, L.; ZHAO, J. Floral classification of honey using liquid chromatography-diode array detection-tandem mass spectrometry and chemometric analysis. **Food Chemistry**. 145, 941-949, 2014b.

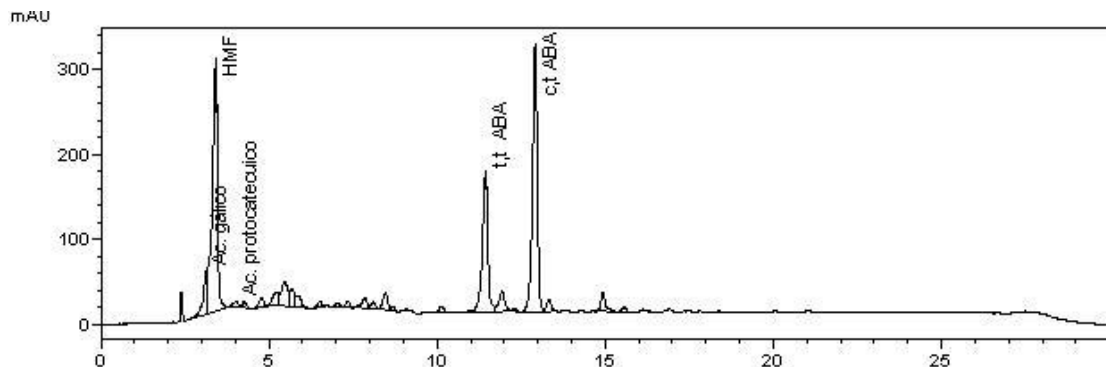
ZULAK, K.; LISCOMBE, D.; ASHIHARA, H.; FACCHINI, P. ALKALOIDS. Plant Secondary Metabolism in Diet and Human Health. Blackwell Publishing: Oxford, **2006**.

ZULUETA, A.; FRÍGOLA, A.; ESTEVE, M. J. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**. 114, 310-316, 2009

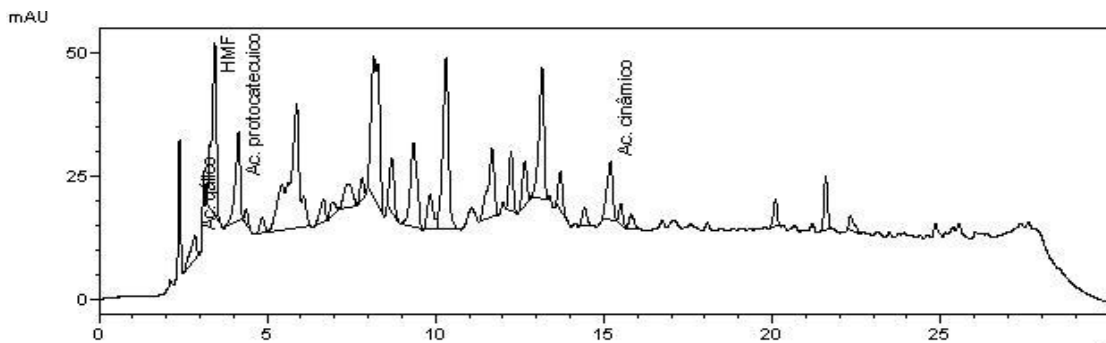
ZUO, Y.; WANG, C.; ZHAN, J. Separation, characterization and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50, 3789-3794, 2002



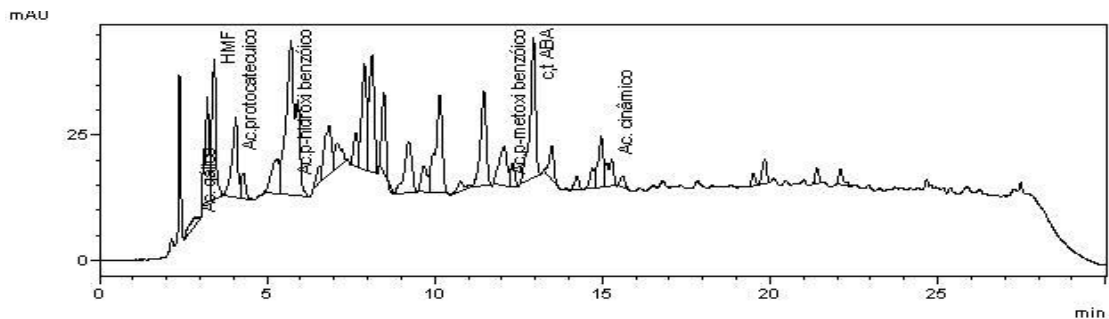
**Figura 42** - Extrato **EE01** de mel de eucalipto analizado por CLAE-DAD.



**Figura 43** - Extrato **EE02** de mel de eucalipto analizado por CLAE-DAD

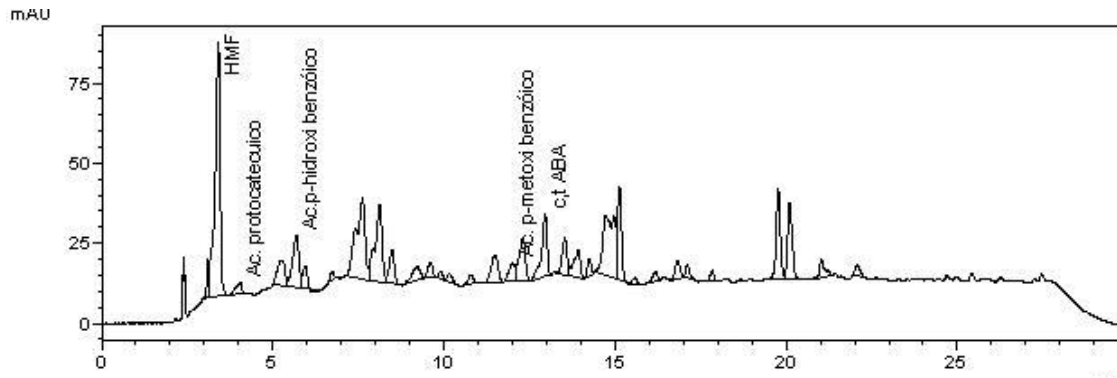


**Figura 44** - Extrato **EE03** de mel de eucalipto analizado por CLAE-DAD

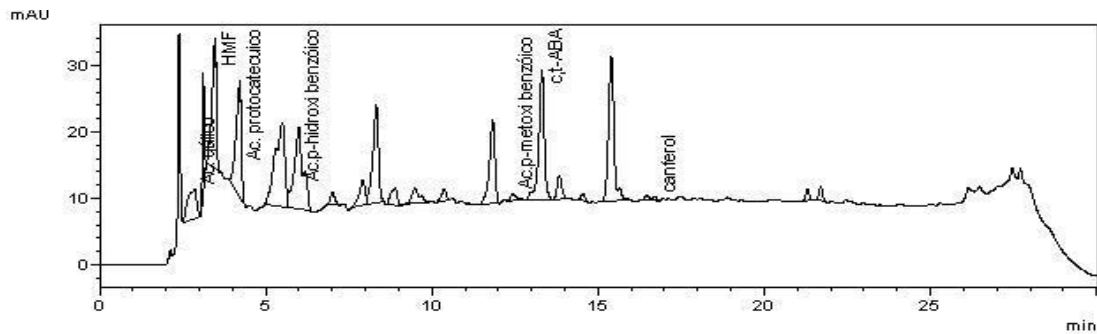


**Figura 45** - Extrato **EE04** de mel de eucalipto analizado por CLAE-DAD

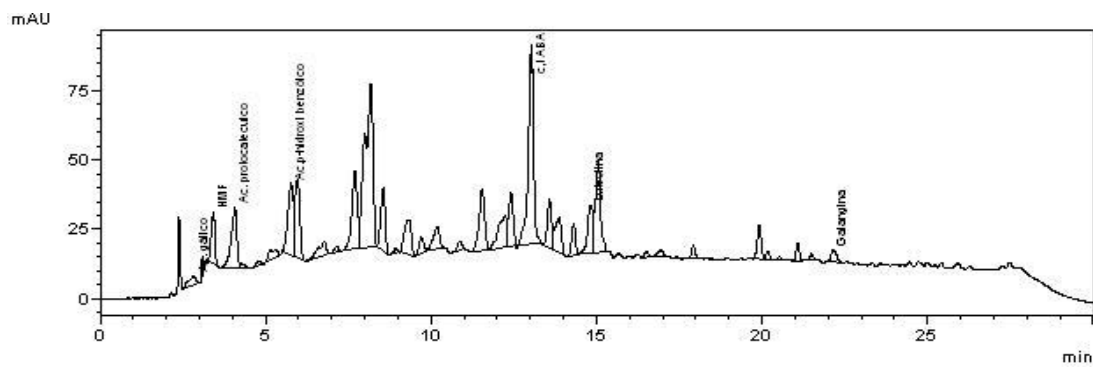




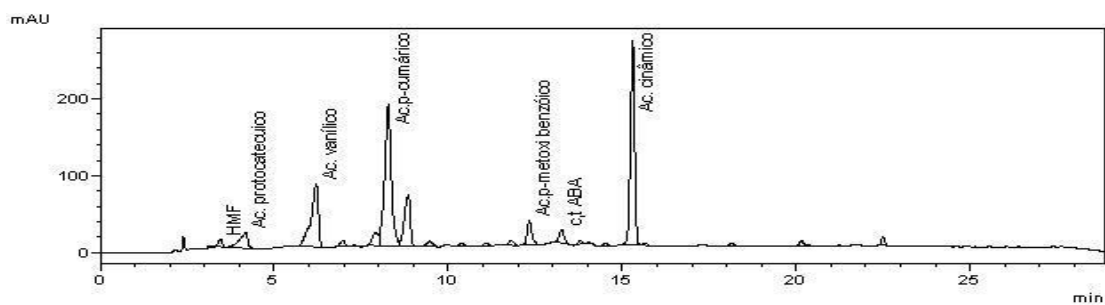
**Figura 46 - Extrato EE05** de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD



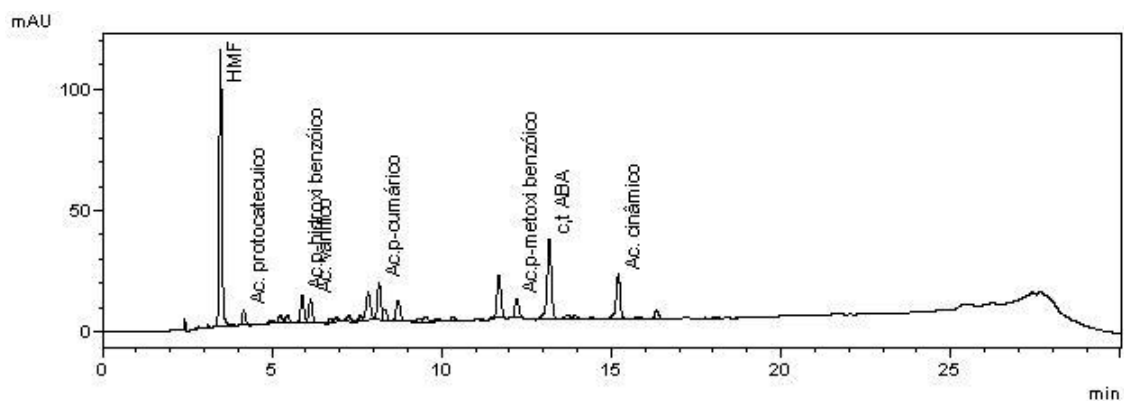
**Figura 46 - Extrato EE06** de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD



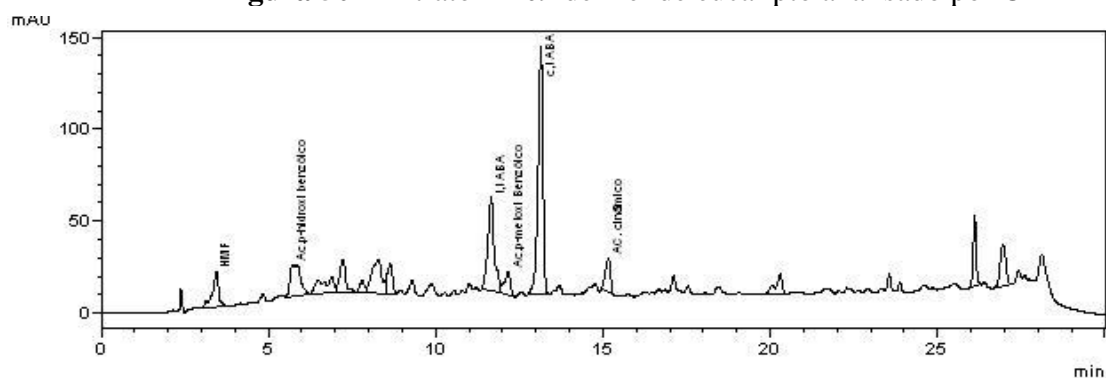
**Figura 48 - Extrato EE07** de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD



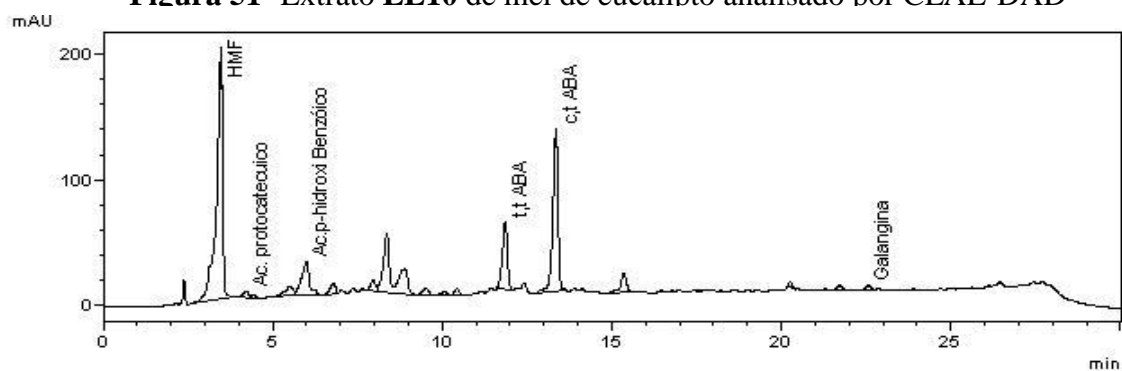
**Figura 49 - Extrato EE08** de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD



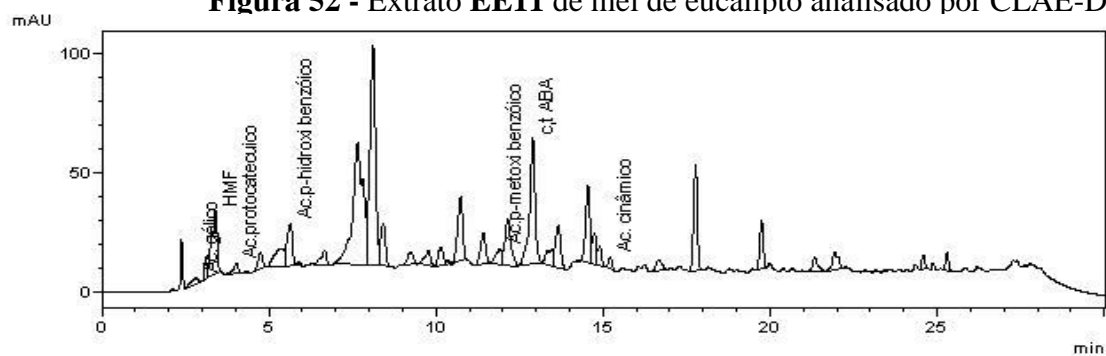
**Figura 50** - Extrato EE09 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD



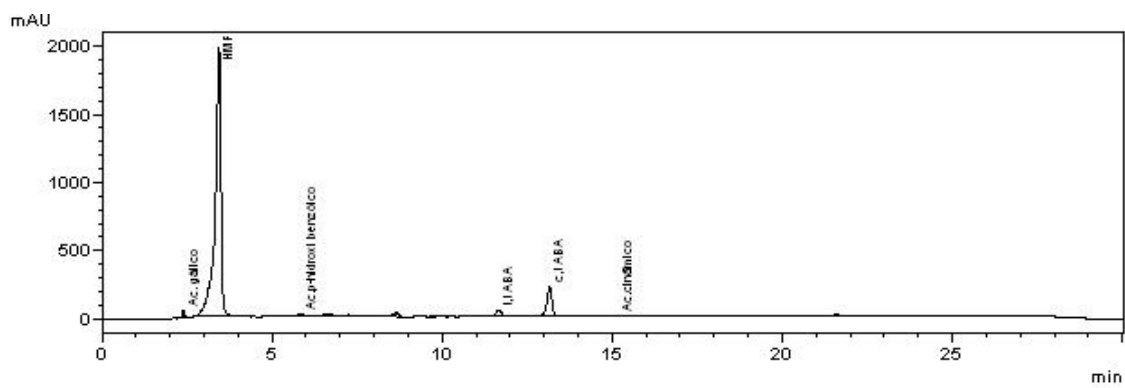
**Figura 51**- Extrato EE10 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD



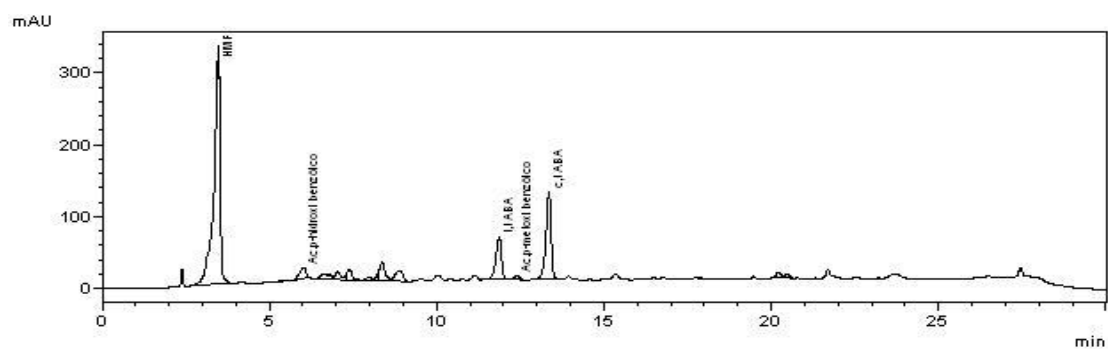
**Figura 52** - Extrato EE11 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD



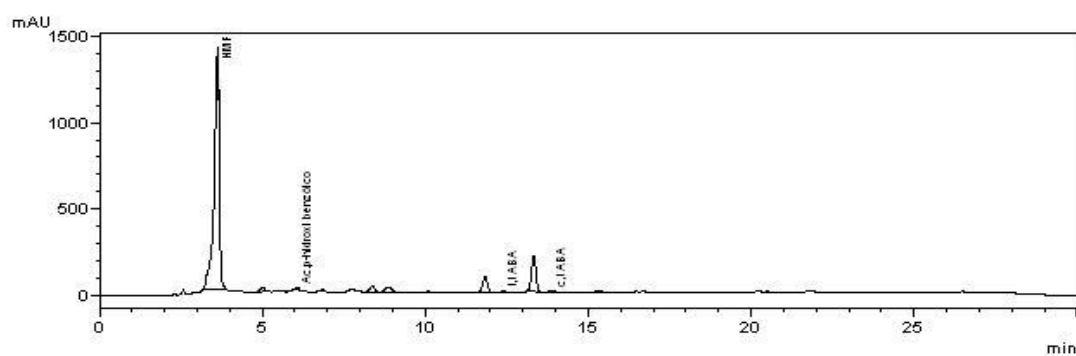
**Figura 53** - Extrato EE12 de mel de eucalipto analisado por CLAE-DAD



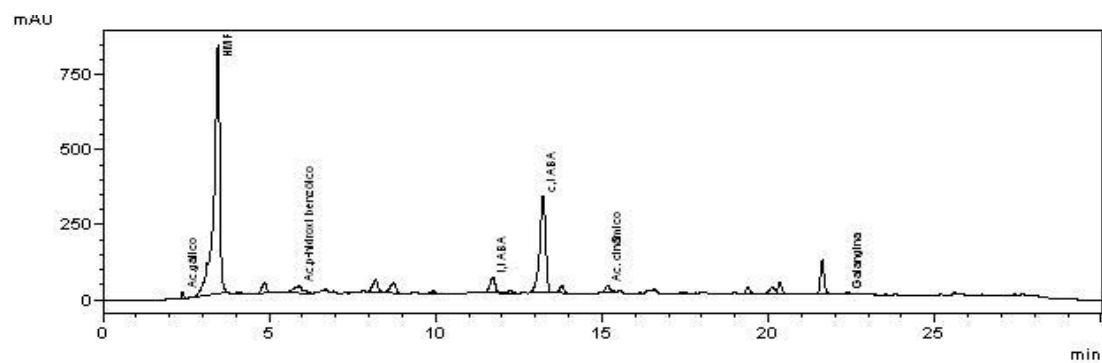
**Figura 54** - Extrato EM01 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD



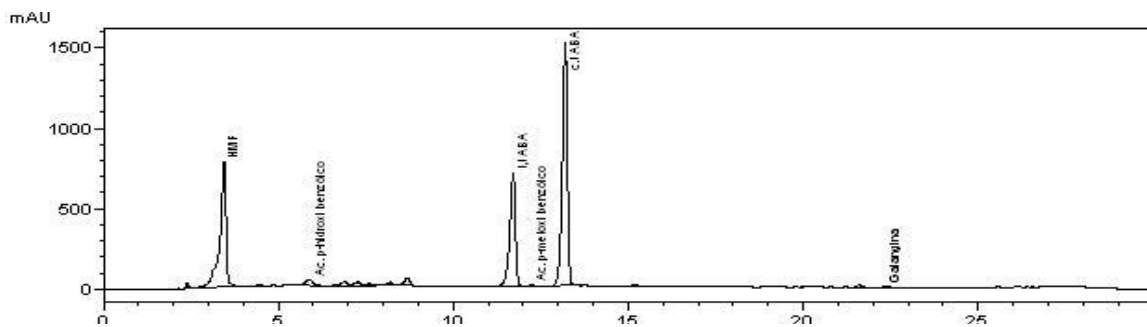
**Figura 55** - Extrato EM02 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD



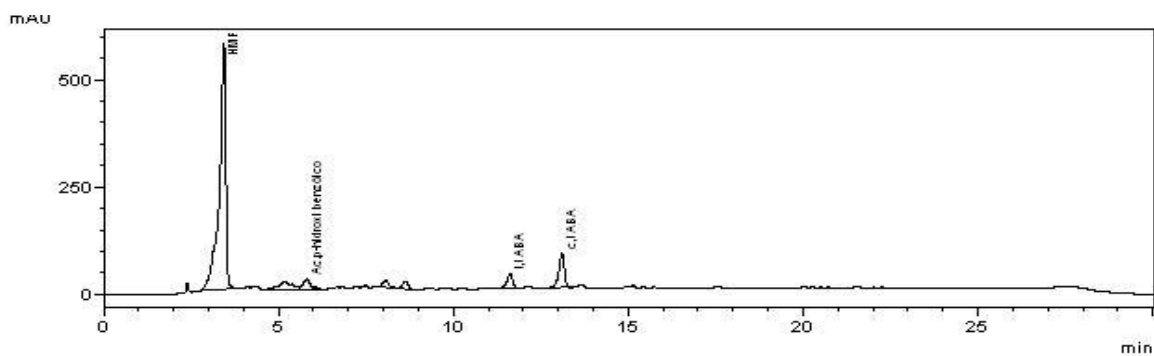
**Figura 56** - Extrato EM03 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD



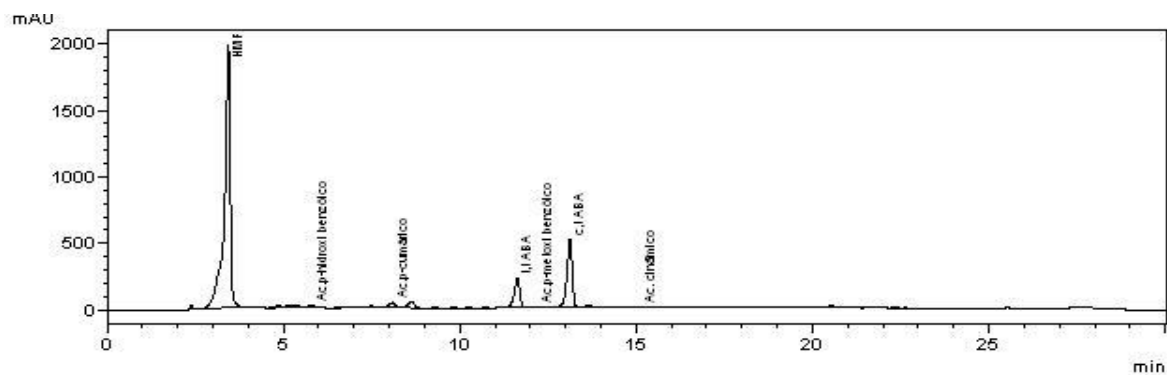
**Figura 57** - Extrato EM04 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD



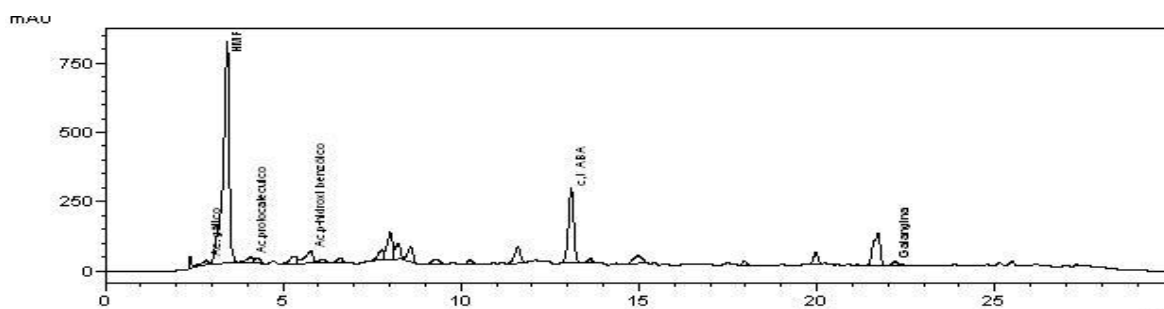
**Figura 58** - Extrato EM05 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD



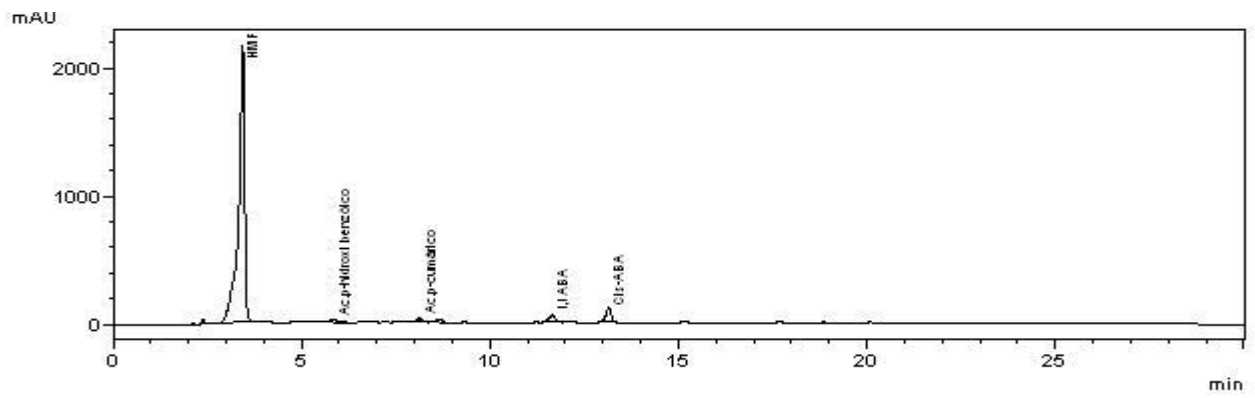
**Figura 59** - Extrato EM06 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD



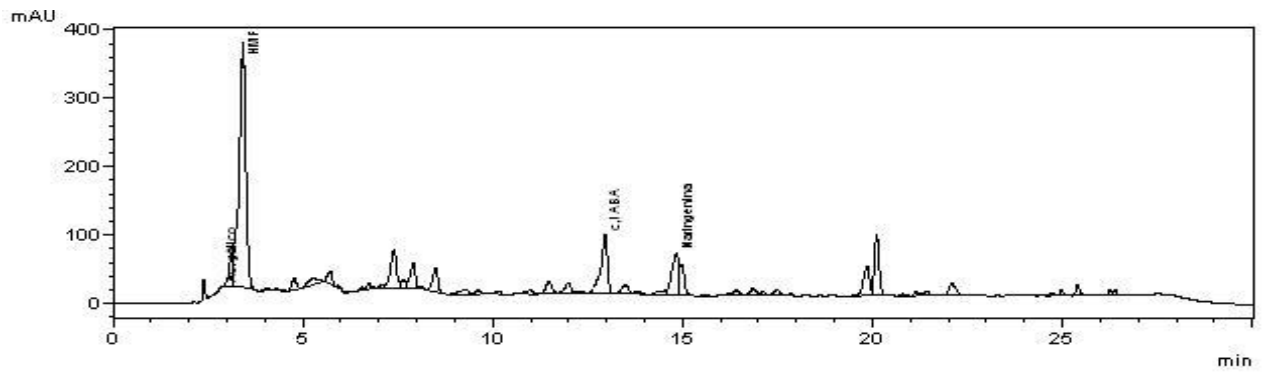
**Figura 60** - Extrato EM07 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD



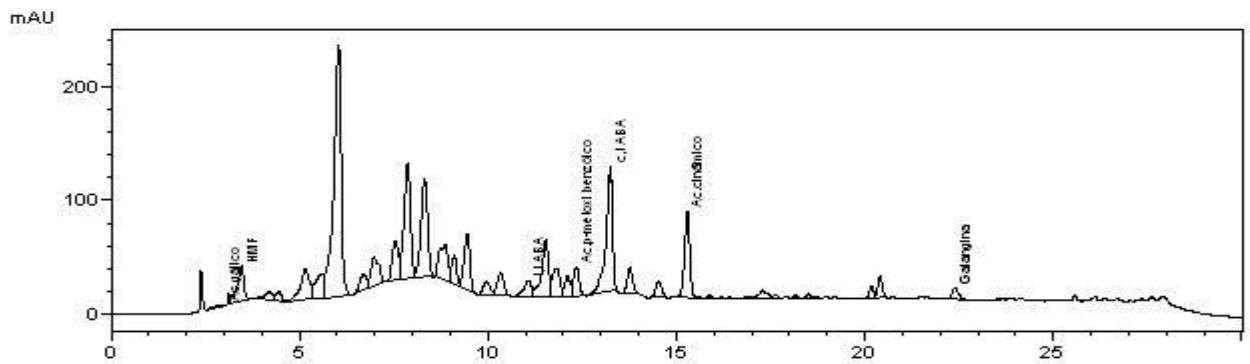
**Figura 61** - Extrato EM08 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD



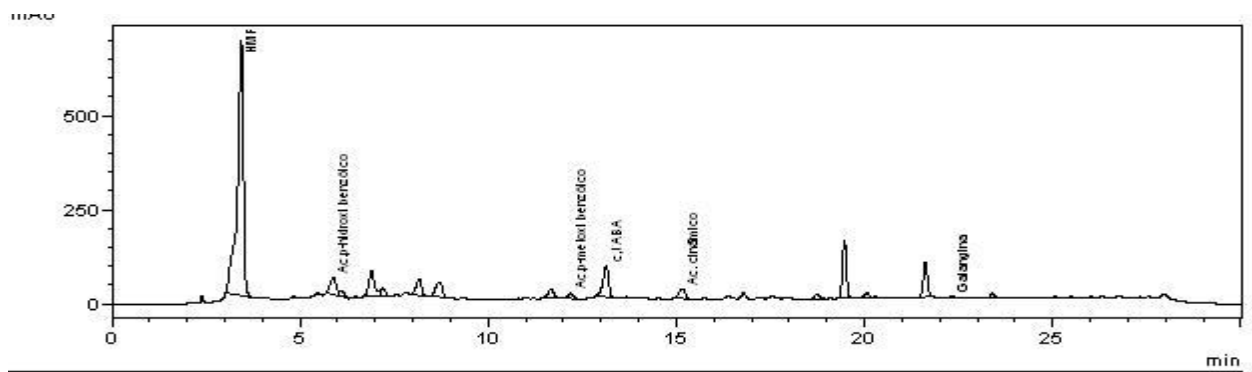
**Figura 62** - Extrato EM09 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD



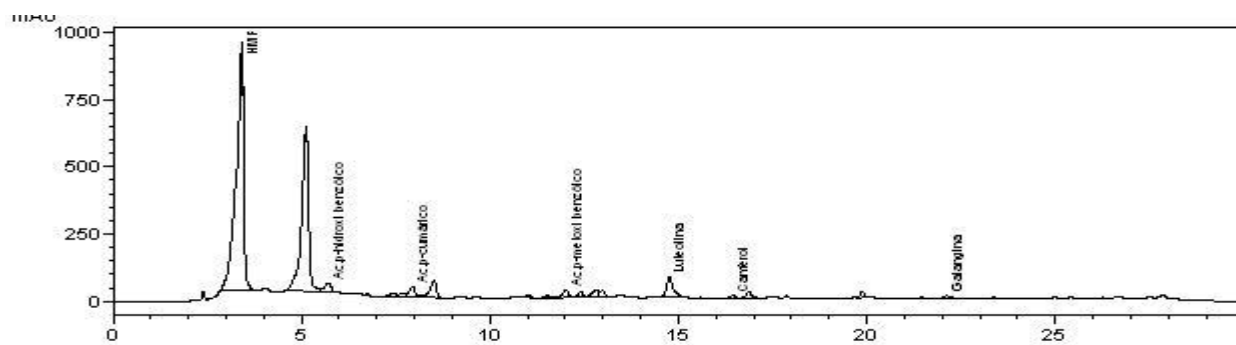
**Figura 63** - Extrato EAS01 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD



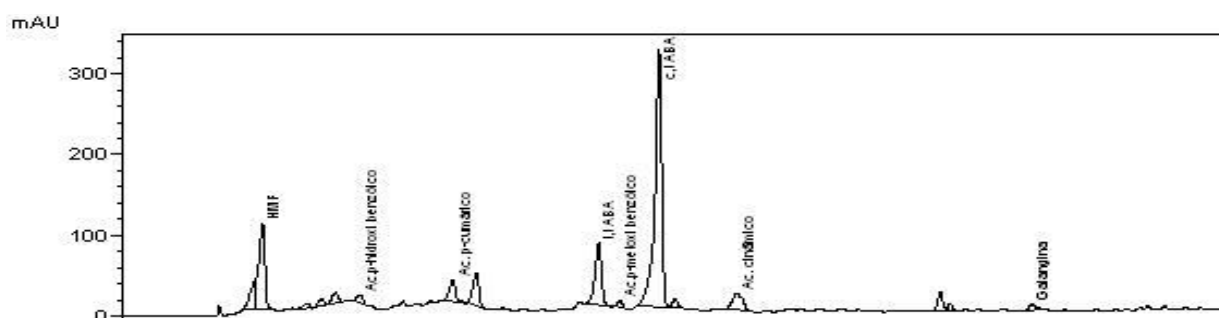
**Figura 64** - Extrato EA02 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD



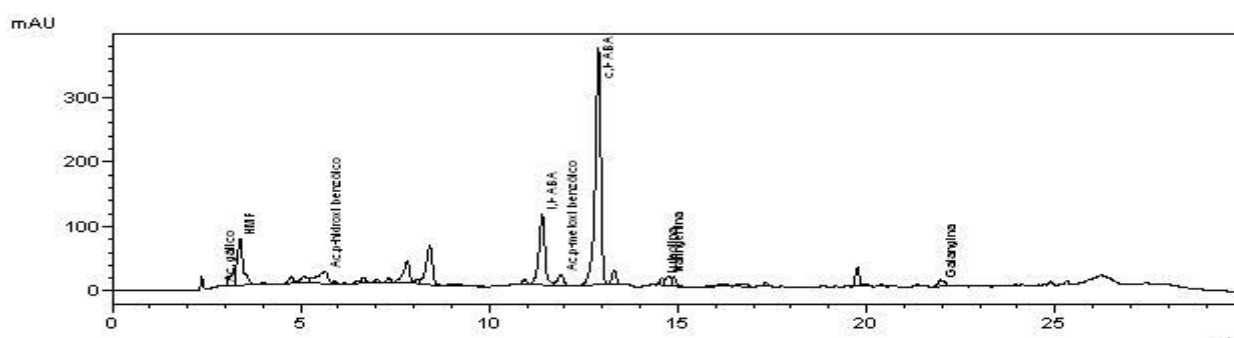
**Figura 65**- Extrato EAS03 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD



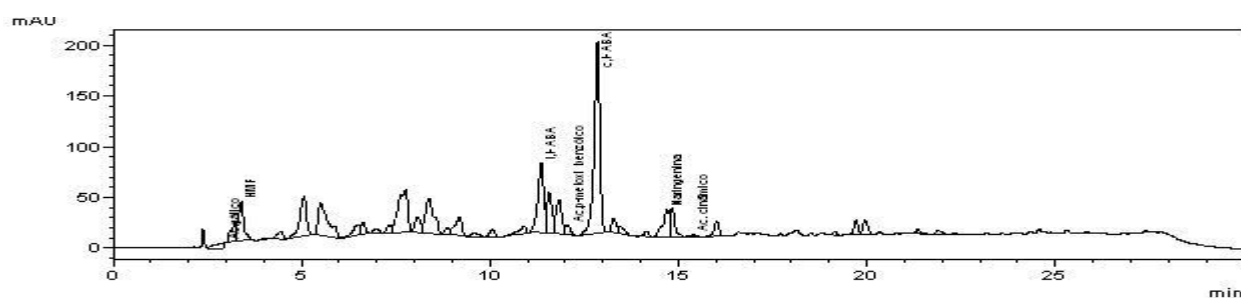
**Figura 66** - Extrato EAS04 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD



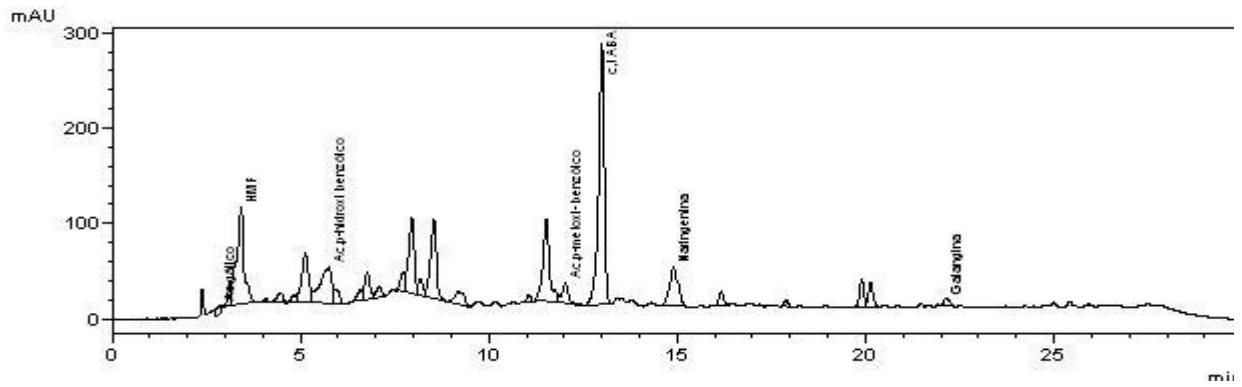
**Figura 67** - Extrato EAS05 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD



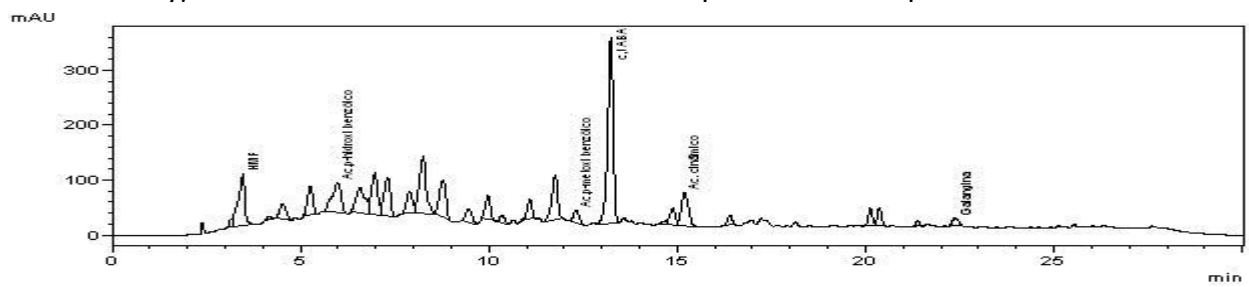
**Figura 68** - Extrato EAS06 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD



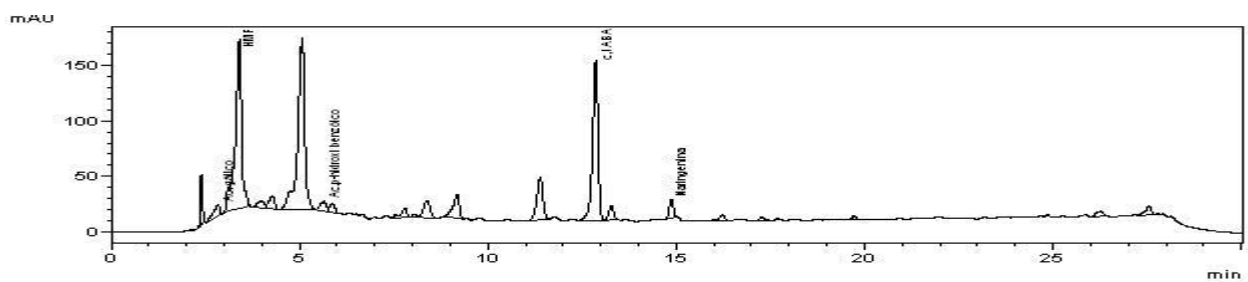
**Figura 69** - Extrato EAS07 de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD



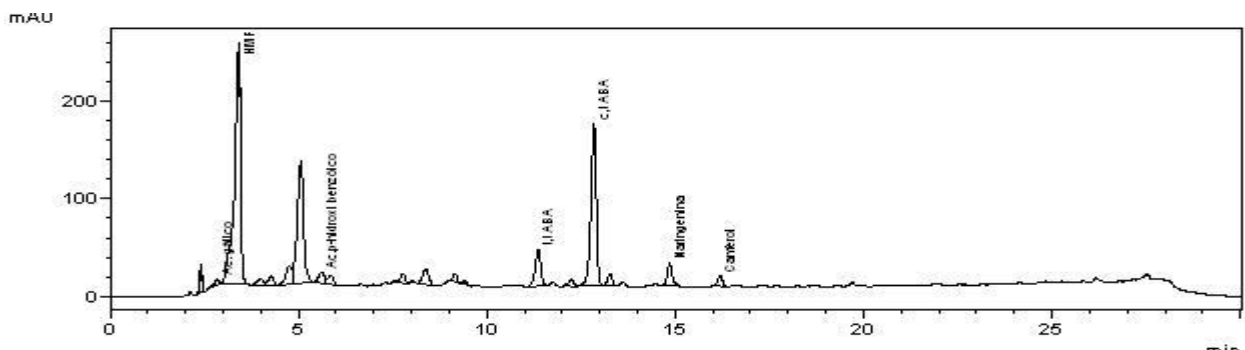
**Figura 70** - Extrato **EAS08** de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD



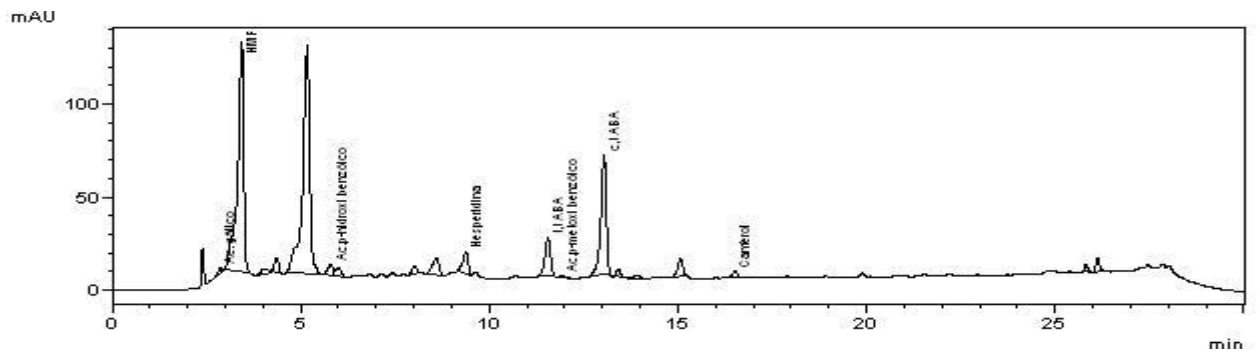
**Figura 71** - Extrato **EAS09** de mel de assa-peixe analisado por CLAE-DAD



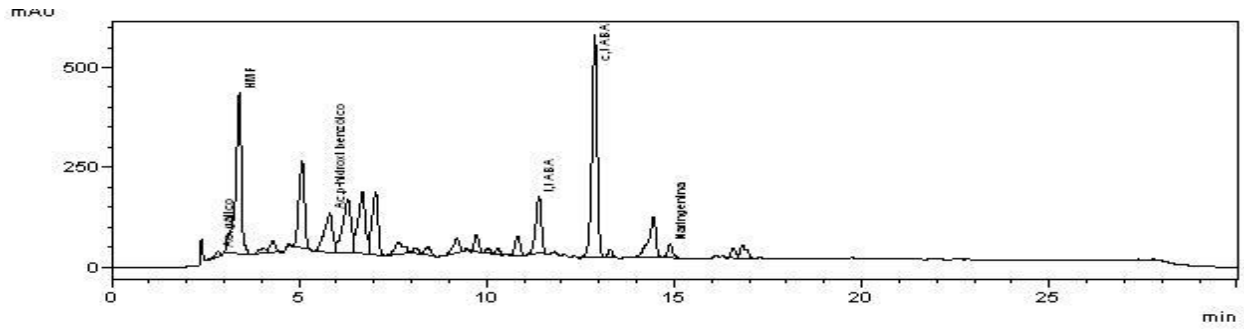
**Figura 72** - Extrato **EL01** de mel de laranja analisado por CLAE-DAD



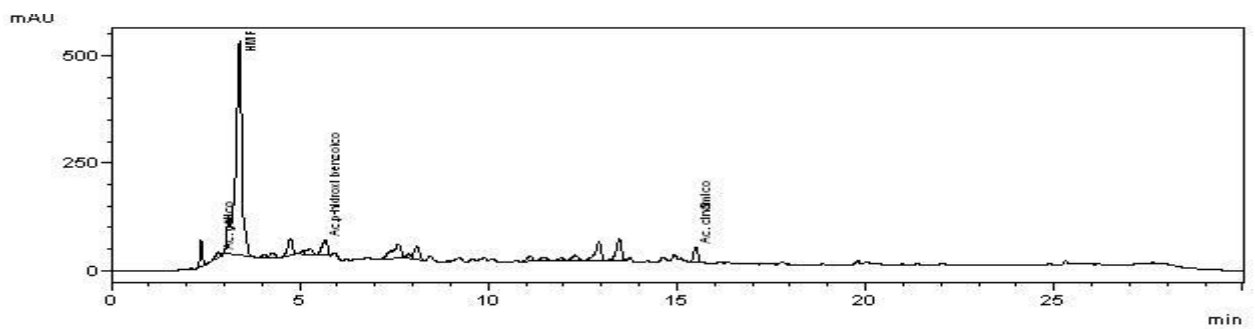
**Figura 73** - Extrato **EL02** de mel de laranja analisado por CLAE-DAD



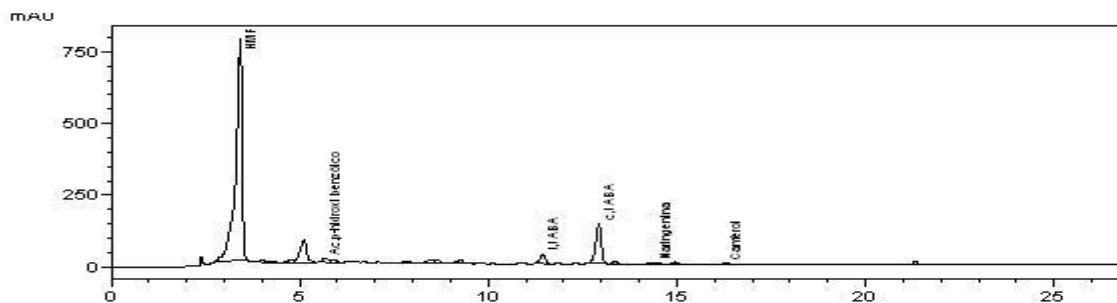
**Figura 74** - Extrato **EL03** de mel de laranja analisado por CLAE-DAD



**Figura 75** - Extrato **EL04** de mel de laranja analisado por CLAE-DAD

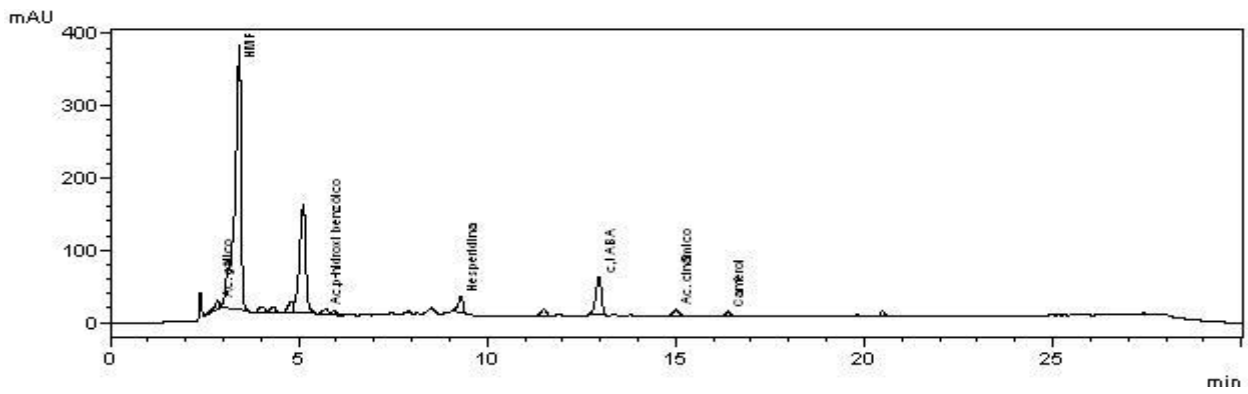


**Figura 76** - Extrato **EL05** de mel de laranja analisado por CLAE-DAD

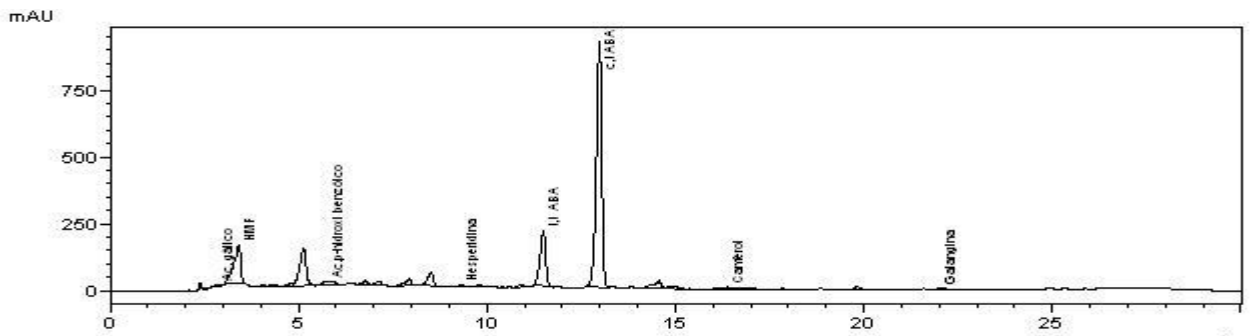


**Figura 77** - Extrato **EL06** de mel de laranja analisado por CLAE-DAD

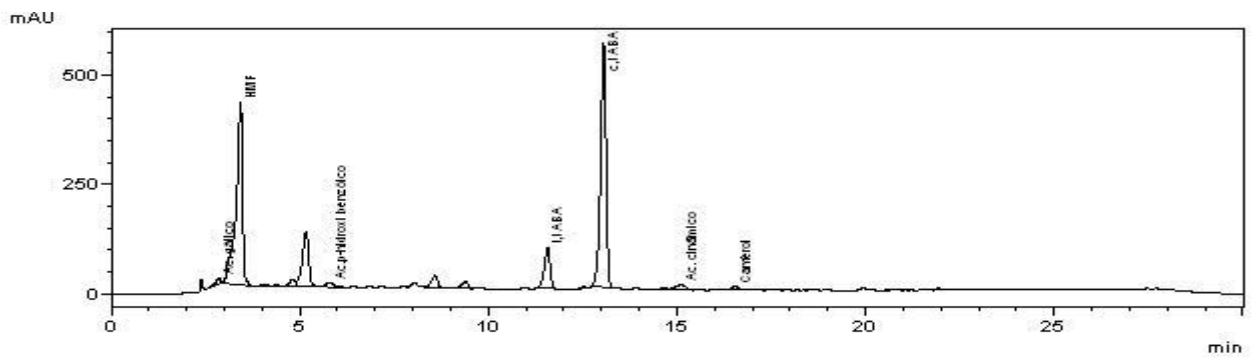




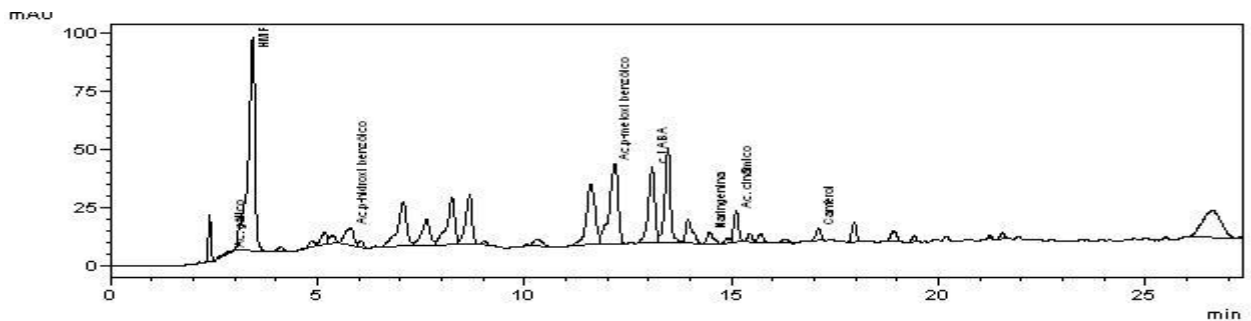
**Figura 78 - Extrato EL07** de mel de laranja analisado por CLAE-DAD



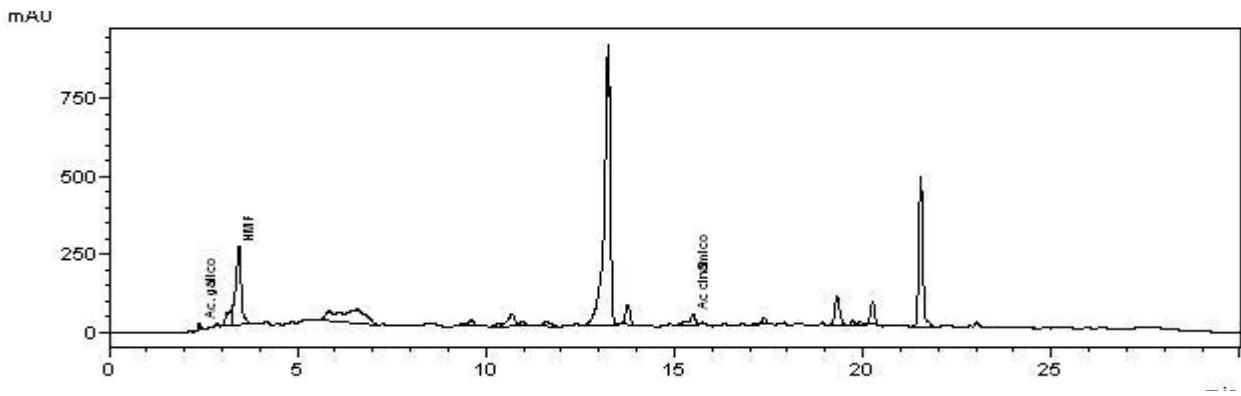
**Figura 79- Extrato EL08** de mel de laranja analisado por CLAE-DAD



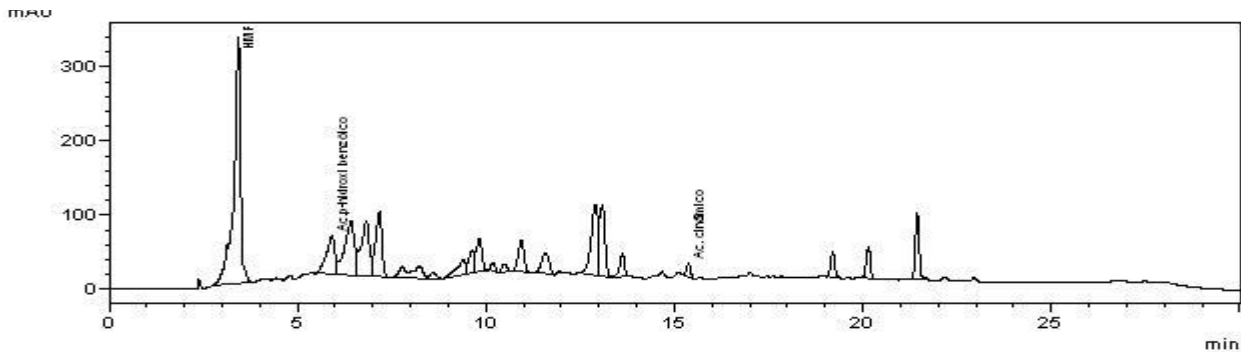
**Figura 80 - Extrato EL09** de mel de laranja analisado por CLAE-DAD



**Figura 81 - Extrato ES01** de mel silvestre analisado por CLAE-DAD



**Figura 82** - Extrato **ES02** de mel silvestre analisado por CLAE-DAD



**Figura 83** - Extrato **ES03** de mel silvestre analisado por CLAE-DAD

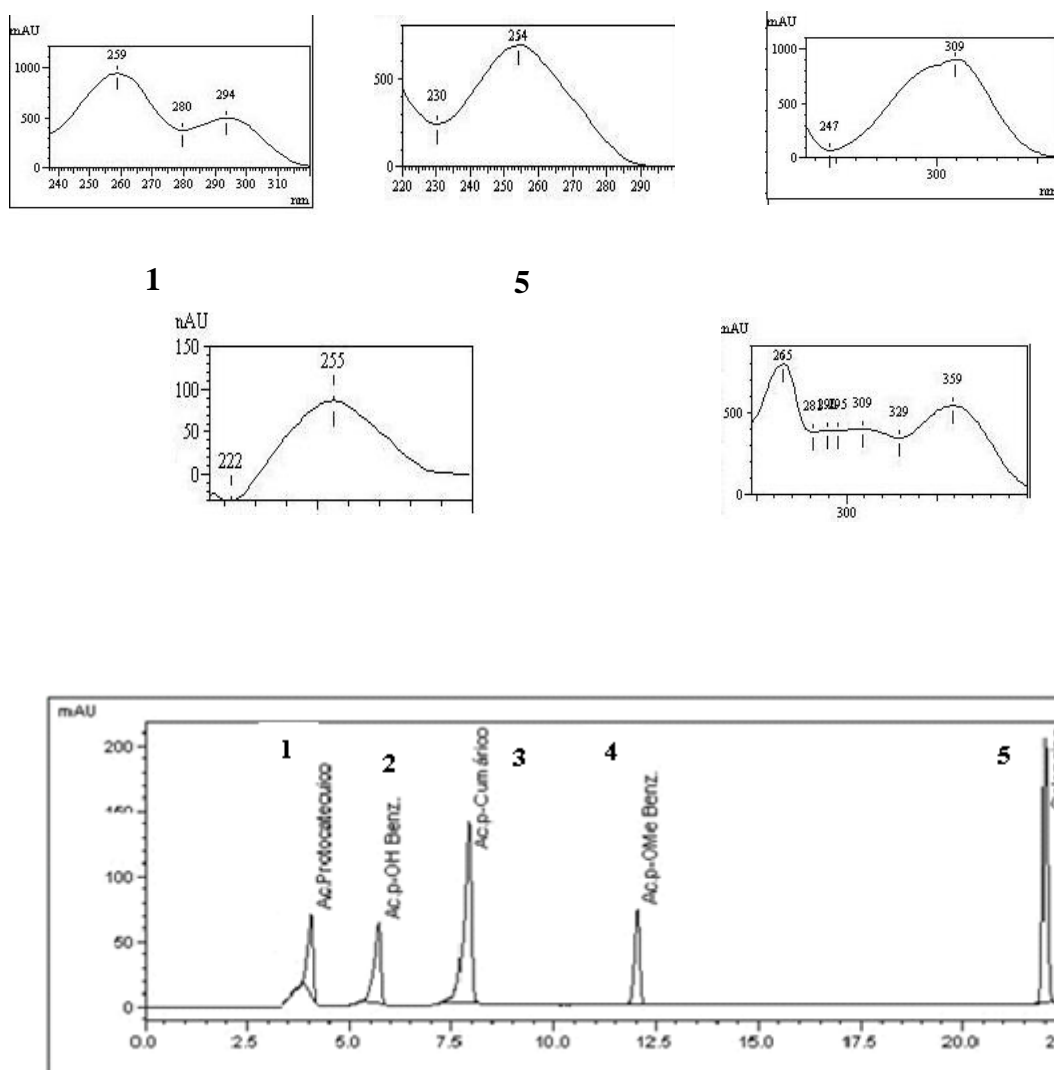
4

**Figura 84**- Extrato **ES04**de mel silvestre analisado por CLAE-DAD

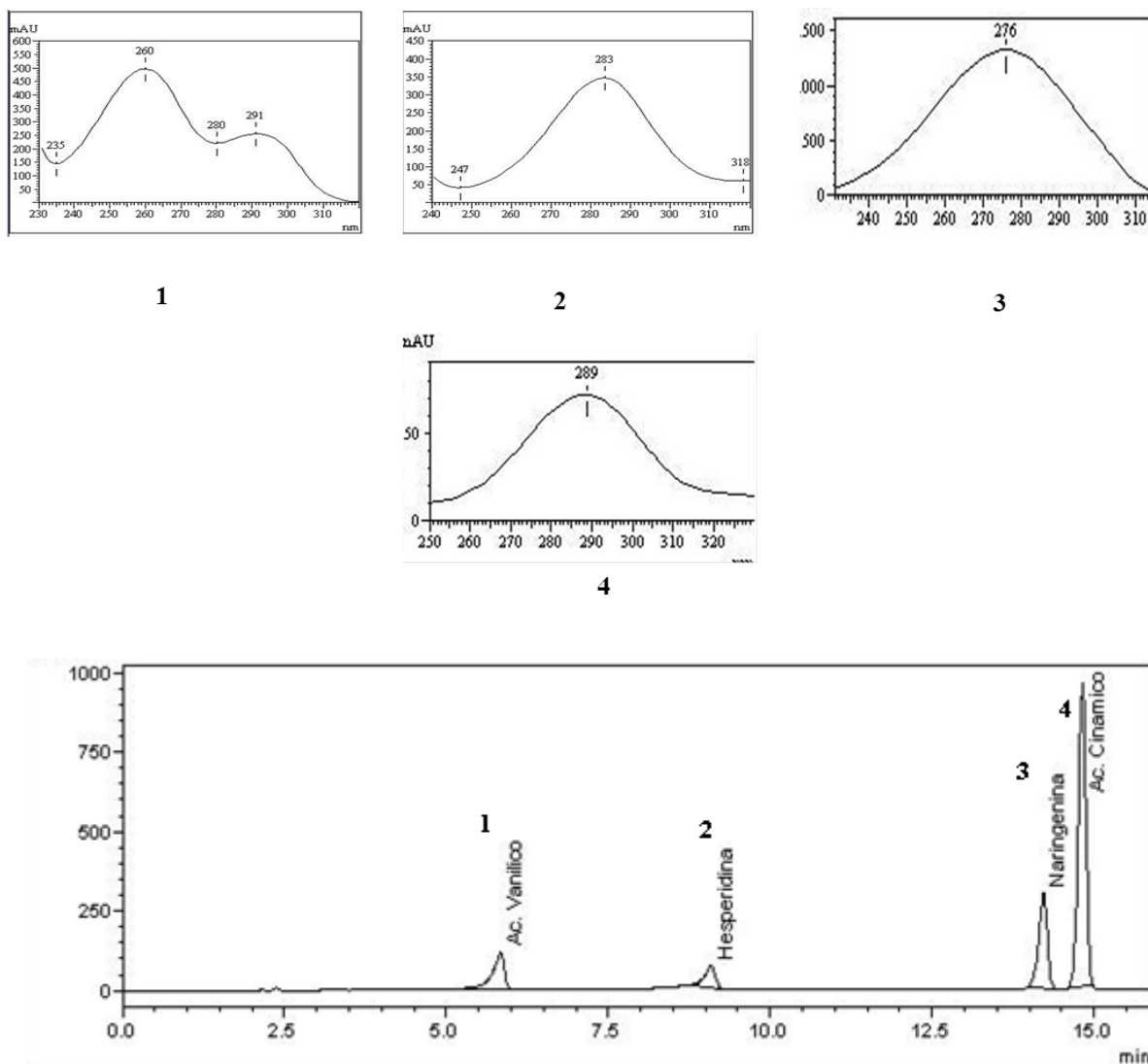
**Figura 85** - Extrato **ES05**de mel silvestre analisado por CLAE-DAD

5

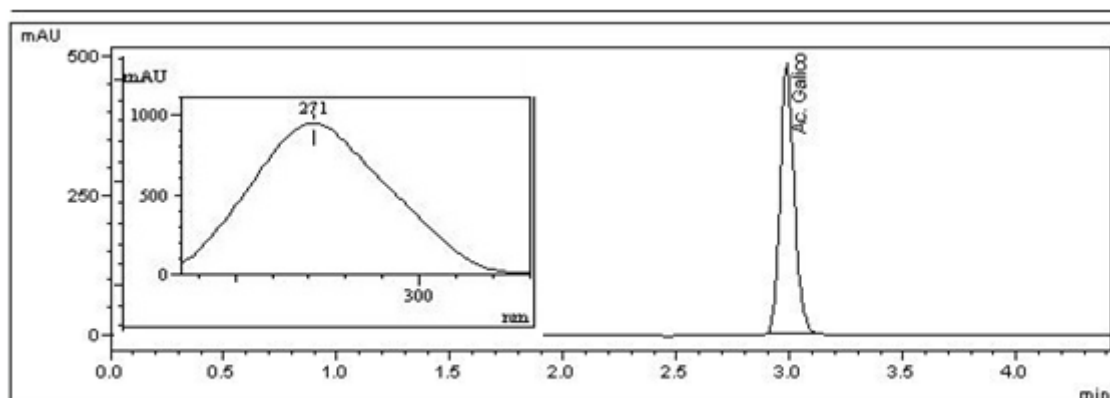
**Figura 86** - Extrato **ES06** de mel silvestre analisado por CLAE-DAD



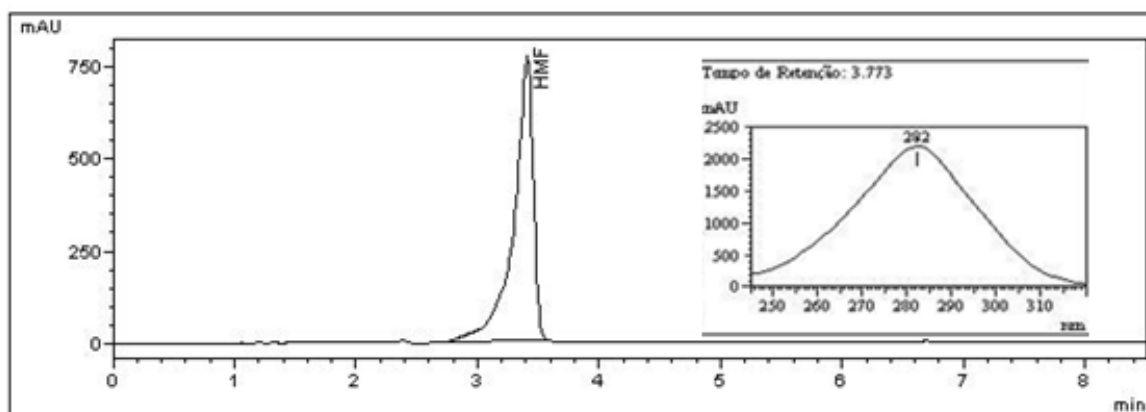
**Figura 87** – Mistura1: Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD e seus espectros de UV: ácido p-cumárico, galangina, ácido protocatecuico, ácido p-hidroxi-benzóico, ácido p-Metoxi Benzóico.



**Figura 88-** Mistura 2: cromatogramas dos padrões por CLAE-DAD e seus espectros de UV: ácido vanílico, hesperidina, naringenina e ácido cinâmico.

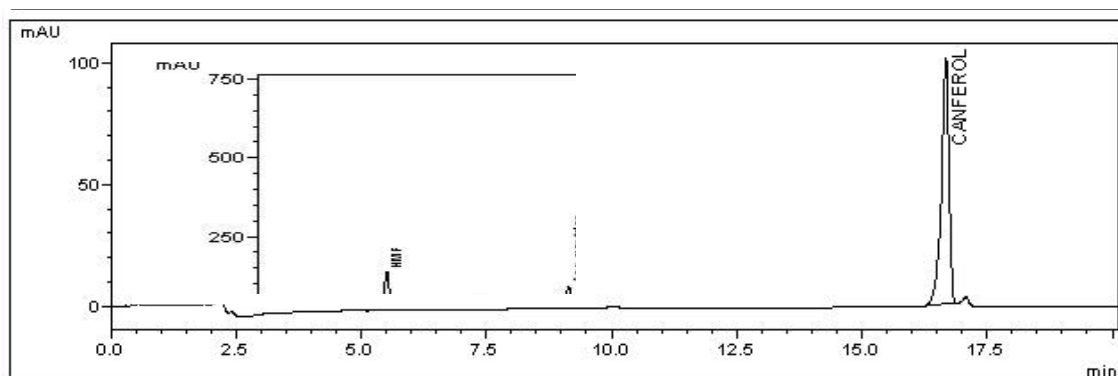
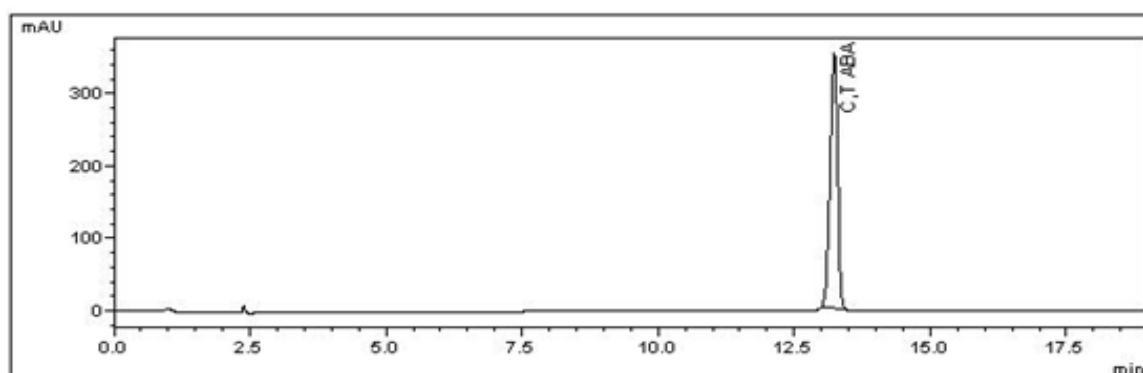


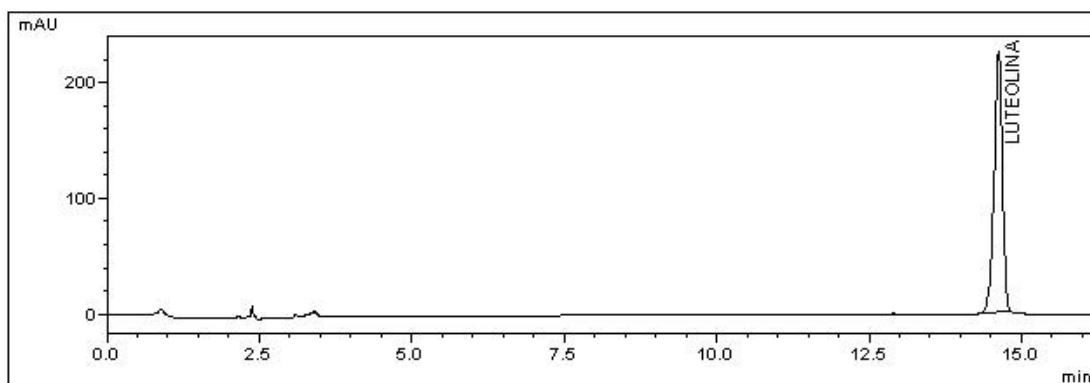
4



**Figura 89** – Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD e seus espectros de UV: 1- ácido gálico e 2 –HMF

m/





**Figura 90-** Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD e seus espectros de UV: 3-c,t ABA, 4 – Canferol e 5- Luteolina