

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

DISSERTAÇÃO

**DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE MÉIS DE *APIS
MELLIFERA* COMERCIALIZADOS NO ESTADO DO RIO DE
JANEIRO**

LUIZA D'OLIVEIRA SANT'ANA

**Seropédica, Rio de Janeiro
2010**



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

LUIZA D'OLIVEIRA SANT'ANA

Sob a Orientação da Professora

Dra. Rosane Nora Castro

e Co-Orientação do Professor

Dr. Aurélio Baird Buarque Ferreira

Dissertação submetida como
requisito parcial para a obtenção do
grau de **Mestre em Ciências.**

Seropédica, Rio de Janeiro

Julho 2010

547.632098153

S232d

T

Sant'Ana, Luiza D'Oliveira, 1987-

Determinação do conteúdo de substâncias fenólicas e avaliação da capacidade antioxidante em méis de *Apis mellifera* comercializados no estado do Rio de Janeiro/ Luiza D'Oliveira Sant'Ana - 2010.

129 f. : il.

Orientador: Rosane Nora Castro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química. Bibliografia: f. 112-128.

1. Fenólicos - Avaliação - Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 2. Mel - Comercialização - Rio de Janeiro (Estado) - Teses. I. Castro, Rosane Nora, 1965-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Química, Química de Produtos Naturais. III. Título.

Bibliotecário: _____

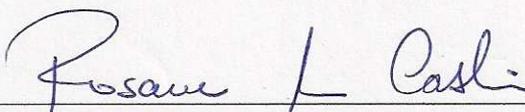
Data: ___/___/___

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

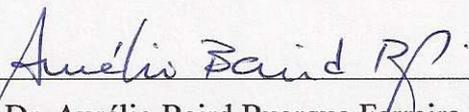
LUIZA D'OLIVEIRA SANT'ANA

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

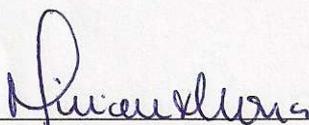
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 05/07/2010



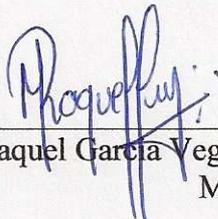
Prof. Dra. Rosane Nora Castro (ICE-DEQUIM-UFRRJ)
Orientadora e Presidente



Prof. Dr. Aurélio Baird Buarque Ferreira (ICE-DEQUIM-UFRRJ)
Co-Orientador



Prof. Dra. Mirian Ribeiro Leite Moura (Faculdade de Farmácia - UFRJ)
Membro Titular



Prof. Dra. Maria Raquel Garcia Vega (Centro de Ciências e Tecnologias - UENF)
Membro Titular

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jair Sant'Ana e Luzia D'Oliveira, que sempre me apoiaram em tudo e procuraram buscar para mim o melhor.

Especialmente à Prof^a Rosane Nora Castro, pela orientação, pelas excelentes aulas, pelo exemplo de vida e profissionalismo. Também pelas cobranças e estímulos que me fizeram concluir esse trabalho.

A Prof. Maria Cristina Affonso Lorenzon, pelo fornecimento das amostras e dos dados palinológicos e físico-químicos, e por toda a atenção e apoio.

Ao Prof^o Aurélio Baird B. Ferreira, pela amizade, ensinamentos e pela oportunidade.

Aos professores Mário Geraldo, Carlos Maurício e Victor M. Rumjanek, pelas excelentes aulas; aos profs. Marco Edilson, Cedric e Arthur, pelo convívio no laboratório, e aos demais professores do programa, que sempre estiveram dispostos a apoiar.

A Juliana Paes Leme de Mello, pelo companheirismo e amizade, e também pela realização das análises físico-químicas, que tanto contribuíram para este trabalho.

Ao amigo Carlos Vianna, que me ensinou pacientemente cada procedimento, e a Milene Pereira, pela amizade e alegria durante o convívio no lab.

Aos demais amigos de laboratório, Thiago (*MacGyver*), Mirza, Breno, Natália, Welison, Luiz Gustavo, Tatiana, Lucas e Marcela, pelo ótimo convívio no Laboratório 48B.

Ao Luís Augusto “Coquero” (*In memoriam*), André Luiz, Ari, Andréa e Bauer, amigos do Laboratório 51, aos quais sou muito grata e sempre guardarei ótimas lembranças.

A Carla M. Goulart e Wellington, meus grandes amigos da UFRRJ, aos quais tenho um enorme carinho. Sempre vou lembrar de nossas histórias e aventuras...

A banca examinadora, por aceitar o convite e pelas futuras contribuições.

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

As abelhas, em especial às *Apis mellifera*, que cederam parte de seu próprio alimento para análise.

E, por fim, agradeço a Deus, por ter criado as abelhas e a diversidade das flores, e ter nos dado os sentidos para apreciar tudo isso.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. HISTÓRICO, UTILIZAÇÃO E TIPOS DE MEL	1
1.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MEL.....	6
1.3. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DO MEL.....	11
1.4. ALGUNS ASPECTOS DE QUALIDADE DO MEL	16
1.5. SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E SUAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES	23
1.6. ORIGENS FLORAIS DOS MÊIS ANALISADOS.....	44
1.6.1. Características do gênero <i>Citrus spp.</i>	44
1.6.2. Características do gênero <i>Copaifera</i>	45
1.6.3. Características da família <i>Myrtaceae</i>	46
1.6.4. Características da família <i>Asteraceae / Compositae</i>	47
1.6.5. Características do gênero <i>Anadenanthera</i>	48
1.6.6. Características do gênero <i>Ambrósia</i>	49
2. OBJETIVOS	51
2.1. OBJETIVO GERAL.....	52
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
3. PARTE EXPERIMENTAL	52
3.1. MATERIAL E MÉTODOS	53
3.2. AMOSTRAS DE MÊIS	53
3.3. DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS NOS MÊIS COM REAGENTE DE FOLIN-DENIS	56
3.3.1. Preparo do reagente de Folin-Denis.....	56
3.3.2. Preparo da curva analítica do ácido gálico.....	56
3.4. ENSAIO DE FLAVONÓIDES TOTAIS NOS MÊIS COM CLORETO DE ALUMÍNIO.....	57
3.4.1. Preparo da curva analítica com quercetina.....	57
3.5. AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH.....	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS	60
4.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS	68
4.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	74
4.3.1. Avaliação da atividade antioxidante dos padrões fenólicos	75
4.3.2. Avaliação da atividade antioxidante das amostras de mel.....	83
4.4. CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS AVALIADOS	91
4.4.1. Amostras de méis monoflorais.....	91
4.4.2. Amostras de méis heteroflorais por mesorregião (23 amostras).....	98
4.4.3. Considerações gerais sobre os resultados das análises dos méis	100
5. CONCLUSÕES.....	110
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112
7. ANEXO: ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS, COR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	129

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Algumas floradas do Brasil (KISS, 2008).....	4
Tabela 2: Principais enzimas presentes no mel e suas funções (NATIONAL HONEY BOARD, 2005).....	7
Tabela 3: Composição média do mel (VARGAS, 2006).....	9
Tabela 4: Composição físico-química do mel de flores e melato, para <i>Apis Mellifera</i> *	22
Tabela 5: Principais sistemas antioxidantes do organismo (EIRIN, 2009).....	24
Tabela 6: Classes de substâncias fenólicas encontradas em plantas	26
Tabela 7: Bandas de absorção de flavonóides em solução metanólica e na presença de cloreto de alumínio (AlCl ₃).....	33
Tabela 8: Características dos méis analisados (origem floral, geográfica e cor)	50
Tabela 9: Características dos méis analisados (origem floral, geográfica e cor)	55
Tabela 10: Absortividade molar de soluções de substâncias fenólicas a 5%, lidas a 725 nm após 1 hora de reação	62
Tabela 11: Resultados obtidos para teor de fenóis totais para as amostras de méis, através do reagente de Folin-Denis	66
Tabela 12: Valores obtidos para teores de flavonóides totais para as amostras de méis usando cloreto de alumínio	72
Tabela 13: Quantidade de fenólicos e flavonóides totais para méis de diferentes origens.....	74
Tabela 14: Valores de CE ₅₀ dos padrões (µM, µg/mL e mg/mL) obtidos no ensaio com DPPH.	81
Tabela 15: Melhores valores em substâncias fenólicas e o CE ₅₀ , suas médias e desvios padrões	87
Tabela 16: Parâmetros físico-químicos e atividade antioxidante de méis de <i>Anadenanthera</i>	91
Tabela 17: Dados físico-químicos e atividade antioxidante de méis de Asteraceae	93
Tabela 18: Dados físico-químicos e atividade antioxidante de méis de <i>Eucalyptus</i>	94
Tabela 19: Dados físico-químicos e atividade antioxidante de méis de Myrcia	95
Tabela 20: Dados físico-químicos e atividade antioxidante de méis de diversas origens florais.....	96
Tabela 21: Dados físico-químicos e atividade antioxidante dos méis heteroflorais.....	99
Tabela 22: Valores médios das análises orgânicas e físico-químicas dos méis, separados pela coloração.....	100
Tabela 23: Valores médios das análises, separados por origem floral.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Da esquerda para direita: pintura feita na Espanha (6000 AC), de homem coletando mel; menção do mel nos livros sagrados da Índia Antiga (2-3000 AC); pintura feita na Tumba de Pabasa (monumento egípcio) em 760-656 AC (BOGDANOV, 2009a).....	2
Figura 2: Exemplos de méis de diferentes aspectos (http://161.58.48.157/media/imag egallery.asp).....	5
Figura 3: Conversão da sacarose a glicose, através da enzima invertase (adaptado de WIECHOCZEK, 2000).....	8
Figura 4: Exemplo de substâncias comumente presentes no mel (MOYNA, 1999; WOLSKI <i>et al.</i> , 2006).....	10
Figura 5: Mecanismo de formação do metilglioxal através da Reação de Maillard (adaptado de SHIPAR, 2006).....	13
Figura 6: Redução dos íons $AuCl_4^-$ a Au^0 (adaptado de LIANG <i>et al.</i> , 2008).....	15
Figura 7: Quelatos de íons metálicos com flavonóides (VANKAR <i>et al.</i> , 2009; PIETTA, 2000).....	15
Figura 8: Formação de polímeros coloridos a partir de substâncias fenólicas (adaptado de http://class.fst.ohio-state.edu/fst605/605p/Maillard.pdf).....	19
Figura 9: Formação de frutossamina a partir da glicose, através do rearranjo de Amadori (adaptado de AYDA, 2007).....	20
Figura 10: Mecanismo de oxidação lipídica provocada por radicais livres, onde: RH = ácido graxo insaturado; R^\bullet = radical livre; ROO^\bullet = radical peróxido; ROOH = hidroperóxido (RAMALHO e JORGE, 2006).....	23
Figura 11: Reação geral de oxido-redução de uma substância antioxidante.....	24
Figura 12: Exemplos de antioxidantes sintéticos comumente utilizados (adaptado de RAMALHO e JORGE, 2006).....	26
Figura 13: Estrutura básica de flavonóides (ACKER <i>et al.</i> , 1998).....	27
Figura 14: Subclasses da família dos flavonóides, diferenciadas pela estrutura do anel C (adaptado de ACKER <i>et al.</i> , 1998).....	28
Figura 15: Exemplos de flavonóides aglicona.....	29
Figura 16: Exemplos de flavonóides glicosilados.....	29
Figura 17: Seqüestro de radicais por compostos fenólicos e formação de quinonas estáveis (adaptado de MCPHAIL <i>et al.</i> , 2003).....	30
Figura 18: Características estruturais (em azul) responsáveis pela atividade antioxidante de flavonóides (TWARI, 2001).....	30
Figura 19: Bandas de absorção no UV para flavonóides (SEIJAS <i>et al.</i> , 2008).....	31
Figura 20: Complexo formado entre o flavonóide e a solução de $AlCl_3$	32
Figura 21: Complexo bimolecular da morina com cloreto de alumínio (adaptado de KEUSCH, 2003).....	32
Figura 22: Exemplos de ácidos hidroxibenzóicos.....	35
Figura 23: Exemplos de ácidos hidroxicinâmicos.....	35
Figura 24: Estrutura do ácido clorogênico.....	36
Figura 25: Ordem de atividade antioxidante de ácidos fenólicos (SROKA e CISOWSKI, 2003).....	36
Figura 26: Reação do ácido gálico com o reagente de Folin-Denis (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2009).....	38
Figura 27: Complexo fosfotúngstico (KLEMPERER, 2007).....	39

Figura 28: Reação redox com DPPH.....	41
Figura 29: Análise espectrofotométrica (UV-Vis) de uma solução de DPPH com substâncias antioxidantes (adaptado de www.baltic-analytics.de/index.php?id=40&L=1).....	42
Figura 30: Efeito de proteção do nitrogênio pelo <i>o</i> -NO ₂ (FOTI e DAQUINO, 2006).....	43
Figura 31: Abelha nas flores de <i>Citrus</i> (SHTILMAN, 2009) e a direita microscopia de pólen deste gênero (ODDO e PIRO, 2004).....	45
Figura 32: Imagem de <i>Copaifera officinalis</i> (http://www.rain-tree.com/Plant-Images/copaiba-pic.htm , 2006) ...	46
Figura 33: Abelha em flor de <i>Eucalyptus</i> (VOLPICELI, 2006) e a direita grão de pólen desta família (ODDO e PIRO, 2004)	47
Figura 34: Abelha coletando néctar em Asteraceae (HUANG, 2002) e a direita microscopia de pólen desta família (ODDO e PIRO, 2004).....	48
Figura 35: A esquerda, árvore e flor de <i>Anadenanthera colubrina</i> , superior à direita, grão de pólen e abaixo, abelha freqüente visitadora desta planta (<i>Partamona cupira</i>) (MEC, 2008).....	49
Figura 36: <i>Ambrósia</i> sp.; direita: pólen e sementes da planta (abaixo) (BOHREN, 2008).....	49
Figura 37: A esquerda, tabela com a quantidade de amostras de mel analisadas, separadas por região; à direita, mapa com as mesorregiões do estado do Rio de Janeiro (www.nachrichtenmann.de).....	54
Figura 38: Esquema do ensaio de atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA	58
Figura 39: Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico e as absorbâncias (760 nm), nos ensaios de Folin-Denis (VIANNA, 2010)	63
Figura 40: Curva analítica das médias das concentrações da solução de quercetina <i>versus</i> as leituras de absorbâncias (415 nm), após o ensaio com cloreto de alumínio	69
Figura 41: Esquema de leitura das microplacas no espectrofotômetro de ELISA (adaptado de www.bmglabtech.com/technology/tandem.cfm).....	76
Figura 42: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da quercetina	77
Figura 43: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da rutina.....	78
Figura 44: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da isoquercetina.....	78
Figura 45: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da miricetina.....	79
Figura 46: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração do ácido gálico	79
Figura 47: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração do ácido protocatecuico.	80
Figura 48: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração do ácido cafeico.....	80
Figura 49: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração do ácido ferúlico.....	81
Figura 50: Interações de hidrogênio intramoleculares da miricetina	83
Figura 51: Mudança na coloração da solução promovida pelas amostras de mel, através da redução do radical púrpura DPPH (adaptado de http://www.naturalsolution.co.kr/tech21e.html).....	83
Figura 52: Exemplo de confecção da curva de CE ₅₀ de amostra de mel.....	85
Figura 53: Gráfico que relaciona a média do percentual de atividade antioxidante <i>versus</i> a concentração do mel n° 57 (3,55 a 35,50 mg/mL), equação da reta e o seu valor de CE ₅₀	86
Figura 54: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante <i>versus</i> a concentração do mel n° 57 (0,71 a 10,65 mg/mL), equação da reta e o seu valor de CE ₅₀	87

Figura 55: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante <i>versus</i> a concentração do mel nº 43 (3,55 a 35,50 mg/mL), equação da reta e o seu valor de CE ₅₀	88
Figura 56: Resultado das análises das substâncias orgânicas dos méis de <i>Anadenanthera</i>	91
Figura 57: resultado das análises orgânicas de méis de Asteraceae.....	93
Figura 58: Resultado das análises orgânicas de méis de <i>Eucalyptus</i>	94
Figura 59: Resultado das análises orgânicas de méis de Myrcia	95
Figura 60: Resultado das análises orgânicas de méis de diversas origens florais	96
Figura 61: Hidrólise da hesperidina, presente nas plantas cítricas, para gerar a aglicona hesperitina	97
Figura 62: Resultado das análises orgânicas de méis heteroflorais.....	98
Figura 63: Formação de HMF a partir da reação de desidratação de açúcares redutores	101
(LEWKOWSKI, 2001).....	101
Figura 64: Exemplos de substâncias coloridas que podem ser formadas a partir do HMF (Univ. Porto, 2004;..	102
Figura 65: Etapas iniciais da reação de Maillard. A direita, ação catalizadora provocada por metais. (http://www.biology.buffalo.edu/courses/bio401/KiongHo/Lecture31.ppt#301,1,Enzyme (Basic Principle)	103
Figura 66: Alguns complexos formados por flavonóides com íons metálicos bivalentes ou trivalentes (GUO <i>et al.</i> , 2007; Maselev e Kuntic, 2007).	105
Figura 67: Semiquinona complexada com íon metálico (BUKHARI <i>et al.</i> , 2008).....	107
Figura 68: Quelação de polifenóis com íons de ferro (PERRON e BRUMAGHIM, 2009)	107

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%AA	percentual de atividade antioxidante
(AA)mgE _{QC}	atividade antioxidante expressa em miligramas em equivalente de quercetina
<i>A_w</i>	atividade de água
CE ₅₀	concentração efetiva para redução de 50% dos radicais
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DPPH-H	2,2-difenil-1-picril-hidrazina
EROs	espécies reativas de oxigênio
HMF	5-hidroximetilfurfural
meq/kg	mili-equivalentes/kg
mgE _{AG}	miligramas em equivalente de ácido gálico
mgE _{QC}	miligramas em equivalente de quercetina
nm	nanômetros
pág.	página
PPO	polifenoloxidase
UV	ultravioleta
UV-Vis	ultravioleta ao visível
μM	micromolar

SANT'ANA, Luiza D'Oliveira. Determinação do conteúdo de substâncias fenólicas e avaliação da capacidade antioxidante em méis de *Apis mellifera* comercializados no estado do Rio de Janeiro. Seropédica. UFRRJ, 2010. pág. 129. Dissertação de Mestrado em Ciências, Química de Produtos Naturais.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os teores de fenólicos e flavonóides totais de sessenta amostras de mel de *Apis mellifera* comercializadas em diferentes mesorregiões do estado do Rio de Janeiro (Metropolitana, Sul, Centro, Noroeste Fluminense e Baixada Litorânea). Para cada amostra foram analisados os totais de fenólicos e flavonóides, através dos métodos de Folin-Denis e cloreto de alumínio (AlCl_3), respectivamente. Foi determinado, também, o potencial da atividade antioxidante (%AA e CE_{50}) para todas as amostras de mel, bem como para alguns padrões de ácidos fenólicos e flavonóides. O método utilizado para determinar a capacidade antioxidante foi o de captura do radical orgânico 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 520 nm.

Os méis avaliados foram classificados de monoflorais e heteroflorais. Para os monoflorais foi observado que os méis de *Anadenanthera* apresentaram a maior média em totais de fenólicos (112,60 $\text{mgE}_{\text{AG}}/100\text{g}$), e também a maior atividade antioxidante (59,93 (AA) $\text{mgE}_{\text{QC}}/500\text{g}$ ou 18,92 mg/mL em termos de CE_{50}), enquanto os méis de *Eucalyptus* apresentaram, em média, o maior conteúdo de flavonóides totais (9,17 $\text{mgE}_{\text{EC}}/100\text{g}$).

A partir dos resultados obtidos foi feito um estudo comparativo entre as várias amostras de méis de diferentes regiões quanto ao teor de fenólicos e flavonóides totais, a atividade antioxidante e algumas propriedades físico-químicas (HMF, acidez, pH, umidade, atividade de água e intensidade de coloração). Ao comparar esses resultados, foi possível observar que os méis mais escuros apresentaram uma maior atividade antioxidante e uma maior quantidade de fenólicos e flavonóides totais, bem como valores mais altos para todos os outros parâmetros físico-químicos comparados.

Palavras-chave: méis de *Apis mellifera*, substâncias fenólicas, atividade antioxidante, parâmetros físico-químicos.

SANT'ANA, Luiza D'Oliveira. Determination of total phenolic compounds and the evaluation of the antioxidant capacity of *Apis mellifera* honeys commercialized in the state of Rio de Janeiro. Seropédica. UFRRJ, 2010. pág. 129. Dissertação de Mestrado em Ciências, Química de Produtos Naturais.

ABSTRACT

This work aimed at the evaluation of the total phenolic and flavonoid contents of sixty *Apis mellifera* honey samples, commercialized in different regions of the state of Rio de Janeiro (Metropolis, Southern, Central, Northwestern and Seaside). For each sample, the total phenolic and the total flavonoid contents were analyzed by the Folin-Denis and aluminum chloride (AlCl_3) methods, respectively. Also, the antioxidant activity (%AA and EC_{50}) for all the honey samples was evaluated, as well as for some phenolic acids and flavonoids, used as standards. The determination of the antioxidant capacity was carried out by the method of trapping the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl organic radical (DPPH) by antioxidant compounds, resulting in an absorbance decrease at 520 nm.

The analyzed honeys were classified as monofloral or heterofloral. For the monofloral samples, it was observed that *Anadenanthera* honeys showed the highest average value for total phenolics (112,60 $\text{mgE}_{\text{AG}}/100\text{g}$) and also for the antioxidant capacity (59,93 (AA) $\text{mgE}_{\text{QC}}/500\text{g}$ or 18,92 mg/mL if expressed as EC_{50}), while the *Eucalyptus* honeys showed the highest mean for total flavonoids (9,17 $\text{mgE}_{\text{QC}}/100\text{g}$).

With these results, a comparative study was carried out with diverse honey samples of different regions, in terms of total phenolic and flavonoid content, antioxidant capacity and some physico-chemistry parameters (HMF, acidity, pH, humidity, water activity and color intensity). Comparison of these results allowed to observe that darker honeys showed both higher antioxidant activity and the highest values for total phenolic and flavonoid contents, as well as for all the other physico-chemical parameters.

Keywords: *Apis mellifera* honey, phenolic compounds, antioxidant activity, physico-chemical parameters.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico, utilização e tipos de mel

Acredita-se que as abelhas surgiram na região seca do interior do paleocontinente Gondwana. As primeiras abelhas sociais sem ferrão (*Meliponinae*) surgiram no meio do período Cretáceo, há cerca de 100 milhões de anos, coincidindo com o período de difusão das angiospermas como vegetação dominante (WINSTON, 1987). Já as espécies de *Apis* surgiram na era Cenozóica, no período do surgimento dos primeiros primatas (CRANE, 1999).

Dentre as 16.000 a 20.000 espécies de abelha existentes no mundo, apenas cerca de 2% são produtoras de mel. Dentre elas estão a *Apis cerana*, *A. dorsata*, *A. florea* e *Apis mellifera*, sendo a última a mais conhecida como abelha produtora de mel (READICKER-HENDERSON e MCCARTY, 2009).

Segundo WIESE (1995), as abelhas do gênero *Apis* não são nativas do nosso continente americano. Esta espécie chegou ao Brasil em 1839, originada do continente Europeu, quando o Padre Antônio Carneiro conseguiu a autorização do Rei Dom Pedro II para importar para o estado do Rio de Janeiro algumas sub-espécies de *Apis mellifera* europeias. GONÇALVES (1998) relatou que em 1956 foram introduzidas no Brasil a sub-espécie africana *Apis mellifera scutellata*, pelo geneticista Warwick Estevam Kerr.

Atualmente, a maior responsável pela produção de mel no Brasil é a abelha africanizada, mais agressiva, híbrido das abelhas europeias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera carnica*) com a abelha africana *Apis mellifera scutellata* (CAMARGO *et al.*, 2003).

Em geral, o mel é um líquido viscoso e doce produzido pelas abelhas, comumente a partir do néctar das flores, que é transportado pelas abelhas operárias em suas bolsas melíferas até a colméia, onde o armazenam e maturam para servir como reserva de alimento para o período de escassez das floradas (OSACHLO, 2004).

O mel tem sido apreciado ao longo do tempo por seu sabor doce e por suas propriedades medicinais. Após a Era do Gelo, o homem caçava as abelhas com tochas, que produziam fumaça e as acalmavam, possibilitando a retirada do mel (NATIONAL HONEY BOARD, 2001). Há em diversos lugares pinturas anteriores a 6000 AC, que relatam a caça pelo mel e sua utilização (**Figura 1**) (BOGDANOV, 2009a). Na Babilônia e na Grécia Antiga, o mel era utilizado para conservar corpos de reis e generais mortos em batalha, até que pudesse ser feito o funeral. Na Idade Média, o mel era um alimento tão importante para a

subsistência que há inclusive registros de testamentos destinando colméias com abelhas a pessoas da família ou a Igreja (VARGAS, 2006). Com o passar dos anos o homem foi aperfeiçoando e aprendendo métodos mais eficientes e menos exploratórios de trabalhar com as abelhas.



Figura 1: Da esquerda para direita: pintura feita na Espanha (6000 AC), de homem coletando mel; menção do mel nos livros sagrados da Índia Antiga (2-3000 AC); pintura feita na Tumba de Pabasa (monumento egípcio) em 760-656 AC (BOGDANOV, 2009a)

O mel é também um importante integrante da medicina popular, sendo comumente utilizado por via oral ou tópica contra diversas enfermidades. Muitas vezes o mel ainda é misturado com ervas, grãos e outros produtos de origem botânica, com a finalidade de agregar ou aumentar suas propriedades medicinais (OSMAN *et al.*, 2003; KOSHIO e ALMEIDA-MURADIAN, 2003; REIS *et al.*, 2002).

Há diversos relatos da utilização das propriedades medicinais do mel desde a antiguidade, como nas tábuas de argila sumerianas (6200 AC), nos papiros egípcios (1900-1250 AC), nas escrituras Hindus, há 5000 anos, no Alcorão, Talmude, na Bíblia e diversas outras escrituras como nos livros sagrados da Índia, China, Pérsia e Egito (GELLER, 2004; OFFICE OF COMPLEMENTARY MEDICINES, 1998; BOGDANOV, 2009a). Suas diversas utilizações populares incluem o tratamento contra tosse e afecções de garganta, queda de cabelo, úlceras gástricas e constipação. Na Nigéria, o mel também é utilizado contra dor de ouvido e na Índia, há a utilização do mel de Lótus contra doenças oftalmológicas (MOLAN, 2001; LUCAS *et al.*, 2000).

Durante muito tempo o mel foi uma fonte muito importante de carboidratos e o único adoçante disponível, até começar a ser substituído pela produção industrial de açúcar, a partir de 1800. Segundo levantamentos estatísticos, atualmente, a produção anual de mel é de cerca de 1,2 milhões de toneladas, que corresponde a menos que 1% da produção total de açúcar (BOGDANOV, 2010).

O Brasil é, atualmente, o 11º maior produtor mundial de mel, porém o consumo de mel no país como alimento ainda é muito baixo (aproximadamente 300g/habitante/ano), sendo mais consumido como medicamento nas épocas mais frias do ano, quando aumentam os casos de problemas respiratórios (CAMARGO *et al.*, 2003). Em uma pesquisa feita no município de Itabuna-BA, 66% dos entrevistados consumiam mel com a finalidade de cura de doenças, sendo 41% por tosse e 40% por gripe (MAGALHÃES *et al.*, 2007). Há políticas públicas como tentativas de aumentar o consumo de mel como alimento no país, como o Programa de Aquisição de Alimentos desenvolvido pela CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), realizando compras de mel diretas dos apicultores para distribuição em diversas instituições (SIMÕES e TEIXEIRA, 2009).

O baixo consumo de mel no Brasil torna a exportação uma alternativa aos produtores à alta produção gerada no país. Em 2004, porém, houve uma grande queda na exportação por conta do bloqueio da União Européia aos méis brasileiros, que até então absorvia a maior parte da produção, alegando falta de controle e monitoramento de resíduos e contaminantes. Com isso os Estados Unidos passaram a ser o principal importador do mel brasileiro, mas a custos mais baixos. O embargo foi apenas liberado em 2008, após dois anos de adequações, que acabaram por gerar melhorias no setor (CRESPAM e SCHERER, 2009). Em 2009, a produção brasileira atingiu um marco histórico de 50 mil toneladas de mel (KOHLMANN, 2009), ultrapassando ainda o “record” anual de exportação do país (XEYLA, 2009).

Os números mostram que a apicultura virou um instrumento de inclusão econômica e alternativa de emprego e renda para pequenos produtores de mel. Alguns produtores de diferentes regiões do país já adotam a apicultura como sua principal fonte de renda familiar e decidiram investir cada dia mais nessa atividade, entretanto, é uma atividade que requer capacitação, gerenciamento de tecnologia e apoio governamental. Essa capacitação se refere à profissionalização do pequeno produtor, pois a qualificação e especialização são fundamentais para que seu produto se torne competitivo no mercado nacional e internacional.

Segundo BRASIL (2000), os méis florais podem ser considerados como uniflorais ou monoflorais, quando tem origem predominante de uma única família, gênero ou espécie, com características próprias, ou multiflorais ou heteroflorais, quando há mais de uma origem. Há ainda os méis de melato, provenientes do caule da bracinga (*Leguminosae fabaceae*) ou do ingá (*Inga uruguensis*), que ao invés do néctar de flores, e estão presentes em sua composição secreções de partes vivas de plantas ou excreção de insetos sugadores de plantas. Estes méis também se caracterizam por não possuírem grãos de pólen (CAMPOS *et al.*, 2003).

Os méis florais são obtidos majoritariamente através do néctar das flores, cujos principais constituintes são os carboidratos e sais minerais. Alguns possuem maior quantidade de sacarose, outros de frutose e glicose. Já o pólen fornece às abelhas seu suprimento de proteínas, sais minerais e produtos biológicos especiais utilizados na sua alimentação. Também possuem em sua composição os aminoácidos necessários a alimentação das abelhas e outros componentes. A composição do pólen varia entre espécies de plantas; também sofre a influência da idade, da condição nutricional da planta e das condições ambientais durante o desenvolvimento da planta (MARCHINI *et al.*, 2006).

O Brasil possui uma grande variedade de floradas, que dão origem a méis de diferentes sabores, odores e aspectos. A **Tabela 1** a seguir mostra algumas floradas brasileiras e suas características.

Tabela 1: Algumas floradas do Brasil (KISS, 2008)

Flores	Local	Descrição do mel
Angico	Semi-árido e Cerrado	muito claro
Assa peixe	Sudeste e Cerrado	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 Cerrado	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

Além das diferentes floradas, há vários outros fatores que influenciam as características do mel, como o clima, solo, umidade, altitude, origem da abelha e até mesmo a manipulação do apicultor, que pode inclusive induzir as abelhas à produção de algum determinado tipo de mel através do cheiro. Caso não sofram indução, as abelhas tendem a procurar o cheiro que estiver predominando no ar, e caso haja mais de um aroma, darão preferência às espécies com néctar em maior quantidade e mais rico em glicose (NUNES, 2005).

Alguns méis são de difícil cristalização, como o mel de assa peixe e cambará, já outros, como os méis de eucalipto, cristalizam mais facilmente. A cristalização do mel também pode ser induzida e controlada, a fim de gerar produtos comercialmente chamados de

“méis cremosos” (BERG, 1998). Há diversos fatores que influenciam na cristalização, como a porcentagem de água do mel, o índice glicose/frutose, cuja maior concentração de glicose reduz a solubilidade e favorece a precipitação, a presença de bolhas de ar, que funcionam como núcleos de cristalização, baixas temperaturas, etc. (ARAUCO, 2008).

Além da cristalização, a composição de carboidratos também influencia em algumas características reológicas do mel, como a viscosidade, e estas podem sofrer uma grande variação de acordo com o tipo de mel. A frutose é um açúcar bastante higroscópico, bem mais do que a glicose, que apesar de ter o mesmo número de hidroxilas que a frutose, estas se encontram menos disponíveis para realizar interações de hidrogênio com moléculas de água (SERAVALLI e RIBEIRO, 2007). Portanto, uma maior razão frutose/glicose, além de prevenir a cristalização do mel, proporciona uma maior viscosidade.

CRANE (1985) em suas pesquisas relatou que tanto o conteúdo total quanto a composição de açúcar do mel influenciam na sua doçura. Os dois açúcares principais do mel são a frutose e a glicose. Normalmente, há ligeira predominância da frutose, por conta da conversão de parte da glicose em frutose pelas abelhas, através da enzima glicose isomerase (BELITZ *et al.*, 2009).

A coloração do mel varia de incolor a castanho escuro, tendo geralmente tonalidade amarela ou âmbar (**Figura 2**). Enquanto a cor pode depender da origem botânica, tempo de prateleira e condições de estocagem, a transparência do mel está relacionada a quantidade de partículas em suspensão, como os grãos de pólen. As cores mais raras de mel são amarelo brilhante (mel de girassol), tons avermelhados (mel de castanha), acinzentados (eucalipto) e esverdeado (melato) (OLAITAN *et al.*, 2007). Seu odor pode variar de suave a forte, muitas vezes predominando um aroma floral, cítrico, amadeirado ou de frutas frescas. Assim como o aroma, o sabor do mel também varia com a origem floral, podendo ser de maior ou menor intensidade, doçura, acidez, etc. (ODDO e PIRO, 2004).



Figura 2: Exemplos de méis de diferentes aspectos (<http://161.58.48.157/media/imagallery.asp>)

Essa grande variedade composição, cores, odores e sabores fazem ser único cada tipo de mel comercializado, e por isso há cada vez mais pesquisas sobre a sua composição química e como esta influencia nas características sensoriais, perceptíveis ao consumidor, a fim de entender as suas diferenças de valorização no mercado.

1.2. Composição química do mel

A composição do mel é bastante complexa, sendo constituída de uma mistura de cerca de 200 componentes, onde se destacam os carboidratos, e podem estar presentes enzimas, aminoácidos, minerais, ácidos orgânicos, vitaminas, ceras e grãos de pólen (GHEDOLF *et al.*, 2002; CRANE, 1985; WHITE, 1979). Porém, basicamente, é uma solução supersaturada de açúcares, com predominância de glicose e frutose, e cerca de apenas 17% de água em sua composição final. Isso ocorre devido à ação de evaporação promovida pelas abelhas, que na manipulação do néctar batem as asas para aumentar a exposição ao ar e eliminar o excesso de umidade, e também utilizam suas trombas para absorver parte da água e inserir enzimas. Além de ser um mecanismo para regulação da temperatura, a retirada do excesso de água aumenta a concentração de glicose e frutose, tornando o mel mais estável e menos susceptível a ataques de microrganismos (WINSTON, 1987).

Segundo a legislação nacional (BRASIL, 2000), que regulamenta a padronização do mel para fins de comercialização, o mel de *Apis mellifera* não deve exceder o valor máximo de 20% de água. Já para os méis de meliponíneos do Brasil, como *Tetragonisca angustula* (jataí), que possuem teores de água mais altos que o de *Apis*, o limite máximo sugerido é de 35% (ANACLETO *et al.*, 2009).

Além da frutose e da glicose, também estão presentes no mel dissacarídeos, trissacarídeos e oligossacarídeos, mas em quantidade muito inferiores. Por ser um alimento concentrado, possui uma grande quantidade de calorias (304 cal por 100 g de mel). Na maior parte dos méis a frutose é o açúcar predominante. Isso faz com que o mel seja levemente mais doce que a sacarose, sendo em média de 1 a 1,5 vezes mais doce (NATIONAL HONEY BOARD, 2005). Em comparação com a sacarose, o mel também possui menor efeito cariogênico devido a sua atividade antibacteriana, podendo ser utilizado em substituição no processamento de diversos doces (BOGDANOV *et al.*, 2008).

O mel também possui, em pequenas quantidades, proteínas, vitaminas e minerais. A quantidade de aminoácidos é baixa, tendo uma média de 18 aminoácidos essenciais e não-

essenciais, sendo os tipos e concentrações variáveis de acordo com a origem floral. A prolina e a lisina são os aminoácidos mais frequentes, mas também podem ser encontrados a fenilalanina, a tirosina, e os ácidos glutâmico e aspártico. Os ácidos orgânicos contribuem para um sabor levemente azedo, e também auxiliam na atividade antimicrobiana do mel. O ácido orgânico presente em maior quantidade é o ácido glicônico, mas também estão presentes o ácido butírico, acético, fórmico, láctico, succínico, málico, cítrico, maleico, oxálico e piroglutâmico (NATIONAL HONEY BOARD, 2006; ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010).

Dentre as várias enzimas presentes no mel, algumas são introduzidas pelas abelhas, outras oriundas do néctar das flores. Assim como ocorre em outros aspectos do mel, a atividade enzimática pode variar intensamente com a origem floral e outros fatores ambientais. As principais enzimas presentes no mel são a diastase (α -amilase), invertase (α -glicosidase), glicose oxidase, catalase e fosfatase ácida (**Tabela 2**). A diastase, por exemplo, é a enzima responsável por converter amido à dextrinas, e é introduzida no mel pelas abelhas. Alguns fatores que influenciam a presença destas enzimas são a composição e quantidade do néctar, e também a idade das abelhas. A abundância de néctar geralmente resulta em valores baixos de atividade de diastase e invertase. As enzimas permanecem no mel conservando sua atividade por algum tempo, a menos que sejam inativadas pelo aquecimento (CAMARGO *et al.*, 2003).

Tabela 2: Principais enzimas presentes no mel e suas funções (NATIONAL HONEY BOARD, 2005)

Nome comum	Nome / Grupo	Reações químicas catalisadas
Diastase / Amilase	α e β -amilase	transforma amido em outros carboidratos (dextrinas, oligo, di e monossacarídeos)
Invertase / Sacarase	α -glicosidade	converte sacarose em glicose e frutose (açúcar invertido)
Glicose oxidase	grupo das peroxidases	converte glicose em gliconolactona, que gera ácido glucônico e peróxido de hidrogênio
Catalase	grupo das oxidoreduções	converte peróxido a água e oxigênio
Fosfatase ácida	-	remove fosfato dos fosfatos orgânicos
Protease	grupo das hidrolases de proteína	hidrolisam proteínas e polipeptídeos para gerar peptídeos de baixo peso molecular
Estearase	grupo das hidrolases	quebram ligações de ésteres
β -glicosidase	-	converte β -glicanas em oligossacarídeos e glicose

A enzima invertase, presente nas glândulas hipofaríngeas das abelhas operárias, é a enzima de maior importância no mel, pois é a responsável pela conversão da sacarose do néctar em glicose e frutose (**Figura 3**) (<http://www.airborne.co.nz/Enzymes.html>, 1999).

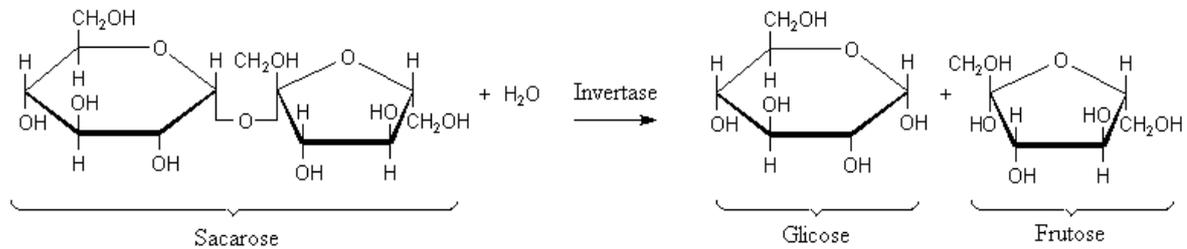


Figura 3: Conversão da sacarose a glicose, através da enzima invertase (adaptado de WIECHOCZEK, 2000)

A frutose e a glicose fazem parte de 38% e 30% da composição química do mel (**Tabela 3**), respectivamente. Essa proporção frutose/glicose confere benefícios a saúde, pois os derivados da frutose ativam a liberação da glucoquinase no fígado, enzima necessária à conversão da glicose em glicogênio, um polissacarídeo composto por unidades de glicose, sendo a principal reserva energética nas células animais (FESSENDEN, 2007).

Apesar da grande quantidade de frutose e glicose, o mel deve conter uma baixa quantidade de sacarose. A quantidade máxima geralmente aceita em méis florais é de 50g/kg, mas em alguns méis, devido a fonte do néctar, a concentração pode chegar a 100g/kg, como é o caso dos méis de alfalfa (*Medicago sativa*) e *Citrus* spp. Já os méis de lavanda (*Lavandula* spp) e borago (*Borago officinalis*) podem chegar até 150 g/kg (CODEX STANDARD, 1981).

Quanto aos açúcares redutores (frutose e glicose), os méis florais não devem ter menos do que um total de 650 g/kg e os méis de melato, 600 g/kg (BRASIL, 2000).

Tabela 3: Composição média do mel (VARGAS, 2006)

	Média	Faixa de variação	Desvio Padrão
Taxa Frutose/Glicose	1,23	0,76 - 1,86	0,126
Frutose (%)	38,38	30,91 - 44,26	1,77
Glicose (%)	30,31	22,89 - 40,75	3,04
Minerais (%)	0,169	0,020 - 1,028	0,15
Umidade (%)	17,2	13,4 - 22,9	1,46
Açúcares redutores (%)	76,75	61,39 - 83,72	2,76
Sacarose (%)	1,31	0,25 - 7,57	0,87
pH	3,91	3,42 - 6,10	-
Acidez total (meq/kg)	29,12	8,68 - 59,49	10,33
Proteína (mg/100g)	168,6 (0,1686%)	57,7 - 567 (0,0577 - 0,567%)	70,9

Há várias diferenças entre a composição química e as propriedades dos méis florais e do melato. O melato possui maiores quantidades de nitrogênio, em sua maior parte sob forma de aminoácidos. Também possui mais cinzas, mais sacarose, menos açúcares redutores e maior valor de pH que os méis florais. Quanto a presença de ácidos orgânicos, destaca-se o ácido cítrico. A quantidade de carboidratos é alta, assim como nos méis florais, porém estes são oriundos da seiva do floema das plantas ou da ação de enzimas do organismo de insetos (VARGAS, 2006). Tanto os méis florais como os de melato possuem uma grande variedade de substâncias orgânicas (**Figura 4**).

Os méis escuros possuem maior quantidade de minerais, uma média de 2.148 ppm, enquanto os méis claros possuem um total de apenas cerca de 461 ppm de minerais (NUNES, 2005), sendo o principal mineral encontrado o potássio. Estudos mostram que, além dos minerais, a quantidade de ácidos fenólicos em méis escuros tende a ser maior do que em méis claros, e estes também possuem em geral maior atividade antioxidante (FERREIRA *et al.*, 2009). Contrariamente, os méis claros são mais aceitos e mais valorizados no mercado. Comparando as diversas origens botânicas dos méis monoflorais, costuma haver uma predominância da coloração clara sobre a escura (MODESTA, 2007).

O mel também possui uma grande quantidade de compostos voláteis. Um dos principais é o 2-fenilacetaldéido, mas dependendo da fonte floral e das condições ambientais, há diversos outros compostos voláteis que influenciam no aroma do mel (OVERTON e MANURA, 1999).

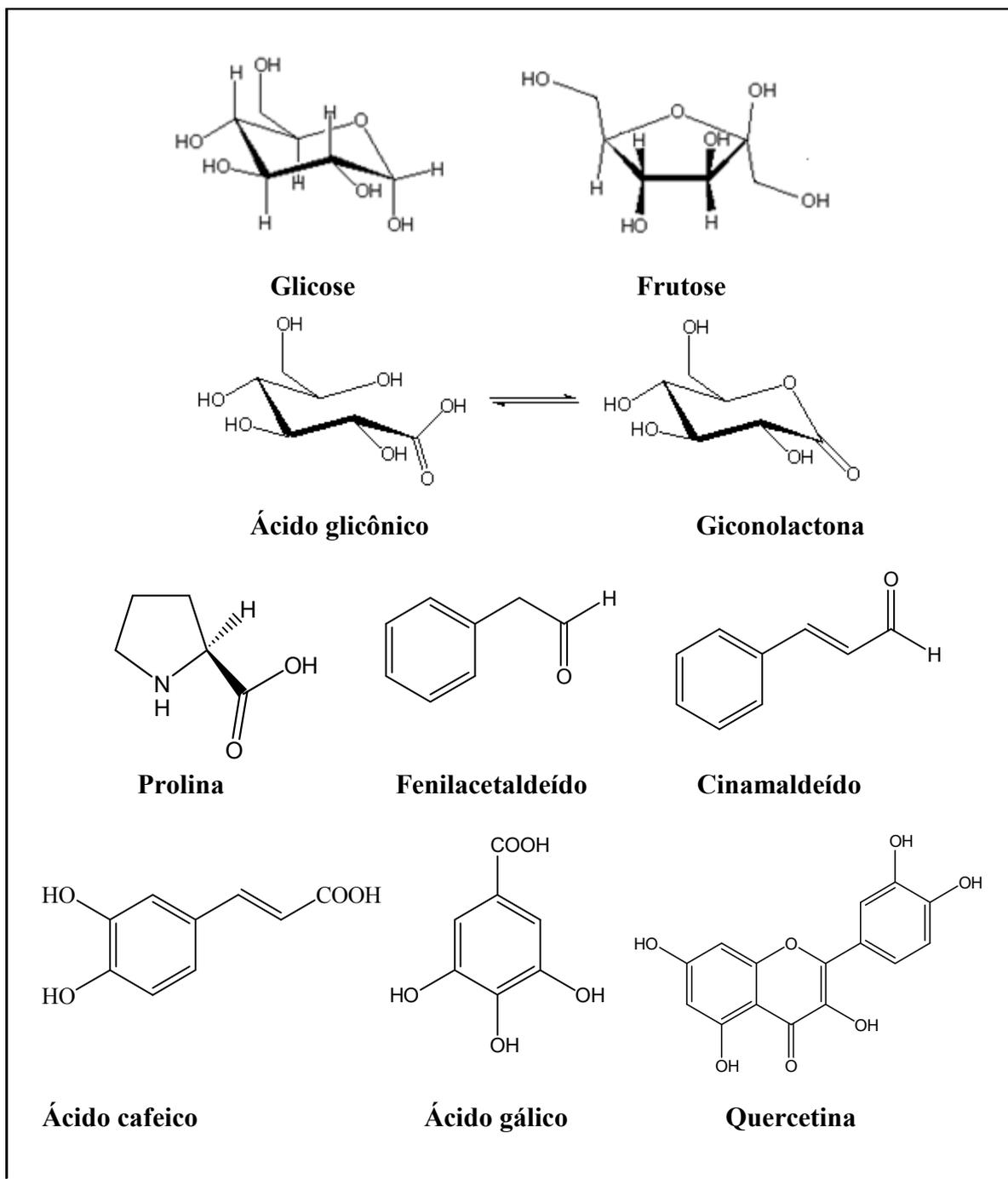


Figura 4: Exemplo de substâncias comumente presentes no mel (MOYNA, 1999; WOLSKI *et al.*, 2006)

O mel é um alimento bastante atrativo por proporcionar ao consumidor sabores e aromas únicos, sendo também um marco regional, despertando a curiosidade do consumidor em conhecer as características sensoriais de um mel de determinada região ou florada. Além da utilização como alimento, um dos maiores atrativos na comercialização de méis são suas

propriedades medicinais, que assim como as características organolépticas, podem sofrer grande variação de acordo com a região, época, clima ou florada.

É importante, portanto, haver a divulgação do conhecimento científico a respeito da imensa gama de utilizações populares que o mel apresenta, levando em consideração sua composição e variedades, a fim de valorizar ainda mais seu consumo e evitar sua utilização de forma inadequada.

1.3. Propriedades biológicas do mel

O mel é utilizado por diversas culturas, tanto na medicina tradicional como popular, sendo empregado com bons resultados no tratamento de queimaduras, distúrbios gastrointestinais, feridas infeccionadas e úlceras na pele (JALALI *et al.*, 2007; ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010).

Os antioxidantes naturais, especialmente os flavonóides, possuem uma grande variedade de aplicações biológicas, incluindo anti-inflamatória, anticancerígena, anti-alérgica, anti-trombótica e vasodilatadora. Flavonóides com atividade antimicrobiana também foram detectados em vários tipos de mel, como o canferol, quercetina, naringenina e pinocembrina, presentes, por exemplo, no mel de girassol (AL-MAMARY *et al.*, 2002; VIUDA-MARTOS *et al.*, 2008; PYRZYNSKA e BIESAGA, 2009).

Em um estudo realizado por SCHRAMM *et al.* (2003), foi demonstrado que o consumo de 1,5g de mel/kg de massa corporal aumentou significativamente o conteúdo total de fenólicos no plasma, assim como sua capacidade antioxidante e redutora.

Desde a antiguidade, há relatos da utilização do mel como antimicrobiano pelos egípcios, chineses, assírios, gregos e romanos. Mesmo após a II Guerra Mundial, o mel continuou sendo usado pelas suas propriedades antibacterianas no tratamento de feridas (KNOX, 2004). Essa utilização perdurou até a década de 1940, com a ascensão da produção industrial de antibióticos. Porém, com os atuais problemas de resistências de bactérias a antibióticos, a atividade antimicrobiana do mel voltou a ser um foco de atenção como uma possível alternativa (MOLAN, 2006).

A atividade antibacteriana mais estudada do mel é a ação da enzima glicose oxidase, que é introduzida no mel pelas abelhas. Esta enzima é praticamente inativa nos méis em seu estado natural, o que é causado pelo baixo pH (em média, 3,9). Esta enzima se torna ativa em méis diluídos, gerando a partir da glicose, o peróxido de hidrogênio e o ácido glicônico, sendo o peróxido de hidrogênio responsável por grande parte da atividade antibacteriana. Durante o

processo de maturação do mel (méis verdes), o peróxido de hidrogênio é capaz de impedir a ação microbiana até que a quantidade de água esteja baixa e a quantidade de açúcares alta, a ponto de impedir a proliferação de microrganismos (CARAVACA, 2009). A enzima catalase, no entanto, presente em alguns méis por ser oriunda do néctar de plantas, possui a atividade inversa, decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água, reduzindo assim, a ação antimicrobiana de determinados méis.

A acidez e o efeito hiperosmótico proporcionado pelo mel devido a sua baixa umidade promovem a desidratação de microrganismos, sendo também fatores que auxiliam na atividade antimicrobiana do mel (OLAITAN *et al.*, 2007; KWAKMAN *et al.*, 2010).

Em teste microbiológico feito contra *Staphylococcus aureus* realizado por BOGDANOV (1997), o mel de rape atingiu a melhor atividade, acima de 70% de inibição, seguida do mel de melato, dente-de-leão e lavanda, que atingiram porcentagem de inibição maior que 60%, tendo sido observado pelo autor que os méis com maiores quantidades de ácidos totais e livres apresentaram maior atividade. Os méis de melato são em geral bons agentes antibacterianos, antivirais e antifúngicos. O conteúdo de flavonóides e ácidos fenólicos também é em geral alto quando comparado a outros méis (OTILIA *et al.*, 2008).

Vários compostos naturais com atividade antimicrobiana também já foram identificados em diversos tipos de mel. O mel de manuka, por exemplo, de origem monofloral de *Leptospermum scoparium*, planta característica da Nova Zelândia, é conhecido por sua alta atividade antimicrobiana, havendo inclusive curativos comerciais a base deste mel (WOUND CENTRAL, 2007). Sua atividade antimicrobiana não está apenas relacionada a produção de peróxido de hidrogênio, mas também a componentes derivados da planta. O principal deles é o metilglioxal, que se origina das altas concentrações de diidroxiacetona presente no néctar das flores de manuka (ADAMS *et al.*, 2009). O metilglioxal é um intermediário da reação de Maillard entre a diidroxiacetona com aminoácidos e proteínas (**Figura 5**), como a glicina. Também pode ser formado diretamente pela diidroxiacetona fosfatase através da enzima metilglioxal sintase. Foi observado por HENRIQUES *et al.* (2010) que um acondicionamento deste mel a 37°C gerou um decréscimo do total de diidroxiacetona e um aumento considerável de metilglioxal.

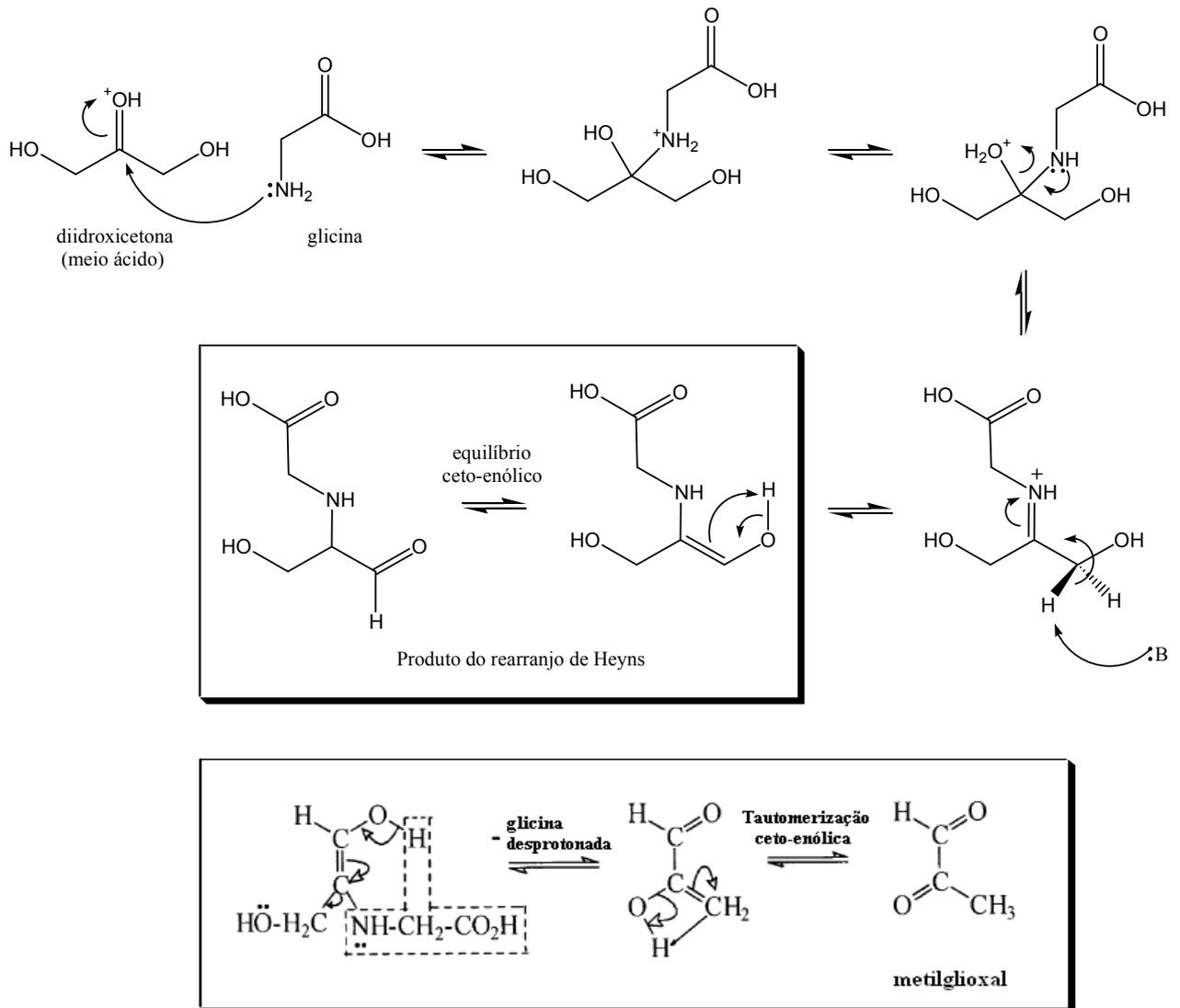


Figura 5: Mecanismo de formação do metilglioxal através da Reação de Maillard (adaptado de SHIPAR, 2006)

Outro fator que também promove a ação cicatrizante e antimicrobiana do mel é alta concentração de açúcares, que gera uma ação osmótica de retirada de fluidos das feridas, aumentando a diluição do mel (com isso aumentando também a geração de H_2O_2), tornando assim, o ambiente com umidade mais equilibrada. Isso auxilia na cicatrização e previne a aderência do curativo, com a vantagem do meio continuar muito concentrado para o desenvolvimento de microrganismos. A alta viscosidade, por sua vez, promove uma barreira contra infecções (MOLAN, 2006).

Pesquisas utilizando méis destilados (hidroméis) demonstraram que estes são comparáveis aos antimicóticos comerciais para a inibição de *Candida albicans*, e já foi demonstrado também que alguns tipos de méis possuem atividade contra dermatofitoses.

Outros estudos indicam atividade do mel contra diversas desordens oftalmológicas como blefarite, conjuntivite e queratite, sendo geralmente utilizado em forma de pomada. Ainda há várias outras atividades relatadas, como contra úlceras, gastrite e diarreia, pois além da sua atividade antimicrobiana, promove o reparo da mucosa intestinal, estimulando o crescimento de novos tecidos e funcionando como um agente antiinflamatório (NATIONAL HONEY BOARD, 2003; NAMIAS, 2003).

Na Alemanha, o mel tem sido aplicado com injeções intravenosas, e tem substituído a glicose no tratamento de cardíacos, tendo também aplicações contra insuficiências coronárias, miocardites, arritmias e angina (MASSON, 1986). Também já foi relatada atividade oral e intravenosa contra pneumonia (ABDULRHMAN, 2008) e na melhoria das funções hepáticas e renais, causando menor hiperglicemia do que com o uso de dextrose, em teste realizado com carneiros (AL-WAILI, 2003).

O mel também possui atividade contra o escurecimento de frutas e vegetais, na deterioração oxidativa e no controle de crescimento de patógenos em alimentos, devido a certos compostos presentes, como o α -tocoferol, ácido ascórbico, flavonóides e outras substâncias fenólicas, além de enzimas, como a glicose oxidase, catalase e peroxidase. Muitas dessas substâncias possuem atividade antioxidante e inibem a ação da polifenol oxidase, ou tirosinase, enzima responsável pelo escurecimento de alimentos. O mel tem sido estudado como uma alternativa ao uso de sulfitos no controle do escurecimento de alimentos e no processamento de certos alimentos como uvas passas claras, maçã e sucos (CHEN *et al.*, 2000).

O mel também possui algumas aplicações industriais, sendo utilizado, para estes fins, geralmente os méis mais escuros, que não são tão apreciados pelos consumidores. Uma de suas maiores utilizações é na indústria de cosméticos, sendo incorporado a diversos produtos para agregar valores desejáveis aos consumidores, como a umectância (HOWARD, 2005).

Uma de suas recentes aplicações industriais é como catalisador na síntese de nanopartículas de metais como ouro e prata, sendo utilizado como material de partida o ácido cloroáurico (HAuCl_4) e nitrato de prata (AgNO_3), respectivamente. Ao ser adicionada uma base ao sistema, esta promove a abertura da cadeia dos açúcares redutores através da abstração do hidrogênio alfa ao oxigênio do anel e os íons metálicos oxidam a glicose ao ácido glicônico. Com a adição progressiva de base, há um aumento do pH e mais ácido glicônico é produzido através da glicose (**Figura 6**), o que promove uma redução rápida dos íons de ouro ou prata, formando um grande número de nanopartículas muito pequenas (PHILIP, 2010). A aplicação do mel como catalisador promove uma “química verde”, menos

poluente e mais econômica que os outros métodos de síntese de nanopartículas (PHILIP, 2009).

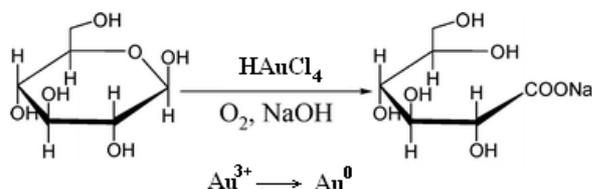


Figura 6: Redução dos íons AuCl_4^- a Au^0 (adaptado de LIANG *et al.*, 2008)

O mel também tem sido estudado por sua ação anticorrosiva. A maior parte das substâncias anticorrosivas tem estruturas que apresentam funções polares com átomos de nitrogênio, enxofre ou oxigênio, sendo a maioria destas substâncias tóxicas aos seres humanos e ao ambiente, e a síntese é muitas vezes cara, assim o mel seria uma alternativa eficiente, não-tóxica e de mais baixo custo. Há publicações recentes que relatam uma boa capacidade anticorrosiva do mel em superfície de cobre (EL-ETRE e ABDALLAH, 2000) e liga de aço-carbono em várias soluções, bem como em liga metálica de Al-Mg-Si (alumínio-magnésio-silício) em água do mar (ROSLIZA *et al.*, 2010).

Em um estudo feito por RADOJCIC *et al.* (2008), foi feita a comparação da atividade anticorrosiva do mel de acácia, de coloração clara, e o mel de castanha, de coloração escura, em superfície de estanho. O mel de castanha apresentou maior atividade anticorrosiva, e também maior concentração de flavonóides, tendo a miricetina em quantidade significativa, ao contrário do mel de acácia, que não apresentou este flavonóide em sua composição. Foi concluído que diversos compostos contendo oxigênio (polifenóis) podem ser adsorvidos no metal corroído (**Figura 7**), e como a miricetina presente no mel de castanha possui seis grupos hidroxila eletrodoadores, há a tendência de aumentar o efeito de inibição da corrosão ao formar quelatos com os cátions metálicos.

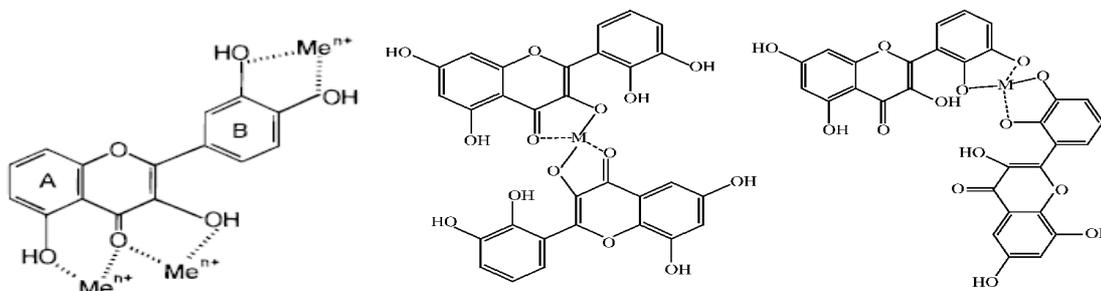


Figura 7: Quelatos de íons metálicos com flavonóides (VANKAR *et al.*, 2009; PIETTA, 2000)

Outra aplicação industrial é a utilização como flavorizante de tabaco, pois ajuda a neutralizar o sabor amargo do cigarro. Em contrapartida, durante a queima dos açúcares há a geração de substâncias dicarbonílicas, que se ciclizam formando derivados de furano, como o 5-hidroximetilfurfural (HMF), que fica presente na fumaça gerada, prejudicando a saúde do usuário e das pessoas ao redor (TALHOUT *et al.*, 2006).

Apesar das várias propriedades benéficas de méis de diversas origens florais, o mel oriundo do néctar de plantas da família *Rhododendron*, como *R. luteum*, *R. ponticum* e *R. simsii*, chamado de “mel bravo”, pode causar certos efeitos colaterais como arritmia cardíaca, hipotensão e problemas respiratórios, por conter em sua composição uma neurotoxina chamada grayanotoxina ou rhodotoxina, substâncias presentes nas folhas e flores destas plantas, que crescem em algumas áreas montanhosas da Turquia, Japão, Brasil e alguns lugares da América do Norte e Europa (DUBEY *et al.*, 2009).

O mel também tem sido identificado como uma das maiores fontes de intoxicação alimentar por *Clostridium botulinum*, bactéria causadora do botulismo (RAGAZANI *et al.*, 2008). Segundo o Informe Técnico da ANVISA n° 37/2008, por conta da contaminação de cerca de 16% do mel brasileiro com esta bactéria, deve ser evitada a administração de mel a crianças menores de um ano, que são mais suscetíveis ao desenvolvimento da doença, devido a imaturidade da flora intestinal. Há méis comercializados que são previamente tratados com irradiação-gama, este processo mata os esporos sem comprometer a atividade antimicrobiana do mel (MOLAN, 2001).

Como qualquer outro alimento, é necessário um controle de qualidade do mel para se evitar intoxicações ou ingestão de um produto cuja composição química ou aspectos sanitários estejam fora dos padrões.

1.4. Alguns aspectos de qualidade do mel

Devido ao medo de comprar méis adulterados, muitos consumidores tendem a comprar o mel diretamente do produtor, ou recorrem a métodos empíricos e populares para identificar a pureza do mel, com falsos mitos como a crença de que o mel puro não cristaliza. A adulteração é realizada em função do alto custo, da facilidade e da impunidade no país. A adulteração do mel é geralmente feita com a adição de outros carboidratos, como a glicose comercial, solução de sacarose ou sacarose invertida, proveniente de cana ou milho. Atualmente, há inclusive adulteradores que incluem pólen, corantes e aromatizantes, a fim de tentar burlar os consumidores e os métodos de controle de qualidade (VARGAS, 2006). Outro

problema tem sido a contaminação de méis com antibióticos usados no tratamento de doenças das abelhas (BOGDANOV *et al.*, 2008).

Vários aspectos da qualidade do mel são influenciados pela fonte de néctar, como a composição de açúcares, acidez, sabor e odor (SANDE *et al.*, 2009). Apesar das características dos méis dependerem, em grande parte, da origem floral e geográfica, certos aspectos de sua composição química e alguns parâmetros físicos possuem intervalos aceitáveis, permitindo a realização de análises para seu controle de qualidade.

Segundo resolução da ANVISA (1978), o mel não pode conter substâncias estranhas a sua composição normal, nem é permitida a adição de corretivos de acidez. É permitido o aquecimento do mel até o limite de 70 °C, desde que seja mantida sua atividade enzimática. Pode apresentar-se parcialmente cristalizado e não apresentar caramelização, nem espuma superficial. Também é proibida a adição de corantes, aromatizantes, espessantes, conservantes e edulcorantes de qualquer natureza, naturais ou sintéticos.

As soluções de mel em geral apresentam rotação levógira devido a presença da frutose, enquanto a sacarose utilizada na falsificação do mel é dextrógira. É possível, portanto, avaliar a concentração de sacarose no mel através da medição da rotação da luz polarizada. A concentração de sacarose presente no mel deve ser baixa, com um limite de 6% para os méis florais e 15% para melato. Um teor de sacarose superior ao aceito pode indicar também uma colheita prematura, na qual ainda não houve conversão deste açúcar a glicose e frutose pela ação da enzima invertase (BOGDANOV, 2009).

O conteúdo de água do mel pode ser avaliado por refratometria, e caso exceda o limite de 20% é considerado inadequado para consumo, pois o alto conteúdo de água pode levar a sua fermentação (ANACLETO *et al.*, 2009). No entanto, há uma correlação positiva entre a quantidade de água presente no mel e a atividade antioxidante. Em um estudo realizado por FRANKEL *et al.* (1998) com méis de diferentes origens florais, a atividade antioxidante aumentou com a intensidade da coloração e também com o teor de água do mel, possivelmente devido ao maior acúmulo de substâncias fenólicas hidrossolúveis.

O mel tende a cristalizar a temperaturas baixas ou quando é submetido à agitação. A temperatura de 14 °C é a que mais favorece a cristalização, pois até esta temperatura há o aumento da supersaturação da glicose no mel, aumentando a força motriz e, portanto, o crescimento dos cristais de glicose. Porém, quando a temperatura é ainda mais reduzida, a viscosidade do mel aumenta de forma que afeta a difusão da dextrose e, dessa forma, há um retardo na formação dos cristais (YONG, 2003).

Temperaturas acima de 27°C previnem a cristalização, mas aumentam as possibilidades de desenvolvimento de microrganismos, além de poder começar a degradar o mel. O maior problema da granulação do mel é o favorecimento à fermentação, pois ao precipitar, a glicose perde água, se transformando em monoidrato de glicose, assumindo a forma de cristal. A precipitação da glicose gera um aumento do teor de umidade da fase líquida, tornando o ambiente mais favorável ao desenvolvimento de microrganismos (VARGAS, 2006). A cristalização também promove uma mudança na coloração do mel, que se torna mais claro devido a coloração branca dos cristais de glicose que vão sendo formados (OLAITAN *et al.*, 2007).

Outro fator que controla o desenvolvimento de microrganismos no mel, e que também é utilizado como parâmetro de qualidade apesar de não estar presente na legislação brasileira na avaliação da qualidade do mel, é a medição da atividade de água (A_w), sendo seu valor relacionado à quantidade de água na forma livre. A atividade de água se difere da umidade por estar relacionada diretamente a quantidade de água na forma livre, ou seja, fracamente associada a outras substâncias. O mel pode apresentar teor de umidade dentro dos padrões legais (20%), mas sua atividade de água (A_w) pode estar fora do padrão geralmente aceitável de água livre (0,600), ou vice-versa. Uma amostra pode ter, por exemplo, uma baixa quantidade de água total, mas a maior parte dessas moléculas de água estar na forma dissociada, realizando pouca interação de hidrogênio com outras substâncias. Esta amostra, portanto, terá um alto valor de atividade de água apesar de sua baixa umidade. A avaliação da atividade de água é muito importante no controle da qualidade do mel, pois a água nessa forma livre pode ser mais facilmente utilizada por microrganismos, facilitando sua proliferação.

A atividade de água (A_w) do mel deve se apresentar abaixo de 0,600, sendo o mel, portanto, classificado como um alimento de baixa umidade, assim como os alimentos desidratados. Apesar da baixa atividade de água não significar a destruição de microrganismos, a possibilidade de crescimento microbiano costuma cessar nos alimentos quando a A_w está abaixo deste limite (VARGAS, 2006), devido à tendência de desidratação das células dos microrganismos através da osmose (EL-SABBAHY, 2008).

Um fator que auxilia o mel a estar na faixa adequada de atividade de água é a sua alta concentração de carboidratos, que possui uma boa ação umectante, ou seja, sua capacidade de se ligar à água do meio é alta, reduzindo o teor de água livre (SERAVALLI e RIBEIRO, 2007).

O principal constituinte secundário do mel é o HMF, uma substância de cor avermelhada que é usado como um indicador de aquecimento e armazenamento incorreto do mel, sendo no Brasil aceito o limite de 60 mg/kg (BRASIL, 2000).

A coloração do mel parece estar principalmente relacionada aos compostos orgânicos formados através de reações de escurecimento enzimático e não enzimático. A oxidação de substâncias fenólicas, pela enzima polifenoloxidase (PPO), proporciona a formação de quinonas instáveis, que podem sofrer reações de polimerização (**Figura 8**), ocasionando a produção de melanoidinas, que são pigmentos com coloração que varia de marrom a preto e possuem atividade antibacteriana e antifúngica. Porém, nem todos os compostos fenólicos são substratos para essa enzima (SAJJAANANTAKUL e RUANGCHAKPET, 2007; BEKEDAM, 2008; NUNES e COIMBRA, 2010).

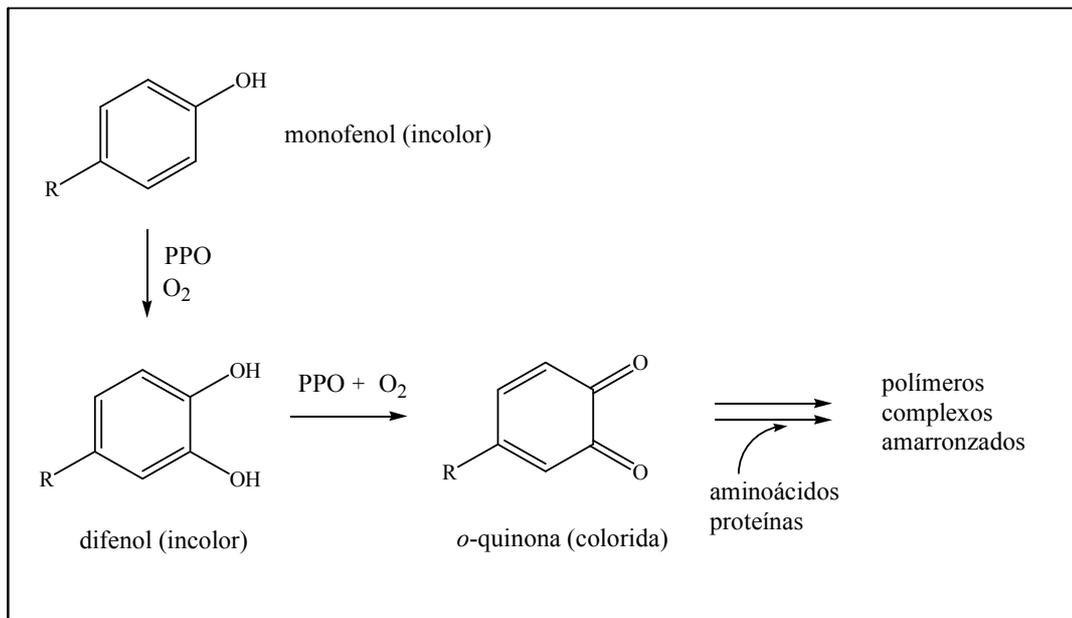


Figura 8: Formação de polímeros coloridos a partir de substâncias fenólicas (adaptado de <http://class.fst.ohio-state.edu/fst605/605p/Maillard.pdf>)

Um dos tipos de escurecimento não enzimáticos mais conhecidos é a reação de Maillard, caracterizada pela condensação entre o grupo carbonila de um açúcar redutor com o grupamento amina de um aminoácido ou proteína que, após desidratação, sofre rearranjo formando os compostos de Amadori, como o 1-amino-1-desoxi-*D*-frutose (frutosamina), no caso da glicose como açúcar de partida (**Figura 9**).

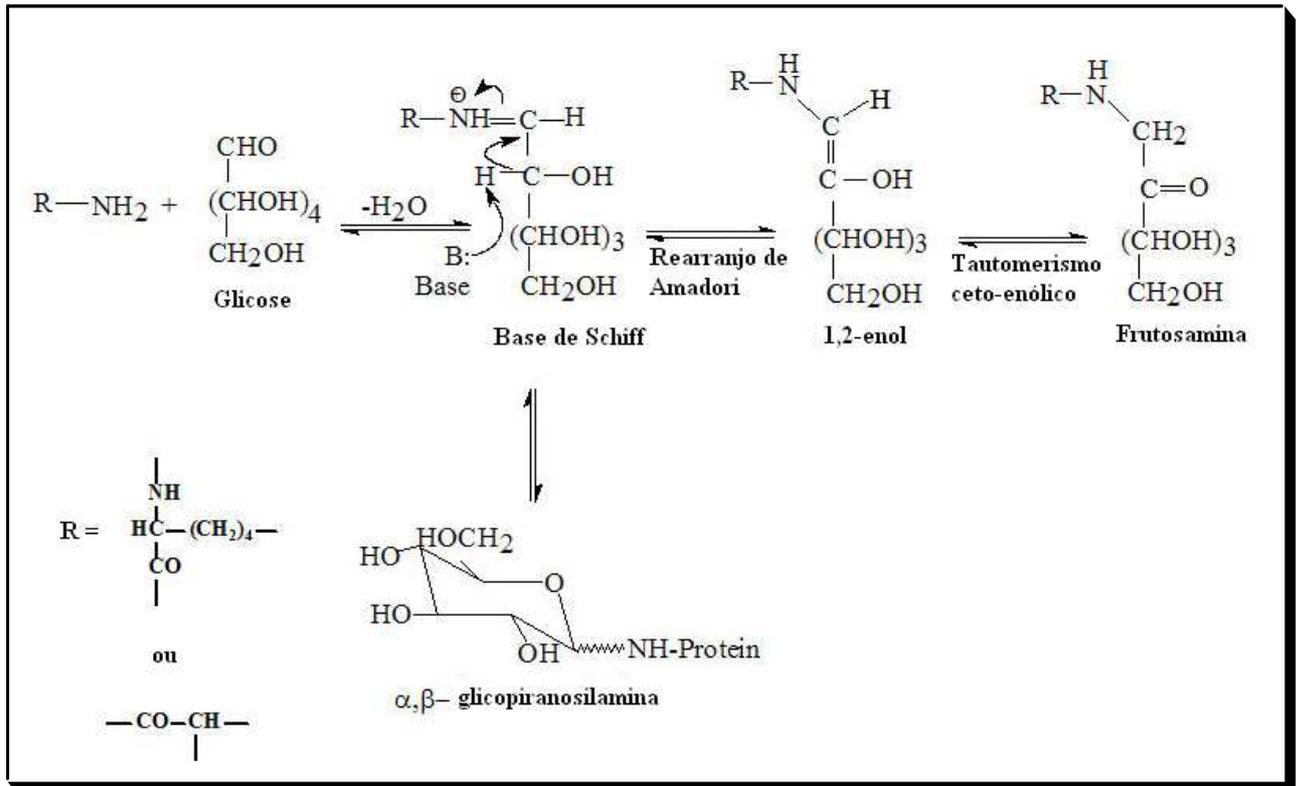


Figura 9: Formação de frutosamina a partir da glicose, através do rearranjo de Amadori (adaptado de AYDA, 2007)

Os compostos de Amadori são os primeiros intermediários da seqüência de reações de escurecimento, e também na geração de produtos como o HMF, que conforme mencionado, é utilizado no controle de qualidade do mel. Se essas substâncias estiverem em meio menos ácido (pH >5), tendem, assim como os compostos fenólicos, a se polimerizarem formando melanoidinas e aumentando assim o escurecimento do alimento (FENNEMA *et al.*, 2010).

As reações de Maillard são favorecidas principalmente pelo aquecimento. O mel, por ser rico em açúcares redutores, ter baixo pH, baixa umidade e possuir alguns aminoácidos em sua composição, é um alimento bastante susceptível a formação dessas substâncias, principalmente nas regiões mais quentes do Brasil. Em diversos alimentos esta reação é desejável, por ser responsável por aromas agradáveis, como durante o aquecimento do café e da carne. Quanto ao mel, a presença destes compostos é indesejável, pois é comum sua associação com um estoque inadequado a temperaturas altas, que pode acarretar na degradação de alguns outros constituintes presentes no mel, principalmente as substâncias voláteis.

Apesar de ser utilizado como indicativo de qualidade, a determinação do teor de HMF não pode ser um parâmetro único para avaliação da pureza do mel, pois a utilização de

açúcares não-redutores, como a sacarose, inibe a reação de Maillard. Dessa forma pode haver méis adulterados com xaropes com teores muito baixos de HMF. Apesar de ser considerado carcinogênico, não há indícios que esta substância se apresente no mel em quantidades que possam causar danos à saúde humana (MAKAWI *et al.*, 2009), estando em vários outros alimentos em quantidades iguais ou muito superiores, como em biscoitos (3,1 a 182,5 mg/kg) (DELGADO-ANDRADE *et al.*, 2009) e geléias (26,1 a 807 mg/kg) (MAKAWI *et al.*, 2009), alimentos que não sofrem a exigência do limite de HMF imposto ao mel e são consumidos com muito mais frequência.

A atividade de água (A_w) também influencia nos teores de HMF e outros produtos derivados da reação de Maillard. Em A_w maior que 0,90, a velocidade da reação costuma diminuir por conta da diluição, e em A_w menor que 0,25 a velocidade tende a zero, devido a quantidade de solvente insuficiente para haver a movimentação e o encontro das moléculas dos reagentes. É observado que nos alimentos com faixa de atividade de água entre 0,5 e 0,8, como é o caso dos méis, há uma maior tendência ao escurecimento por conta desse favorecimento das reações de Maillard (SERAVALLI e RIBEIRO, 2007).

Há alguns tratamentos que podem ser utilizados em alimentos com a finalidade de reduzir a geração de compostos de Maillard. Um exemplo é a adição de açúcares não redutores ou a diminuição dos teores de açúcares redutores por tratamento com enzima, sendo em geral, nesse caso, adicionada a glicose oxidase para converter a glicose em ácido glicônico, reduzindo assim a possibilidade de conversão a produtos de Maillard. Também pode ser adicionado dióxido de enxofre (SO_2), que atua como um inibidor, bloqueando a reação da carbonila dos carboidratos com o grupo amina dos aminoácidos através da formação de sulfonatos (SERAVALLI e RIBEIRO, 2007). Porém, no caso do mel, para ser classificado como puro, não deve haver a adição de nenhuma dessas substâncias (BRASIL, 2000).

Os ânions como citrato, fosfato e íons metálicos são catalisadores da reação de Maillard, o que é também uma possível causa do escurecimento de méis, pois conforme citado anteriormente, méis escuros possuem uma quantidade bastante superior de minerais.

As enzimas presentes no mel também podem ocasionar transformações nas características físico-químicas e nutricionais do mel, dependendo das condições de armazenamento. A quantificação da enzima diastase (α -amilase) é bastante utilizada nas avaliações físico-químicas do mel, e é recomendado pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 2000), em geral o valor mínimo de 3 de atividade diastásica na escala de Göthe, pois um baixo índice é uma indicação de superaquecimento, e também um

possível indicador de adulterações. Sendo esta enzima produzida pelas abelhas e transferida ao néctar, não está presente nas preparações de açúcar invertido, sendo assim a adição destes xaropes ao mel diminui o índice de diastase. O índice de diastase é expresso como volume (mL) de solução de amido a 1% hidrolisado pela enzima em 1g de mel, e os valores são medidos através da escala de Göthe, podendo variar de 1 a 50 (LOTHROP e PAINE, 1931).

O teor de sólidos insolúveis é tido como um fator de controle higiênico. Estes correspondem às impurezas como resíduos de cera, patas, asas de abelhas e outros elementos inerentes ao processamento do mel. Apesar do limite permitido de sólidos insolúveis ser de apenas 0,1%, no caso de méis prensados é tolerável, segundo a legislação nacional, uma quantidade de até 0,5% (**Tabela 4**). O teor de cinzas também permite detectar algumas irregularidades. Um alto teor de cinzas pode indicar falta de higiene e/ou a não decantação ou filtração no final do processo de retirada do mel (MENDES *et al.*, 2009).

Tabela 4: Composição físico-química do mel de flores e melato, para *Apis Mellifera* *

	Mel de flores	Mel de melato
Umidade máxima	20%	20%
Açúcares redutores (mínimo)	65%	60%
Sacarose (máximo)	6%	15%
Cinzas (máximo)	0,6%	1,2%
HMF (máximo)	60 mg/kg	60 mg/kg
Acidez (máxima)	50 meq/kg	50 meq/kg
Atividade diastásica	Mínimo de 8 na escala de Göthe (méis com baixo conteúdo enzimático)	
	Mínimo de 3 na escala de Göthe (méis com HMF até 15mg/kg)	
Sólidos insolúveis (máximo)	0,1%	0,1%

*Instrução Normativa nº 11, 20/10/2000

O mel também pode ter sua qualidade influenciada pela localização geográfica. Tendo em vista que as abelhas adaptam seus esforços e o tempo de vôo de acordo com a distância da fonte do néctar, a proximidade e disponibilidade de espécies vegetais florais ou extraflorais são itens que contribuem para a qualidade do mel. Em um estudo feito por SANDE *et al.* (2009), pela primeira vez foi avaliada a qualidade de méis provenientes de diferentes regiões, classificados de acordo com a proximidade florestal. A atividade da abelha na produção de mel demonstrou-se maior em áreas próximas a florestas, promovendo melhores rendimentos e méis de qualidades superiores, apresentando, por exemplo, menores teores de HMF e maiores quantidades de açúcares.

Quanto ao acondicionamento do mel, os recipientes de vidro são os mais apropriados devido a sua composição. Os silicatos de sódio e cálcio, que fazem parte de 75% destes

recipientes, e os demais óxidos proporcionam uma maior resistência ao impacto e ao aquecimento, formando uma barreira contra os raios luminosos sobre o produto (OSACHLO, 2004).

1.5. Substâncias fenólicas e suas atividades antioxidantes

As substâncias fenólicas, ou polifenóis, se encontram distribuídos largamente no reino vegetal, especialmente nas frutas e verduras, assim como no café, chocolate, vinho, mel e outros insumos, que fazem parte habitualmente da dieta humana. Uma das razões pelas quais essas substâncias tem sido alvo de grande interesse é a sua atividade antioxidante, que depende principalmente de sua capacidade de reduzir radicais livres e quelar metais, impedindo as ações danosas causadas por esses radicais, como, por exemplo, a oxidação lipídica (**Figura 10**).

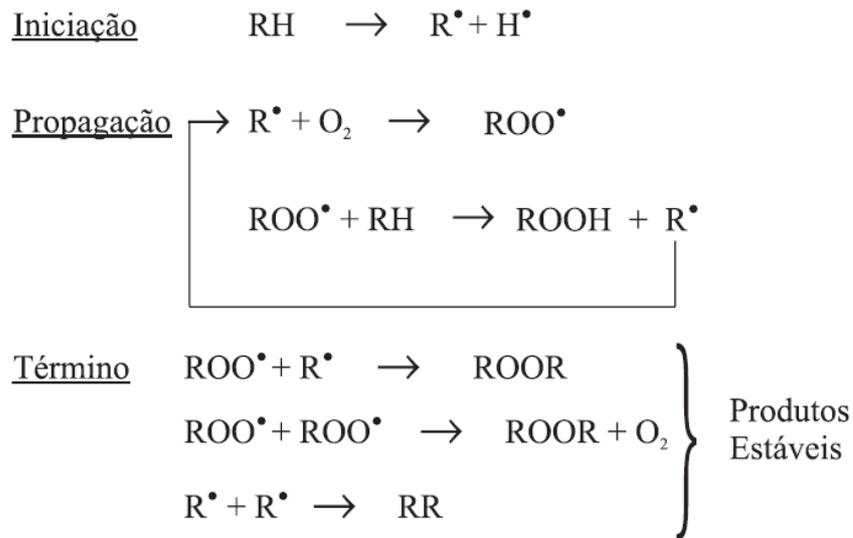


Figura 10: Mecanismo de oxidação lipídica provocada por radicais livres, onde: RH = ácido graxo insaturado; R^\bullet = radical livre; ROO^\bullet = radical peróxido; ROOH = hidroperóxido (RAMALHO e JORGE, 2006)

Os antioxidantes são substâncias que podem interromper reações radiculares, retardando ou prevenindo o estresse oxidativo. Eles combatem esses radicais através de uma reação de óxido-redução, na qual a substância antioxidante (**AH**) doa um elétron ou hidrogênio para o radical (R^\bullet), e passa a ser a substância radicalar (A^\bullet), porém de maior estabilidade, e assim, de natureza não tóxica e que em alguns casos pode ser regenerado pela ação de outros antioxidantes (**Figura 11**). Desta maneira, os antioxidantes podem interromper as reações de propagação e inibir a oxidação de moléculas evitando a alteração do

funcionamento normal da célula (AL-MAMARY *et al.*, 2002; SERAVALLI e RIBEIRO, 2007).

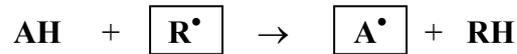


Figura 11: Reação geral de oxido-redução de uma substância antioxidante

Assim, uma substância é considerada antioxidante quando cumpre pelo menos, uma das seguintes propriedades: (i) elimina as espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou outras espécies reativas; (ii) diminui a disponibilidade de espécies pró-oxidantes; e (iii) protege moléculas da oxidação.

Existem inúmeras formas de classificar os antioxidantes. As mais utilizadas são a classificação segundo sua natureza enzimática e não enzimática (**Tabela 5**), e segundo o mecanismo de ação pelo qual atuam: (i) de maneira preventiva (impedem a formação de radicais e seqüestram metais do meio); (ii) diminuindo a quantidade de radicais do meio e interrompendo as reações em cadeia; (iii) reparando e reconstituindo os danos que os radicais podem provocar (EIRIN, 2009; JEREZ *et al.*, 2007).

Tabela 5: Principais sistemas antioxidantes do organismo (EIRIN, 2009)

Antioxidantes enzimáticos	Função
---------------------------	--------

Superóxido dismutase (SOD)	Eliminação do radical superóxido
Catalase	Eliminação de hidroperóxidos
Glutaciona peroxidase (GPx)	Eliminação de hidroperóxidos
Glutaciona redutase (G_{Red})	Redução de glutaciona oxidado
Glutaciona-S-transferase (GST)	Eliminação de peróxidos lipídicos
Metionina sulfóxido redutase	Reparação de resíduos oxidados de metionina
Peroxidase	Decomposição de H ₂ O ₂ e peróxidos lipídicos
Antioxidantes não enzimáticos	
Glutaciona reduzida (GSH)	Substrato das enzimas GPx e GST e seqüestrador
Ácido úrico	Seqüestrador de oxigênio singleto e radicais
Albumina	Atividade peroxidase na presença de GSH
Bilirrubina	Captação de radicais peroxila
Lactoferrinas, transferrinas	Fixação de grupos hemo. Inibição da reação de
Glicose, manose e manitol	Inativa os radicais (HO [•] , O ₂ ^{•-})
Ubiquinol (Coenzima Q)	Seqüestrador de radicais livres
Ácido α - lipóico	Seqüestrar HO [•] , O ₂ ^{•-} e H ₂ O ₂
Antioxidantes não enzimáticos	
Ácido ascórbico (vit. C)	Regeneração de tocoferol e inativação de radicais
α - tocoferol (vit. E)	Proteção de membrana e inativação do HO [•]
Substâncias fenólicas	Seqüestro de radicais e atividade quelante de

Os radicais são seqüestrados e destruídos por enzimas específicas, como superóxido dismutase, catalase e glutaciona peroxidase, protegendo os sistemas biológicos do estresse oxidativo. A superprodução de radicais livres, junto com avitaminoses A, C e E e um nível reduzido das enzimas citadas, contribui para o estresse oxidativo, pois esses radicais ou espécies reativas de oxigênio (EROs) podem induzir danos oxidativos em biomoléculas como carboidratos, proteínas, lipídios e DNA, acelerando assim o envelhecimento cutâneo e de membranas lipídicas, e contribuindo para a indução de câncer, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamações (BANERJEE e DASGUPTA, 2005; CERQUEIRA *et al.*, 2007).

As EROs participam da iniciação e progressão das reações em cadeia envolvendo a formação de espécies radicalares. A reatividade destes compostos com biomoléculas é variável, sendo alguns estáveis e pouco reativos, como por exemplo, o radical superóxido, O₂^{•-}, e outros altamente reativos, apresentando velocidade de reação próxima à constante de colisão com moléculas-alvo, sendo o radical hidroxila, HO[•], o principal exemplo.

Várias fontes de antioxidantes naturais são conhecidas e algumas são amplamente encontradas no reino vegetal. Diversos extratos de plantas ou outros produtos naturais têm sido estudados devido ao poder antioxidante, que pode ser atribuído ao seu conteúdo de substâncias fenólicas (LUZIA e JORGE, 2009; GALVÃO *et al.*, 2008; JARDINI e MANCINI FILHO, 2007; ANGELO e JORGE, 2007).

A presença de substâncias fenólicas antioxidantes em produtos alimentícios vem sendo explorada pelas empresas por conta do interesse dos consumidores nos potenciais benefícios à saúde gerados pela presença dos antioxidantes na dieta.

A oxidação de substâncias orgânicas é uma das principais causas da redução da vida de prateleira de diversos produtos alimentícios. As principais reações de oxidação que ocorrem nestes produtos são o escurecimento enzimático e a oxidação de lipídeos (DEGÀSPARI e WASZCZYNSKYJ, 2004). A utilização de antioxidantes, além de retardar o processo oxidativo, protege carotenóides, vitaminas A e D e outros ingredientes insaturados. Na indústria de alimentos, estas reações são inibidas por seqüestradores de radicais livres, sendo os mais utilizados o butil-hidroxianisol (**BHA**), butil-hidroxitolueno (**BHT**), *terc*-butil-hidroquinona (**TBHQ**) e galato de propila (**PG**), **Figura 12**.

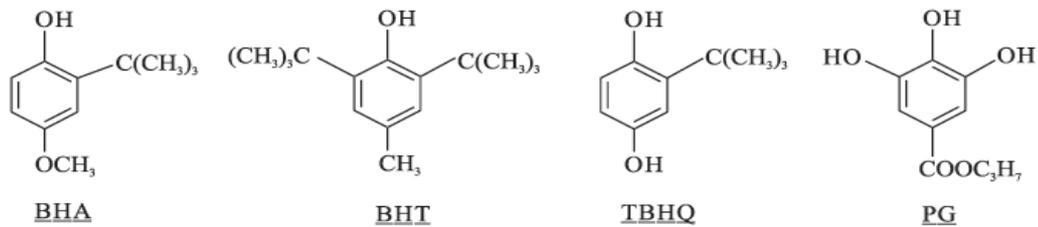


Figura 12: Exemplos de antioxidantes sintéticos comumente utilizados (adaptado de RAMALHO e JORGE, 2006)

A partir do início da década de 80, devido a estudos toxicológicos que mostraram as possibilidades destas substâncias apresentarem efeitos tóxicos no organismo, como influência no peso do fígado e aumento do retículo endoplasmático, passaram a ser avaliados produtos naturais que pudessem substituir ou reduzir a quantidade destes antioxidantes sintéticos em alimentos (SOARES, 2002).

A diversidade estrutural das substâncias fenólicas é resultado da grande variedade de combinações que acontece no processo da biossíntese e as substâncias resultantes são chamadas de polifenóis. Estas combinações fenólicas podem ser divididas em várias classes, como mostradas na **Tabela 6**. Dentre os fenólicos, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (HARBORNE *et al.*, 1999).

Tabela 6: Classes de substâncias fenólicas encontradas em plantas

Classe	Representação Estrutural
--------	--------------------------

Fenólicos simples, benzoquinonas	C ₆
Ácidos hidroxibenzóicos	C ₆ -C ₁
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C ₆ -C ₃
Nafitoquinonas	C ₆ -C ₄
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbenos, antoquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonóides, isoflavonóides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignanas, neolignanas	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonóides	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n
Taninos condensados	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

As substâncias fenólicas têm sido muito estudadas por sua ampla atividade farmacológica e nutricional. Estas substâncias conferem a diversos alimentos propriedades como cor, adstringência e aroma, englobando desde moléculas simples, até aquelas com alto grau de complexidade. Dentre as substâncias fenólicas amplamente encontradas na natureza, destacam-se os flavonóides, cumarinas e os ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico, e seus derivados), que tem se mostrado bastante eficientes e de grande influência na qualidade de alimentos (SOARES, 2002; ANGELO e JORGE, 2007).

Os flavonóides são polifenóis, constituídos por um núcleo flavona (2-fenilbenzopirano), que possuem quinze átomos de carbono em seu núcleo fundamental (C₆-C₃-C₆), sendo formados através do metabolismo secundário das plantas. São largamente distribuídos no reino vegetal, estando presentes em diversos alimentos, flores, folhas e sementes.

A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 13).

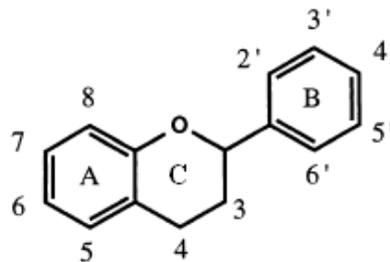


Figura 13: Estrutura básica de flavonóides (ACKER *et al.*, 1998)

O anel aromático A é derivado biossinteticamente da via do acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina (HARBONE *et al.*, 1999). Variações quanto a

substituição e ao nível de oxidação do anel C resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas (**Figura 14**). Estas substâncias possuem uma importante atividade na inibição de doenças como câncer (GATES *et al.*, 2007), problemas cardiovasculares (HOOPER *et al.*, 2008), doenças neurodegenerativas (NAKAJIMA *et al.*, 2007; MANDEL *et al.*, 2008) e na prevenção do envelhecimento (SCHMID *et al.*, 2008), pois são capazes de reduzir radicais oxidantes como superóxido, peroxila, alcoxila e hidroxila (PIETTA, 2000).

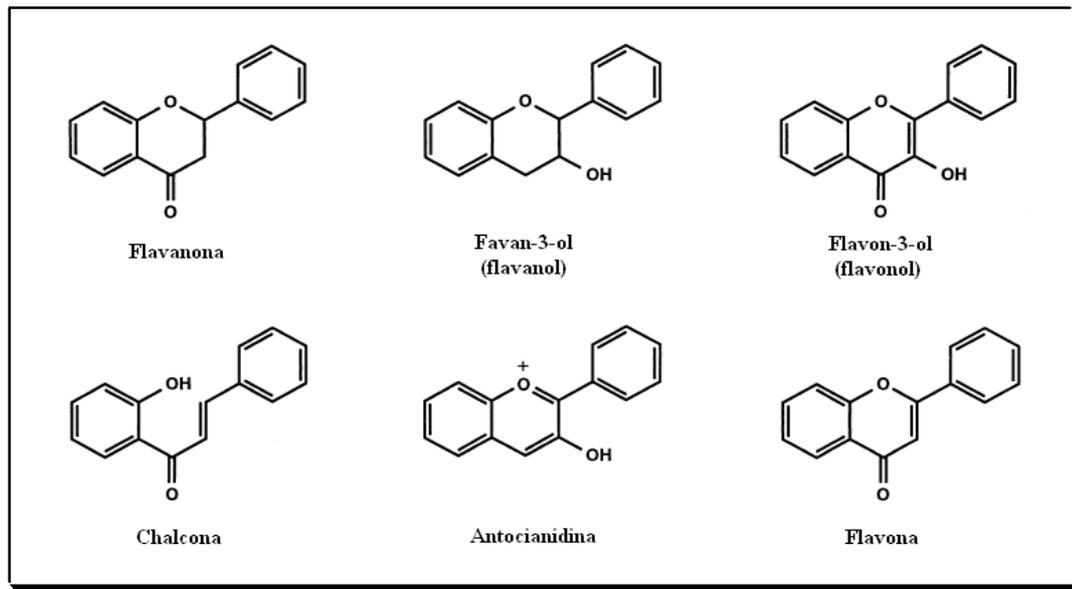
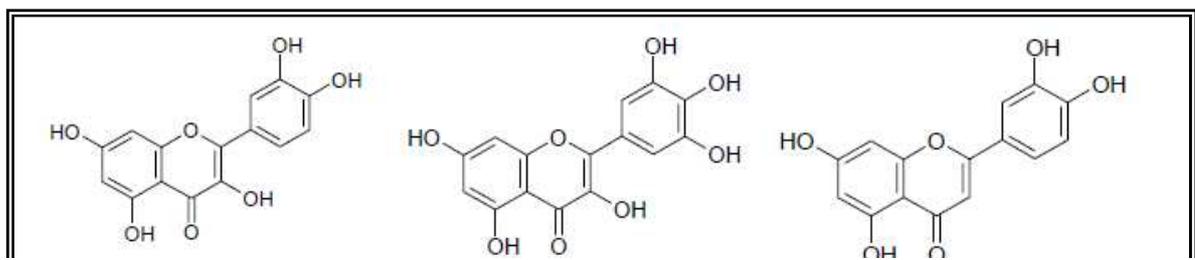


Figura 14: Subclasses da família dos flavonóides, diferenciadas pela estrutura do anel C (adaptado de ACKER *et al.*, 1998)

Os flavonóides, além de se diferenciarem pelo anel C, podem ser encontrados na forma não glicosilada, como, por exemplo, a quercetina, miricetina e luteolina (**Figura 15**) ou na forma glicosilada, unidos a moléculas de açúcares, como ramnose ou rutinose (três moléculas de *D*-glicose), ligadas nas posições 3 (anel C) ou 7 (anel A), como, por exemplo, a isoquercetrina e rutina (**Figura 16**).



Quercetina
(Flavonol)

Miricetina
(Flavonol)

Luteolina
(Flavona)

Figura 15: Exemplos de flavonóides aglicona

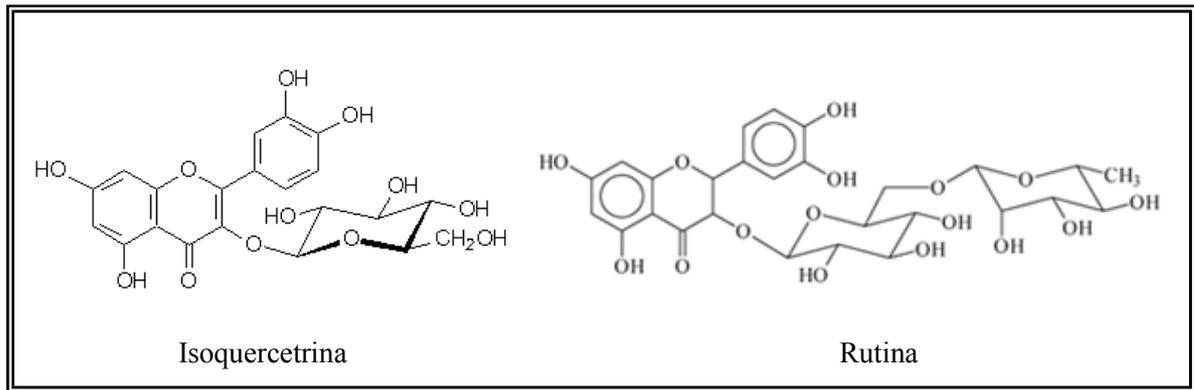


Figura 16: Exemplos de flavonóides glicosilados

Os flavonóides glicosilados são mais solúveis e melhor absorvidos pelo organismo humano, porém possuem menor atividade antioxidante, pois os glicosídeos interferem na planaridade do radical, reduzindo a deslocalização dos elétrons, e, portanto, diminuindo sua estabilidade. Flavonóides ligados a grupos de ácidos fenólicos também possuem sua atividade antioxidante reduzida, porém nem tanto como os flavonóides glicosilados (AGUIAR *et al.*, 2009). A atividade antioxidante é definida principalmente pelo anel B, pois este é o anel que possui maior característica eletrodadora, definindo a estabilidade redox do radical flavonoil formado (HEIM *et al.*, 2002). Os flavonóides que geram radicais mais estáveis agem como melhores antioxidantes (**Figura 17**).

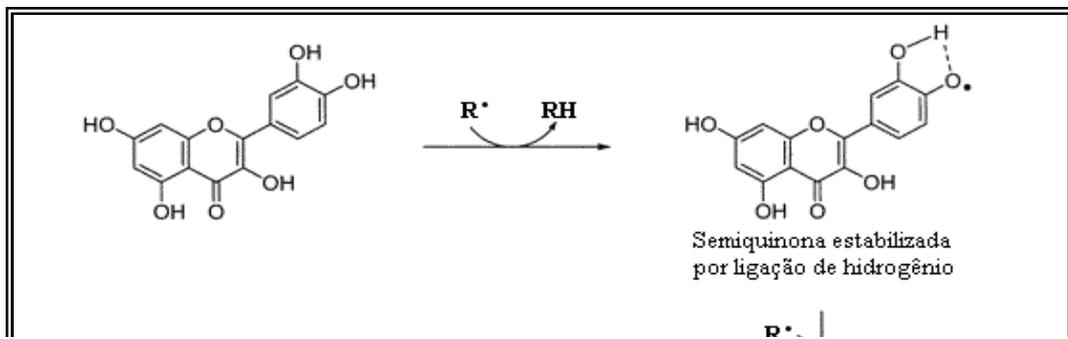


Figura 17: Sequestro de radicais por compostos fenólicos e formação de quinonas estáveis (adaptado de MCPHAIL *et al.*, 2003)

Os fatores determinantes para uma boa atividade antioxidante são a presença de grupo catecol (3,4-diidroxil) no anel B, uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 conjugada com uma carbonila na posição 4, que auxilia na deslocalização de elétrons do anel B, a presença de hidroxilas nas posições 3 e 5, possibilitando a formação de quelatos com a carbonila (TIWARI, 2001), bem como a presença de outros grupos hidroxila nos anéis A ou B (**Figura 18**).

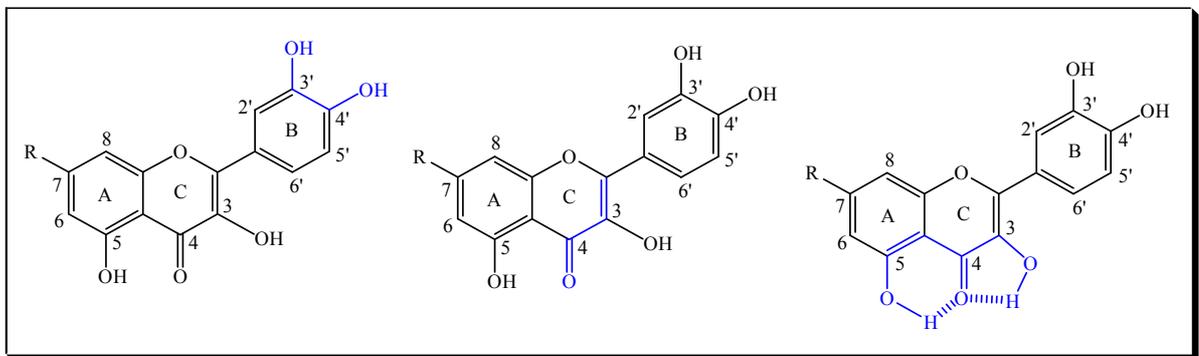


Figura 18: Características estruturais (em azul) responsáveis pela atividade antioxidante de flavonóides (TWARI, 2001)

Os flavonóides, que são os principais responsáveis pela coloração das flores e acabam sendo incorporado ao mel pelas abelhas, absorvem radiação ultravioleta, o que é inclusive uma de suas funções na planta, pois além de promover a atração dos insetos protege contra a radiação. Por isso, os flavonóides podem ser identificados e quantificados por espectrometria no UV-Vis. Os flavonóides apresentam duas bandas de absorção, uma entre 240 a 285 nm, que é a absorção máxima, chamada de **banda II**, e outra em cerca de 300 a 400 nm, chamada de **banda I** (**Figura 19**). A absorção na banda II é gerada pelas transições $\pi \rightarrow \pi^*$ do sistema

benzênico do anel A, e a absorção na banda I, relativa às transições $n \rightarrow \pi^*$ do sistema cinamoíla, no anel B (MASELEV e KUNTIC, 2007).

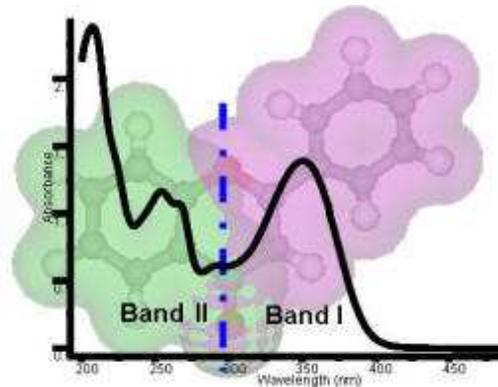


Figura 19: Bandas de absorção no UV para flavonóides (SEIJAS *et al.*, 2008)

A absorção máxima dos flavonóides no UV-Vis pode variar com o tipo de flavonóide e os grupos presentes nas suas estruturas. Por exemplo, a metilação ou substituição de hidroxilas por açúcares, promove um efeito hipsocrômico, deslocando a banda de absorção máxima para um comprimento de onda menor, seja pelo menor efeito doador e/ou maior volume dos grupos, a ponto de causar uma torção que diminua o efeito de ressonância.

A maior parte dos flavonóides possui alguma atividade de complexação com íons metálicos, o que promove um efeito batocrômico por conta da extensão da conjugação. Essa complexação depende muito dos fatores estruturais, como a presença de grupos catecol (1,2-diidroxil), que possibilitam a interação com metais formando complexos em anéis de cinco membros, e também a presença de grupo carbonila na posição 4 e hidroxila na posição 5, que forma complexo em anéis de seis membros, mais estáveis, deslocando ainda mais o comprimento de onda.

Para a quantificação de flavonóides totais em produtos naturais, um método bastante utilizado é a análise por espectrometria no UV, através de reação com cloreto de alumínio ($AlCl_3$). Esta reação foi primeiramente descrita em 1962 e é um método de baixo custo e rápido, que permite a análise em série de várias amostras (MALEŠEV e KUNTIC, 2007).

A formação de complexos ácidos estáveis pelo cloreto de alumínio ocorre com o grupamento cetona da posição C-4 ou com as hidroxilas das posições C-3 ou C-5, já os complexos ácidos lábeis ocorrem com os grupos *orto*-diidroxil dos anéis A e B (COUTO *et al.*, 2009). Com a formação destes complexos, principalmente dos complexos estáveis, há o aumento a absorvância, através do deslocamento batocrômico das duas bandas de absorção de

flavonóides quando comparadas com as do flavonóide sem a complexação (LIANDA e CASTRO, 2008; **Figura 20**).

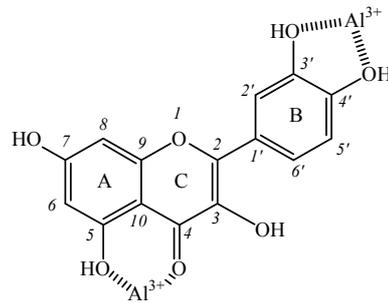


Figura 20: Complexo formado entre o flavonóide e a solução de AlCl_3

Alguns flavonóides podem ainda formar complexos bimoleculares com íons metálicos bivalentes ou trivalentes através da hidroxila C-3 e a do C-2' ou 6', através da carbonila e a hidroxila vizinha, ou ainda com os flavonóides na forma oxidada, como as paraquinonas (**Figura 21**).

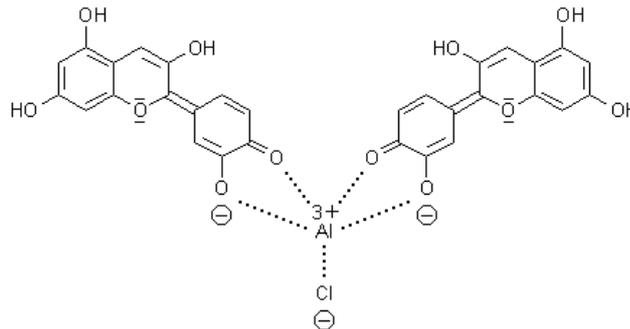


Figura 21: Complexo bimolecular da morina com cloreto de alumínio (adaptado de KEUSCH, 2003)

No entanto, esse deslocamento é revertido com o aumento da acidez do meio (MALEŠEV e KUNTIC, 2007), e como o mel é uma matriz composta, com diferentes aspectos físico-químicos, a sua acidez, por exemplo, pode influenciar esses resultados obtidos. Assim, pode-se esperar que os méis mais ácidos talvez apresentem resultados de total de flavonóides inferiores à realidade.

Estes complexos formados com alumínio em geral possuem absorção máxima entre 415 e 440 nm, podendo variar de acordo com a estrutura do flavonóide (LIANDA e CASTRO, 2008). É observada durante esta complexação a mudança da coloração da solução para amarelo fluorescente, exceto para flavonas e diidroxiflavonas.

As flavonas, como a crisina e apigenina, por não apresentarem hidroxila em C3 nem grupo *orto*-diidroxil, a formação de complexo com AlCl_3 pode se dar apenas pela carbonila do C4 e o grupo hidroxila em C5, gerando complexos com $\lambda_{\text{máx}}$ mais baixos, de 395 e 385 nm, respectivamente. Já as flavanonas, pela ausência de hidroxila em C3 e por não possuírem ligação dupla entre C2 e C3, formam complexos de $\lambda_{\text{máx}}$ ainda mais baixos que as flavonas, não podendo ser quantificadas pelo método.

Os métodos espectrofotométricos usando AlCl_3 , embora permitam quantificar flavonóides com estruturas similares, são convenientes e apropriados nas determinações de flavonóis e flavonas, porém apresentam limitações na sensibilidade e especificidade. O uso deste reagente na determinação de flavonas, flavonóis, flavanonas e isoflavonas se encontra bem documentado (**Tabela 7**). No caso, dos flavonóis (quercetina, canferol, rutina, miricetina e morina) e flavonas (apigenina, crisina e luteolina), é gerado um complexo estável com um máximo de absorção a 415 nm (JURD, 1962). As flavanonas naringenina, hesperidina e naringina não apresentam absorção significativa com AlCl_3 , porém são ativas com 2,4-dinitrofenilhidrazina com máximo de absorção a 495 nm.

Tabela 7: Bandas de absorção de flavonóides em solução metanólica e na presença de cloreto de alumínio (AlCl_3)

Tipos de Flavonóides	Banda I (nm)	Banda II (nm)	Deslocamento por
Flavonas	310-350	250-280	+ 35-55
Flavonóis	350-385	250-280	+ 35-55
Flavonóis (3-OH substituído)	330-360	250-280	+ 50-60
Isoflavonas	310-330 ombro	245-275	+ 10-14
Flavanonas e diidroflavonóis	300-330 ombro	230-270	+ 20-26

* Em 415 nm, os ácidos fenólicos e outras substâncias fenólicas não absorvem em presença de AlCl_3 , por isso não há interferência destas substâncias na quantificação de flavonóides.

Por esses motivos, a medição da quantidade de flavonóides em análise de méis pode dar resultados muito inferiores a realidade. Nesse caso se faria necessária a utilização conjunta do método com 2,4-dinitrofenilhidrazina para a quantificação, que ao somar com os valores obtidos com o AlCl_3 proporcionaria resultados totais mais exatos (CHANG *et al.*, 2002). Porém, a detecção inferior de flavonóides não inviabiliza o método do cloreto de alumínio, que apesar de perder na exatidão é bastante reprodutível e preciso, sendo um dos métodos mais amplamente utilizados.

Para fins de padronização, é adotado o comprimento de onda de 415 nm para análises de absorvância de flavonóides, por ser um valor médio de absorção desses complexos no UV.

Os flavonóides presentes no mel são oriundos do néctar ou do pólen das plantas, e estes se encontram geralmente na forma de agliconas ao invés da forma de glicosídeos, como são a maioria dos encontrados nos vegetais, pois os flavonóides glicosilados podem sofrer hidrólise pelas glândulas salivares das abelhas, se transformando nas agliconas (PAULINO, 2005).

Apesar do mel não ser uma das maiores fontes alimentícias em antioxidantes, o fato de ter um sabor agradável faz com que seja uma fonte alternativa aos consumidores que não ingerem muitos antioxidantes provenientes de vegetais. Em comparação com a sacarose, que não tem potencial antioxidante, o mel é uma fonte saborosa e mais saudável destas substâncias (PHILLIPS *et al.*, 2009).

Outra classe de substâncias oriundas de plantas que é comumente incorporada no mel são os ácidos fenólicos. Estes se caracterizam por possuírem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula, o que contribui para as propriedades antioxidantes nos alimentos e vegetais (ANGELO e JORGE, 2007).

Os ácidos fenólicos consistem de dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos são os mais encontrados na natureza e possuem em sua estrutura sete átomos de carbono (C6-C1), como, por exemplo, os ácidos vanílico, protocatecuico, siríngico, *para*-metoxibenzóico, gálico e *para*-hidroxibenzóico (**Figura 22**); enquanto os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6-C3), como os ácidos cafeico, *orto*-cumárico, *para*-metoxicinâmico, ferúlico, *para*-cumárico e sinápico (**Figura 23**; ANGELO e JORGE, 2007).

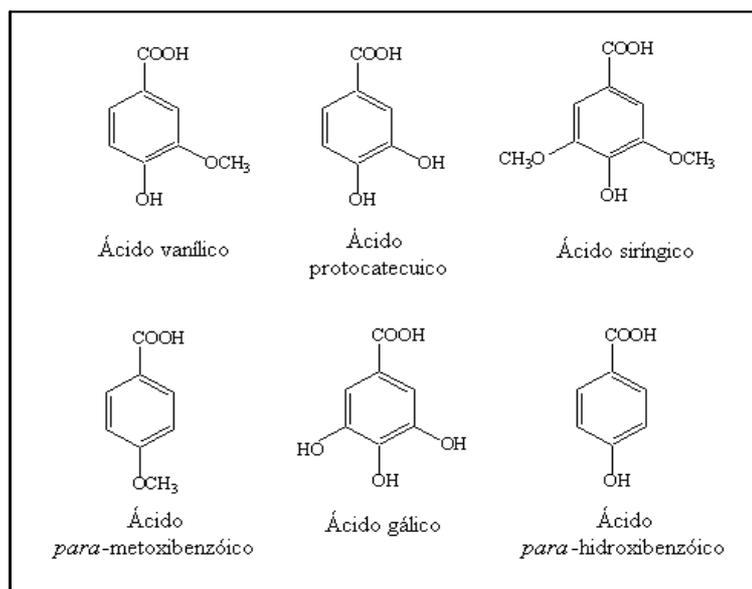


Figura 22: Exemplos de ácidos hidroxibenzoicos

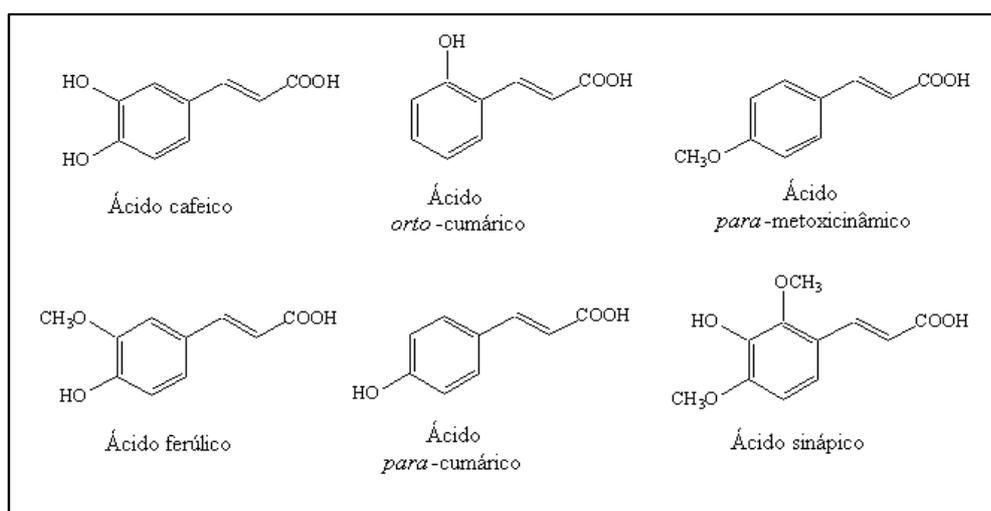


Figura 23: Exemplos de ácidos hidroxicinâmicos

Os ácidos fenólicos também podem se ligar entre si ou a outros compostos, como ocorre no caso do ácido clorogênico, que é um éster do ácido quínico com o ácido cafeico (Figura 24; GARAMBONE e ROSA, 2007).

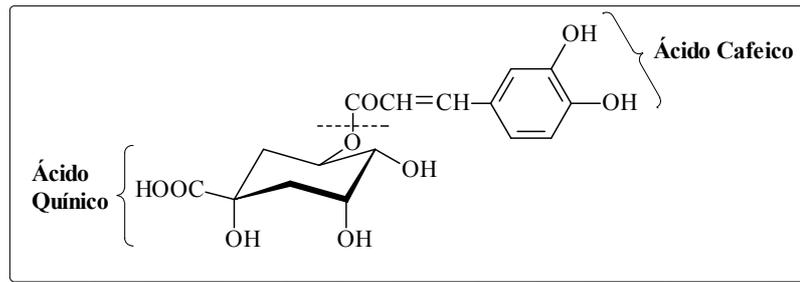


Figura 24: Estrutura do ácido clorogênico

Segundo estudo feito por SROKA e CISOWSKI (2003), comparando a atividade antioxidante de ácidos fenólicos, o ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzóico), que apresenta três hidroxilas ligadas ao anel aromático em posição *orto*, uma em relação a outra, foi o que apresentou maior capacidade de seqüestro do radical DPPH e para H_2O_2 . Os ácidos cafeico (3,4-diidroxicinâmico) e 3,4-diidroxibenzóico (protocatecuico), que possuem dois grupos hidroxila ligados ao anel aromático e em posição *orto*, também mostraram uma boa atividade antioxidante, porém menor que o ácido gálico. Compostos como o ácido α e β -resorcílico, com duas hidroxilas ligadas em posição *meta*, uma em relação a outra, apresentaram atividade moderada, e compostos com apenas um grupo hidroxila, como o ácido 3-hidroxibenzóico, 4-hidroxifenilacético e 2-hidroxibenzóico (salicílico), apresentaram atividades ainda mais baixas (**Figura 25**).

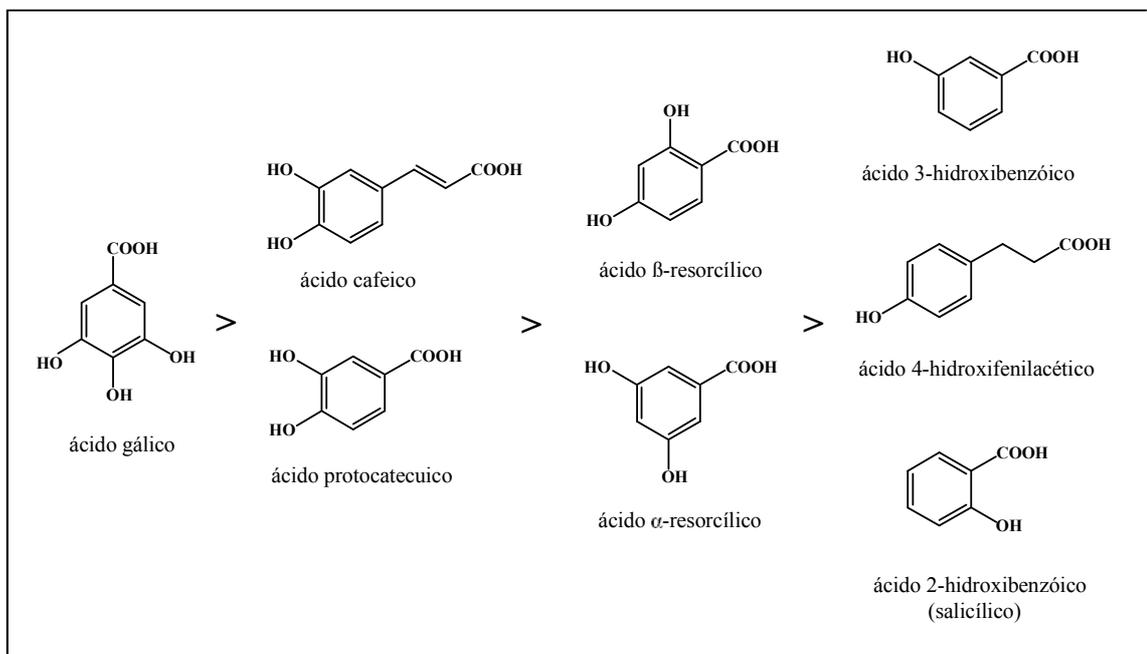


Figura 25: Ordem de atividade antioxidante de ácidos fenólicos (SROKA e CISOWSKI, 2003)

Isso mostra que, assim como nos flavonóides, a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos está relacionada ao número de hidroxilas ligadas ao anel aromático, e a presença destas hidroxilas em substituição *orto*, é a mais adequada para a atividade antioxidante.

Em outro estudo realizado por MARINOVA e YANISHLIEVA (2006), resultado semelhante foi obtido, onde a atividade antioxidante para os ácidos fenólicos estudados teve a seguinte ordem: ácido cafeico > 3,4-dihidroxibenzóico > sinápico > siringico > ferúlico > *para*-cumárico > vanílico.

Os ácidos fenólicos podem agir como antioxidantes de diversas formas. Os grupos hidroxílicos fenólicos são bons doadores de hidrogênio, podendo reagir com espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, interrompendo o ciclo de geração de radicais. A interação dos grupos hidroxila com os elétrons π do anel benzênico confere à molécula a propriedade de gerar radicais estabilizados por ressonância, assim como ocorre na classe dos flavonóides. A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos também é atribuída a sua capacidade de quelar íons metálicos envolvidos na produção de radicais livres. As substâncias fenólicas também podem interagir fortemente com proteínas, devido à característica hidrofóbica do anel e seu potencial de formação de ligações de hidrogênio pelos grupos hidroxila fenólico. E isso é mais um fator que contribui para sua atividade antioxidante, através da capacidade de inibir algumas enzimas envolvidas no processo de geração de radicais, como enzimas do citocromo P450, a lipoxigenase, cicloxigenase e a xantina oxidase. Também já foram descritos efeitos sinérgicos de certos compostos fenólicos com outros antioxidantes, como o ácido ascórbico, β -caroteno e α -tocoferol (PEREIRA *et al.*, 2009).

Os métodos realizados para análises de substâncias fenólicas podem ser classificados em determinação de substâncias fenólicas totais, quantificação individual e/ou de um grupo ou classe de compostos fenólicos. A análise de substâncias fenólicas pode ser influenciada pela natureza do composto, o método de extração empregado, o tamanho da amostra, o tempo e as condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de interferentes tais como ceras, gorduras, terpenos, clorofila, etc.

Ainda não se desenvolveu um método satisfatório para a extração de todos ou de uma classe específica de fenólicos presentes nos alimentos. A solubilidade dos fenólicos varia de acordo com a polaridade do solvente utilizado, o grau de polimerização dos fenólicos e suas interações com outros constituintes dos alimentos. Os solventes mais utilizados para a extração dessas substâncias são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Outro aspecto importante no desenvolvimento de métodos de quantificação de compostos fenólicos é a dificuldade de se encontrar um padrão específico e conveniente, devido a complexidade das substâncias fenólicas presentes nos alimentos e as diferenças de reatividade entre estas substâncias e os reagentes (ANGELO e JORGE, 2007).

Vários são os métodos espectrofotométricos que tem sido utilizado para quantificação de substâncias fenólicas em diferentes matrizes. Esses métodos são baseados em diferentes princípios e são usados para quantificar fenólicos totais, determinar um composto fenólico específico ou uma classe de fenólicos (ESCARPA e GONZÁLEZ, 2001).

Para fins de quantificação de ácidos fenólicos em alimentos, normalmente é empregado o método de Folin-Denis ou Folin-Ciocalteu. Estes reagentes consistem na mistura de ácido fosfomolibídico e fosfotúngstico, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação (VI), sendo o reagente de Folin-Denis de coloração esverdeada e o Folin-Ciocalteu, amarela, devido ao complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em solução. Na presença de agentes redutores, no caso os ácidos fenólicos, há a formação de um complexo de cor azul, o $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}$, 18 ou 24-fosfomolibdotungstato, devido a redução do molibdênio ao estado de oxidação (V) (OLIVEIRA *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2005). A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada (**Figura 26**). A mudança na coloração permite a quantificação dos compostos fenólicos do mel, que são os agentes redutores da reação, e, portanto, quanto maior a concentração de ácidos fenólicos maior a intensidade da coloração azul formada. A determinação do total equivalente de ácido fenólico é feita através da leitura da solução por espectrofotometria de UV-Vis a 760 nm e comparação com a curva padrão.

Um aspecto importante a ser considerado neste método é a escolha do padrão. Os mais utilizados têm sido o ácido tânico e a catequina, entretanto, estes compostos apresentam reatividades diferentes frente ao reagente de Folin-Denis.

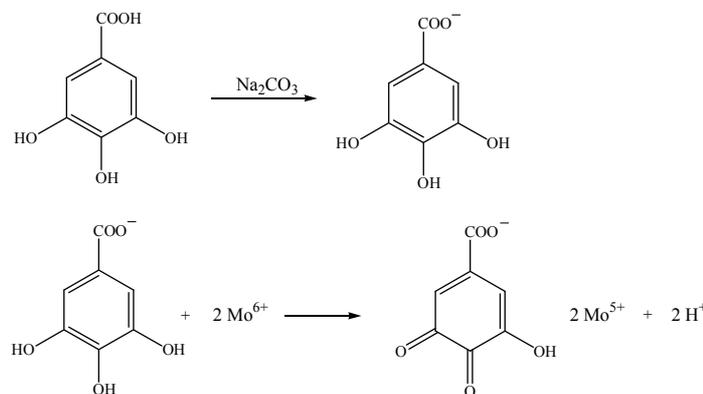


Figura 26: Reação do ácido gálico com o reagente de Folin-Denis (OLIVEIRA *et al.*, 2009)

O método de Folin-Denis, no entanto, não é um método específico, pois determina todos os fenólicos presentes, além de substâncias redutoras adicionadas aos alimentos ou naturalmente presentes que podem interferir nos resultados.

Muitas vezes o reagente de Folin-Denis é substituído pelo de Folin-Ciocalteu. Este último é mais sensível à redução pelos fenóis e diminui a tendência à precipitação. As principais diferenças entre estes dois reagentes é o uso de sulfato de lítio, a presença de ácido hidrocloreídrico e o longo tempo de aquecimento para a preparação do reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI JUNIOR, 1965).

A solução de Folin consiste de uma série integrada polimérica, com forma geral de uma unidade central de fosfato cercada de várias unidades de oxiácidos octaédricos de molibdênio, formando uma estrutura na qual o tungstênio, que também é um agente oxidante, pode livremente substituir o molibdênio (**Figura 27**). Esse reagente promove a oxidação dos fenolatos, e o heteropoliácido é parcialmente reduzido de +6 para uma mistura de valência +5 e +6, resultando na produção de um complexo azul de molibdênio-tungstênio. No entanto, uma redução completa à valência +5 acabaria com a coloração da solução (SINGLETON e ROSSI JUNIOR, 1965).

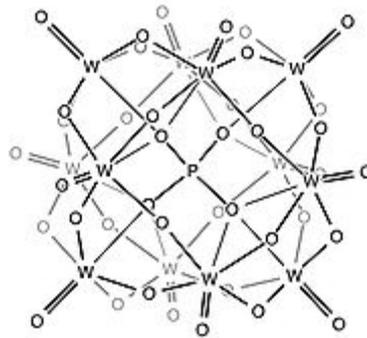


Figura 27: Complexo fosfotúngstico (KLEMPERER, 2007)

Os polifenóis são oxidados rapidamente, mas apenas em soluções básicas suficientes para haver a formação de quantidades razoáveis de ânions fenolato. Porém, tanto o reagente oxidante como o pigmento azul formado são instáveis em soluções alcalinas. Dessa forma, há a necessidade da utilização de bases fracas, como o carbonato de cálcio, que, em excesso, é suficiente para a análise, pois não é necessário aumentar o pH da solução até que todos os fenóis sejam convertidos a fenolatos. Conforme a fração ionizada reage com a solução de Folin, o equilíbrio se desloca para a formação de mais ânions fenolatos.

O complexo reativo do reagente de Folin-Denis está presente tanto na proporção de 1:18 ou 1:24 dos óxidos de fósforo e molibdênio. No preparo do reagente de Folin-Ciocalteu, com a adição de HCl e um aquecimento mais prolongado, há uma formação quase exclusiva do complexo 1:24, aumentando assim sua sensibilidade à redução devido a maior quantidade de molibdênio no complexo. Por isso, o Folin-Ciocalteu produz uma intensidade de coloração azul maior que a do Folin-Denis e maiores valores de leitura a 760 nm (WU, 1920).

Há também uma diferença entre a coloração do reagente de Folin-Denis e do Folin-Ciocalteu. O reagente de Folin-Denis é comumente descrito como uma solução límpida e esverdeada, enquanto o Ciocalteu, amarela. A cor esverdeada decorre da redução promovida por substâncias orgânicas contaminantes, o que, segundo WU (1920), não promove interferência prática na análise. No método de Folin-Ciocalteu, houve a adaptação da adição de algumas gotas de bromo na solução, pois este oxida qualquer traço de complexo azul de molibdênio-tungstênio, tornando a solução amarela, sem nenhum aspecto esverdeado. Na ausência de capela ou área ventilada apropriada, o Br₂ pode ser substituído por peróxido de hidrogênio a 30% (SINGLETON e ROSSI JUNIOR, 1965).

Para ambos os testes, o número de grupos hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a quantidade de cor formada. O grupo fenólico deve estar na forma de fenolato para os ânions molibdato e tungstofosfato promoverem a oxidação. As moléculas reduzidas são azuis e as não reduzidas, amarelas. Estas últimas se decompõem vagarosamente em pH alcalino, o qual é necessário para a manutenção do fenol na forma de fenolato (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A presença de ácidos fenólicos e flavonóides em mel está, em geral, positivamente relacionada com sua atividade antioxidante. Portanto, é de uma grande importância a determinação do teor total destas substâncias, bem como avaliar o potencial antioxidante das amostras de mel, a fim de correlacionar esses quantitativos e avaliar a qualidade do mel também quanto aos fatores orgânicos.

Enquanto é necessária a adição de antioxidantes em diversos alimentos comercializados, o mel é um alimento privilegiado nesse sentido, pois possui naturalmente esses compostos que contribuem para sua longevidade.

Os antioxidantes, para serem utilizados como aditivos em alimentos, devem ser efetivos em pequenas concentrações (até 0,01%), retardando ou prevenindo a oxidação de substratos oxidáveis. Deve também ser compatível com o substrato, não conferir odor ou sabor estranho ao produto, ser efetivo durante o período de armazenamento, ser estável ao processo de aquecimento e ser facilmente incorporado ao alimento (CANTERLE, 2005).

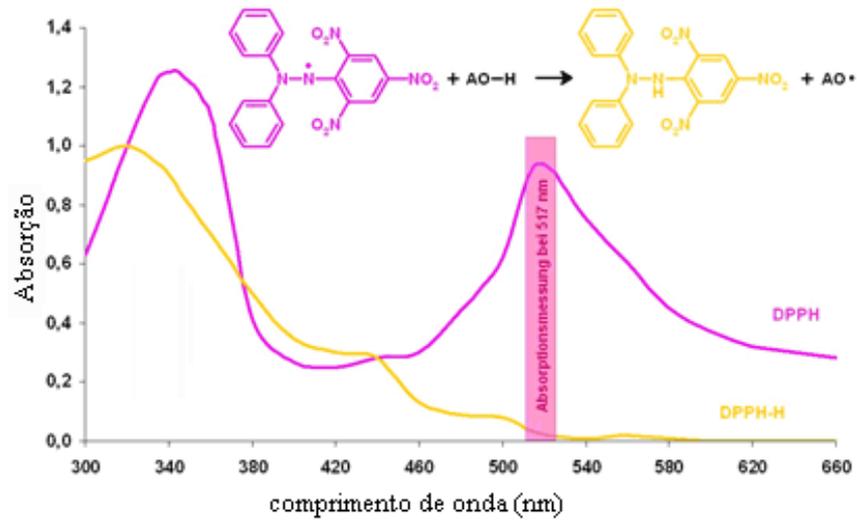


Figura 29: Análise espectrofotométrica (UV-Vis) de uma solução de DPPH com substâncias antioxidantes (adaptado de www.baltic-analytics.de/index.php?id=40&L=1)

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e a estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias.

Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais comuns, prático, rápido e sensível são os que envolvem um radical cromóforo, simulando as espécies reativas de oxigênio (EROs), que é o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), de coloração púrpura que absorve a 517 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R^{\bullet}), o DPPH é reduzido formando a 2,2-difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional.

A reação entre as substâncias fenólicas (ROH) e o radical DPPH é alvo de contínua investigação, porque serve como um modelo para entender as reações radicalares que são extremamente importantes, no meio biológico e na química, devido aos seus efeitos inibitórios sobre os processos de auto-oxidação de materiais orgânicos.

O 2,2-difenil-picril-hidrazil é um radical livre bastante estável e de redução reversível, quando comparado, por exemplo, ao radical peroxila (ROO^{\bullet}), que é três vezes mais reativo e que apresenta, inclusive, uma reação considerada irreversível. Uma explicação para a

estabilidade do radical DPPH está relacionada, principalmente, ao efeito de proteção do grupo nitro em posição *orto* ao nitrogênio bivalente (radicalar), tendo em vista que a remoção do grupo em posição *para* tem pouca influência, enquanto a retirada de um dos grupos em *orto* afeta intensamente a reatividade da molécula (**Figura 30**; FOTI e DAQUINO, 2006).

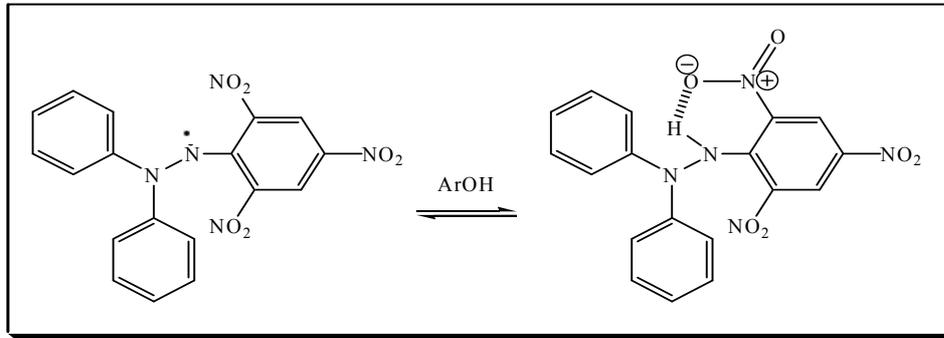


Figura 30: Efeito de proteção do nitrogênio pelo *o*-NO₂ (FOTI e DAQUINO, 2006)

Um parâmetro introduzido recentemente para interpretação dos resultados da atividade antioxidante é a determinação do valor de CE₅₀, que é a concentração de substrato que causa a redução de 50% dos radicais livres de DPPH. Dessa forma, quanto menor o valor obtido, maior a capacidade antioxidante da amostra. Esse parâmetro foi introduzido por BRAND-WILLIAMS *et al.* (1995) e vem sendo um dos métodos mais utilizados como forma de expressar a capacidade antioxidante de amostras.

Além do método colorimétrico do DPPH, vários outros métodos de avaliação de atividade antioxidante ainda podem ser empregados, como o método de oxidação de β -caroteno/ácido linoléico, que avalia a inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico, o método de FRAP (Ferro Redutor/Poder Antioxidante), que mede a capacidade dos antioxidantes de reduzirem o íon de ferro do complexo de ferro com cloreto de 2,3,5-trifenil-1,3,4-triaza-2-azoniaciclopenta-1,4-dieno (TPTZ) a pH baixo, e o método de ORAC, na qual um gerador de radicais livres, como um iniciador azo, é adicionado a uma molécula fluorescente, como a fluoresceína, e ao ser aquecido produz radicais livres peroxila, que degradam a molécula fluorescente resultando numa queda da fluorescência (MERMELSTEIN, 2008). Enquanto o método do DPPH se baseia na transferência de elétrons de um antioxidante para um agente oxidante, o método utilizando β -caroteno determina a capacidade de proteção contra a oxidação de um substrato lipídico (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

Dentre as diversas formas de determinação da atividade antioxidante, o método com DPPH apresenta vantagens como a possibilidade de ensaio com grande número de amostras em um curto período de tempo e ser de fácil aplicação, preciso e bastante sensível, podendo ser utilizadas amostras em baixas concentrações (DIAS *et al.*, 2009).

1.6. Origens florais dos méis analisados

Em geral para caracterizar o mel em relação a sua origem floral, deve-se fazer uma avaliação através do seu espectro polínico (Melissopalinologia). Desta maneira o pólen aparecerá no mel e assim, é possível identificar a espécie botânica apícola da qual foi obtido o mesmo e dados sobre a participação de cada uma das espécies botânicas visitadas pelas abelhas durante a coleta do néctar, constituindo-se num importante indicador para a origem botânica e geográfica do mel (BARTH, 1989).

As análises palinológicas geralmente se baseiam nas classes de frequência (LOUVEAUX *et al.* 1970, BARTH, 2004), aceitas internacionalmente. O pólen é considerado dominante quando representa mais de 45% do total de grãos de pólen contidos no mel. Quando ocorre entre 15 e 45% é chamado de pólen acessório. Quando a frequência está abaixo de 15% é chamado de pólen isolado, este por sua vez pode ser pólen isolado importante, de 3 a 15% ou pólen isolado ocasional, até 3%. Os méis que apresentam o pólen de uma única planta nectarífera (45%) são chamados de monoflorais, que são os méis ditos nobres e que no mercado costumam apresentar preços mais altos que os méis heteroflorais (silvestres).

A seguir estão apresentadas de forma resumida algumas características das fontes vegetais das principais famílias, espécies e/ou gêneros dos méis monoflorais utilizados neste trabalho.

1.6.1. Características do gênero *Citrus* spp.

As espécies de *Citrus* spp. são mais comuns nos países mediterrâneos, sendo cultivadas, geralmente, para a produção de frutas e essências aromáticas. Os principais produtores do mel de *Citrus* são Espanha e Itália, e fora da Europa os principais produtores são Israel, Estados Unidos (Califórnia), Brasil e México (ODDO e PIRO, 2004). As espécies desse gênero são bastante atrativas às abelhas, gerando um mel monofloral em ótimo

rendimento. Os méis de *Citrus* também possuem um alto valor comercial, sendo comum seu comércio via exportação. A análise de pólen deste mel não é tão útil como nas outras origens florais, por apresentar uma quantidade de pólen pequena e variável. Uma quantidade de 10% de pólen de *Citrus* encontrado no mel é suficiente para caracterizá-lo como monofloral (LIANDA, 2009; OUCHEMOUKH *et al.*, 2007; **Figura 31**).



Figura 31: Abelha nas flores de *Citrus* (SHTILMAN, 2009) e a direita microscopia de pólen deste gênero (ODDO e PIRO, 2004)

O mel de *Citrus* apresenta baixa quantidade de enzimas e baixa condutividade elétrica e possui uma das mais altas quantidades relativas de sacarose, podendo chegar a até 150 g/kg. São marcadores florais de méis destas espécies o metilantranilato e o flavonóide hesperitina (WHITE e BRYANT, 1996; FERRERES *et al.*, 1993; TOMAS-BARBERAN *et al.*, 2001; SESTA *et al.*, 2008).

O mel de *Citrus* apresenta coloração clara, com odor floral e doçura média, o que deve decorrer da alta proporção de sacarose, menos doce que a frutose. Sua acidez é relativamente baixa (17,6 meq/kg) e sua propensão à cristalização é moderada. Seu pH costuma estar em torno de 3,8 e o conteúdo total de água na média de 16,6% (ODDO e PIRO, 2004).

1.6.2. Características do gênero *Copaifera*

A *Copaifera*, popularmente chamada de “copaíba”, é um gênero geralmente encontrado na América do Sul, principalmente no Brasil e Venezuela (LLOYD, 1898).

São árvores de crescimento lento, que alcançam entre 25 a 40 metros de altura. As flores são pequenas, sem pétalas e hermafroditas (**Figura 32**). A floração ocorre entre outubro

e julho, podendo variar dentre esses meses dependendo da região e do clima. Em algumas regiões há ausência de florescimento anual (PINTO e VEIGA JUNIOR, 2002).



Figura 32: Imagem de *Copaifera officinalis* (<http://www.rain-tree.com/Plant-Images/copaiba-pic.htm>, 2006)

Este gênero compreende plantas nectíferas, e algumas espécies, como a *Copaifera langsdorfii*, são polinizadas no período diurno, de 8 às 16 horas, com grande participação de *Trigona* sp e *Apis mellifera* (PINTO e VEIGA JUNIOR, 2002).

As espécies de *Copaifera* são bastante utilizadas na produção do óleo de copaíba, um líquido transparente cuja coloração varia entre amarelo a marrom, e é encontrado em canais secretores localizados em todas as partes da árvore, sendo considerado por alguns autores como um produto da desintoxicação do organismo vegetal, funcionando como defesa contra animais, fungos e bactérias. É bastante utilizado como cicatrizante, e também pelas indústrias de cosméticos pelas suas propriedades emolientes, como bactericida e antiinflamatório (PINTO e VEIGA JUNIOR, 2002). Este óleo é também bastante utilizado na comercialização de méis compostos.

1.6.3. Características da família Myrtaceae

Uma das espécies mais conhecidas de Myrtaceae é o *Eucalyptus* spp., geralmente encontrado em áreas costeiras, e tendo aplicação na indústria de papel e para a produção de óleos essenciais e espécies ornamentais. As espécies de *Eucalyptus* são bastante atrativas às abelhas, que coletam destas plantas tanto o néctar quanto o pólen (**Figura 33**). Os méis de eucalipto são produzidos majoritariamente na Itália, Espanha, Portugal, Austrália e alguns locais da África, América do Sul e Central. São de coloração média a escura, com tom

acinzentado e odor de intensidade média, amadeirado e morno. Também possui tendência moderada a cristalização (ODDO e PIRO, 2004).



Figura 33: Abelha em flor de *Eucalyptus* (VOLPICELI, 2006) e a direita grão de pólen desta família (ODDO e PIRO, 2004)

O mel unifloral de eucalipto apresenta baixa acidez (cerca de 22,0 meq/kg), pH em torno de 4,0 e valores de diastase e invertase um pouco mais altos. Também possui uma alta razão de glicose/água, devido ao baixo conteúdo de água (em torno de 16%) mais do que ao conteúdo de glicose (ODDO e PIRO, 2004).

A *Myrcia* é uma outra fonte floral da família Myrtaceae, que engloba, por exemplo, a *Myrcia cauliflora* (jaboticabeira) e *Myrcia salicifolia* (pedra-hume).

1.6.4. Características da família Asteraceae / Compositae

A família Asteraceae (ou Compositae) também é popularmente conhecida como de “família do girassol”, sendo bastante encontrada nos solos oleosos europeus. Essa família vegetal representa uma importante fonte de néctar e pólen, mas não possui um grande valor comercial. Este mel é de coloração média, geralmente amarelo brilhante, porém é de aroma fraco, com odor de frutas frescas (**Figura 34**). É um mel de cristalização rápida devido a alta concentração de glicose, que precipita em cristais duros e pouco solúveis. Quando cristalizado na forma de pequenos cristais possui sabor refrescante, devido a absorção do calor latente promovida pelos cristais de glicose ao se derreter (ODDO e PIRO, 2004).



Figura 34: Abelha coletando néctar em Asteraceae (HUANG, 2002) e a direita microscopia de pólen desta família (ODDO e PIRO, 2004)

Uma das principais espécies deste gênero é a *Helianthus annuus* L., que apresenta valores um pouco altos de acidez (32,1 meq/kg) e prolina. Possui uma baixa relação frutose/glicose, em média de apenas 0,04, por conta da alta quantidade de glicose. Porém, um fator que ameniza um pouco a razão glicose/água é o conteúdo de água ser geralmente alto. Possui em torno de 17,8% de água e seu pH é em média 3,8 (ODDO e PIRO, 2004).

Também fazem parte dessa família o gênero *Montanoa*, conhecido como “margarida de maio”, a *Vernonia* (assa peixe) e *Gochnatia* (popularmente chamada de cambará). Há duas espécies vegetais diferentes com o nome de cambará, e foi analisada neste trabalho uma amostra de mel de cada, a *Gochnatia polymorpha* (Less.), desta família, e a *Lantana câmara* L., da família Verbenaceae. Ambas as plantas são citadas na literatura por sua eficiência contra moléstias do aparelho respiratório (MENTZ e SCHENKEL, 1989).

1.6.5. Características do gênero *Anadenanthera*

Este gênero, da família Mimosoideae, é popularmente chamado de “angico”. É uma árvore com 12 a 15 metros, encontrada nas regiões mais altas da encosta atlântica dos estados do Rio de Janeiro e São Paulo. Sua florescência ocorre entre dezembro a abril (MEC, 2008).

A *Anadenanthera macrocarpa* é a espécie de angico de maior abrangência geográfica, ocorrendo desde o sul da Bolívia até o norte da Argentina (**Figura 35**). No Brasil, só não aparece nos estados da Região Sul (BERNARDINO *et al.*, 2005). Os méis de angico possuem em geral coloração clara (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

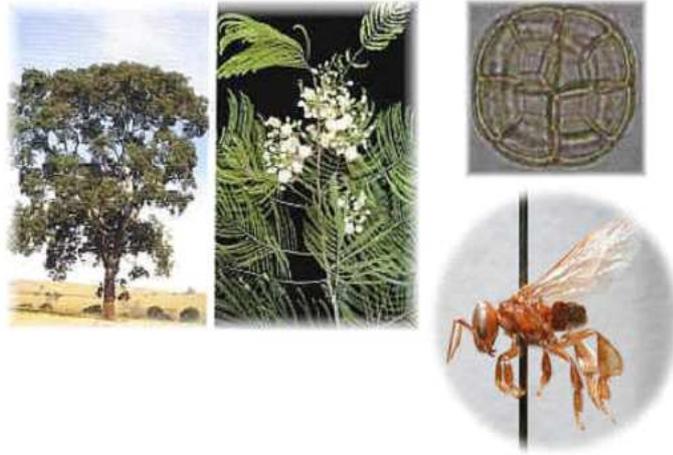


Figura 35: A esquerda, árvore e flor de *Anadenanthera colubrina*, superior à direita, grão de pólen e abaixo, abelha freqüente visitadora desta planta (*Partamona cupira*) (MEC, 2008)

1.6.6. Características do gênero *Ambrósia*

A ambrosia é uma planta de hábito anual, originária da América do Norte; seu crescimento é muito influenciado pelas condições ambientais, como o solo, luz e umidade. Sua altura pode variar entre 30 a 150 cm (**Figura 36**). Em solos pobres em substâncias nutritivas, a ambrosia tem porte baixo e produz poucas sementes. Já em solos ricos, pode apresentar porte alto e produzir grande quantidade de pólen e sementes. É considerada uma planta invasora, que se multiplica rapidamente, podendo inclusive ameaçar a biodiversidade através da concorrência com outras plantas. Uma mesma planta desenvolve flores masculinas e flores femininas separadas, e sua floração ocorre entre abril a julho (BOHREN, 2008).



Figura 36: *Ambrósia* sp.; direita: pólen e sementes da planta (abaixo) (BOHREN, 2008)

É considerada uma planta perigosa, pois cerca de 10 a 15% da população é potencialmente alérgica à ambrósia, pois seu pólen provoca rinites e conjuntivites, e em alguns casos pode provocar crises de asma, atingindo em torno de 25% das pessoas alérgicas. Uma única planta produz de 76 milhões a 1 bilhão de grãos de pólen, com capacidade de dispersão superior a 200 km (BOHREN, 2008).

A **Tabela 8** apresenta os dados de origem floral, geográfica e cor para os méis estudados neste trabalho (a numeração utilizada foi à mesma que foi cadastrada nas amostras pelo Laboratório Abelha-Natureza/UFRRJ). Estas amostras foram obtidas de apicultores e no comércio do estado do Rio de Janeiro nos anos de 2009 e 2010.

Tabela 8: Características dos méis analisados (origem floral, geográfica e cor)

AMOSTRA	ORIGEM FLORAL	LOCAL DE OBTENÇÃO	MESORREGIÃO	COR
01	<i>Ambrosia</i>	Volta Redonda (RJ)	Sul Fluminense	Média
23	<i>Anadenanthera</i>	Maricá (RJ)	Metropolitana	Média
24	<i>Anadenanthera</i>	Maricá (RJ) - Ponta Grossa	Metropolitana	Escura
25	<i>Anadenanthera</i>	Rio Claro (RJ)	Sul Fluminense	Escura
26	<i>Anadenanthera</i>	Cordeiro (RJ)	Sul Fluminense	Escura

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Determinar o teor das substâncias fenólicas totais (ácidos e flavonóides) e a atividade antioxidante em méis brasileiros de *Apis mellifera*, comercializados em diferentes mesorregiões do estado do Rio de Janeiro, e correlacioná-los com suas características físico-químicas, origens florais e geográficas.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar o conteúdo de fenólicos totais das amostras de méis através do método colorimétrico de Folin-Denis.

- Determinar o conteúdo de flavonóides totais das amostras de méis, através do método de complexação com cloreto de alumínio.

- Avaliar as propriedades antioxidantes (%AA e CE_{50}) dos méis através do método de captura de radicais livres (DPPH).

- Realizar um estudo comparativo das várias amostras de méis de diferentes regiões quanto ao teor de fenólicos e flavonóides totais, atividade antioxidante e suas propriedades físico-químicas.

- Avaliar a qualidade de méis monoflorais e heteroflorais comercializados em diferentes mesorregiões do estado do Rio de Janeiro (Metropolitana, Sul, Centro, Noroeste Fluminense e Baixada Litorânea) de modo a estabelecer comparações, na tentativa de encontrar eventuais relações entre a origem floral e as propriedades antioxidantes a partir dos resultados obtidos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Material e Métodos

Os solventes utilizados para os ensaios espectrofotométricos foram metanol de grau espectroscópico (VETEC) e água, obtida através de purificação com aparelho purificador Milli-Q (Millipore). Os reagentes carbonato de sódio anidro (Grupo Química), cloreto de alumínio hexahidratado (VETEC), tungstato de sódio diidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; VETEC), ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]_x \cdot \text{H}_2\text{O}$; VETEC), ácido fosfórico (H_3PO_4 ; VETEC) e 2,2-difenil-picril-hidrazil (Sigma) também foram obtidos comercialmente.

Para a determinação do total de flavonóides e total de fenólicos foi utilizado o espectrofotômetro UV-Vis da marca NOVA 2000UV, e as leituras realizadas a 415 e 760 nm, respectivamente, em cubeta de quartzo de caminho ótico de 1 cm. Os ensaios de atividade antioxidante, tanto para a determinação do percentual de atividade antioxidante (%AA) quanto do CE_{50} , foram realizados no espectrofotômetro de ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*), modelo 680 Microplate Reader (Bio Rad), a 520 nm e utilizando microplacas de acrílico. Quanto aos padrões de ácidos fenólicos utilizados, os ácidos cafeico e protocatecuico foram obtidos da Sigma Chemical Co. (Saint Louis, MO, EUA), e os ácidos gálico e ferúlico foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os padrões de flavonóides quercetina, isoquercetrina, rutina e miricetina foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha).

Os gráficos foram confeccionados com o auxílio do programa Origin 6.0 e/ou Microsoft Office Excel 2003, e os dados foram expressos em $\text{mgE}_{\text{AG}}/100\text{g}$ (mg em equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de mel) para fenólicos, $\text{mgE}_{\text{QC}}/100\text{g}$ para flavonóides (mg em equivalentes de quercetina por cem gramas de mel), $(\text{AA})\text{mgE}_{\text{QC}}/500\text{g}$ para atividade antioxidante, mg/kg para HMF, meq/kg para acidez e porcentagem para umidade.

3.2. Amostras de méis

Neste trabalho foram realizadas apenas as análises para determinação de fenólicos e flavonóides totais e a atividade antioxidante (%AA e CE_{50}) de sessenta amostras de méis de *Apis mellifera* africanizada de diferentes origens florais obtidas do comércio e/ou diretamente de apicultores de diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro (**Tabela 9**).

As amostras de mel, bem como os seus dados de palinologia, pH, acidez, HMF, umidade e atividade de água foram fornecidos gentilmente pela prof. Dra. Maria Cristina Affonso Lorenzon do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, coordenadora do Laboratório Abelha-Natureza/UFRRJ e Dra. Monika Barth, coordenadora do laboratório de palinologia da UFRJ.

Todas as amostras foram obtidas entre 2009-2010 e estocadas a 4°C até serem analisadas.

As propriedades físico-químicas de cada um dos tipos de mel, nomeadamente pH, acidez total, umidade, atividade de água e 5-hidroximetilfurfural permitiu, por comparação com valores da literatura, considerar a qualidade dos méis analisados.

As regiões de onde os méis foram obtidos se encontram distribuídas de acordo com a numeração no mapa apresentada na **Figura 37**.

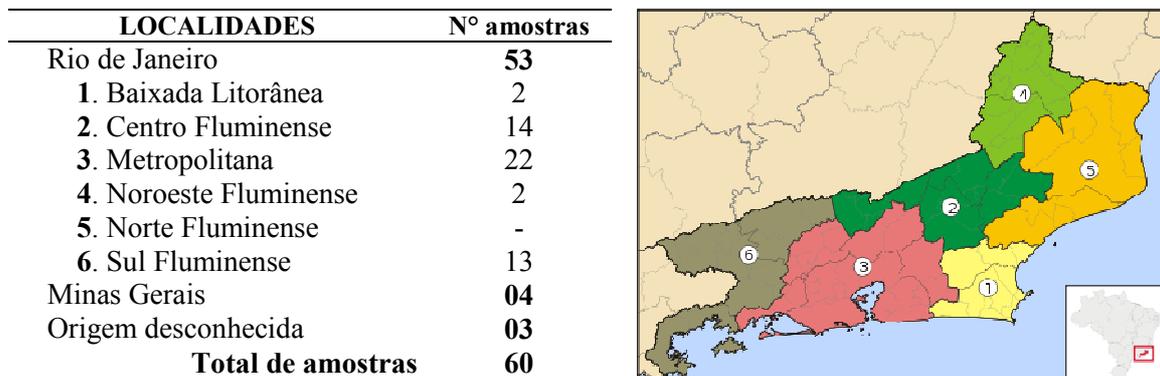


Figura 37: A esquerda, tabela com a quantidade de amostras de mel analisadas, separadas por região; à direita, mapa com as mesorregiões do estado do Rio de Janeiro (www.nachrichtenmann.de)

No sentido de encontrar possíveis relações entre a atividade antioxidante do mel e algumas características de fácil observação foi também descrita a cor das diversas amostras segundo avaliação visual em clara, média e escura.

Na **Tabela 9** seguem os dados de origem floral, geográfica e cor dos méis estudados nesse trabalho (a numeração utilizada foi à mesma cadastrada pelo Laboratório Abelha-Natureza/UFRRJ).

Tabela 9: Características dos méis analisados (origem floral, geográfica e cor)

Amostra	Palinológica	Obtenção da amostra	Cor	Mesorregião
01	<i>Ambrosia</i>	Volta Redonda (RJ)	Média	Sul Fluminense
02	<i>Heterofloral</i>	Quatis (RJ)	Média	Sul Fluminense
03	<i>Myrtaceae</i>	Santa Maria Madalena (RJ)	Média	Centro Fluminense
04	<i>Eucalyptus</i>	B. de Minas (MG)	Clara	-
05	<i>Eucalyptus</i>	Rio Preto (MG)	Escura	-
06	<i>Eucalyptus</i>	Nova Friburgo (RJ)	Escura	Centro Fluminense
07	<i>Eucalyptus</i>	Itamonte (MG)	Média	-
08	<i>Heterofloral</i>	Teresópolis (RJ)	Média	Metropolitana
09	<i>Heterofloral</i>	-	Clara	-
10	<i>Heterofloral</i>	Paraíba do Sul (RJ)	Clara	Centro Fluminense
11	<i>Myrcia</i>	Paraíba do Sul (RJ)	Clara	Centro Fluminense
12	<i>Myrcia</i>	Paraíba do Sul (RJ)	Clara	Centro Fluminense
13	<i>Heterofloral</i>	Nova Friburgo (RJ)	Média	Centro Fluminense
14	<i>Heterofloral</i>	Nova Friburgo (RJ)	Média	Centro Fluminense
15	<i>Eucalyptus</i>	Paracambi (RJ)	Média	Metropolitana
16	<i>Heterofloral</i>	Santa Maria Madalena (RJ)	Média	Centro Fluminense
17	<i>Asteraceae</i>	Piraí (RJ)	Média	Sul Fluminense
18	<i>Copaifera</i>	Valença (RJ)	Média	Sul Fluminense
19	<i>Heterofloral</i>	-	Média	-
20	<i>Eucalyptus</i>	Valença (RJ)	Escura	Sul Fluminense
21	<i>Myrcia</i>	Barra do Piraí	Média	Sul Fluminense
22	<i>Bifloral</i>	Maricá (RJ)	Média	Metropolitana
23	<i>Anadenanthera</i>	Maricá (RJ)	Média	Metropolitana
24	<i>Anadenanthera</i>	Maricá (RJ) - Ponta Grossa	Escura	Metropolitana
25	<i>Anadenanthera</i>	Rio Claro (RJ)	Escura	Sul Fluminense
26	<i>Anadenanthera</i>	Casimiro de Abreu (RJ)	Clara	Baixada
27	<i>Vernonia</i>	Casimiro de Abreu (RJ)	Escura	Baixada
28	<i>Heterofloral</i>	Porciúncula (RJ)	Média	Noroeste Fluminense
29	<i>Gochnatia (Cambará)</i>	Rio Bonito (RJ)	Média	Metropolitana
30	<i>Eucalyptus</i>	São Gonçalo (RJ)	Média	Metropolitana
31	<i>Eucalyptus</i>	Volta Redonda (RJ)	Clara	Sul Fluminense
32	<i>Myrcia</i>	Barra Mansa (RJ)	Escura	Sul Fluminense
33	<i>Asteraceae (Senecio)</i>	Rio das Flores (RJ)	Média	Sul Fluminense
34	<i>Heterofloral</i>	Rio das Flores (RJ)	Média	Sul Fluminense
35	<i>Heterofloral</i>	Rio das Flores (RJ)	Média	Sul Fluminense
36	<i>Montanoa</i>	Paty do Alferes (RJ)	Média	Metropolitana
37	<i>Heterofloral</i>	Paty do Alferes (RJ)	Média	Metropolitana
38	<i>Heterofloral</i>	Paty do Alferes (RJ)	Média	Metropolitana
39	<i>Heterofloral</i>	Paty do Alferes (RJ)	Média	Metropolitana
40	<i>Heterofloral</i>	Três Rios (RJ)	Média	Centro Fluminense
41	<i>Heterofloral</i>	Três Rios (RJ)	Média	Centro Fluminense
42	<i>Heterofloral</i>	Três Rios (RJ)	Média	Centro Fluminense
43	<i>Heterofloral</i>	Três Rios (RJ)	Média	Centro Fluminense
44	<i>Asteraceae</i>	Miguel Pereira (RJ)	Média	Metropolitana
45	<i>Heterofloral</i>	Miguel Pereira (RJ)	Média	Metropolitana
46	<i>Montanoa</i>	Miguel Pereira (RJ)	Média	Metropolitana
47	<i>Heterofloral</i>	Miguel Pereira (RJ)	Média	Metropolitana
48	<i>Anadenanthera</i>	Caxias (RJ)	Média	Metropolitana
49	<i>Anadenanthera</i>	4° Distrito de Itaocara (RJ)	Média	Noroeste Fluminense
50	<i>Eucalyptus</i>	-	Escura	Metropolitana
51	<i>Heterofloral</i>	Friburgo (RJ)	Média	Centro Fluminense
52	<i>Heterofloral</i>	Nova Friburgo (RJ)	Escura	Centro Fluminense
53	<i>Citrus</i>	Apicultura migratória Pb. do Sul e SP	Clara	-
54	<i>Heterofloral</i>	Bambu (MG)	Média	-
55	<i>Heterofloral</i>	Barra Mansa (RJ)	Escura	Sul Fluminense
56	<i>Heterofloral</i>	Niterói (RJ)	Escura	Metropolitana
57	<i>Verbenaceae (Cambará)</i>	Itaboraí (RJ)	Escura	Metropolitana
58	<i>Heterofloral</i>	Estrada da Posse - Tanguá (RJ)	Escura	Metropolitana
59	<i>Asteraceae</i>	Vale das Videiras - Petrópolis (RJ)	Média	Metropolitana
60	<i>Myrcia</i>	Região do mendanha (RJ)	Escura	Metropolitana

3.3. Determinação de fenólicos totais nos méis com reagente de Folin-Denis

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras de méis estudadas foi feita por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin-Denis, com adaptações quanto ao tempo de reação e concentração da amostra (FOLIN e DENIS, 1912; MEDA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006).

Para cada amostra de mel foram preparadas soluções na concentração de 100 mg/mL em água Milli-Q, e todas as análises foram feitas em triplicatas. A uma alíquota de 0,5 mL (utilizando micropipetas de 1000 μ L) 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 de carbonato de sódio a 14%, recém-preparada. A mistura reacional ficou em repouso por 2h, e observou-se a mudança da coloração da solução de esverdeada para azul. Em seguida, fez-se a leitura a 760 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e água Milli-Q como branco (PÉREZ *et al.*, 2007).

O teor de fenóis totais dos méis foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com soluções padrão de ácido gálico em metanol e expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por 100g de mel ($\text{mgE}_{AG}/100\text{g}$).

3.3.1. Preparo do reagente de Folin-Denis

Em um balão de fundo redondo de 250 mL acoplado a um condensador de refluxo, foram inseridos 20g de tungstato de sódio diidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 4g de ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]_x \cdot \text{H}_2\text{O}$), 10 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 152 mL de água Milli-Q. Após duas horas de refluxo, a solução foi resfriada a temperatura ambiente, passada para balão volumétrico de 200 mL e seu volume completado com água Milli-Q. A solução apresentou coloração esverdeada, foi armazenada em frasco âmbar, sob refrigeração até o momento do uso (LIANDA, 2009).

3.3.2. Preparo da curva analítica do ácido gálico

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução metanólica do padrão de ácido gálico (1 mg/mL \equiv 0,0059 mM). Alíquotas de 2, 6, 8, 10, 20, 30, 50, 75 e 100 μ 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 recém-preparada de carbonato de sódio a 14%. As leituras foram feitas a 760 nm, utilizando-se água Milli-Q como branco. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.4. Ensaio de flavonóides totais nos méis com cloreto de alumínio

O teor de flavonóides totais foi determinado segundo adaptação da metodologia descrita por MEDA *et al.*, 2005 e AHN *et al.*, 2007, utilizando como reagente o cloreto de alumínio. Foram preparadas as soluções de mel a 500 mg/mL, 100 mg/mL ou 50 mg/mL em metanol UV-HPLC/água Milli-Q (1:1). Foram feitas triplicatas das amostras. A 2,0 mL da solução de mel e foram adicionados 2,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso as soluções foram lidas a 415 nm, utilizando metanol como branco.

A concentração dos flavonóides totais dos méis foi determinada utilizando uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida para quercetina padrão. Os resultados foram expressos, pela média de três determinações, em mg de equivalentes de quercetina por 100g de mel ($\text{mgE}_{\text{QC}}/100\text{g}$).

3.4.1. Preparo da curva analítica com quercetina

Para a construção da curva analítica foi preparada uma solução padrão de quercetina, em metanol (1,78 mg/mL \equiv 0,0059 mM). Em seguida, alíquotas de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 μL desta solução padrão foram misturadas 2,0 mL solução metanólica de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso, foi realizada a leitura espectrofotométrica em 415 nm, utilizando metanol como branco. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.5. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante pelo método do DPPH

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura, com pequenas modificações quanto ao tempo e concentrações, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras de méis, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações (PÉREZ *et al.*, 2007). A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro ELISA no comprimento de onda de 520 nm, tendo como controle positivo a quercetina.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração efetiva (CE_{50}), também chamada de concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante.

Para a determinação da atividade antioxidante (%AA) dos méis foi utilizado uma solução metanólica 0,3 mM de DPPH. Para as amostras dos méis foram preparadas soluções na concentração de 100 mg/mL em MeOH/H₂O 1:1, dissolvendo 0,5 g de mel em 2,5 mL de água e 2,5 mL de metanol grau espectroscópico. Os ensaios foram realizados em microplacas com 96 poços, onde foram pipetados 71 μ L das soluções de mel (fileiras B, C e D, da coluna 1 a 11). Como controle negativo, nos seis primeiros poços (fileira A), foram pipetados 71 μ L de metanol, e para o branco foram pipetados 29 μ L de metanol e 71 μ L da solução de mel (colunas 10 e 11 da microplaca). Em seguida foram pipetados 29 μ 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 520 nm (**Figura 38**). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

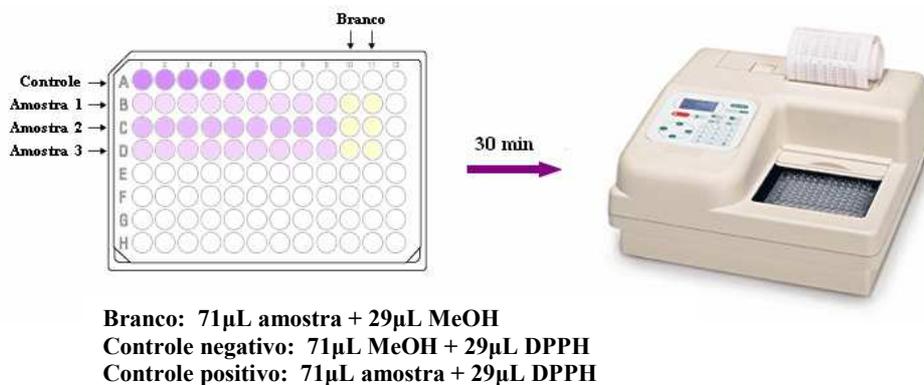


Figura 38: Esquema do ensaio de atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA

A porcentagem de atividade antiradicalar (%AA) foi calculada através da descoloração do radical DPPH, segundo a equação abaixo (MENSOR *et al.*, 2001). Para determinação da atividade antioxidante (%AA), foram selecionados para o controle negativo três valores, dos quais foi feita a média usada no cálculo ($Abs_{controle}$), e para o branco foi feita a média das leituras dos dois poços (10 e 11). Para cada amostra de mel, foram realizadas as triplicatas e calculados os valores de %AA pela média de absorbância de cada uma. Foi então

calculada a média dos %AAs obtidos em cada triplicata, sendo este valor considerado a atividade antioxidante (%AA) da amostra.

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

Onde:
 Abs amostra = absorbância da amostra com a solução de DPPH
 Abs branco = absorbância da amostra com metanol
 Abs controle = absorbância do metanol com a solução de DPPH

Para a determinação do CE₅₀ das amostras de mel foram preparadas soluções de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg/mL em MeOH/H₂O (1:1), partindo de uma solução inicial de 100 mg/mL, exceto para as amostras de mel números 50, 56, 57, 58 e 60, que foram necessárias a utilização de soluções mais diluídas, nas concentrações de 1, 3, 6, 9, 12 e 15 mg/mL. Foi realizado o mesmo procedimento descrito para a determinação da atividade antioxidante (%AA), porém utilizando duas placas para cada amostra, com três concentrações em cada linha e em ordem crescente de diluição. Foram utilizadas para a construção das curvas, as concentrações iniciais presentes nos poços a partir das diluições que foram feitas a 71%. Sendo assim, pode ser calculada as concentrações obtidas em cada poço, representada por $[]_{\text{poço}} = 0,71.[]_{\text{sol}}$, onde as concentrações de 3,55; 7,1; 14,2; 21,3; 28,4 e 35,5 mg/mL foram obtidas para as amostras de mel diluídas de 5 a 50 mg/mL, enquanto as concentrações de 0,71; 2,13; 4,26; 6,39; 8,52 e 10,65 mg/mL para as amostras de mel diluídas de 1 a 15 mg/mL.

As curvas analíticas foram preparadas com os padrões de ácidos gálico, cafeico, ferúlico e protocatecuico e dos flavonóides quercetina, isoquercetina, miricetina e rutina. A partir de soluções-estoque de 100 µM, foram feitas diluições nas concentrações de 2,5; 5; 7,5; 10; 15 e 20 µM para a quercetina, rutina, miricetina, ácido gálico e isoquercetina. Para os ácidos cafeico e ferúlico foram utilizadas as concentrações de 2,5; 5; 10; 20; 30 e 40 µM, enquanto para o ácido protocatecuico nas concentrações de 2,5; 5; 8; 12; 15 e 20 µM. As concentrações dos poços foram calculadas conforme citado anteriormente para as amostras.

A concentração efetiva, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE₅₀), foi determinada para os padrões e amostras usando o programa Microcal 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 (µg/mL) e na ordenada, a porcentagem de atividade antioxidante (% AA).

Os valores de CE_{50} obtidos pelas curvas padrão foram comparados com os das curvas de CE_{50} dos méis, após a conversão para as mesmas unidades, a fim de calcular a quantidade equivalente de padrão das amostras.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação do teor de fenólicos totais

Os métodos mais utilizados na literatura para a determinação do teor de ácidos fenólicos são os métodos de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu. O método de Folin-Denis é o mais antigo, desenvolvido por Otto Folin e Willey Denis em 1912 (FOLIN e DENIS, 1912), enquanto o Folin-Ciocalteu data de 1927 e foi desenvolvido por Otto Folin e Vintila Ciocalteu (FOLIN e CIOCALTEAU, 1927). Ambos os métodos consistem na redução do molibdênio (Mo^{+6}) presente no reagente em meio básico, através da oxidação de compostos fenólicos a ortoquinonas, formando, parcialmente, a forma reduzida Mo^{+5} (AOAC, 2006).

A solução de Folin-Denis é preparada, conforme mencionado na parte experimental, apenas pela reação entre ácido fosfórico, ácido fosfomolibídico e tungstato de sódio, e o Folin-Ciocalteu foi um aprimoramento, contendo, além dos reagentes presentes na solução de Folin-Denis, bromo, sulfato de lítio e ácido clorídrico, e o refluxo é feito sob um aquecimento mais prolongado.

No preparo das soluções de Folin-Denis realizadas neste trabalho, foi observado que algumas vezes começavam a ser formados traços esverdeados logo em seguida da adição do ácido fosfomolibídico ao tungstato de sódio, ou a solução ficava esverdeada após o início do aquecimento. Outras vezes, porém mais raramente, a solução final se apresentava amarela límpida. Isso possivelmente ocorre devido a ação de contaminantes do reagente ou do ambiente que são capazes de reduzir uma parcela do complexo de molibdênio, gerando uma leve coloração azul e assim transformando a solução amarela do reagente em esverdeada.

Outro problema que pode ocorrer durante as análises com Folin-Denis é a formação de um precipitado branco e cristalino de sal de sódio proveniente do reagente, que interfere nos resultados de absorbância. Este precipitado, caso formado, deve ser removido por centrifugação, pois a filtração gera adsorção do pigmento azul e, conseqüentemente, um valor de leitura mais baixo. Uma forma de evitar a formação do precipitado é mantendo a concentração do reagente de Folin-Denis e do carbonato de sódio a uma concentração mais

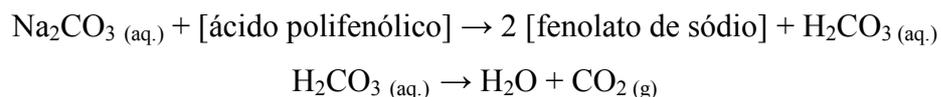
baixa, para que haja menos reagente em excesso. Da mesma forma, é mais difícil haver a formação de precipitado nas soluções que contêm maiores quantidades de fenólicos (SINGLETON e ROSSI JUNIOR, 1965).

Quanto ao Folin-Ciocalteu, há a adição de sulfato de lítio para prevenir a precipitação do sal de sódio, pois os íons sulfato previnem sua precipitação através da formação de interações de hidrogênio, que mantém o complexo do sal sódico em solução. O sulfato utilizado é o de lítio, pois o sulfato de sódio aumentaria o teor de íons de sódio e os sais de amônio e potássio são ainda menos solúveis que os sais de sódio (SINGLETON e ROSSI JUNIOR, 1965).

Quanto a interferência do ambiente na análise de substâncias fenólicas, um estudo realizado por ROSENBLAFF e PELUSO (1941) relatou não haver interferência em ambientes escuros ou com iluminação natural. Conforme os resultados obtidos por SINGLETON e ROSSI JUNIOR (1965), a exposição ao ar também não modificou os resultados, apenas tendo sido observada certa influência nas análises quando houve variação de temperatura.

Neste trabalho, as análises foram realizadas a temperatura ambiente, sendo observado, no entanto, que nos dias muito quentes (~40°C) havia aparecimento de bolhas durante o tempo de reação. Isto causou um aumento significativo no desvio padrão, sendo necessária a repetição da análise. Sendo assim, parece ser mais adequada a realização do ensaio a temperaturas controladas, pois segundo SINGLETON e ROSSI JUNIOR (1965), temperaturas muito baixas podem favorecer também a formação do precipitado branco de sal de sódio mencionado.

A análise de polifenóis se dá através da reação ácido-base o carbonato de sódio e o ácido polifenólico, produzindo o ânion fenolato, que é o agente redutor do molibdênio, e ácido carbônico. Provavelmente, esta interferência em dias mais quentes ocorre por conta da instabilidade térmica do ácido carbônico, que se decompõe a gás carbônico e água (reação abaixo), sendo observada a formação constante de pequenas bolhas durante o tempo de ensaio.



No estudo comparativo realizado por SINGLETON e ROSSI JUNIOR (1965) foram determinadas as absorvâncias de oito diferentes substâncias fenólicas a diferentes comprimentos de onda, tanto com o reagente de Folin-Denis quanto Folin-Ciocalteu, a temperatura ambiente e com diferentes tempos de reação. Os espectros obtidos foram

similares para ambos os reagentes, havendo apenas uma variação entres os valores de leitura realizados a diferentes comprimentos de onda com o reagente de Folin-Denis, na maioria dos casos a um tempo reacional acima de 4h.

Neste trabalho, foi utilizado apenas o reagente de Folin-Denis, em virtude do nosso laboratório dispor dos reagentes para sua síntese. Mesmo nas amostras de mel que apresentaram menor absorbância no ultravioleta, não foi observada a formação de precipitado durante as 2h de reação. Também, o padrão e as amostras apresentaram uma boa reatividade, com uma média de absorbância pouco acima de 0,900 a 760 nm. Portanto, o método de Folin-Denis nestas condições reacionais apresentou-se satisfatório para a análise de méis, exceto quando a temperatura ambiente encontrava-se alta ($\sim 40^{\circ}\text{C}$). O reagente de Folin-Denis apresenta ainda a vantagem de ter um custo menor e uma maior rapidez no preparo.

Quanto à reatividade das substâncias fenólicas, sabe-se que pode haver uma grande variação no grau de oxidação de acordo com os aspectos estruturais, o que faz com que a solução de Folin-Denis, quando reagida com diferentes padrões de ácidos fenólicos, apresente diferentes absorbâncias no ultravioleta.

Por exemplo, o grupo catecol (1,2-diidroxifenol) reage com a solução de Folin-Denis de forma que ambas as hidroxilas são oxidadas, formando ortoquinonas. Dessa forma, este grupo promove, em média, o dobro da absortividade molar quando comparado ao fenol. Já o ácido gálico e o pirogalol (derivados de 1,2,3-benzenotriol) reagem como se apenas duas hidroxilas estivessem envolvidas no processo. Em teste realizado por SINGLETON e ROSSI JUNIOR (1965), o ácido tânico, que apresenta dez unidades de ácido gálico, apresentou absortividade molar cerca de dez vezes maior que a do ácido gálico, no comprimento de onda de 725 nm (**Tabela 10**).

Tabela 10: Absortividade molar de soluções de substâncias fenólicas a 5%, lidas a 725 nm após 1 hora de reação

	Folin-Ciocalteu	Folin-Denis
Fenol	11,6	9,1
Catecol	21,5	17,1
Pirogalol	20,9	16,1
Ácido gálico	23,3	19,3
Ácido tânico	186,7	152,7

Complexos também podem ser formados entre o reagente de Folin-Denis e outros polifenóis, taninos e flavonóides que estejam presentes na amostra, e, como a análise depende exclusivamente da oxidação do complexo do reagente e não do substrato, o método promove a leitura das substâncias fenólicas totais (flavonóides, ácidos fenólicos, taninos, etc) que estiverem presentes.

Apesar do ácido tânico também ser bastante utilizado na construção da curva analítica, o ácido gálico é mais adequado, em virtude da sua pureza, por ser mais fácil de se obter e conservar, e também por apresentar uma boa solubilidade, estabilidade e ser mais viável economicamente (SINGLETON e ROSSI JUNIOR, 1965). Outros ácidos fenólicos, tanto derivados do ácido hidroxibenzóico como hidroxicinâmico, também podem ser usados como padrão. Neste trabalho, foi utilizada a curva padrão de ácido gálico (**Figura 36**; VIANNA, 2010).

O conteúdo foi expresso em concentração de ácido gálico ($\text{mgE}_{\text{AG}}/100\text{g}$ de mel, metodologia já descrita nas pág. 56 e 57). Entre os ácidos fenólicos mais utilizados como substância padrão para a determinação de substâncias fenólicas nos méis, descritos na literatura, está o ácido gálico (MEDA *et al.*, 2005; SOCHA *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2009; PICHICHERO *et al.*, 2009; AL *et al.*, 2009).

Foi utilizada uma curva analítica obtida a partir de diferentes concentrações de ácido gálico (0-0,025 mg/mL) para a determinação indireta dos teores de fenólicos totais, que foi relatada por VIANNA, 2010. Os valores das diferentes concentrações obtidas da solução do padrão de ácido gálico, com suas absorbâncias (triplicata e média) nos ensaios de Folin-Denis, geraram o gráfico apresentado abaixo (**Figura 39**).

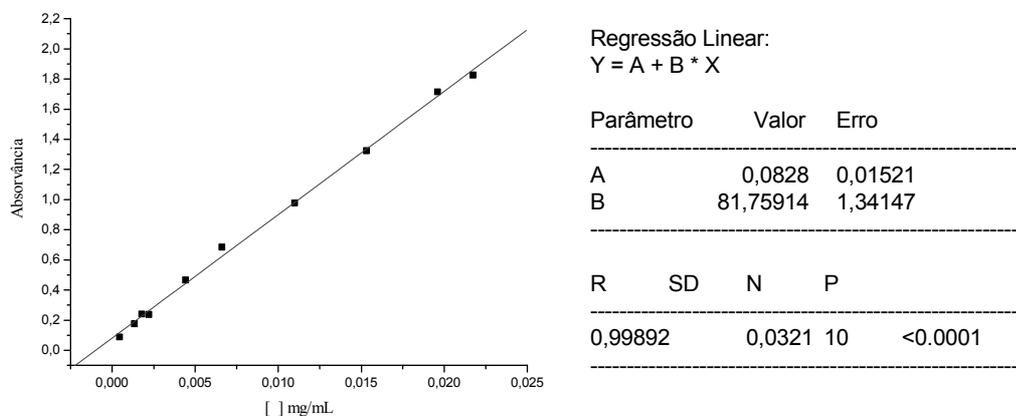


Figura 39: Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico e as absorbâncias (760 nm), nos ensaios de Folin-Denis (VIANNA, 2010)

Esta 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 absorbância a 760 nm, X é a concentração de ácido gálico. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,999. Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de fenóis totais nas amostras (concentração X), substituindo Y pela média das absorbâncias de cada amostra de mel. Utilizando como exemplo as três absorbâncias obtidas para a amostra n° 1 (**Tabela 11**, pág. 66), têm-se as seguintes equações:

$$\begin{aligned} Y_1 &= A + B \cdot X_1 \text{ (1ª leitura)} \\ Y_1 &= 0,083 (\pm 0,0152) + 81,759 (\pm 1,3415) \cdot X_1 \\ \mathbf{0,807} &= 0,083 (\pm 0,0152) + 81,759 (\pm 1,3415) \cdot X_1 \\ \mathbf{X_1} &= \mathbf{0,00886 \text{ mg/mL}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Y_2 &= A + B \cdot X_2 \text{ (2ª leitura)} \\ Y_2 &= 0,083 (\pm 0,0152) + 81,759 (\pm 1,3415) \cdot X_2 \\ \mathbf{0,810} &= 0,083 (\pm 0,0152) + 81,759 (\pm 1,3415) \cdot X_2 \\ \mathbf{X_2} &= \mathbf{0,00889 \text{ mg/mL}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} Y_3 &= A + B \cdot X_3 \text{ (3ª leitura)} \\ Y_3 &= 0,083 (\pm 0,0152) + 81,759 (\pm 1,3415) \cdot X_3 \\ \mathbf{0,810} &= 0,083 (\pm 0,0152) + 81,759 (\pm 1,3415) \cdot X_3 \\ \mathbf{X_3} &= \mathbf{0,00889 \text{ mg/mL}} \end{aligned}$$

Em cada frasco da triplicata há uma concentração, em equivalente de ácido gálico, de 0,00886; 0,00889 e 0,00889 mg/mL, respectivamente. Como há um volume total de 5 mL por frasco (0,5 mL de solução de mel + 2,5 mL de solução de Folin-Denis + 2,0 mL de solução de carbonato de sódio), para encontrar a massa do ácido fenólico contida em cada triplicata o valor foi multiplicado por cinco.

$$\begin{aligned} 0,00886 \text{ mg} &\text{ ---- } 1 \text{ mL} \\ X_1 &\text{ ----- } 5 \text{ mL} \therefore \mathbf{X_1 = 0,04430 \text{ mg}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 0,00889 \text{ mg} &\text{ ---- } 1 \text{ mL} \\ X_2 &\text{ ----- } 5 \text{ mL} \therefore \mathbf{X_2 = 0,04445 \text{ mg}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 0,00889 \text{ mg} &\text{ ---- } 1 \text{ mL} \\ X_3 &\text{ ----- } 5 \text{ mL} \therefore \mathbf{X_3 = 0,04445 \text{ mg}} \end{aligned}$$

$$\mathbf{X_{méd.} = 0,04440 \text{ mg}}$$

Como foi inserido em cada frasco um volume de 0,5 mL de solução de mel a 100 mg/mL, conclui-se que a massa de mel presente em cada triplicata foi de 50 mg.

$$\begin{array}{l} 100 \text{ mg} \text{ --- } 1 \text{ mL} \\ x \text{ ----- } 0,5 \text{ mL} \therefore x = 50 \text{ mg (0,05g)} \end{array}$$

Conforme calculado, a média em equivalente de ácido gálico presente em 0,05g de mel (quantidade de mel inserida por frasco) foi de 0,04440 mg. Dessa forma, pode ser obtido o teor médio por 100g de mel.

$$\begin{array}{l} 0,0440 \text{ mg} \text{ ----- } 0,05\text{g de mel} \\ [\] \text{ mgE}_{\text{AG}} \text{ ----- } 100\text{g de mel} \rightarrow [\] \text{ mgE}_{\text{AG}} = \mathbf{88,80 \text{ mg/100g de mel}} \end{array}$$

Juntando as equações e simplificando os valores, pode-se obter a fórmula geral utilizada para os cálculos:

$$[\] \text{ E}_{\text{AG}} = \left(\frac{Y - A}{B} \right) \times 10000$$

Na **Tabela 11** a seguir encontram-se as quantidades de fenóis totais calculadas para cada amostra de mel.

Tabela 11: Resultados obtidos para teor de fenóis totais para as amostras de méis, através do reagente de Folin-Denis

Amostra	y ₁	y ₂	y ₃	y _{med.}	Desvio Padrão	mgE _{AG} /100g	Cor	Palinológica	Obtenção da amostra
26	0,726	0,730	0,729	0,728	± 0,002	78,93	Clara	<i>Anadenanthera</i>	Casimiro de Abreu (RJ)
23	1,097	1,115	1,117	1,110	± 0,011	125,57	Média	<i>Anadenanthera</i>	Maricá (RJ)
48	1,006	0,995	0,996	0,999	± 0,006	112,04	Média	<i>Anadenanthera</i>	Caxias (RJ)
49	0,952	0,957	0,953	0,954	± 0,003	106,53	Média	<i>Anadenanthera</i>	4° Distrito de Itaocara (RJ)
24	1,250	1,248	1,242	1,247	± 0,004	142,33	Escura	<i>Anadenanthera</i>	Maricá (RJ) - Ponta Grossa
25	0,990	0,972	0,990	0,984	± 0,010	110,20	Escura	<i>Anadenanthera</i>	Rio Claro (RJ)
Média	1,004	1,003	1,005	1,004	± 0,006	112,60	-	<i>Anadenanthera</i>	-
17	0,927	0,924	0,922	0,924	± 0,003	102,90	Média	<i>Asteraceae</i>	Pirai (RJ)
44	0,903	0,903	0,902	0,903	± 0,001	100,25	Média	<i>Asteraceae</i>	Miguel Pereira (RJ)
59	0,773	0,777	0,772	0,774	± 0,003	84,52	Média	<i>Asteraceae</i>	Vale das Videiras - Petrópolis (RJ)
33	0,906	0,907	0,908	0,907	± 0,001	100,78	Média	<i>Asteraceae</i>	Rio das Flores (RJ)
Média	0,877	0,878	0,876	0,877	± 0,002	97,11	-	<i>Asteraceae</i>	-
04	0,560	0,559	0,559	0,559	± 0,001	58,26	Clara	<i>Eucalyptus</i>	B. de Minas (MG)
31	0,576	0,576	0,573	0,575	± 0,002	60,18	Clara	<i>Eucalyptus</i>	Volta Redonda (RJ)
07	0,670	0,666	0,667	0,668	± 0,002	71,51	Média	<i>Eucalyptus</i>	Itamonte (MG)
15	1,234	1,236	1,239	1,236	± 0,003	141,06	Média	<i>Eucalyptus</i>	Paracambi (RJ)
30	1,164	1,164	1,150	1,159	± 0,008	131,65	Média	<i>Eucalyptus</i>	São Gonçalo (RJ)
05	1,161	1,166	1,161	1,163	± 0,003	132,05	Escura	<i>Eucalyptus</i>	Rio Preto (MG)
06	0,982	0,982	0,981	0,982	± 0,001	109,92	Escura	<i>Eucalyptus</i>	Nova Friburgo (RJ)
20	1,204	1,201	1,205	1,203	± 0,002	137,03	Escura	<i>Eucalyptus</i>	Valença (RJ)
50	1,002	0,990	0,997	0,996	± 0,006	111,71	Escura	<i>Eucalyptus</i>	-
Média	0,950	0,949	0,948	0,949	± 0,003	105,93	-	<i>Eucalyptus</i>	-
09	0,701	0,702	0,707	0,703	± 0,003	75,87	Clara	<i>Heterofloral</i>	-
10	0,707	0,709	0,700	0,705	± 0,005	76,12	Clara	<i>Heterofloral</i>	Paraíba do Sul (RJ)
51	0,692	0,698	0,707	0,699	± 0,008	75,34	Média	<i>Heterofloral</i>	Friburgo (RJ)
54	0,656	0,653	0,664	0,658	± 0,006	70,29	Média	<i>Heterofloral</i>	Bambu (MG)
02	0,841	0,838	0,844	0,841	± 0,003	92,71	Média	<i>Heterofloral</i>	Quatis (RJ)
08	0,800	0,798	0,802	0,800	± 0,002	87,70	Média	<i>Heterofloral</i>	Teresópolis (RJ)
13	0,872	0,879	0,880	0,877	± 0,004	97,11	Média	<i>Heterofloral</i>	Nova Friburgo (RJ)
14	1,222	1,220	1,220	1,221	± 0,001	139,15	Média	<i>Heterofloral</i>	Nova Friburgo (RJ)
16	0,763	0,769	0,762	0,765	± 0,004	83,38	Média	<i>Heterofloral</i>	Santa Maria Madalena (RJ)
19	0,749	0,745	0,747	0,747	± 0,002	81,21	Média	<i>Heterofloral</i>	-
22	1,108	1,100	1,108	1,105	± 0,005	125,04	Média	<i>Heterofloral</i>	Maricá (RJ)
28	0,969	0,969	0,971	0,970	± 0,001	108,45	Média	<i>Heterofloral</i>	Porciúncula (RJ)
34	0,801	0,805	0,804	0,803	± 0,002	88,10	Média	<i>Heterofloral</i>	Rio das Flores (RJ)
35	0,857	0,867	0,868	0,864	± 0,006	95,52	Média	<i>Heterofloral</i>	Rio das Flores (RJ)
37	0,903	0,910	0,895	0,903	± 0,008	100,25	Média	<i>Heterofloral</i>	Paty do Alferes (RJ)
38	0,851	0,858	0,853	0,854	± 0,004	94,30	Média	<i>Heterofloral</i>	Paty do Alferes (RJ)
39	0,840	0,841	0,839	0,840	± 0,001	92,59	Média	<i>Heterofloral</i>	Paty do Alferes
40	0,821	0,834	0,827	0,827	± 0,007	91,04	Média	<i>Heterofloral</i>	Três Rios (RJ)
41	0,924	0,926	0,924	0,925	± 0,001	102,94	Média	<i>Heterofloral</i>	Três Rios (RJ)
42	0,901	0,900	0,894	0,898	± 0,004	99,72	Média	<i>Heterofloral</i>	Três Rios (RJ)
43	0,904	0,910	0,909	0,908	± 0,003	100,87	Média	<i>Heterofloral</i>	Três Rios (RJ)
45	0,909	0,910	0,910	0,910	± 0,001	101,11	Média	<i>Heterofloral</i>	Miguel Pereira (RJ)
47	0,917	0,920	0,927	0,921	± 0,005	102,54	Média	<i>Heterofloral</i>	Miguel Pereira (RJ)
52	0,877	0,891	0,892	0,887	± 0,008	98,30	Escura	<i>Heterofloral</i>	Nova Friburgo (RJ)
55	0,930	0,926	0,930	0,929	± 0,002	103,43	Escura	<i>Heterofloral</i>	Barra Mansa (RJ)
56	1,164	1,160	1,162	1,162	± 0,002	131,97	Escura	<i>Heterofloral</i>	Niterói (RJ)
58	1,334	1,335	1,321	1,330	± 0,008	152,52	Escura	<i>Heterofloral</i>	Estrada da Posse - Tanguá (RJ)
Média	0,889	0,892	0,891	0,891	± 0,004	98,80	-	<i>Heterofloral</i>	-
36	0,897	0,897	0,891	0,895	± 0,003	99,32	Média	<i>Montanoa</i>	Paty do Alferes
46	0,922	0,916	0,915	0,918	± 0,004	102,09	Média	<i>Montanoa</i>	Miguel Pereira (RJ)
Média	0,910	0,907	0,903	0,906	± 0,004	100,70	-	<i>Montanoa</i>	-
11	0,750	0,739	0,742	0,744	± 0,006	80,81	Clara	<i>Myrcia</i>	Paraíba do Sul (RJ)
12	0,750	0,743	0,744	0,746	± 0,004	81,05	Clara	<i>Myrcia</i>	Paraíba do Sul (RJ)
03	0,957	0,948	0,959	0,955	± 0,006	106,61	Média	<i>Myrcia</i>	Santa Maria Madalena (RJ)
21	0,863	0,868	0,868	0,866	± 0,003	95,81	Média	<i>Myrcia</i>	Barra do Pirai (RJ)
32	1,055	1,058	1,064	1,059	± 0,005	119,38	Escura	<i>Myrcia</i>	Barra Mansa (RJ)
60	1,130	1,138	1,137	1,135	± 0,004	128,67	Escura	<i>Myrcia</i>	Região do mendanha (RJ)
Média	0,918	0,916	0,919	0,917	± 0,005	102,05	-	<i>Myrcia</i>	-
53	0,659	0,674	0,663	0,665	± 0,008	71,23	Clara	<i>Citrus</i>	Apicultura migratória Pb. do Sul e SP
18	0,994	1,010	1,005	1,003	± 0,008	112,53	Média	<i>Copaifera</i>	Valença (RJ)
01	0,807	0,810	0,810	0,809	± 0,002	88,80	Média	<i>Ambrosia</i>	Volta Redonda (RJ)
27	1,163	1,170	1,169	1,167	± 0,004	132,63	Escura	<i>Vernonia</i>	Casimiro de Abreu (RJ)
57	1,269	1,253	1,262	1,261	± 0,008	144,12	Escura	<i>Verbenaceae</i>	Itaboraí (RJ)
29	1,070	1,084	1,082	1,079	± 0,008	121,78	Média	<i>Gochnatia</i>	Rio Bonito (RJ)

Conforme pode ser observado, o teor em fenólicos totais para os méis estudados nesse trabalho variou significativamente com o tipo/região do mel analisado, apresentado os valores que variaram de 58,26 a 152,52 mgE_{AG}/100g de mel. A média obtida foi de 102,83 mgE_{AG}/100g. Dos méis analisados, a amostra n° 4 (mel de eucalipto de cor clara) foi o que apresentou a menor concentração, enquanto a amostra n° 58 (mel heterofloral de cor escura) foi a que apresentou a maior concentração.

Ao comparar esses resultados com os estudos realizados por LIANDA (2009) para outros méis brasileiros (Rio de Janeiro e São Paulo), foi descrito que o teor de fenólicos totais para méis silvestres esteve em uma faixa entre 42,8 a 78,2 mgE_{AG}/100g de mel, e para méis de laranjeira (cítrico) entre 34,0 a 53,2 mgE_{AG}/100g de mel. Verificou-se que os valores obtidos no presente trabalho foram bem superiores, sendo obtida a faixa de 70,29 a 152,52 mgE_{AG}/100g para méis silvestres (monoflorais) e para o mel cítrico, foi obtido o valor de 71,23 mgE_{AG}/100g de mel.

O trabalho realizado por VIANNA, (2010) com outros méis brasileiros (Minas Gerais e Espírito Santo), apresentou valores de 23,83 a 62,69 mgE_{AG}/100g de mel para as amostras de assa peixe (*Vernonia*) e de 79,2 a 179,13 mgE_{AG}/100g de mel para as de eucalipto, estando em faixa inferior a obtida neste trabalho quanto ao mel de *Vernonia* (132,63 mgE_{AG}/100g de mel) e um pouco inferior a de eucalipto (58,26 a 141,07 mgE_{AG}/100g de mel).

É importante destacar que os méis de *Anadenanthera* apresentaram o maior teor em fenólicos (112,60 mgE_{AG}/100g de mel), seguido dos méis de eucalipto (105,93 mgE_{AG}/100g de mel), *Myrcia* (103,05 mgE_{AG}/100g de mel), *Montanoa* (100,70 mgE_{AG}/100g de mel), heterofloral (98,80 mgE_{AG}/100g de mel) e, por último, os méis de Asteraceae (97,11 mgE_{AG}/100g de mel). De um modo geral, em todas as amostras de mesma origem botânica, o teor em fenólicos foi maior para os méis de coloração mais escura. Esse resultado também está de acordo com vários relatos da literatura (SOCHA *et al.*, 2009; BERTONCELJ *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2009; FRANKEL *et al.*, 1998).

Em um estudo realizado por PICHICHERO *et al.* (2009) com méis italianos de diversas origens florais, os fenólicos totais foram bastante inferiores (entre 6,05 a 27,60 mgE_{AG}/100g de mel), com uma média de apenas 14,49 mgE_{AG}/100g de mel. Os resultados obtidos por ZALIBERA *et al.* (2008) com méis da Eslováquia mostraram uma variação na faixa de 16 a 58 mgE_{AG}/100g, e os apresentados por BERTONCELJ *et al.* (2007), com méis da Eslovênia, variaram entre 2,57 a 27,23 mgE_{AG}/100g de mel. Os resultados obtidos por AL *et al.* (2009) para méis florais da Romênia apresentaram uma faixa de 2,00 a 45,00

mgE_{AG}/100g de mel, valores também bastante inferiores aos deste e aos dos outros trabalhos mencionados com méis brasileiros.

Já em um estudo realizado com méis venezuelanos (VIT *et al.*, 2009), o total de fenólicos variou entre 38,15 e 182,10 mgE_{AG}/100g, com uma média de 93,50 mgE_{AG}/100g de mel, sendo bastante similar aos méis brasileiros estudados neste trabalho. No estudo realizado por MEDA *et al.* (2005) com méis sul-africanos, foi obtida a faixa de 32,59 a 114,75 mgE_{AG}/100g, com uma média de 74,38 mgE_{AG}/100g, sendo também mais semelhante aos totais de fenólicos obtidos para os méis brasileiros estudados do que aos europeus.

O fato dos méis europeus apresentarem perfil diferenciado pode estar relacionado a flora da região, e/ou ainda com as características das abelhas européias. Todos os méis dos trabalhos mencionados são provenientes da abelha *Apis mellifera*, porém não são mencionadas as subespécies. Na África, as subespécies são conhecidas por terem uma alta produtividade de mel. Isso pode ter também contribuído para o alto teor de fenólicos encontrados nos méis sul-africanos, assim como nos méis produzidos pelas abelhas africanizadas brasileiras. Na Europa, no entanto, predomina a subespécie *Apis mellifera mellifera*, uma abelha menos agressiva, porém menos resistente e que produz mel apenas em determinadas épocas. Portanto, é provável que a diferença entre subespécies possa também ter ocasionado uma menor coleta, retenção ou acumulação das substâncias fenólicas totais, seja pela forma ou frequência de visita das abelhas às flores ou pela manipulação do néctar na colméia.

Cabe destacar que, nos trabalhos mencionados, as metodologias utilizadas foram os métodos de Folin-Denis ou Ciocalteau.

4.2. Determinação do teor de flavonóides totais

Neste trabalho, foi feita a avaliação da quantidade de flavonóides das amostras de mel pelo método espectrofotométrico utilizando o cloreto de alumínio (AlCl₃). O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. A leitura dos complexos é feita a 415 nm, o que evita a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos.

Os flavonóides presentes no mel podem ter origem no pólen, na propólis e no néctar, sendo a propólis a fonte mais rica em flavonóides (FERREIRA *et al.*, 1997; SIESS *et al.*, 1996; MARTOS *et al.*, 2000).

Tendo em vista as diferentes capacidades de quelação dos flavonóides, estes apresentam diferentes intensidades de absorção a 415 nm, gerando curvas de absorbância *versus* concentração, com distintos coeficientes. Para a determinação indireta do teor de flavonóides totais para cada amostra de mel, utilizou-se a quercetina como padrão, que é um flavonóide que apresenta uma boa capacidade complexante.

A curva analítica para a determinação indireta dos flavonóides totais dos méis foi construída a partir das leituras de absorbância (415 nm) obtidas para cada concentração da solução padrão de quercetina (0 – 0,025 mg/mL; **Figura 40**).

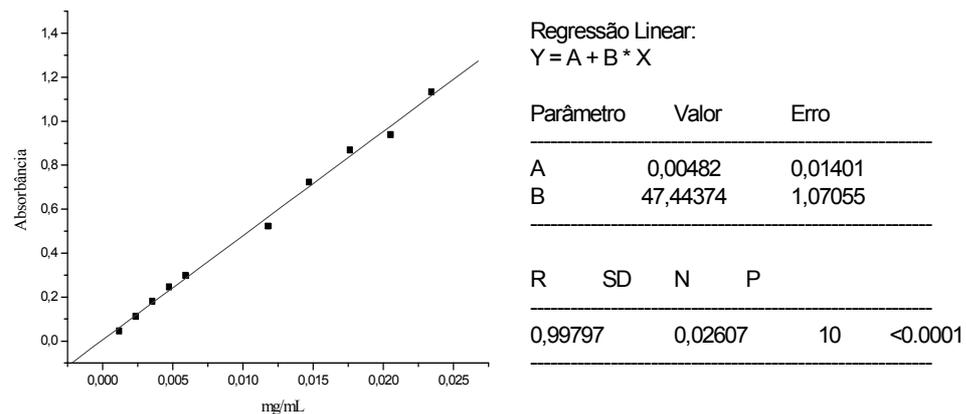


Figura 40: Curva analítica das médias das concentrações da solução de quercetina *versus* as leituras de absorbâncias (415 nm), após o ensaio com cloreto de alumínio

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 415 nm e X é a concentração de quercetina. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,998. 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. Foi aplicado o mesmo método utilizado para a quantificação de fenólicos totais, porém levando em conta a maior concentração da solução, que foi de 500 mg/mL, bem como o volume final da solução, que foi diferente. Utilizando como exemplo as três absorbâncias obtidas para a amostra n° 1 (**Tabela 12**, pág. 72), têm-se as seguintes equações:

$$\begin{aligned}
 Y_1 &= A + B \cdot X_1 \text{ (1ª leitura)} \\
 Y_1 &= 0,00482 (\pm 0,01401) + 47,44374 (\pm 1,07055) \cdot X_1 \\
 \mathbf{0,911} &= 0,00482 (\pm 0,01401) + 47,44374 (\pm 1,07055) \cdot X_1 \\
 \mathbf{X_1} &= \mathbf{0,01910 \text{ mg/mL}}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Y_2 &= A + B \cdot X_2 \text{ (2ª leitura)} \\
 Y_2 &= 0,00482 (\pm 0,01401) + 47,44374 (\pm 1,07055) \cdot X_2 \\
 \mathbf{0,909} &= 0,00482 (\pm 0,01401) + 47,44374 (\pm 1,07055) \cdot X_2 \\
 \mathbf{X_2} &= \mathbf{0,01906 \text{ mg/mL}}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Y_3 &= A + B \cdot X_3 \text{ (3ª leitura)} \\
 Y_3 &= 0,00482 (\pm 0,01401) + 47,44374 (\pm 1,07055) \cdot X_3 \\
 \mathbf{0,911} &= 0,00482 (\pm 0,01401) + 47,44374 (\pm 1,07055) \cdot X_3 \\
 \mathbf{X_3} &= \mathbf{0,01910 \text{ mg/mL}}
 \end{aligned}$$

Em cada frasco da triplicata há uma concentração, em equivalente de quercetina, de 0,01910; 0,01906 e 0,01910 mg/mL, respectivamente. Como há um volume total de 2 mL por frasco (2 mL de solução de mel + 2 mL de solução de cloreto de alumínio), para encontrar a massa de flavonóide contida em cada triplicata o valor foi multiplicado por quatro.

$$\begin{aligned}
 &0,01910 \text{ mg} \text{ ---- } 1 \text{ mL} \\
 X_1 &\text{ ----- } 4 \text{ mL} \therefore \mathbf{X_1 = 0,07640 \text{ mg}}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &0,01906 \text{ mg} \text{ ---- } 1 \text{ mL} \\
 X_2 &\text{ ----- } 4 \text{ mL} \therefore \mathbf{X_2 = 0,07624 \text{ mg}}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &0,01910 \text{ mg} \text{ ---- } 1 \text{ mL} \\
 X_3 &\text{ ----- } 4 \text{ mL} \therefore \mathbf{X_3 = 0,07640 \text{ mg}}
 \end{aligned}$$

$$\mathbf{X_{méd.} = 0,07635 \text{ mg}}$$

Como foi inserido em cada frasco um volume de 2 mL de solução de mel a 500 mg/mL, conclui-se que a massa de mel presente em cada triplicata foi de 1g.

$$\begin{aligned}
 &500 \text{ mg} \text{ --- } 1 \text{ mL} \\
 x &\text{ ----- } 2 \text{ mL} \therefore x = 1000 \text{ mg (1,00 g)}
 \end{aligned}$$

Conforme calculado, a média em equivalente de quercetina presente em 0,05g de mel (quantidade de mel inserida por frasco) foi de 0,07635 mg. Dessa forma, pode ser obtido o teor médio por 100g de mel.

$$\begin{aligned}
 &0,07635 \text{ mg} \text{ ----- } 1 \text{ g de mel} \\
 [] \text{ mgE}_{\text{QC}} &\text{ ----- } 100 \text{ g de mel} \rightarrow [] \text{ mgE}_{\text{QC}} = \mathbf{7,63 \text{ mg/100g de mel}}
 \end{aligned}$$

Simplificando as equações, para calcular a concentração equivalente de quercetina nas amostras, basta a multiplicação dos valores da equação da reta pelos 4 mL de solução e a massa de 100g, conforme a equação:

$$[\text{E}]_{\text{QC}} = \left(\frac{Y - A}{B} \right) \times 400$$

Os valores de absorvância das amostras e os teores de flavonóides totais encontram-se listados na **Tabela 12** a seguir.

Tabela 12: Valores obtidos para teores de flavonóides totais para as amostras de méis usando cloreto de alumínio

Amostra	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y _{méd.}	Desvio Padrão	mgE _{oc} /100g	Cor	Palinológica	Obtenção da amostra
26	0,305	0,308	0,309	0,307	± 0,002	2,55	Clara	<i>Anadenanthera</i>	Casimiro de Abreu (RJ)
23	0,712	0,715	0,716	0,714	± 0,002	5,98	Média	<i>Anadenanthera</i>	Maricá (RJ)
48	0,431	0,437	0,438	0,435	± 0,004	3,63	Média	<i>Anadenanthera</i>	Caxias (RJ)
49	0,430	0,433	0,438	0,434	± 0,004	3,62	Média	<i>Anadenanthera</i>	4° Distrito de Itaocara (RJ)
24	0,890	0,898	0,901	0,896	± 0,006	7,52	Escura	<i>Anadenanthera</i>	Maricá (RJ) - Ponta Grossa
25	0,935	0,941	0,946	0,941	± 0,006	7,89	Escura	<i>Anadenanthera</i>	Rio Claro (RJ)
Média	0,617	0,622	0,625	0,621	± 0,004	5,20	-	<i>Anadenanthera</i>	-
17	0,837	0,842	0,849	0,843	± 0,006	7,06	Média	<i>Asteraceae</i>	Piraiá (RJ)
44	0,643	0,643	0,643	0,643	± 0,000	5,38	Média	<i>Asteraceae</i>	Miguel Pereira (RJ)
59	0,489	0,490	0,491	0,490	± 0,001	4,09	Média	<i>Asteraceae</i>	Vale das Videiras - Petrópolis (RJ)
33	0,654	0,662	0,660	0,659	± 0,004	5,51	Média	<i>Asteraceae</i>	Rio das Flores (RJ)
Média	0,656	0,659	0,661	0,659	± 0,003	5,51	-	<i>Asteraceae</i>	-
04	1,311	1,310	1,310	1,310	± 0,001	11,01	Clara	<i>Eucalyptus</i>	B. de Minas (MG)
31	0,238	0,242	0,243	0,241	± 0,003	1,99	Clara	<i>Eucalyptus</i>	Volta Redonda (RJ)
07	1,243	1,245	1,256	1,248	± 0,007	10,48	Média	<i>Eucalyptus</i>	Itamonte (MG)
15	1,291	1,300	1,305	1,299	± 0,007	10,91	Média	<i>Eucalyptus</i>	Paracambi (RJ)
30	1,008	1,002	1,005	1,005	± 0,003	8,43	Média	<i>Eucalyptus</i>	São Gonçalo (RJ)
05	1,201	1,198	1,200	1,200	± 0,002	10,07	Escura	<i>Eucalyptus</i>	Rio Preto (MG)
06	1,412	1,414	1,410	1,412	± 0,002	11,86	Escura	<i>Eucalyptus</i>	Nova Friburgo (RJ)
20	1,073	1,085	1,084	1,081	± 0,007	9,07	Escura	<i>Eucalyptus</i>	Valença (RJ)
50	1,039	1,042	1,045	1,042	± 0,003	8,74	Escura	<i>Eucalyptus</i>	-
Média	1,091	1,093	1,095	1,093	± 0,004	9,17	-	<i>Eucalyptus</i>	-
09	0,311	0,311	0,311	0,311	± 0,000	2,58	Clara	<i>Heterofloral</i>	-
10	0,305	0,310	0,306	0,307	± 0,003	2,55	Clara	<i>Heterofloral</i>	Paraíba do Sul (RJ)
51	0,391	0,391	0,394	0,392	± 0,002	3,26	Média	<i>Heterofloral</i>	Friburgo (RJ)
54	0,346	0,342	0,342	0,343	± 0,002	2,85	Média	<i>Heterofloral</i>	Bambu (MG)
02	0,593	0,597	0,597	0,596	± 0,002	4,98	Média	<i>Heterofloral</i>	Quatis (RJ)
08	0,520	0,521	0,517	0,519	± 0,002	4,34	Média	<i>Heterofloral</i>	Teresópolis (RJ)
13	0,621	0,623	0,625	0,623	± 0,002	5,21	Média	<i>Heterofloral</i>	Nova Friburgo (RJ)
14	1,279	1,300	1,296	1,292	± 0,011	10,85	Média	<i>Heterofloral</i>	Nova Friburgo (RJ)
16	0,396	0,395	0,396	0,396	± 0,001	3,30	Média	<i>Heterofloral</i>	Santa Maria Madalena (RJ)
19	1,375	1,379	1,383	1,379	± 0,004	11,59	Média	<i>Heterofloral</i>	-
22	0,713	0,716	0,713	0,714	± 0,002	5,98	Média	<i>Heterofloral</i>	Maricá (RJ)
28	0,791	0,797	0,794	0,794	± 0,003	6,65	Média	<i>Heterofloral</i>	Porciúncula (RJ)
34	0,658	0,661	0,666	0,662	± 0,004	5,54	Média	<i>Heterofloral</i>	Rio das Flores (RJ)
35	0,729	0,729	0,730	0,729	± 0,001	6,11	Média	<i>Heterofloral</i>	Rio das Flores (RJ)
37	0,728	0,733	0,729	0,730	± 0,003	6,11	Média	<i>Heterofloral</i>	Paty do Alferes (RJ)
38	0,693	0,695	0,701	0,696	± 0,004	5,83	Média	<i>Heterofloral</i>	Paty do Alferes (RJ)
39	0,699	0,700	0,705	0,701	± 0,003	5,87	Média	<i>Heterofloral</i>	Paty do Alferes (RJ)
40	0,613	0,615	0,615	0,614	± 0,001	5,14	Média	<i>Heterofloral</i>	Três Rios (RJ)
41	0,622	0,626	0,629	0,626	± 0,004	5,23	Média	<i>Heterofloral</i>	Três Rios (RJ)
42	0,633	0,633	0,632	0,633	± 0,001	5,29	Média	<i>Heterofloral</i>	Três Rios (RJ)
43	0,654	0,659	0,657	0,657	± 0,003	5,50	Média	<i>Heterofloral</i>	Três Rios (RJ)
45	0,638	0,635	0,645	0,639	± 0,005	5,35	Média	<i>Heterofloral</i>	Miguel Pereira (RJ)
47	0,634	0,634	0,638	0,635	± 0,002	5,32	Média	<i>Heterofloral</i>	Miguel Pereira (RJ)
52	0,651	0,656	0,663	0,657	± 0,006	5,50	Escura	<i>Heterofloral</i>	Nova Friburgo (RJ)
55	0,836	0,845	0,842	0,841	± 0,005	7,05	Escura	<i>Heterofloral</i>	Barra Mansa (RJ)
56	0,620	0,623	0,625	0,623	± 0,003	5,21	Escura	<i>Heterofloral</i>	Niterói (RJ)
58	1,049	1,048	1,057	1,051	± 0,005	8,82	Escura	<i>Heterofloral</i>	Estrada da Posse - Tanguá (RJ)
Média	0,670	0,673	0,674	0,673	± 0,003	5,63	-	<i>Heterofloral</i>	-
36	0,711	0,713	0,727	0,717	± 0,009	6,00	Média	<i>Montanoa</i>	Paty do Alferes (RJ)
46	0,623	0,623	0,623	0,623	± 0,000	5,21	Média	<i>Montanoa</i>	Miguel Pereira (RJ)
Média	0,667	0,668	0,675	0,670	± 0,005	5,61	-	<i>Montanoa</i>	-
11	0,295	0,294	0,298	0,296	± 0,002	2,45	Clara	<i>Myrcia</i>	Paraíba do Sul (RJ)
12	0,284	0,284	0,284	0,284	± 0,000	2,35	Clara	<i>Myrcia</i>	Paraíba do Sul (RJ)
03	0,854	0,857	0,859	0,857	± 0,003	7,18	Média	<i>Myrcia</i>	Santa Maria Madalena (RJ)
21	0,514	0,515	0,514	0,514	± 0,001	4,30	Média	<i>Myrcia</i>	Barra do Pirai (RJ)
32	1,097	1,107	1,110	1,105	± 0,007	9,27	Escura	<i>Myrcia</i>	Barra Mansa (RJ)
60	0,678	0,681	0,684	0,681	± 0,003	5,70	Escura	<i>Myrcia</i>	Região do mendanha (RJ)
Média	0,620	0,623	0,625	0,623	± 0,003	5,21	-	<i>Myrcia</i>	-
53	0,261	0,259	0,262	0,261	± 0,002	2,16	Clara	<i>Citrus</i>	Apicultura migratória Pb. do Sul e SP
18	0,894	0,899	0,899	0,897	± 0,003	7,52	Média	<i>Copaifera</i>	Valença (RJ)
01	0,911	0,909	0,911	0,910	± 0,001	7,63	Média	<i>Ambrosia</i>	Volta Redonda (RJ)
27	1,184	1,182	1,179	1,182	± 0,003	9,92	Escura	<i>Vernonia</i>	Casimiro de Abreu (RJ)
57	0,611	0,617	0,619	0,616	± 0,004	5,15	Escura	<i>Verbenaceae</i>	Itaboraí (RJ)
29	0,495	0,490	0,497	0,494	± 0,004	4,12	Média	<i>Gochnatia</i>	Rio Bonito (RJ)

Os resultados obtidos para totais de flavonóides foram bastante inferiores aos totais de fenóis. Os valores variaram de 1,99 a 11,86 mgE_{QC}/100g de mel, sendo estes valores relativos, respectivamente, as amostra n° 91, um mel claro de eucalipto, e a amostra n° 06, um mel escuro, desta mesma origem floral. A média obtida para todas as amostras foi de 6,11 mgE_{QC}/100g de mel.

Os méis de eucalipto foram os que apresentaram a maior média em total de flavonóides (9,17 mgE_{QC}/100g de mel), sendo muito superior aos demais méis analisados. Em seguida, os valores médios apresentados para outras amostras foram semelhantes. Os méis heteroflorais foram os que apresentaram o segundo maior valor (5,63 mgE_{QC}/100g de mel), seguido dos méis de *Montanoa* (5,61 mgE_{QC}/100g de mel), Asteraceae (5,51 mgE_{QC}/100g de mel), *Myrcia* (5,21 mgE_{QC}/100g de mel) e os méis de *Anadenanthera*, com a menor quantidade (5,20 mgE_{QC}/100g de mel).

Os méis de *Anadenanthera*, no entanto, apresentaram a maior quantidade de substâncias fenólicas totais, conforme indicado na **Tabela 11**, pág. 66. A atividade antioxidante média destes méis foi também a melhor, em termos de CE₅₀ e %AA (**Anexo**, pág. 129). Apesar dos flavonóides apresentarem, em geral, melhor atividade antioxidante que os demais compostos fenólicos (ácidos fenólicos, taninos, etc.), o maior teor de substâncias fenólicas pode ter sido responsável pela melhor atividade antiradicalar.

De um modo geral, os resultados indicam existir uma diferença significativa entre teor em flavonóides para os méis de eucalipto comparados aos demais méis analisados.

As amostras de mel n° 53, 18, 01, 27, 57 e 29 não foram consideradas para fins de cálculo de média, pois havia apenas uma amostra de cada origem floral. Porém, observando individualmente estas amostras, a n° 27 (mel escuro de *Vernonia* [assa-peixe]) foi o que apresentou maior quantidade em flavonóides totais (9,92 mgE_{QC}/100g de mel), quantidade até mesmo superior a média encontrada para os méis de eucalipto. Já a amostra n° 53 (mel claro de *Citrus*) foi a que apresentou a menor quantidade em flavonóides (2,16 mgE_{QC}/100g de mel).

Comparando esses resultados com os de MEDA *et al.* (2005), que avaliou também o teor de flavonóides de méis sul-africanos, foram encontrados teores em flavonóides que variaram de 0,17 a 8,35 mg de quercetina/100g de mel, mostrando serem similares aos obtidos neste trabalho. Os resultados apresentados por PICHICHEIRO *et al.* (2009), ao analisar méis italianos, variaram entre 4,19 a 21,17 mgE_{QC}/100g de mel, enquanto AL *et al.* (2009) obteve valores entre 0,91 a 15,33 para méis florais provenientes da Romênia, valores um pouco superiores aos deste trabalho.

Os resultados determinados neste trabalho estão de acordo com os dados da literatura, que relataram que, nos méis brasileiros, os ácidos fenólicos são bem mais abundantes que os flavonóides (VIANNA, 2010; LIANDA, 2004 e 2009; ALENCAR, 2002). Na **Tabela 13** seguem os intervalos obtidos para fenólicos e flavonóides totais, para méis de diferentes origens geográficas e florais.

Tabela 13: Quantidade de fenólicos e flavonóides totais para méis de diferentes origens

País	mgE _{AG} /100g	mgE _{QC} /100g
África do Sul ¹	32,59 - 114,75	0,17 - 8,35
Romênia ²	2,00 - 45,00	0,91 - 15,33
Venezuela ³	38,15 - 182,10	2,32 - 14,41
Itália ⁴	6,05 - 25,38	4,19 - 21,17
Austrália ⁵	48,53 - 63,43	8,12 - 12,77
Polônia (sul) ⁶	21,7 - 75,3	6,9 - 28,5
Polônia (noroeste) ⁷	7,17 - 20,16	1,35 - 20,16
Brasil*	58,26 - 152,52	1,99 - 11,86

¹ MEDA *et al.*, 2005; ² AL *et al.*, 2009; ³ VIT *et al.*, 2009; ⁴ PICHICHEIRO *et al.*, 2009;

⁵ ODDO *et al.*, 2008; ⁶ SOCHA *et al.*, 2009; ⁷ KASKONIENE *et al.*, 2009;

* Variações obtidas neste trabalho.

4.3. Avaliação da atividade antioxidante

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais crônicas (BARREIROS *et al.*, 2006; MEDA *et al.*, 2005). Os radicais livres promovem reações com substratos biológicos podendo ocasionar danos às biomoléculas e, conseqüentemente, afetar a saúde humana. Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA.

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por retardarem ou prevenirem, significativamente, a oxidação de

lipídios ou outras moléculas ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia (CHAVES *et al.*, 2007; VOLP *et al.*, 2008).

Os compostos fenólicos (ácidos e flavonóides) presentes nos méis possuem fortes propriedades antioxidantes, pois podem interagir com as espécies radicalares como eficientes captadores de espécies reativas de oxigênio (EROs), além de atuarem na quelação de metais (AL-MAMARY *et al.*, 2002; DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006; MARIUTTI e BRAGAGNOLO, 2007). O mecanismo complexo de atividade anti e pró-oxidante destas substâncias é alvo de extensos estudos científicos contemporâneos, tendo em vista que o sucesso destas investigações está diretamente relacionado com a melhoria da qualidade de vida do ser humano.

O mel é um produto natural reconhecido por sua propriedade antioxidante, em decorrência, principalmente, da presença de ácidos fenólicos e flavonóides na sua composição. A avaliação desta bioatividade pode ser utilizada para assegurar a qualidade e o possível potencial terapêutico do mel.

O ensaio com o radical DPPH é um método bastante utilizado para a determinação da atividade seqüestradora de radicais de extratos vegetais e compostos puros, por ser de fácil e rápida execução.

4.3.1. Avaliação da atividade antioxidante dos padrões fenólicos

As análises para determinação da atividade antioxidante foram realizadas com o radical 2,2-difenil-picril-hidrazil, no espectrofotômetro de ELISA, com leitura a 520 nm. A atividade antioxidante também pode ser avaliada por leitura em UV-Vis a este comprimento de onda, mas a utilização das microplacas dá a possibilidade da análise imediata de todas as absorbâncias presentes nos poços, sendo um método mais rápido e eficiente (**Figura 41**). A desvantagem é a necessidade do filtro ótico específico para leitura, enquanto no UV os valores de comprimento de onda para leitura podem ser selecionados manualmente.

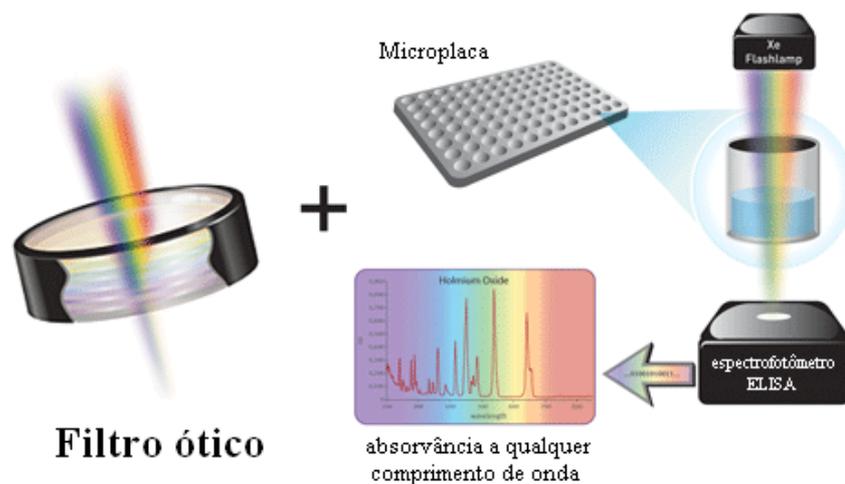


Figura 41: Esquema de leitura das microplacas no espectrofotômetro de ELISA (adaptado de www.bmglabtech.com/technology/tandem.cfm)

Muitas substâncias naturais obtidas de méis têm sido identificadas como captadoras de espécies reativas de oxigênio, protegendo o corpo humano dos efeitos destes, bem como retardando o aparecimento de muitas doenças crônicas.

As substâncias com núcleo fenólico apresentam destaque especial como eficientes captadores radicalares, como demonstrado por FRANKEL *et al.* (1998), AL-MAMARY *et al.* (2002); MEDA *et al.* (2005); SOCHA *et al.* (2009); JAGANATHAN e MANDAL (2009); FERREIRA *et al.* (2009).

A atividade antioxidante foi avaliada pela determinação da captação do radical DPPH para as sessenta amostras de méis e pelos padrões de flavonóides quercetina, rutina, isoquercetina e miricetina, e dos ácidos gálico, protocatecuico, cafeico e ferúlico, que foram selecionados devido às suas estruturas favoráveis para o sequestro deste radical e por já terem sido estudados anteriormente (LIANDA, 2009; VIANNA, 2010).

A determinação do CE_{50} foi obtida para cada padrão inicialmente, por regressão linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada um dos testes com cada padrão.

Inicialmente, será apresentado cada resultado dos gráficos e cálculos do CE_{50} para os padrões analisados.

A) Curva padrão da quercetina

Segundo a metodologia citada nas págs. 57-59, foram preparadas soluções-estoque do padrão quercetina na concentração de 100 μM e foram feitas algumas diluições aleatórias para uma primeira avaliação (em triplicata) em busca do CE_{50} . Os dados obtidos foram utilizados para a construção do gráfico (**Figura 42**) que relaciona o percentual de atividade e a concentração da substância ensaiada, no caso a quercetina.

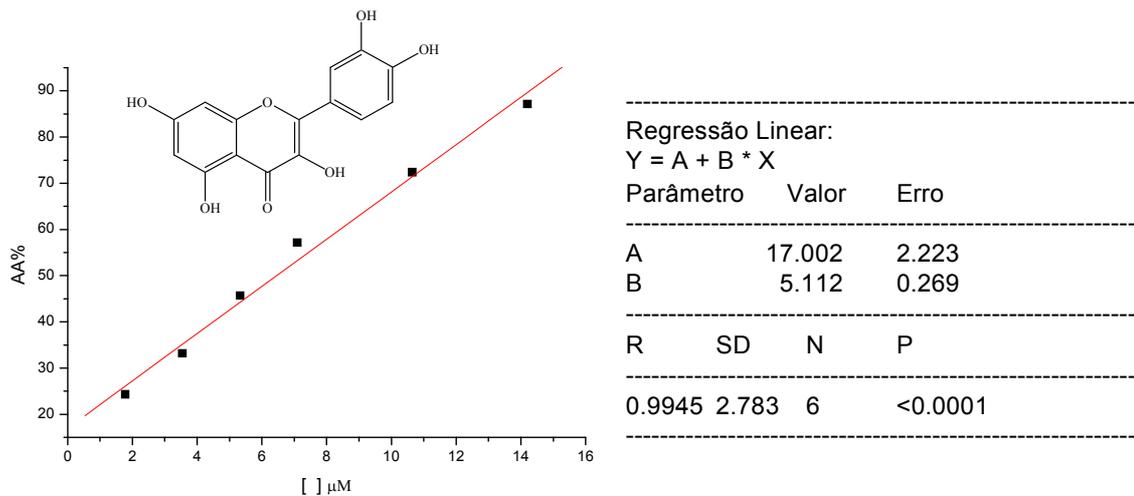


Figura 42: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da quercetina

Juntamente com o gráfico, obteve-se a equação da reta, que permitiu o cálculo do valor de CE_{50} , como exemplificado a seguir:

$$Y = A + B \cdot X$$

$$50 = 17,002 (\pm 2,223) + 5,112 (\pm 0,269) \text{CE}_{50}$$

$$\text{CE}_{50} = 6,46 \mu\text{M}$$

As **Figuras 43 - 49** mostram os gráficos gerados e os valores de CE_{50} calculados para os demais padrões.

B) Curva padrão da rutina

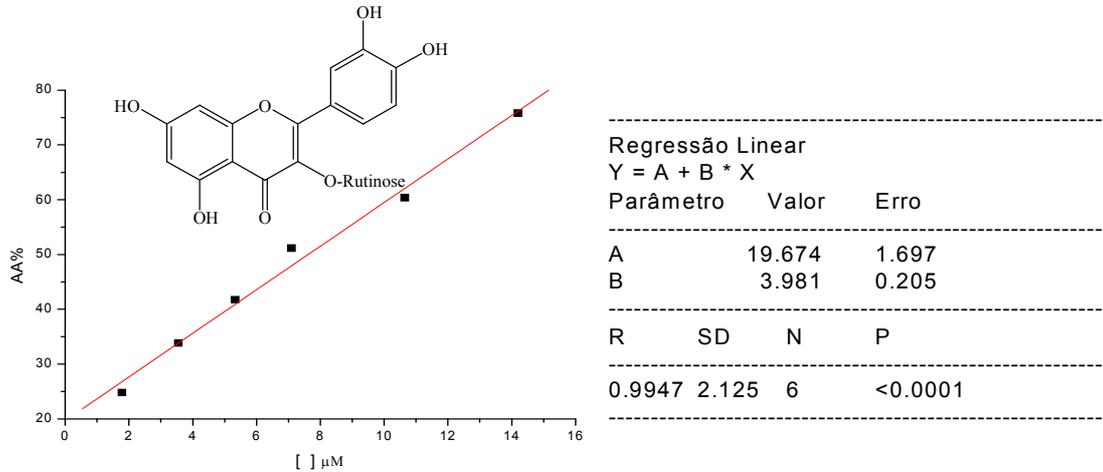


Figura 43: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da rutina

Cálculo do CE_{50} :

$$50 = 19,674 (\pm 1,697) + 3,981 (\pm 0,205).CE_{50}$$

$$CE_{50} = 7,62 \mu M$$

C) Curva padrão da isoquercetrina

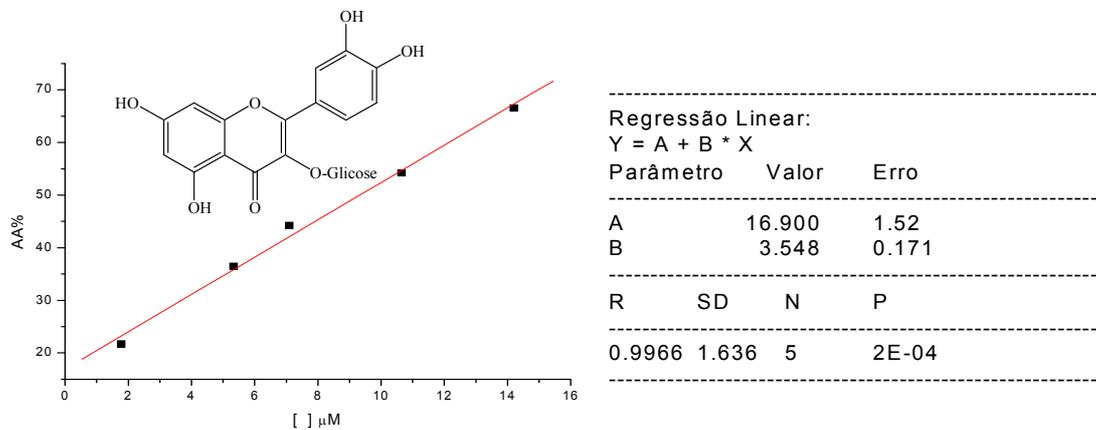


Figura 44: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da isoquercetrina

Cálculo do CE_{50} :

$$50 = 16,900 (\pm 1,52) + 3,548 (\pm 0,171).CE_{50}$$

$$CE_{50} = 9,33 \mu M$$

D) Curva padrão da miricetina

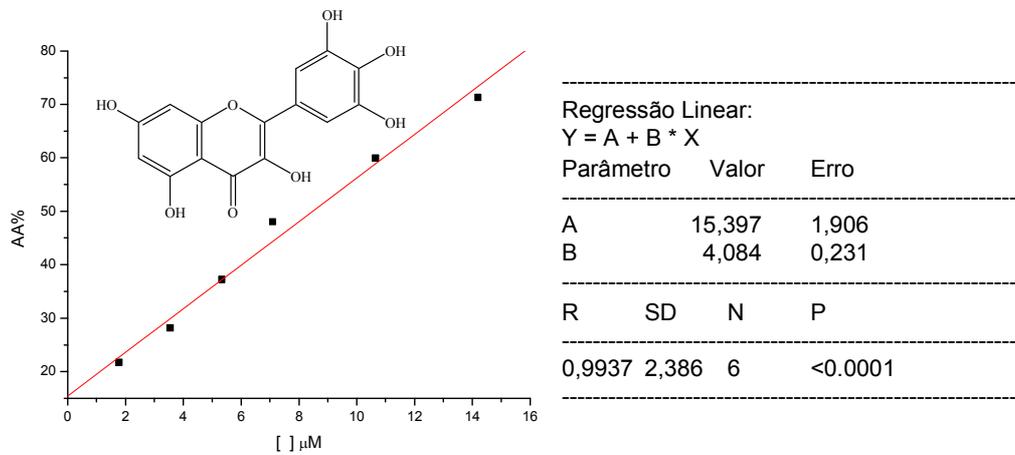


Figura 45: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração da miricetina

Cálculo do CE₅₀:

$$50 = 15,397 (\pm 1,906) + 4,084 (\pm 0,231) \cdot CE_{50}$$

$$CE_{50} = 8,47 \mu\text{M}$$

E) Curva padrão do ácido gálico

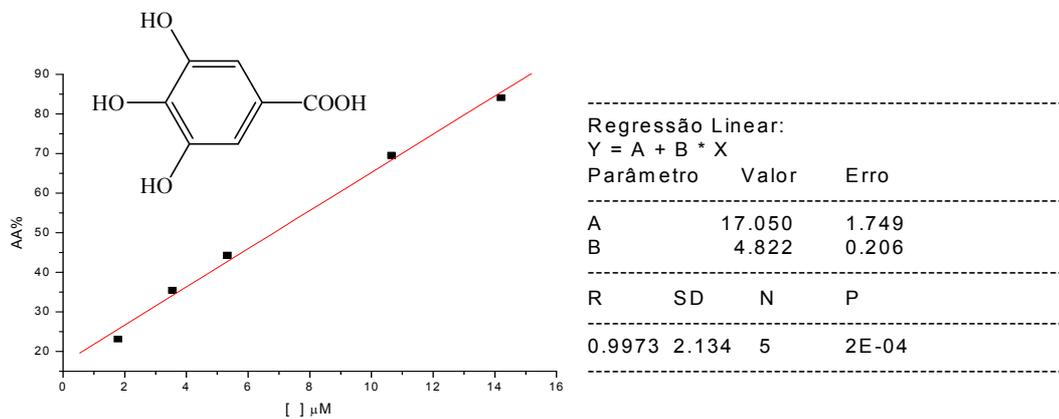


Figura 46: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração do ácido gálico

Cálculo do CE₅₀:

$$50 = 17,050 (\pm 1,749) + 4,822 (\pm 0,206) \cdot CE_{50}$$

$$CE_{50} = 6,83 \mu\text{M}$$

F) Curva padrão do ácido protocatecuico

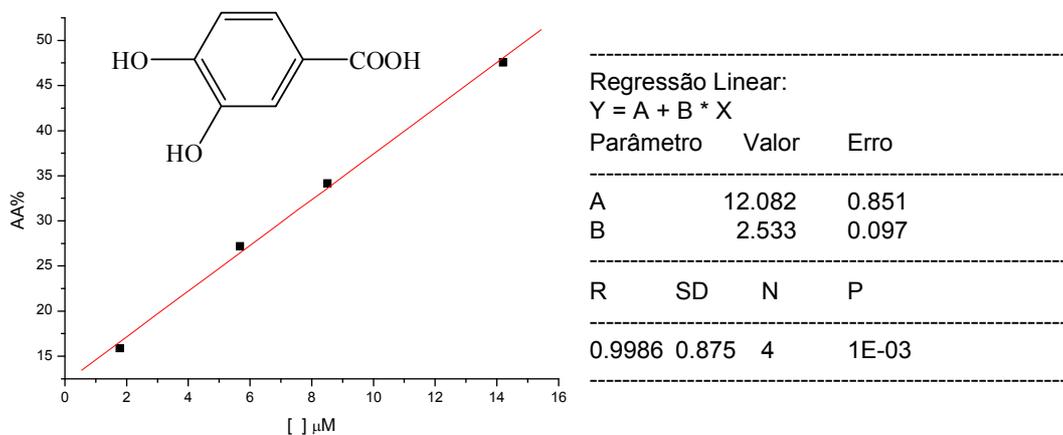


Figura 47: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração do ácido protocatecuico.

Cálculo do CE_{50} :

$$50 = 12,082 (\pm 0,851) + 2,533 (\pm 0,097) \cdot CE_{50}$$

$$CE_{50} = 14,97 \mu M$$

G) Curva padrão do ácido cafeico

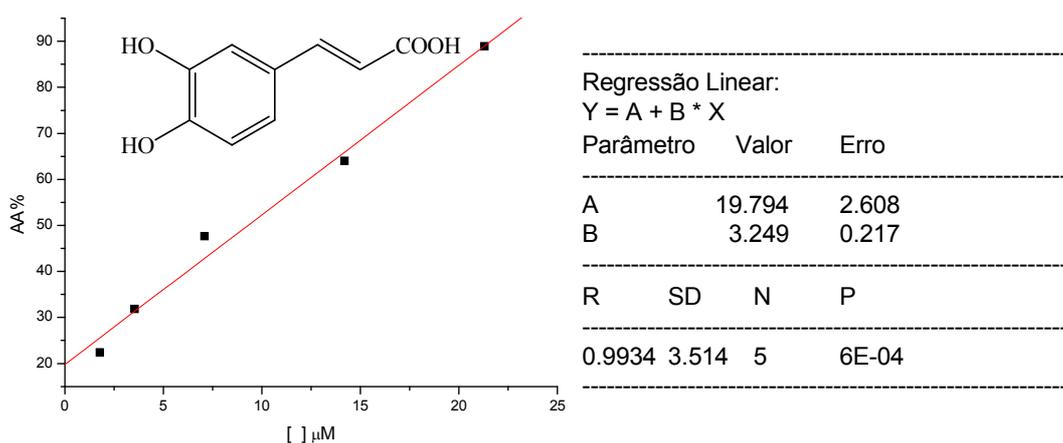


Figura 48: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração do ácido cafeico

Cálculo do CE_{50} :

$$50 = 19,794 (\pm 2,608) + 3,249 (\pm 0,217) \cdot CE_{50}$$

$$CE_{50} = 9,30 \mu M$$

H) Curva padrão do ácido ferúlico

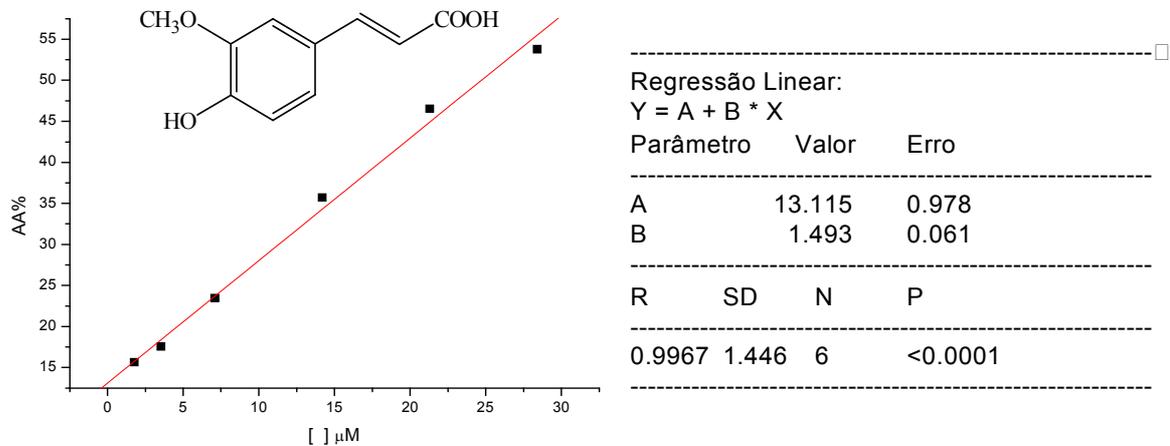


Figura 49: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante e a concentração do ácido ferúlico.

Cálculo do CE_{50} :

$$50 = 13,115 (\pm 0,978) + 1,493 (\pm 0,061) \cdot CE_{50}$$

$$CE_{50} = 24,71 \mu M$$

Os resultados apresentados na **Tabela 14** referem-se aos valores de CE_{50} dos padrões, obtidos em μM e convertidos também em mg/mL , para fins de comparação com os valores de CE_{50} obtidos para as soluções de mel.

Tabela 14: Valores de CE_{50} dos padrões (μM , $\mu g/mL$ e mg/mL) obtidos no ensaio com DPPH.

Valores de CE_{50}	μM	$\mu g/mL$	mg/mL
Quercetina	6,46	1,95	$1,95 \times 10^{-3}$
Rutina	7,62	2,30	$2,30 \times 10^{-3}$
Isoquercetina	9,33	2,82	$2,82 \times 10^{-3}$
Miricetina	8,47	2,56	$2,56 \times 10^{-3}$
Ácido gálico	6,83	2,06	$2,06 \times 10^{-3}$
Ácido protocatecuico	14,97	4,52	$4,52 \times 10^{-3}$
Ácido cafeico	9,30	2,81	$2,81 \times 10^{-3}$
Ácido ferúlico	24,71	7,47	$7,47 \times 10^{-3}$

Dentre os ácidos fenólicos derivados do ácido benzóico, o que apresentou melhor atividade antioxidante foi o ácido gálico ($CE_{50} = 6,83 \mu\text{M}$), que possui três hidroxilas em posição *orto*, o que permite estabilizar melhor os radicais pela maior possibilidade de formação de quinonas.

Na classe dos derivados de ácido cinâmico, o ácido cafeico, que possui duas hidroxilas em posição *orto*, foi o que obteve o segundo menor CE_{50} ($9,3 \mu\text{M}$), enquanto o ácido ferúlico, que se difere do ácido cafeico apenas pela substituição de uma hidroxila por uma metoxila, apresentou a menor atividade antioxidante ($24,71 \mu\text{M}$), pela impossibilidade de formação de ortoquinona. O ácido protocatecuico possui o mesmo padrão de substituição das hidroxilas em *orto* que o ácido cafeico, se diferenciando apenas por serem, respectivamente, derivados do ácido gálico, com um grupo carboxila ligado ao anel, e derivados do ácido cinâmico, com uma dupla ligação conjugada entre o anel e o grupo carboxila. No entanto, o ácido protocatecuico apresentou atividade bem menor ($14,97 \mu\text{M}$) quando comparado ao ácido cafeico ($9,30 \mu\text{M}$), mostrando que a unidade C3 conjugada ao anel aromático (cadeia propenóica) pode ser responsável pelo aumento da atividade antioxidante, como é conferida nos derivados de ácido cinâmico. Este dado está de acordo com os relatados da literatura que destacam que a maior atividade antioxidante dos derivados de ácido cinâmico é causada pela conjugação da dupla ligação com o anel, que aumenta os efeitos de estabilização por ressonância do radical fenoxila (NATELLA *et al.*, 1999).

Quanto aos flavonóides, a quercetina foi o que apresentou melhor atividade ($6,46 \mu\text{M}$), enquanto a rutina e a isoquercetina, que são flavonóides glicosilados, apresentaram valores de CE_{50} de $7,62$ e $9,33 \mu\text{M}$, respectivamente, o que ocorre devido a torção dos anéis causada pelos grupos volumosos de açúcares, que inibem a capacidade de estabilização dos radicais pela ressonância. A miricetina apresentou CE_{50} de $8,47 \mu\text{M}$, não obtendo atividade antioxidante tão boa quanto a quercetina, apesar de se diferenciar apenas por ter uma hidroxila a mais, na posição 5', ao invés de hidrogênio. A hidroxila em posição *para* ao grupo hidroxiflavona, que seria a de mais fácil abstração de hidrogênio por conta da possibilidade de extensão da conjugação à cetona conjugada do anel C, pode realizar interação de hidrogênio com as duas outras hidroxilas vizinhas, tornando mais difícil a abstração de seu hidrogênio do que na quercetina, que só apresenta possibilidade de realizar uma interação de hidrogênio (**Figura 50**). Já as outras hidroxilas, por estarem em posição *meta*, não apresentam uma acidez tão boa.

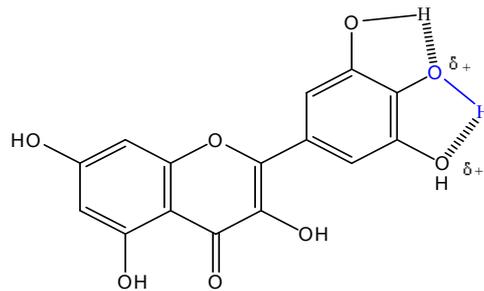


Figura 50: Interações de hidrogênio intramoleculares da miricetina

De uma forma geral, observou-se que os flavonóides apresentaram atividade antioxidante melhor que os ácidos fenólicos avaliados, provavelmente pelas maiores possibilidades de deslocalização do radical pela molécula.

4.3.2. Avaliação da atividade antioxidante das amostras de mel

Com o objetivo de se avaliar a atividade antioxidante de méis de *Apis mellifera*, foi realizado o ensaio para determinação do %AA (percentual de atividade antioxidante) e do CE₅₀ (concentração necessária para reduzir 50% dos radicais de DPPH).

Primeiramente foi realizado o ensaio para determinação do %AA, partindo das soluções de mel a 100 mg/mL. Após 30 minutos com a placa em repouso, observa-se uma grande variação na intensidade da coloração púrpura do radical DPPH nos poços onde foram adicionadas as soluções de mel, tornando a solução amarelada. É observado um aumento da descoloração da solução inicial do radical DPPH conforme há um aumento da concentração dessas substâncias (**Figura 51**). O radical DPPH, responsável pela coloração inicial, ao receber um próton de um agente redutor perde sua capacidade de estabilização por ressonância, apresentando um decaimento da banda de absorção a 517 nm, comprimento de onda máximo observado para o radical púrpura.

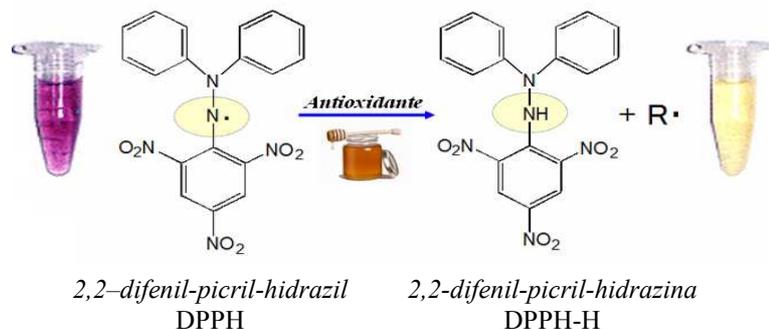


Figura 51: Mudança na coloração da solução promovida pelas amostras de mel, através da redução do radical púrpura DPPH (adaptado de <http://www.naturalsolution.co.kr/tech21e.html>)

No mel costumam estar presentes diversos tipos de substâncias fenólicas (por exemplo, flavonóides e ácidos fenólicos) que podem possuir atividade sequestradora de radicais livres, e acredita-se que estes são os maiores responsáveis pela atividade antirradicalar do mel.

Neste trabalho, foi realizada a leitura dos comprimentos de onda das amostras e padrões com a solução de DPPH a 520 nm, devido à ausência de filtro no comprimento de 517 nm, mas que não alterou as análises porque ainda se tem o máximo de absorção para este radical no comprimento usado. As absorbâncias das amostras foram comparadas com a da solução do radical sem a presença da amostra e subtraindo o valor do branco, com o objetivo de calcular o percentual de redução do radical.

Foram utilizadas, inicialmente, concentrações de 5 a 50 mg/mL de mel. Após diluição nos poços da placa de ELISA, conforme descrito na parte experimental (pág. 57), foram obtidas as concentrações de 3,55 a 35,50 mg/mL, mostradas na **Figura 52**. Foram utilizados para a confecção da reta os valores das concentrações dos poços (eixo x) e os valores médios de %AA (eixo y).

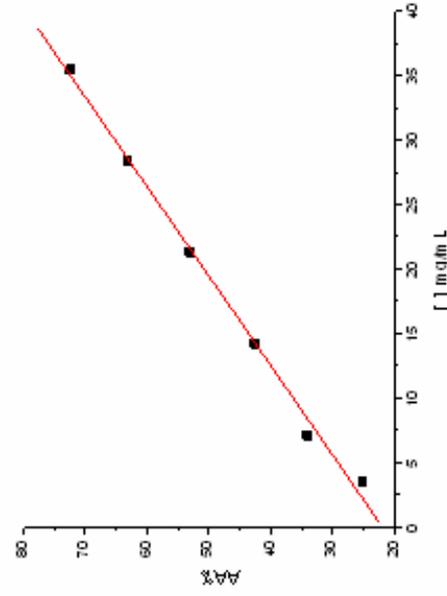
Segue exemplo das leituras e cálculo de CE_{50} de uma amostra aleatória de mel (n° 42), sendo utilizada para confecção da reta os valores médios de %AA em cada concentração (25,21 a 72,44; **Figura 52**).

Amostra n° 42

I J mg/mL	1	2	3	Média	Branco	AA%	4	5	6	Média	Branco	AA%	7	8	9	Média	Branco	
NEG	A	0,201	0,202	0,199	0,201													
5	B	0,201	0,190	0,200	0,197	0,046	24,71	0,205	0,206	0,191	0,201	0,046	22,72	0,191	0,191	0,187	0,190	0,046
10	C	0,185	0,184	0,186	0,185	0,050	32,59	0,182	0,189	0,170	0,180	0,050	35,07	0,181	0,183	0,180	0,181	0,050
20	D	0,163	0,158	0,174	0,165	0,054	44,78	0,184	0,171	0,176	0,177	0,054	38,81	0,173	0,161	0,165	0,166	0,054
NEG	A	0,203	0,203	0,199	0,202													
30	B	0,147	0,144	0,147	0,146	0,054	54,29	0,150	0,147	0,152	0,150	0,054	52,31	0,148	0,153	0,147	0,149	0,054
40	C	0,135	0,139	0,129	0,134	0,063	64,85	0,137	0,135	0,137	0,136	0,063	63,86	0,136	0,142	0,148	0,142	0,063
50	D	0,123	0,122	0,126	0,124	0,072	74,42	0,127	0,136	0,131	0,131	0,072	70,96	0,131	0,121	0,134	0,129	0,072

I J _{poço}	1° AA%	2° AA%	3° AA%	D. P.
3,55	24,71	22,72	28,19	2,770
7,10	32,59	35,07	34,58	1,316
14,20	44,78	38,81	44,28	3,313
21,30	54,29	52,31	52,81	1,031
28,40	64,85	63,86	60,89	2,061
35,50	74,42	70,96	71,95	1,785

I J _{poço}	Média	Branco	AA%	D. P.
3,55	0,196	0,046	25,21	0,007
7,10	0,182	0,050	34,08	0,005
14,20	0,169	0,054	42,62	0,008
21,30	0,148	0,054	53,14	0,003
28,40	0,137	0,063	63,20	0,005
35,50	0,128	0,072	72,44	0,005



Regressão linear:

$$Y = A + B \cdot X$$

Param. Valor Erro

A 22,052 1,0906

B 1,439 0,0506

R SD N P

0,9975 1,402 6 <0,0001

$$Y = A + B \cdot X$$

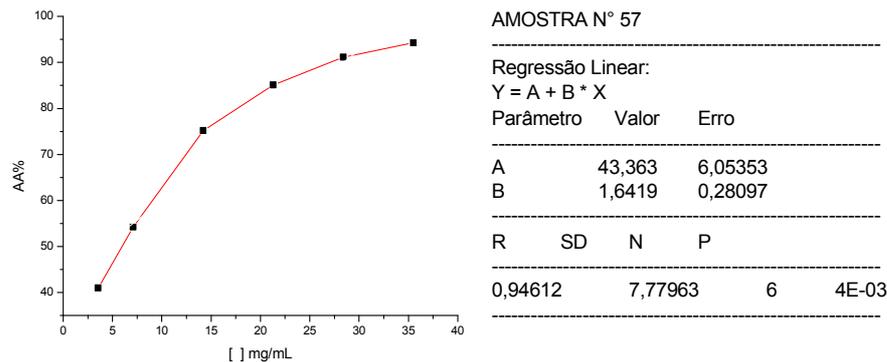
$$50 = 22,052 + 1,439 \cdot CE_{50}$$

$$X = \frac{50 - 22,052}{1,439}$$

$$CE_{50} = 19,42 \text{ mg/mL}$$

Figura 52. exemplo de confecção da curva de CE₅₀ de amostra de mel.

Para a maior parte das amostras, essa faixa de concentração utilizada (3,55 a 35,50 mg/mL nos poços) foi satisfatória para a confecção das curvas. No entanto, foi observado que alguns méis apresentaram um perfil de isoterma mesmo em concentrações abaixo de 35,50 mg/mL (concentração no poço relativa a solução inicial de 50 mg/mL), ou seja, tais méis foram capazes de reduzir todo ou quase todo os radicais de DPPH presente na solução a esta concentração, atingindo um patamar na curva com %AA próximo a constância (**Figura 53**).



Cálculo do CE₅₀:

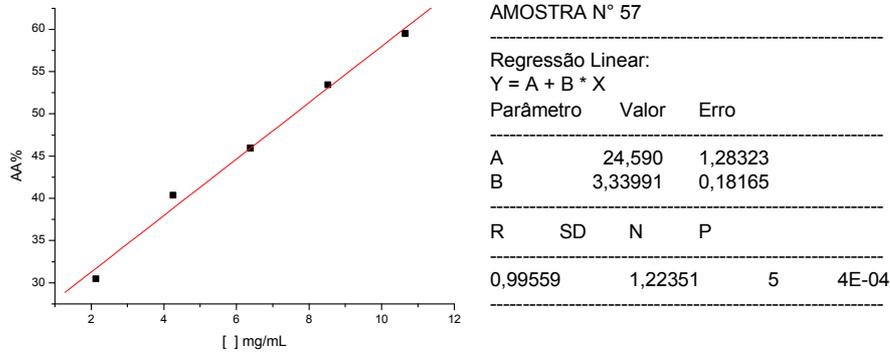
$$50 = 43,363 (\pm 6,05353) + 1,6419 (\pm 0,180) \cdot CE_{50}$$

$$CE_{50} = 4,04 \text{ mg/mL}$$

Figura 53: Gráfico que relaciona a média do percentual de atividade antioxidante versus a concentração do mel n° 57 (3,55 a 35,50 mg/mL), equação da reta e o seu valor de CE₅₀

Este fato ocorreu com as amostras n° 50, 56, 57, 58 e 60. Foi, portanto, necessária uma maior diluição das soluções para a construção das curvas e para uma determinação mais precisa do CE₅₀, pois, por conta desse perfil de curva, utilizando a mesma faixa das demais amostras foi observado um valor relativamente alto do erro de A, significando uma imprecisão no coeficiente linear da reta. Foi, portanto, realizada uma maior diluição das soluções de mel, nas concentrações de 1, 3, 6, 9, 12 e 15 mg/mL (correspondente a faixa de 0,71; 2,13; 4,26; 6,39; 8,52; 10,65 a 10,65 mg/mL nos poços de ELISA).

Como exemplo, segue a curva obtida para amostra n° 57, após diluição para obter as concentrações entre 0,71 a 10,65 mg/mL (**Figura 54**).



Cálculo do CE₅₀:

$$50 = 24,590 (\pm 1,28323) + 3,33991 (\pm 0,18165) \cdot CE_{50}$$

$$CE_{50} = 7,61 \text{ mg/mL}$$

Figura 54: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante versus a concentração do mel n° 57 (0,71 a 10,65 mg/mL), equação da reta e o seu valor de CE₅₀

Essas cinco amostras apresentaram, após a realização do ensaio de atividade antioxidante com as concentrações mais diluídas, os melhores valores de CE₅₀. Também, comparando o CE₅₀ destes méis com seus respectivos resultados de total de polifenólicos e flavonóides, pode ser observado que os resultados estão em geral acima da média dos sessenta méis estudados deste trabalho (23,18 mg/mL), e que essas cinco amostras foram todas de coloração escura e provenientes da mesorregião Metropolitana (**Tabela 15**).

Tabela 15: Melhores valores em substâncias fenólicas e o CE₅₀, suas médias e desvios padrões

Amostra	mgE _{AG} /100g	mgE _{QC} /100g	%AA	CE ₅₀ [mg/mL]	Origem Floral	Origem Geográfica	Cor
50	111,71 ± 0,74	8,74 ± 0,03	93,34 ± 1,31	10,33 ± 0,21	<i>Eucalyptus</i>	Metropolitana	Escura
56	131,97 ± 0,24	5,21 ± 0,02	97,46 ± 1,12	7,35 ± 0,28	<i>Heterofloral</i>	Metropolitana	Escura
57	144,12 ± 0,98	5,15 ± 0,04	96,01 ± 0,89	7,61 ± 0,19	<i>Verbenaceae</i>	Metropolitana	Escura
58	152,52 ± 0,96	8,82 ± 0,04	93,79 ± 0,88	7,05 ± 0,67	<i>Heterofloral</i>	Metropolitana	Escura
60	128,67 ± 0,53	5,70 ± 0,03	91,43 ± 0,41	9,56 ± 0,47	<i>Myrcia</i>	Metropolitana	Escura
Média*	102,83	6,11	78,18	23,18	-	-	-

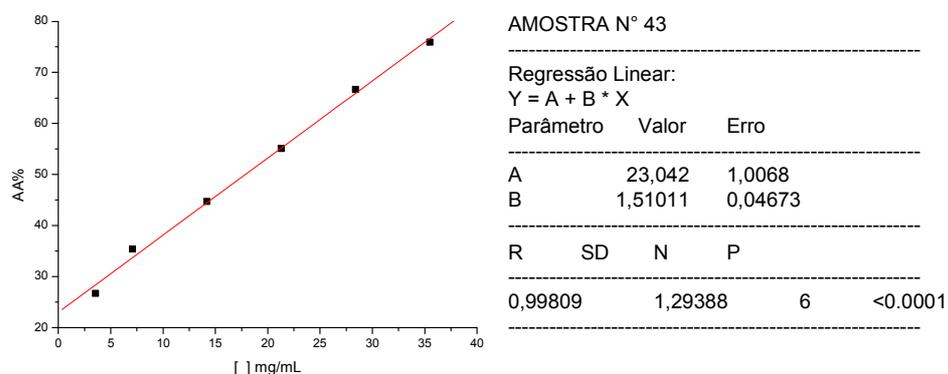
* Para as 60 amostras avaliadas.

Os resultados obtidos para essas amostras demonstraram o baixo grau de confiança da determinação do %AA, pois, nessa análise, a concentração das soluções dos méis nos poços foi a mesma (71 mg/mL) para todas as sessenta amostras, sendo este valor superior ao máximo utilizado para a determinação do CE₅₀, que foi de 35,5 mg/mL. A vantagem de se usar a determinação através da medida por %AA é a sua rapidez e a possibilidade de realizar análises simultâneas para vários méis, utilizando uma única placa, e também de ser expresso numericamente crescente ao aumento da atividade antioxidante. Porém uma desvantagem é o fato de se usar apenas uma concentração, que pode levar ao aumento da margem de erro, principalmente para os casos das amostras com melhores atividades, onde algumas vezes ocorreu precipitação, dificultando a leitura.

Isso demonstra que apenas a determinação do %AA não é um método seguro para avaliação da atividade antioxidante, sendo mais adequada a utilização do CE₅₀. Uma outra vantagem de se usar o CE₅₀ é que, para fins comparativos com a literatura, esse dado é mais confiável, pois o %AA é um dado específico para uma determinada concentração, e diferentes autores adotam concentrações distintas, enquanto o valor do CE₅₀ independe das concentrações escolhidas para a realização da curva.

A atividade antioxidante também pode ser expressa pela concentração equivalente, calculada através da comparação entre os valores de CE₅₀ obtidos para os padrões (ácidos e/ou flavonóides) e os valores de CE₅₀ obtidos para as amostras.

Foi considerado no exemplo a seguir a curva da amostra n° 43 e o seu valor de CE₅₀ (17,85 mg/mL; **Figura 55**) e o valor de CE₅₀ = 1,95 x 10⁻³ mg/mL obtido para o padrão de quercetina (pág. 81, Tabela 14).



$$50 = 23,042 (\pm 1,0068) + 1,51011 (\pm 0,04673) \cdot CE_{50}$$

$$\boxed{CE_{50} = 17,85 \text{ mg/mL}}$$

Figura 55: Gráfico que relaciona o percentual de atividade antioxidante *versus* a concentração do mel n° 43 (3,55 a 35,50 mg/mL), equação da reta e o seu valor de CE₅₀

Sabe-se, através dos cálculos de CE_{50} , que uma quantidade de 50% dos radicais livres de DPPH são seqüestrados pelo padrão e pela amostra nas concentrações de 0,00195 mg/mL e 17,85 mg/mL, respectivamente. Dessa forma, pode ser calculada a concentração equivalente, pois, no caso da amostra nº 43, a cada 1 mL de solução, 17,85 mg de mel equivalem a 0,00195 mg de quercetina.

Foi obtida a concentração equivalente de quercetina em 500 g de mel (500000 mg), conforme demonstrado no cálculo a seguir:

$$\begin{array}{l} \text{Em 1 mL:} \quad 17,85 \text{ mg de mel} \text{ -----} 0,00195 \text{ mg de quercetina} \\ \quad \quad \quad 500000 \text{ mg de mel} \text{ -----} x \text{ mg de quercetina} \end{array}$$

$$17,85 x = 500000 \cdot 0,00195$$

$$x = \frac{500000 \cdot 0,00195}{17,85} = \boxed{54,6 \text{ mg de quercetina/500 g de mel}}$$

Quanto ao teor em equivalentes de ácido gálico ($CE_{50} = 2,06 \times 10^{-3}$ mg/mL, pág. 81, Tabela 14), a mesma amostra teria:

$$\begin{array}{l} 17,85 \text{ mg de mel} \text{ -----} 0,00206 \text{ mg de ácido gálico} \\ 500000 \text{ mg de mel} \text{ -----} x \text{ mg de ácido gálico} \end{array}$$

$$17,85 x = 100000 \cdot 0,00206$$

$$x = \frac{500000 \cdot 0,00206}{17,85} = \boxed{57,7 \text{ mg de ácido gálico/500g de mel}}$$

Dos oito padrões analisados, foram utilizados para os cálculos e para a construção dos gráficos a seguir, o padrão de quercetina, por ter apresentado a melhor atividade antioxidante (6,46 μ M ou $1,95 \times 10^{-3}$ mg/mL) e por ser uma das substâncias fenólicas mais comumente presentes no mel.

Para a construção dos gráficos correlacionando as análises orgânicas por origem floral, foram utilizadas as concentrações de fenólicos totais em equivalente de ácido gálico por 100g de mel, enquanto as concentrações de flavonóides e a atividade antioxidante foram expressas em mg de quercetina por 500g de mel, representada por (AA)mgE_{QC}/500g. Os resultados das últimas duas análises mencionadas foram expressos em unidade maior para facilitar a visualização nos gráficos, pois são valores muito inferiores a concentração de fenólicos totais.

Tendo em vista a importância dos parâmetros físico-químicos na qualidade do mel, procurou-se relacionar os dados das análises orgânicas realizadas com alguns parâmetros

físico-químicos (cor, HMF, pH, acidez, umidade e A_w), apresentados nas tabelas abaixo dos gráficos relativos a cada origem floral.

Uma alta umidade pode levar a fermentação do mel, causada pela ação de leveduras osmotolerantes. Essa fermentação promove a formação de álcool etílico e dióxido de carbono. O etanol formado pode ser posteriormente oxidado a ácido acético e água, resultando em um sabor desagradável e a um aumento na acidez. O teor de umidade depende de diversos fatores, como a época de coleta do mel, o grau de maturação e fatores climáticos (SAXENA *et al.*, 2010). A legislação brasileira (BRASIL, 2000) impõe o limite de 20% de água nos méis.

A atividade de água (A_w) é o teor de água livre, ou seja, a quantidade de água que não está realizando interações com outros componentes da amostra. É também um fator muito importante na avaliação da qualidade do mel, pois está relacionada com sua estabilidade. Um baixo valor de atividade de água promove a limitação do crescimento de microrganismos, uma vez que as leveduras osmotolerantes são capazes de se desenvolver a uma atividade de água mínima de 0,6 (SAXENA *et al.*, 2010), sendo este o limite de A_w aceito para os méis brasileiros.

O HMF costuma ser relacionado na literatura com um mau acondicionamento do mel, como um estoque temperatura alta, aquecimento ou adulteração. O objetivo da limitação do HMF no mel como indicador de aquecimento se deve a perda de substâncias voláteis do mel a temperaturas elevadas. No entanto, há também diversos estudos que relatam a atividade antioxidante desta substância e de seus derivados, e sua relação com a coloração de alimentos. Também há fatores que proporcionam uma maior ou menor formação de HMF no mel, e muitas vezes esses fatores não estão relacionados com a manipulação do apicultor. O HMF é gerado pela desidratação de açúcares redutores, principalmente a frutose, cuja proporção no mel depende muito da origem floral (ODDO e PIRO, 2004). Outros componentes, naturalmente presentes em alguns tipos de mel, também favorecem a formação do HMF, conforme será discutido posteriormente. Os componentes voláteis ou termolábeis, nestes casos que independem de aquecimento, vão permanecer no mel independentemente do teor de HMF. Conforme já mencionado, é aceito um limite de 60 meq/kg para méis brasileiros.

Seguem, em forma de gráficos e tabelas, os dados obtidos para o teor de fenólicos em equivalente de ácido gálico por 100g de mel ($\text{mgE}_{AG}/100\text{g}$), a quantidade de flavonóides em equivalente de quercetina por 500g de mel ($\text{mgE}_{QC}/500\text{g}$) e a atividade antioxidante (expresso em equivalente de quercetina por 500g de mel), para facilitar a comparação. Em seguida, estão apresentados os dados (em forma de tabela) relacionando os parâmetros físico-químicos e os valores de atividade antioxidante. Esses dados foram apresentados segundo a

classificação dos méis em monoflorais e heteroflorais, sendo inicialmente discutidos os resultados obtidos para os méis monoflorais, e posteriormente, para os méis heteroflorais.

4.4. Correlação entre os parâmetros avaliados

4.4.1. Amostras de méis monoflorais

A seguir encontram-se agrupados os resultados obtidos para os méis monoflorais, no sentido de procurar possíveis correlações entre os diferentes parâmetros que foram avaliados para as sessenta amostras de méis (Figura 56-60 e Tabela 16-20).

A) Amostras de mel de *Anadenanthera* (seis amostras)

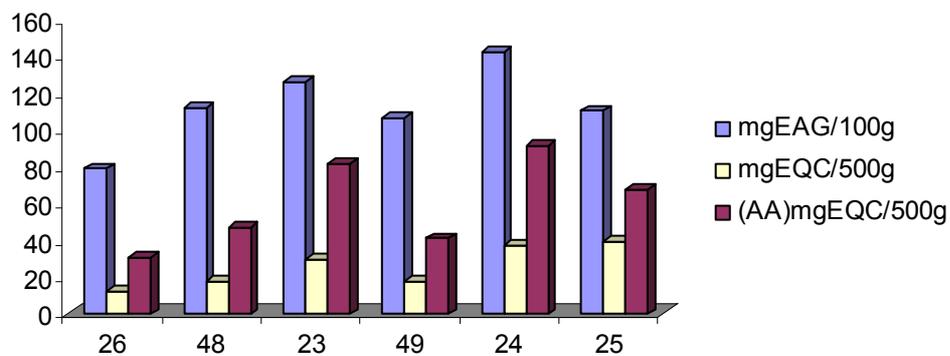


Figura 56: Resultado das análises das substâncias orgânicas dos méis de *Anadenanthera*

Tabela 16: Parâmetros físico-químicos e atividade antioxidante de méis de *Anadenanthera*

Amostra	Cor	Substâncias Fenólicas		Atividade Antioxidante		Análises Físico-Químicas				
		mgE _{AG} /100g	mgE _{QC} /500g	(AA)mgE _{QC} /500g	AA%	HMF (mg/kg)	pH	Acidez (meq/kg)	Umidade (%)	A _w
26	Clara	78,93	12,75	30,34	82,00	2,59	3,87	40,38	18,53	0,601
48	Média	112,04	18,15	47,23	78,79	22,31	3,63	44,02	20,20	0,677
23	Média	125,57	29,91	82,01	91,63	53,52	3,68	83,88	18,80	0,607
49	Média	106,53	18,08	41,03	75,00	26,45	3,65	51,10	19,93	0,637
24	Escura	142,33	37,58	91,18	89,33	24,95	3,85	73,96	20,00	0,622
25	Escura	110,20	39,45	67,80	89,50	9,36	3,79	45,61	18,80	0,614
Média	-	112,60	25,99	59,93	84,38	23,19	3,75	56,49	19,38	0,626

Analisando os resultados, verifica-se que existe uma boa correlação entre o teor em compostos fenólicos, a intensidade da cor e a capacidade de inibição de radicais livres. A avaliação visual da intensidade da cor dos diferentes méis foi realizada com o objetivo de encontrar uma possível relação entre este parâmetro de fácil detecção e a atividade antioxidante. De fato, os méis mais escuros foram os que apresentaram maior teor em compostos fenólicos e maior capacidade de resgate de radicais.

Os méis de *Anadenanthera* (angico) foram os que apresentaram melhor média de atividade antioxidante (59,93 (AA)mgE_{QC}/500g) e de fenólicos totais (112,60 mgE_{AG}/100g) dentre os méis monoflorais. O teor em antioxidantes mostrou estar relacionado de modo significativo com a intensidade da cor e com o teor de polifenóis. Ao considerar, por exemplo, das seis amostras analisadas, os méis n° 23 e 24 (de coloração média e escura, respectivamente), ambos da região metropolitana, verificou-se que estas amostras apresentaram os teores mais altos em antioxidantes e polifenóis, e o maior poder de resgate de radicais desta origem floral.

Em geral, os méis de *Anadenanthera* apresentam coloração clara (OLIVEIRA *et al.*, 2004), porém as amostras analisadas apresentaram visualmente coloração de média a escura. O único mel de coloração clara foi o n° 26, que apresentou também a menor quantidade de fenólicos totais, flavonóides e HMF, o que é esperado tendo em vista que os ácidos fenólicos e o HMF são substâncias que promovem o escurecimento. Este mel também apresentou menor acidez, o que pode estar relacionada com uma menor possibilidade de ocorrer a reação de geração de HMF, que é mais favorecida em meio ácido. Sabe-se que os compostos fenólicos têm em geral características ácidas, e estes podem, portanto, aumentar a acidez do meio e promover reações de formação de HMF com mais facilidade. Os méis de *Anadenanthera* foram os que apresentaram a maior média quanto à umidade e atividade de água. No entanto, a amostra n° 26 também apresentou, dentre estes méis, os menores valores quanto a essas duas análises. Sabendo que a reação de formação de HMF é uma reação de desidratação de açúcares redutores, estes resultados podem ser uma consequência da baixa formação de HMF deste mel (2,59 meq/kg).

Talvez por isso, amostras com maior teor de fenólicos totais (ácidos fenólicos, flavonóides, etc.) tendam a apresentar maior acidez, maior quantidade de HMF, coloração mais escura e em alguns casos, também maior teor de água.

Conforme foi observado na determinação do CE₅₀ dos padrões de ácidos fenólicos e flavonóides, em geral, os flavonóides apresentaram atividade antioxidante superior a dos ácidos fenólicos. Este fato, bem como a coloração, pode ser responsável tanto pela maior atividade antioxidante da amostra n° 25.

Observa-se, pela **Tabela 16**, que nem sempre o melhor resultado de %AA correspondeu aos maiores valores da atividade antioxidante em equivalente de quercetina. Isso indica que a análise do mel do %AA na concentração utilizada (71 mg/mL) não foi ideal para a avaliação desta propriedade.

B) Amostras de mel de Asteraceae (quatro amostras)

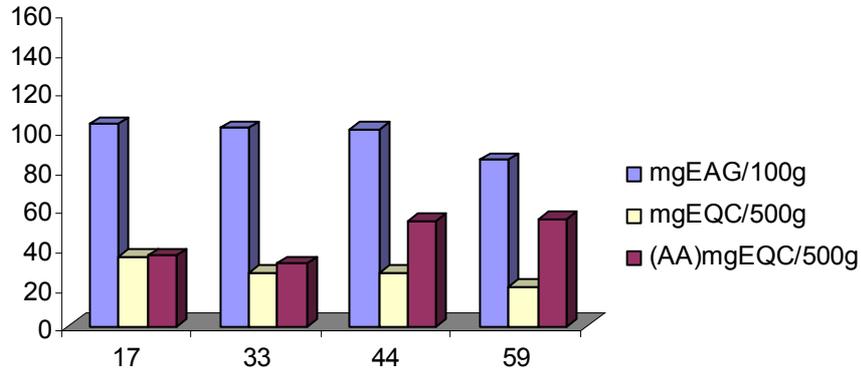


Figura 57: resultado das análises orgânicas de méis de Asteraceae

Tabela 17: Dados físico-químicos e atividade antioxidante de méis de Asteraceae

Amostra	Cor	Substâncias Fenólicas		Atividade Antioxidante		Análises Físico-Químicas				
		mgE _{AG} /100g	mgE _{QC} /500g	(AA)mgE _{QC} /500g	AA%	HMF (mg/kg)	pH	Acidez (meq/kg)	Umidade (%)	<i>A_w</i>
17	Média	102,90	35,32	35,73	86,10	35,80	3,89	40,38	17,87	0,588
33	Média	100,78	27,56	31,91	79,59	1,57	3,78	43,37	19,80	0,598
44	Média	100,25	26,90	53,73	74,86	6,69	3,89	43,26	18,33	0,600
59	Média	84,52	20,45	54,34	83,26	61,50	3,65	45,43	17,13	0,592
Média	-	97,11	27,56	43,93	80,95	26,39	3,80	43,11	18,28	0,595

Os méis de Asteraceae apresentaram intensidade de coloração média, estando de acordo com relatos descrito por ODDO e PIRO (2004), e com relação às substâncias fenólicas, apresentaram teores semelhantes para fenólicos e flavonóides totais, exceto pela amostra n° 59, que apresentou quantidades um pouco inferiores. Porém, as amostras da região metropolitana de Asteraceae apresentaram atividade antioxidante bem maior. A única amostra que apresentou HMF acima do permitido foi justamente a n° 59, adquirida na região metropolitana, que apresentou acidez mais alta, indicando que talvez outros compostos ácidos não-fenólicos possam estar influenciando. Não foi observada a relação crescente do HMF com o *A_w* e umidade, talvez porque, conforme descrito por ODDO e PIRO (2004), os méis de Asteraceae apresentam cristalização rápida, com cristais duros e pouco solúveis devido ao alto teor de glicose, e sabe-se que a cristalização interfere bastante no teor de água da amostra.

Observa-se que os valores obtidos para %AA não apresentou resultados compatíveis com a atividade antioxidante em equivalente de quercetina, indicando, novamente, que apenas a determinação do percentual da atividade antioxidante na concentração avaliada (71 mg/mL) pode não ser fidedigna para a avaliação desta propriedade biológica, pois a confecção de uma curva padrão gera um maior grau de confiabilidade.

C) Amostras de mel de *Eucalyptus* (Myrtaceae; nove amostras)

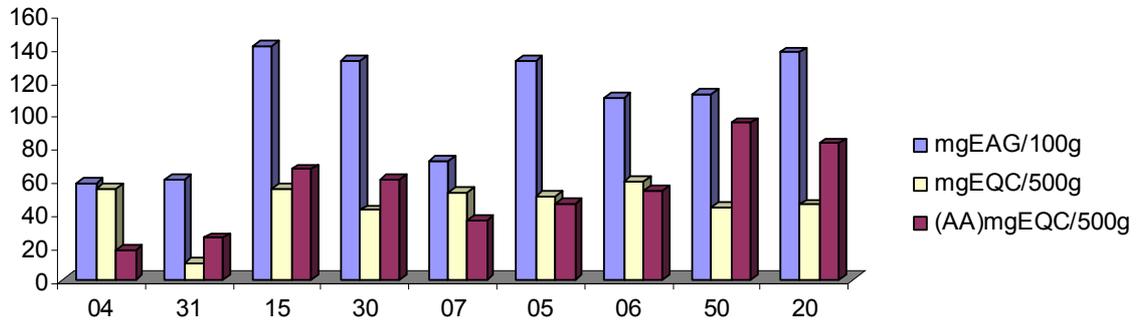


Figura 58: Resultado das análises orgânicas de méis de *Eucalyptus*

Tabela 18: Dados físico-químicos e atividade antioxidante de méis de *Eucalyptus*

Amostra	Cor	Substâncias Fenólicas		Atividade Antioxidante		Análises Físico-Químicas				
		mgE _{AG} /100g	mgE _{QC} /500g	(AA)mgE _{QC} /500g	AA%	HMF (mg/kg)	pH	Acidez (meq/kg)	Umidade (%)	A _w
04	Clara	58,26	55,03	18,35	55,86	ND	3,46	34,25	15,87	0,539
31	Clara	60,18	9,96	25,39	53,55	9,23	3,86	17,67	16,40	0,564
15	Média	141,06	54,54	66,50	86,15	7,32	4,55	34,79	17,40	0,593
30	Média	131,65	42,16	60,20	93,14	16,36	4,02	41,46	17,40	0,579
07	Média	71,51	52,41	35,51	46,23	23,55	4,32	27,58	16,93	0,566
05	Escura	132,05	50,37	46,24	83,63	165,17	4,08	31,19	18,73	0,539
06	Escura	109,92	59,32	54,06	50,45	ND	4,00	29,02	17,07	0,589
50	Escura	111,71	43,72	94,39	93,34	ND	4,83	32,09	17,20	0,574
20	Escura	137,03	45,35	82,21	84,40	ND	4,24	34,07	18,73	0,620
Média	-	105,93	45,87	53,65	71,86	44,33	4,15	31,35	17,30	0,574

*ND: não determinada

Os méis de eucalipto foram os que apresentaram as maiores quantidades de flavonóides, com uma média de 45,87 mgE_{QC}/500g de mel. De acordo com a literatura, os méis de eucalipto europeus costumam apresentar flavonóides, como a quercetina (68,3 a 422,0 µg/100g), canferol (23,2 a 175,4 µg/100g), miricetina (46,6 a 337,0 µg/100g), tricetina (108,1 a 1006,2 µg/100g) e luteolina (103,7 a 418,3 µg/100g), sendo esses três últimos considerados marcadores florais deste mel (MARTOS *et al.*, 2000), e podendo assim, estar contribuindo para sua atividade antioxidante. Grande parte dos flavonóides dos méis de *Eucalyptus* é oriunda do pólen, e já na forma aglicosilada (CAMPOS *et al.*, 1997; 2002; IURLINA *et al.*, 2009). Para haver a caracterização dos méis como monofloral de *Eucalyptus* por melissopalínologia é necessário ser encontrada uma quantidade mínima de 70% de pólen na amostra, devido a alta quantidade de pólen presente na planta, sendo esta uma possível causa da alta quantidade de flavonóides encontrada nos méis dessa origem floral.

As amostras de intensidade de coloração clara, **n° 4 e 31**, apresentaram as menores quantidades de fenólicos totais, bem como de capacidade antioxidante. O valor em equivalentes de flavonóides para a amostra **n° 4** apresentou-se na média quando comparado aos outros méis, porém a sua baixa concentração em substâncias fenólicas totais (58,26 mgE_{AG}/100g) pode ter sido responsável pela menor atividade sequestrante.

A amostra **n° 5** apresentou um teor de HMF muito alto (165,17 mg/kg) e também em fenólicos totais (132,05 mgE_{AG}/100g), porém não houve diferença considerável na acidez total (31,19 meq/kg).

D) Amostras de mel de *Myrcia* (Myrtaceae; seis amostras)

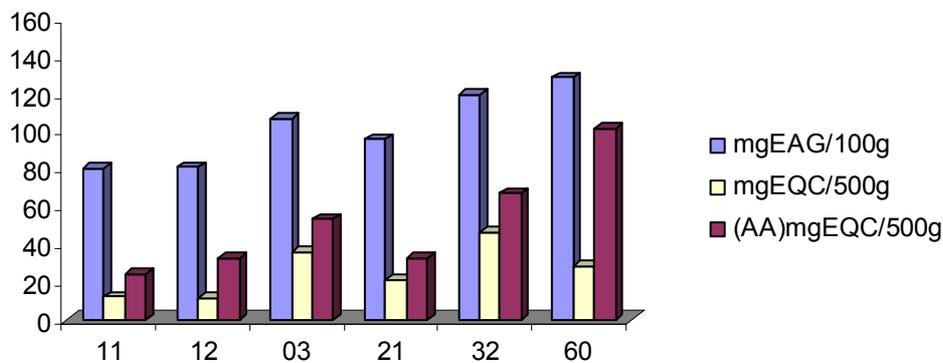


Figura 59: Resultado das análises orgânicas de méis de *Myrcia*

Tabela 19: Dados físico-químicos e atividade antioxidante de méis de *Myrcia*

Amostra	Cor	Substâncias Fenólicas		Atividade Antioxidante		Análises Físico-Químicas				
		mgE _{AG} /100g	mgE _{QC} /500g	(AA)mgE _{QC} /500g	AA%	HMF (mg/kg)	pH	Acidez (meq/kg)	Umidade (%)	A _w
11	Clara	80,81	12,26	24,20	63,71	0,85	3,56	30,11	19,60	0,567
12	Clara	81,05	11,77	32,86	59,68	12,70	3,55	31,55	19,20	0,607
03	Média	106,61	35,91	53,54	80,80	65,99	4,20	30,64	16,40	0,602
21	Média	95,81	21,48	32,97	78,01	38,17	3,48	30,83	17,00	0,581
32	Escura	119,38	46,36	67,39	96,35	8,23	4,03	57,82	18,40	0,598
60	Escura	128,67	28,50	101,99	91,43	ND	4,77	31,73	17,20	0,586
Média	-	102,05	26,05	52,16	78,33	25,19	3,93	35,45	17,97	0,590

Para os méis de *Myrcia* foi possível observar uma relação crescente entre os valores da atividade antioxidante, a quantidade de fenólicos totais e o teor de flavonóides.

As amostras **n° 11 e 12** foram as que obtiveram menor quantidade em fenólicos totais e flavonóides. Conforme esperado, também apresentaram menor atividade antioxidante e uma coloração mais clara.

E) Outros tipos de mel

Embora também sejam méis monoflorais, as amostras a seguir foram discutidas separadamente em virtude de apresentar um número reduzido de amostras de cada origem floral (uma para todas as amostras, exceto Montanoa, com duas).

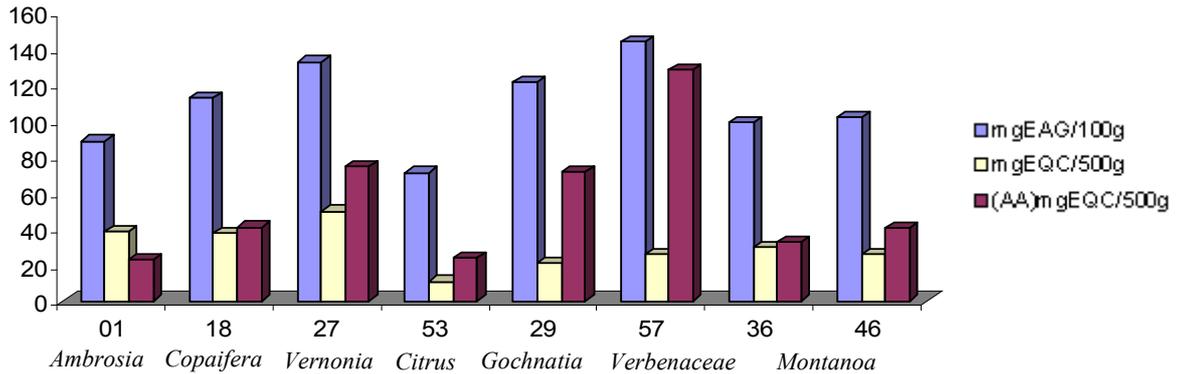


Figura 60: Resultado das análises orgânicas de méis de diversas origens florais

Tabela 20: Dados físico-químicos e atividade antioxidante de méis de diversas origens florais.

Amostra	Cor	Origem Floral	Substâncias Fenólicas		Atividade Antioxidante		Análises Físico-Químicas				
			mgE _{AG} /100g	mgE _{QC} /500g	(AA)mgE _{QC} /500g	AA%	HMF (mg/kg)	pH	Acidez (meq/kg)	Umidade (%)	Aw
01	Média	<i>Ambrosia</i>	88,80	38,17	23,13	69,24	32,83	4,12	28,12	16,60	0,579
18	Média	<i>Copaifera</i>	112,53	37,62	40,88	90,26	53,14	3,97	27,58	18,33	0,583
27	Escura	<i>Vernonia</i>	132,63	49,61	74,47	79,24	63,75	3,96	57,69	19,00	0,608
53	Clara	<i>Citrus</i>	71,23	10,79	23,55	53,67	15,47	3,89	23,07	16,87	0,585
29	Média	<i>Gochnatia</i>	121,78	20,62	71,87	95,62	12,17	3,39	68,51	20,00	0,602
57	Escura	<i>Verbenaceae</i>	144,12	25,75	128,15	96,01	17,22	3,62	131,78	18,47	0,605
36	Média	<i>Montanoa</i>	99,32	30,02	32,94	90,57	4,79	3,93	47,77	18,20	0,602
46	Média	<i>Montanoa</i>	102,09	26,06	40,43	78,10	4,04	4,10	41,09	18,20	0,601
Média	-	-	109,06	29,83	54,43	81,59	25,43	3,87	53,20	18,21	0,596

As amostras n° **29** (*Gochnatia*) e n° **57** (*Verbenaceae*), que são popularmente chamadas de cambará, obtiveram quantidades bastante diferenciadas no conteúdo de substâncias fenólicas, bem como a atividade antioxidante. Ambas tiveram quantidades relativamente altas em fenólicos, mas o mel de *Verbenaceae* apresentou os melhores resultados. No entanto, estas amostras apresentaram características físico-químicas inadequadas (0,602 e 0,605 para teor de água livre e 68,51 e 131,78 meq/kg para acidez, respectivamente), acima do limite estabelecido para o controle de qualidade do mel, que define o máximo de 0,600 para *Aw* e 50 meq/kg para acidez.

As amostras de *Montanoa* (n° 36 e 46), da família Asteraceae, obtiveram perfil similar de quantidades de ácidos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante, bem como quanto aos aspectos físico-químicos.

A amostra n° 27, *Vernonia* (popularmente conhecida como assa peixe), apresentou o maior conteúdo em flavonóides (49,61 mgE_{QC}/500g), e também, uma quantidade relativamente alta em fenólicos (132,36 mEAG/100g), bastante superior a faixa obtida por VIANNA (2009), que analisou quatro méis de assa peixe de Minas Gerais e obteve a faixa de 0,2 a 12,65 mgE_{QC}/500g e 23,83 a 62,69 mgE_{AG}/100g para flavonóides e fenólicos totais, respectivamente.

O mel de *Citrus* foi o que apresentou os piores resultados em relação aos conteúdos de fenólicos totais (71,23 mgE_{AG}/100g) e de flavonóides (10,79 mgE_{QC}/500g). Sua atividade antioxidante também foi baixa (23,55 (AA)mgE_{QC}/500g de mel ou 41,40 em termos de CE₅₀, e 53,67 em %AA). Tal resultado se encontra de acordo com o apresentado por LIANDA (2009), que analisou onze méis de laranja e obteve resultados de CE₅₀ entre 29,85 a 52,64 mg/mL e totais de fenólicos e flavonóides também bastante inferiores (34,0 a 53,2 mgE_{AG}/100g e 0,0 a 1,5 mgE_{QC}/500g).

A baixa atividade antioxidante não significa, necessariamente, que o mel seja de qualidade inferior, pois estes podem apresentar outras substâncias que tenham importantes propriedades biológicas.

O mel de laranja também é conhecido pela presença de hesperitina, uma flavanona gerada a partir da hidrólise da hesperidina pelas enzimas das abelhas (**Figura 61**). Esta flavanona, assim como seu derivado glicosilado, possui pouca atividade antioxidante, mas apresenta uma grande importância na absorção e retenção da vitamina C no organismo (BOINES e HOROSCHAK, 1956; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 2006).

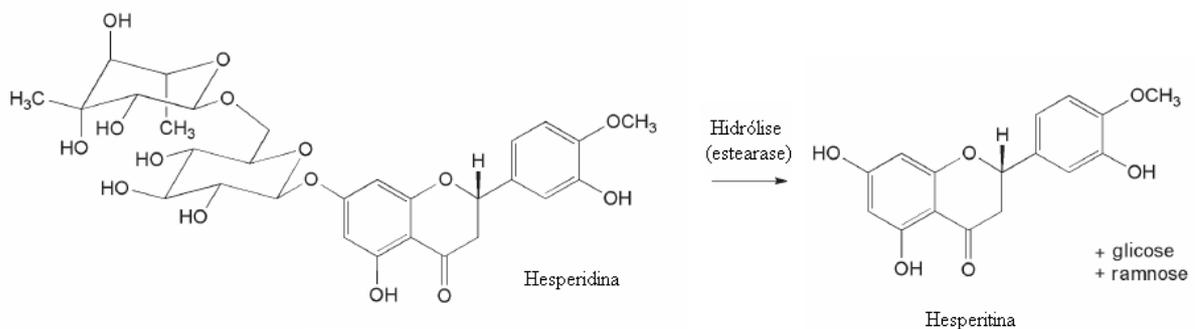


Figura 61: Hidrólise da hesperidina, presente nas plantas cítricas, para gerar a aglicona hesperitina

A seguir encontra-se a avaliação dos méis que não possuem uma única origem floral, denominados heteroflorais, que são os méis mais consumidos pela população, por serem os mais encontrados e de menor custo.

4.4.2. Amostras de méis heteroflorais por mesorregião (23 amostras)

As amostras de méis heteroflorais analisadas foram obtidas de diferentes regiões do estado, porém não há garantia de que estes méis sejam realmente oriundos destas regiões, pois podem ter sido produzidos em outra região e re-comercializados pelos apicultores.

Para fins de comparação foram considerados os resultados destas amostras separadas por mesorregião onde foram comercializadas, a fim de avaliar as características obtidas nas análises, e assim, tentar relacionar a qualidade dos méis que são, geralmente, consumidos nestas regiões. Abaixo segue a **Figura 62**, que indica as análises de fenólicos, flavonóides e capacidade antioxidante das 23 amostras heteroflorais analisadas por mesorregiões do estado do Rio de Janeiro.

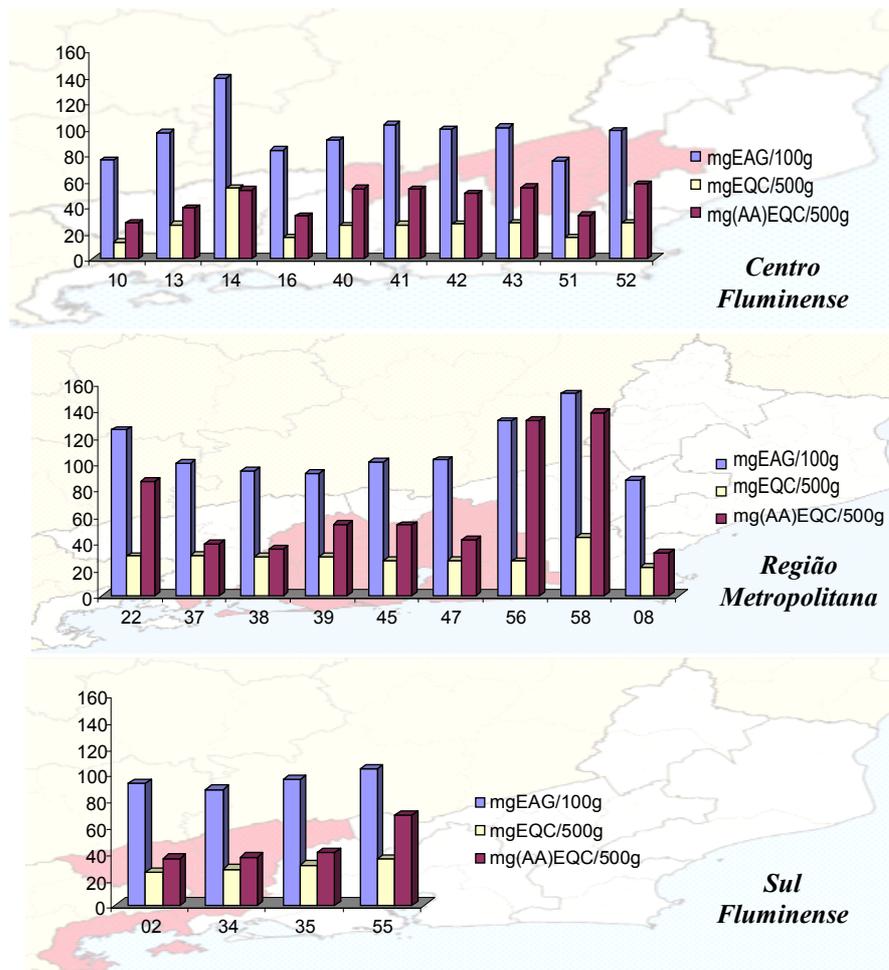


Figura 62: Resultado das análises orgânicas de méis heteroflorais

Tabela 21: Dados físico-químicos e atividade antioxidante dos méis heteroflorais.

Amostra	Cor	Região*	Substâncias Fenólicas		Atividade Antioxidante		Análises Físico-Químicas				
			mgE _{AG} /100g	mgE _{QC} /500g	(AA)mgE _{QO} /500g	AA%	HMF (mg/kg)	pH	Acidez (meq/kg)	Umidade (%)	A _w
10	Clara	C. F.	76,12	12,74	27,77	59,03	6,34	3,58	31,73	18,93	0,604
13	Média	C. F.	97,11	26,06	38,66	80,76	27,77	3,93	29,38	17,20	0,566
14	Média	C. F.	139,15	54,25	52,72	86,73	13,88	4,37	37,50	17,93	0,587
16	Média	C. F.	83,38	16,48	32,88	80,57	15,52	3,77	37,14	19,00	0,607
40	Média	C. F.	91,04	25,69	53,88	73,11	5,84	3,75	46,69	18,20	0,600
41	Média	C. F.	102,94	26,17	53,54	79,54	1,10	3,90	44,53	18,20	0,603
42	Média	C. F.	99,72	26,47	50,21	79,17	9,63	3,87	46,69	18,47	0,601
43	Média	C. F.	100,87	27,48	54,62	72,78	9,68	3,77	46,15	18,20	0,603
51	Média	C. F.	75,34	16,32	33,24	63,67	26,28	3,62	36,59	17,87	0,597
52	Escura	C. F.	98,30	27,48	57,32	85,74	25,83	3,75	51,56	20,00	0,624
Média	-	C. F.	96,40	25,91	45,48	76,11	14,19	3,83	40,80	18,40	0,599
08	Média	M.	87,70	21,69	32,20	70,00	51,00	4,10	17,67	16,73	0,562
22	Média	M.	125,04	29,90	86,27	91,21	18,46	3,62	88,75	18,93	0,612
37	Média	M.	100,25	30,57	39,22	79,23	2,84	3,87	47,05	21,80	0,600
38	Média	M.	94,30	29,15	35,28	79,23	7,29	3,86	43,86	19,00	0,601
39	Média	M.	92,59	29,36	54,08	76,00	5,84	3,92	44,76	17,80	0,600
45	Média	M.	101,11	26,75	53,49	77,64	5,39	3,99	46,87	17,80	0,603
47	Média	M.	102,54	26,58	42,17	76,86	9,78	3,98	41,26	18,80	0,604
56	Escura	M.	131,97	26,05	132,70	97,46	9,36	3,62	123,84	20,13	0,630
58	Escura	M.	152,52	44,12	138,31	93,79	262,47	3,73	108,34	17,20	0,588
Média	-	M.	109,78	29,35	68,19	82,38	41,38	3,85	62,49	18,69	0,600
02	Média	S. F.	92,71	24,91	35,39	79,24	40,87	4,10	30,64	17,33	0,575
34	Média	S. F.	88,10	27,69	36,64	75,12	3,49	3,77	44,88	18,07	0,602
35	Média	S. F.	95,52	30,54	39,98	77,05	3,49	3,93	43,14	18,60	0,600
55	Escura	S. F.	103,43	35,25	68,65	84,63	9,50	3,95	55,34	18,87	0,609
Média	-	S. F.	94,94	29,60	45,17	79,01	14,34	3,94	43,50	18,22	0,597
09	Clara	-	75,87	12,91	23,78	52,58	5,94	3,50	32,27	19,40	0,606
19	Média	-	81,21	57,93	20,59	76,03	26,57	4,13	23,62	17,20	0,571
54	Média	MG	70,29	14,27	27,87	53,56	43,71	3,91	22,71	16,60	0,580
28	Média	N.O.F.	108,45	33,27	43,04	90,61	54,62	3,77	43,26	16,80	0,589

* Mesorregiões do RJ: C. F.: Centro Fluminense; M.: Metropolitana; S. F.: Sul Fluminense; N.O.F.: Noroeste Fluminense

Comparando os méis heteroflorais, não foi observada uma variação significativa entre os méis do Sul Fluminense e Centro Fluminense, tanto no que diz respeito às análises orgânicas como as físico-químicas.

Os méis da região Metropolitana apresentaram uma média muito superior para 5-hidroximetilfurfural, contribuída principalmente pela amostra de n° 58, que apresentou o maior teor de HMF (262,47 mg/kg), sendo quatro vezes superior ao máximo permitido pela legislação brasileira, que é de 60 mg/kg (BRASIL, 2000); e sua acidez (108,34 meq/kg) também extrapolou bastante o limite máximo permitido, que é de 50 meq/kg.

A acidez média para os méis metropolitanos foi também bastante alta, com uma média de 62,49 meq/kg, sendo acima de 30% das amostras consideradas reprovadas, segundo a legislação vigente.

A umidade e o teor de água livre dos méis metropolitanos também foram superiores, tendo duas amostras (n° 37 e 56) sido consideradas reprovadas quanto a umidade (representando 22% do total de amostras dessa região), e cinco amostras (n° 22, 38, 45, 47 e 56) reprovadas quanto à água livre, que representou 60% das amostras metropolitanas.

Esse maior índice de reprovação dos méis comercializados na região metropolitana pode estar relacionado ao fato de muitas amostras metropolitanas serem provenientes de outras regiões. Muitas vezes, quando os méis não estão sendo vendidos em outras regiões, eles são transportados à região metropolitana, devido ao maior comércio nessa região. Porém, durante o transporte esses méis sofrem a influência de diversas condições climáticas, agitação e atrito que promovem uma freqüente cristalização e recristalização desses méis, que pode afetar seus aspectos físico-químicos.

Já as regiões do Sul Fluminense e Centro Fluminense não apresentaram reprovações quanto a umidade, porém obtiveram, respectivamente, e 50 e 60% de reprovação quanto a água livre, respectivamente. A quantidade média em equivalentes de fenólicos totais (109,78 mgE_{AG}/100g) para os méis metropolitanos foi superior às médias de 96,40 e 94,94 mgE_{AG}/100g obtidas para os méis do Centro Fluminense e Sul Fluminense, respectivamente, e também foi maior a atividade antioxidante. Esse resultado corrobora, novamente, para o fato de que a acidez gerada pelas substâncias fenólicas pode influenciar na reação de formação de HMF, e conseqüentemente, no teor de água do mel. Ou ainda, que o inverso esteja acontecendo, um alto teor de água no mel possa acarretar um maior acúmulo das substâncias fenólicas hidrossolúveis que tem maior capacidade antioxidante, como foi justificado por FRANKEL *et al.* (1998). Alguns dados que serão discutidos a seguir indicam que, provavelmente, o aumento da acidez gerada pelas substâncias fenólicas realmente ocasiona essas transformações físico-químicas, e que, possivelmente, ambos os fatores apresentados podem favorecer a atividade antioxidante do mel.

4.4.3. Considerações gerais sobre os resultados das análises dos méis

Observa-se pela **Tabela 22** que, com o aumento da intensidade da coloração do mel, aumentaram os conteúdos de substâncias fenólicas, da atividade antioxidante, acidez, HMF, e também o teor de umidade e água livre.

Tabela 22: Valores médios das análises orgânicas e físico-químicas dos méis, separados pela coloração

Cor	Fenólicos mgE _{AG} /100g	Flavonóides mgE _{OC} /500g	CE ₅₀ (mg/mL)	%AA	HMF (mg/kg)	Acidez (meq/kg)	pH	Umidade (%)	A _w	Nº*
Clara	72,81	17,28	38,89	60,01	6,64	30,13	3,66	18,10	0,589	8
Média	100,87	29,92	23,76	78,83	22,35	41,92	3,90	18,13	0,590	38
Escura	125,30	39,92	12,62	86,81	50,41	61,72	4,02	18,56	0,605	14

*Nº: número de amostras analisadas.

Uma das possíveis explicações para o aumento da acidez nos méis escuros pode ser a presença de substâncias fenólicas em maior proporção, que em geral apresentam características ácidas. Este fato pode também levar a um aumento na formação de HMF, que é gerada pela reação de Maillard, provocada pela quebra da frutose e glicose na presença dos ácidos presentes nos méis. A formação de HMF (**Figura 63**) deve ser, portanto, favorecida nestes méis que possuem maior acidez, e como esta reação é um mecanismo de desidratação de açúcares redutores, é de se esperar que os méis escuros tenham também maior teor de água livre e umidade, conforme foi observado na **Tabela 22**. De acordo com estudo feito por ANAM e DART (1995), a formação de HMF foi acompanhada pelo decréscimo de açúcares redutores.

Estudos da Universidade de Illinois de Urbana-Champaign mostraram que a capacidade antioxidante de mel de diferentes floradas estava possivelmente relacionada com a cor dos méis e também com o conteúdo de água (SILVA *et al.*, 2006). Resultado semelhante foi obtido por GHELDOLF *et al.* (2002), onde foi observada uma correlação linear da atividade antioxidante com a cor do mel.

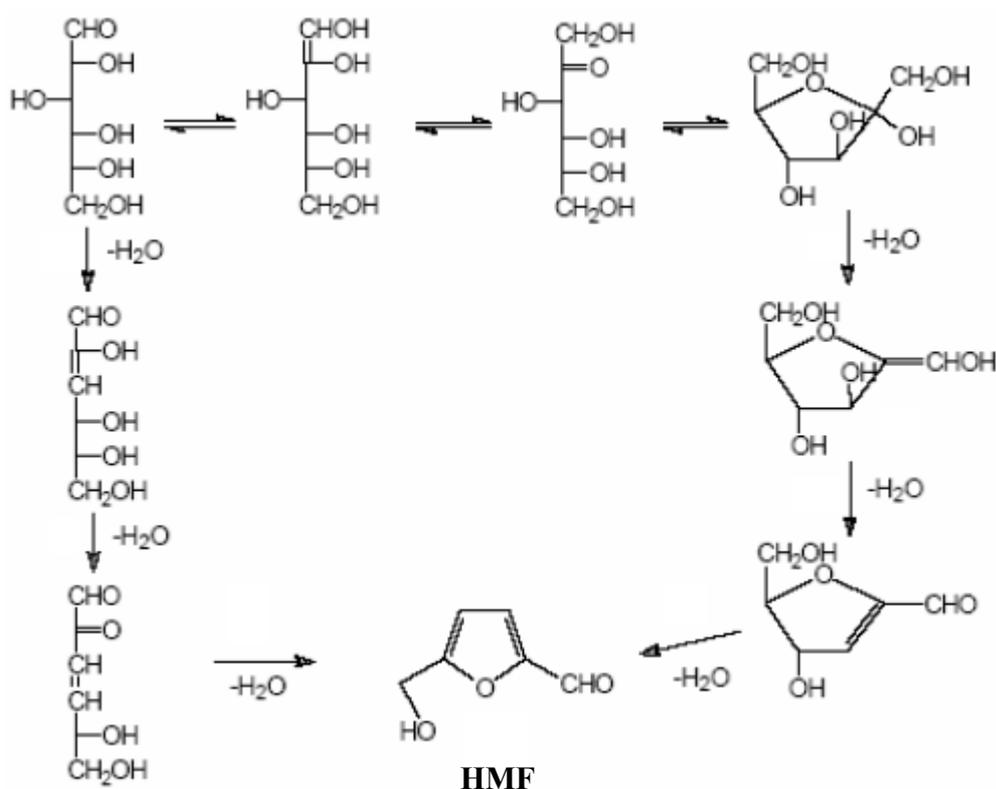


Figura 63: Formação de HMF a partir da reação de desidratação de açúcares redutores (LEWKOWSKI, 2001)

O HMF apresenta três grupos reativos, o hidroximetil, o grupo aldeído e o anel furânico. O grupo hidroximetil, por ser um álcool primário, pode sofrer oxidação ou gerar ésteres. O anel furânico está sujeito a hidrogenação e grupo aldeído está a oxidação à ácido carboxílico, redução a álcool, ou ainda sofrer diversas outras adições nucleofílicas (GONZALEZ e LAIRD, 2006). Portanto, o HMF, assim como outras furanoses, pode reagir com aminas ou aminoácidos presentes na amostra, caso esta tenha sido aquecida, formando derivados de condensação como as melanoidinas. Em geral, alguns alimentos apresentam coloração laranja ou castanha por conta da formação dessas substâncias (**Figura 64**; UNIV. PORTO, 2004).

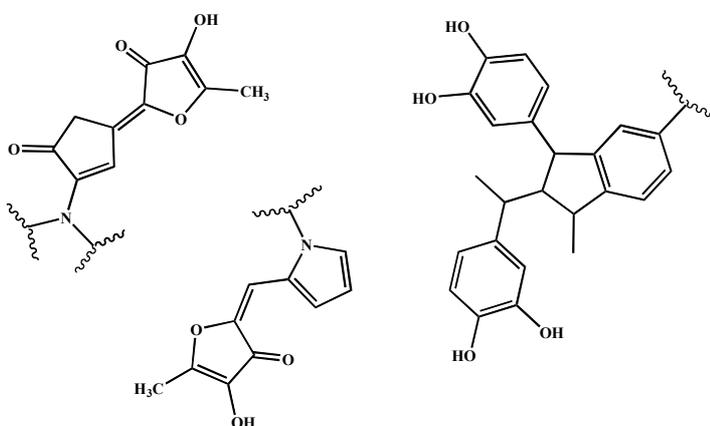


Figura 64: Exemplos de substâncias coloridas que podem ser formadas a partir do HMF (Univ. Porto, 2004; NUNES e COIMBRA, 2010).

Uma outra explicação para a coloração escura encontrada nos méis tem sido apontada pelo conteúdo de minerais encontrados (GONZÁLEZ-MIRET *et al.*, 2005). Conforme estudo realizado por este autor, o conteúdo de minerais dos méis escuros é muito maior do que nos méis claros. Apesar do elemento potássio ser o mineral majoritário, os sais de ferro são os principais responsáveis pelo escurecimento do mel. Uma quantidade muito baixa de ferro (<2,79 mg/kg) está presente em méis claros como, por exemplo, os méis cítricos. Os méis de coloração âmbar clara, como os méis de eucalipto, possuem quantidade mediana de minerais e especialmente de ferro (cerca de 2,84 mg/kg). Já os méis escuros, como o de abacate, castanha e melato, apresentam quantidades superiores a 4,26 mg/kg de ferro. Segundo BOGDANOV *et al.* (2007), o conteúdo de determinados minerais também pode variar com a origem geográfica e floral.

Apesar de não ter sido avaliada a quantidade de minerais nos méis neste trabalho, estudos indicam que estes são bons catalisadores da reação de Maillard (GONZALEZ e

LAIRD, 2006; KATO *et al.*, 1981), e como as amostras escuras apresentam minerais em maior quantidade, é de se esperar uma maior quantidade de HMF formada.

No estudo realizado por ANAM e DART (1995), foi observado que a adição de íons metálicos como manganês, zinco e ferro aceleram a formação de HMF em méis. A maior quantidade de HMF foi provocada pelos íons de manganês, seguido pelo zinco, magnésio e ferro (II). Também foi relatado, pelos mesmos autores, que méis acondicionados em embalagens metálicas possuem geralmente alta quantidade de HMF, muitas vezes excedendo os limites estabelecidos pela legislação (60 meq/kg). Isso ocorre devido a alta acidez do mel, que tende a promover a dissolução dos íons metálicos da embalagem, incorporando-os em solução.

Na primeira etapa da reação de Maillard, o açúcar redutor (glicose ou frutose) se condensa com um aminoácido, e o composto formado se desidrata, levando a formação da base de Schiff, que é insaturada e instável. Nesta etapa, a liberação de água ocorre, portanto, na proporção de 1:1 em relação ao açúcar combinado. A segunda etapa desta reação se dá pelo rearranjo de Amadori, onde ocorre a entrada e saída de um próton, formando, inicialmente, um estado catiônico da base de Schiff, conforme pode ser observado na **Figura 65**. Este produto formado, posteriormente, se isomeriza a cetosamina, que gera, através de outras etapas, o 5-hidroximetilfurfural (OETTERER, 2009).

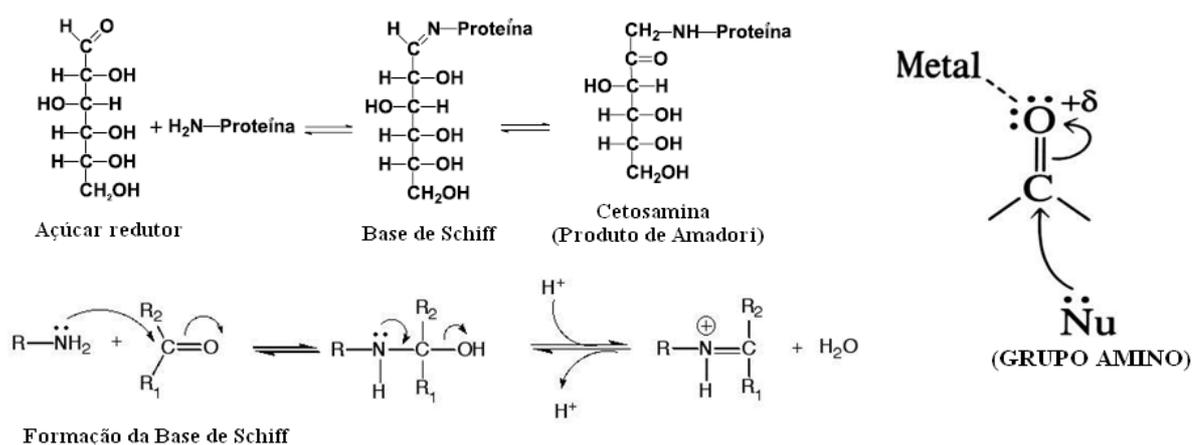


Figura 65: Etapas iniciais da reação de Maillard. A direita, ação catalizadora provocada por metais.

(<http://www.biology.buffalo.edu/courses/bio401/KiongHo/Lecture31.ppt#301,1,Enzyme>
(Basic Principle)

Certos íons metálicos favorecem a formação da base de Schiff, que é a primeira etapa da reação de Maillard, pois a complexação de um metal com o oxigênio da carbonila deixa seu carbono mais deficiente e, portanto, mais susceptível ao ataque do nucleófilo, que, no caso, é representado pelo grupo amino de aminoácidos (**Figura 65**; à direita). O mecanismo da catálise metálica na reação de Maillard é semelhante a catálise ácida, mas o fato dos metais poderem apresentar maior número de oxidação faz com que este possa se quelar com mais de uma carbonila, catalisando a reação com mais eficiência (KATO *et al.*, 1981; ANAM e DART, 1995).

Apesar da acidez ter sido maior nos méis escuros analisados neste trabalho, estes méis também apresentaram maiores valores de pH, o que se encontra de acordo com o proposto por LOTHEOP (1936), no qual foi relatado que os méis com maior acidez são, ao mesmo tempo, mais básicos. A acidez mede apenas a quantidade de ácidos totais da amostra, não sendo relacionável com o pH, que mede também a alcalinidade e é variável de acordo com a força do ácido presente. Segundo o mesmo autor, essa diferença está relacionada a quantidade de minerais, medida pelo teor de cinzas, que conforme mencionado está presente em maior quantidade nos méis escuros. O mel apresenta cinzas com características alcalinas, e uma grande parte desses elementos pode se complexar com substâncias fenólicas (JONGBERG *et al.*, 2009).

Os minerais e as substâncias fenólicas podem ser os dois fatores iniciais que promovem um escurecimento do mel, devido ao aumento da absorbância causada pelos complexos entre essas espécies (**Figura 66**).

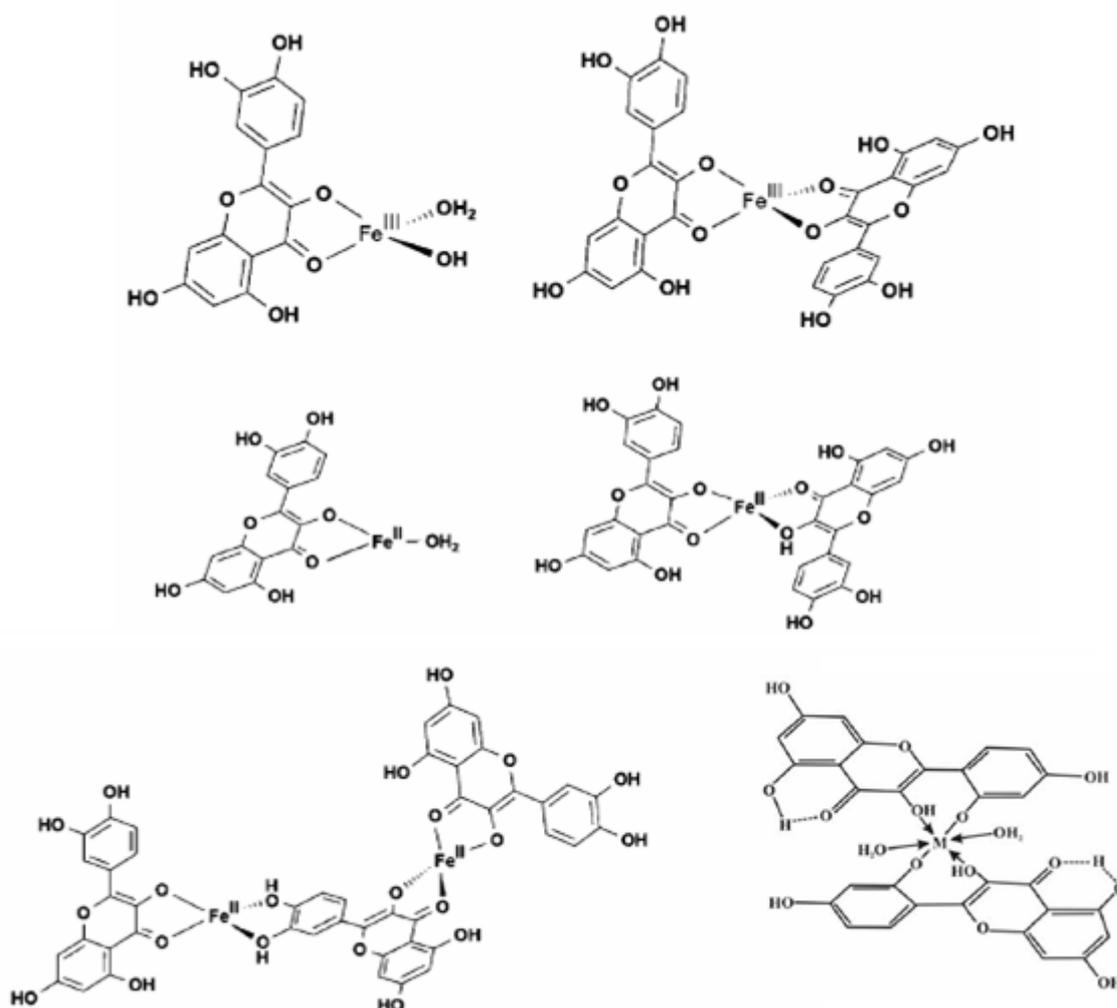


Figura 66: Alguns complexos formados por flavonóides com íons metálicos bivalentes ou trivalentes (GUO *et al.*, 2007; MASELEV e KUNTIC, 2007).

Em contrapartida, não se sabe o quanto a determinação do teor de hidroximetilfurfural é confiável. Segundo um estudo feito por ANDRADE *et al.* (1995), analisando o método oficial para determinação de HMF, foram obtidos valores anormais de absorção no espectro de UV para amostras escuras, e estes valores de HMF foram reduzidos consideravelmente quando as mesmas soluções de mel foram tratadas com 0,05g de carvão ativado, que remove os pigmentos interferentes na absorção no comprimento de onda entre 240 a 350 nm.

Pode haver, portanto, méis escuros com teores de HMF dentro do limite estabelecido pela legislação que estão sendo, erroneamente, reprovados devido a interferentes comuns por UV-Vis, que é usado no método de análise para o HMF. Uma alternativa seria essa purificação prévia com carvão ativado ou a análise por CLAE ou CG-MS.

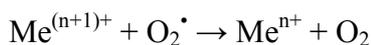
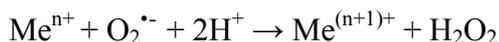
Em um estudo realizado por MASTROCOLA e MUNARI (2000), foi observado um decréscimo na quantidade de HMF em produtos estocados por 30 e 180 dias a temperatura de 25°C. O mesmo autor notou que o teor de HMF teve maior redução nas amostras que apresentaram maior escurecimento. Neste trabalho, foi proposta a explicação da perda do HMF por conta de condensação com aminoácidos presentes (formação de melanoidinas), reduzindo sua detecção no método espectrofotométrico (UV-Vis) e intensificando a coloração. Também foi observado um aumento da atividade antioxidante com o tempo de estoque e com o aquecimento das amostras, o que foi também atribuída a formação de melanoidinas, que apresentam atividade antioxidante conhecida (RUFÍAN-HENARES e MORALES, 2007; MAILLARD *et al.*, 2007).

A atividade antioxidante das melanoidinas está relacionada ao grupo amino presente na estrutura, uma vez que nem os açúcares, nem seus derivados pirolíticos apresentam atividade antioxidante conhecida. Inclusive, a capacidade antioxidante das melanoidinas costuma variar de acordo com o aminoácido que as gerou (CHICHESTER e SCHWEIGERT, 1988).

Além disso, sabendo que muitos compostos fenólicos com capacidade antioxidante são ácidos, o limite de 50meq/kg de acidez total imposto pela legislação brasileira pode estar também limitando a atividade antioxidante dos méis consumidos no país.

No entanto, a maior presença de metais de transição como o ferro nos méis escuros pode participar da geração de espécies livres reativas de oxigênio (ROS), mas conforme relatado por KHOKHAR e APENTEN (2003) sua quelação com as substâncias fenólicas pode reduzir essa toxicidade.

Segundo relatos em um artigo de revisão, MASELEV e KUNTIC (2007), foi demonstrado que os flavonóides complexados com metais de transição são mais hidrofílicos e solúveis que os não complexados e possuem atividade antioxidante maior. Nesse trabalho foi discutido que a formação de complexos metálicos de polifenóis auxilia na redução de radicais, comparando as mesmas substâncias sem a quelação. Os autores observaram que os flavonóides apresentam maior atividade antioxidante quando estão quelados a metais de transição, especialmente Fe(II). Os metais de transição também podem aumentar a atividade antiinflamatória e citoprotetora contra danos oxidativos às células, quando quelados a substâncias polifenólicas, devido a formação do chamado “centro de dismutação de superóxido”. Acredita-se que esses íons metálicos complexados agem reduzindo os radicais pelas seguintes equações (KOSTYUK *et al.*, 2007; MASELEV e KUNTIC, 2007):



Sabe-se que metais podem se complexar com paraquinonas e também com semiquinonas (BUKHARI *et al.*, 2008; KOSTYUK *et al.*, 2007). Possivelmente, esse incremento na atividade antioxidante também pode ser favorecido pelo aumento da conjugação do radical flavonoil formado (**Figura 67**).

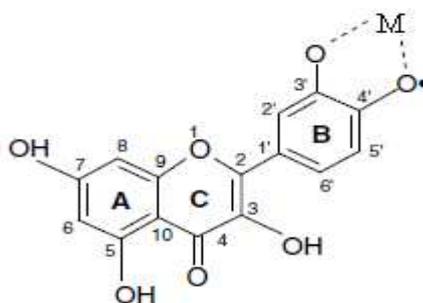


Figura 67: Semiquinona complexada com íon metálico (BUKHARI *et al.*, 2008)

Além disso, as substâncias polifenólicas inibem a ação pró-oxidante característica dos metais de transição, ao formarem complexos. Os polifenóis desprotonados agem como bases de Lewis duras, gerando ligações estáveis com ácidos de Lewis duros como o Fe^{3+} (**Figura 68**). A ligação com ferro é um mecanismo bastante conhecido de ação antioxidante de substâncias polifenólicas.

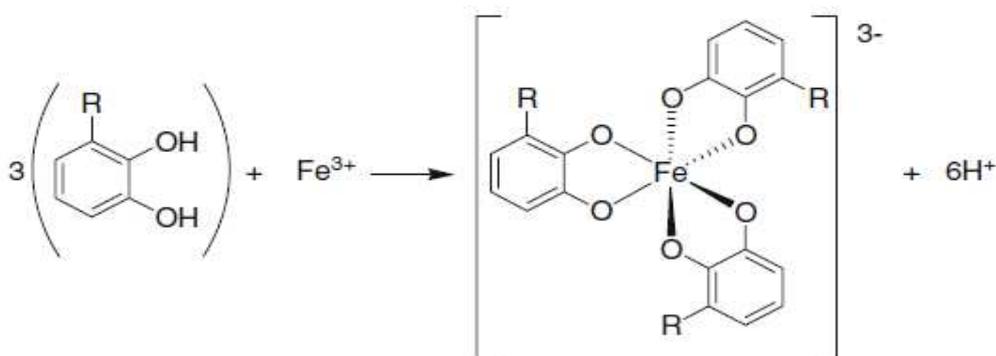


Figura 68: Quelação de polifenóis com íons de ferro (PERRON e BRUMAGHIM, 2009)

Os resultados apresentados na literatura se encontram de acordo com o esperado para as amostras escuras, que em geral apresentam maior quantidade de minerais, maior quantidade de polifenóis e também uma maior atividade antioxidante.

Além da cor, algumas outras considerações podem ser realizadas ao comparar os dados orgânicos e físico-químicos. Através da comparação entre amostras estudadas neste trabalho, separadas por origem floral (exceto para as origens florais com poucas amostras, que foram discutidas separadamente no item 4.4.1), seguem as médias dos resultados, agrupados na **Tabela 23**.

Tabela 23: Valores médios das análises, separados por origem floral

Origem Floral	Substâncias Fenólicas		Atividade Antioxidante		Análises Físico-Químicas					N°
	mgE _{AG} /100g	mgE _{QC} /500g	(AA)mgE _{QC} /500g	AA%	HMF (mg/kg)	pH	Acidez (meq/kg)	Umidade (%)	A _w	
Anadenanthera	112,60	25,99	59,93	84,38	23,19	3,75	56,49	19,38	0,626	6
Asteraceae	97,11	27,56	43,93	80,95	26,39	3,80	43,11	18,28	0,595	4
Eucalyptus	105,93	45,87	53,65	71,86	44,33	4,15	31,35	17,30	0,574	9
Myrcia	102,05	26,05	52,16	78,33	25,19	3,93	35,45	17,97	0,590	6
Heteroflorais	98,80	28,15	50,54	77,46	26,02	3,85	46,90	18,34	0,597	23

*N°: número de amostras analisadas.

Pode-se observar que os méis de *Anadenanthera* apresentaram a melhor atividade antioxidante [59,93 (AA)mgE_{QC}/500g e 84,38% em termos de %AA], embora a acidez média apresentada para esta origem botânica tenha sido a mais alta (56,49 meq/kg), estando acima do permitido pela legislação nacional (50 meq/kg). A umidade e atividade de água desta origem botânica também foram as mais altas (19,38% e 0,626, respectivamente). No entanto, apresentou a menor quantidade de HMF (23,19 mg/kg), assim como a menor média de pH (3,75). O baixo pH pode indicar uma menor presença de minerais, que são, conforme já discutido, bons catalizadores da reação de Maillard, e tal fato pode ser uma justificativa para essa menor formação de HMF. Apesar da maior quantidade de fenólicos totais (112,60 mgE_{AG}/100g), os méis desta origem floral apresentaram a menor média para flavonóides (25,99 mgE_{QC}/500g). Tendo em vista a menor hidrossolubilidade de flavonóides em comparação aos ácidos fenólicos (que estão também comumente presentes em méis), tal fato se encontra de acordo com a teoria proposta por FRANKEL *et al.* (1998), de que o maior acúmulo de substâncias fenólicas antioxidantes hidrossolúveis está relacionado a um maior teor de água no mel.

Os méis de *Eucalyptus* apresentaram a segunda maior média em atividade antioxidante [53,65 (AA)mgE_{QC}/500g]. Estes méis também apresentaram o segundo maior teor em fenólicos totais (105,93 mgE_{AG}/100g), a maior média de pH (4,15) e também, conforme esperado, o maior teor de HMF (44,33 mg/kg), que provavelmente está relacionada a catálise por minerais. O teor de flavonóides foi superior aos das outras origens florais (45,87

mgE_{QC}/500g). Tal fato pode ter contribuído para a capacidade antioxidante, principalmente, por conta da alta média de pH (provavelmente, deve apresentar um alto teor de minerais), pois os complexos flavonóides-metais geram um aumento na atividade antioxidante. O pH relativamente alto dos méis de *Eucalyptus* está de acordo com o descrito por ODDO e PIRO (2004), que relatou que os méis dessa origem floral apresentam pH em torno de 4,0. Os mesmos autores também mencionaram que o baixo conteúdo de água é também característico desta origem botânica, com cerca de apenas 16%, bem como a acidez, que geralmente se encontra na média de 22 meq/kg. O percentual de água para os méis de *Eucalyptus* avaliados nesse trabalho apresentou-se um pouco acima desta média (17,30%), o que pode ser resultado da alta formação de HMF. A acidez total também se apresentou acima da média descrita por ODDO e PIRO (2004), com 31,35 meq/kg, o que pode estar relacionado com a alta quantidade de HMF formada e a alta quantidade de fenólicos totais.

Os méis de Asteraceae apresentaram a menor média de atividade antioxidante [43,93 (AA)mgE_{QC}/500g de mel], estando de acordo com as menores médias em fenólicos totais (97,11 mgE_{AG}/100g). Não foi observada diferença significativa no teor de flavonóides, nem quanto aos aspectos físico-químicos.

Já as amostras heteroflorais apresentaram a segunda menor atividade antioxidante [50,54 (AA)mgE_{QC}/500g de mel] e também a segunda menor média em fenólicos totais (98,80 mgE_{AG}/100g) e, assim como nos méis de Asteraceae, não foi observada relação significativa com o teor de flavonóides.

De um modo geral, observou-se que o teor em fenólicos totais é mais determinante que os flavonóides, provavelmente pela maior quantidade dessas substâncias, que é característica dos méis brasileiros.

Como pode ser observado, há parâmetros físico-químicos, inclusive considerados negativos, que podem ser correlacionados com as propriedades biológicas, como a atividade antioxidante. O teor de HMF, por exemplo, é limitado por lei por conta de que um superaquecimento da amostra pode vir a degradar substâncias termolábeis e/ou voláteis presentes no mel, porém, no entanto, não é feita uma quantificação dessas substâncias no mel. Cabe ser avaliado, os prós e contras do consumo de méis que se encontram fora dos padrões legais vigentes, sem se deixar de lado as considerações sobre o controle da qualidade do produto e os riscos a saúde do consumidor.

5. CONCLUSÕES

De um modo geral, todos os méis que foram analisados apresentaram uma correlação bastante significativa quanto ao conteúdo de fenólicos e flavonóides totais e a atividade antioxidante apresentada. Estas propriedades devem ser divulgadas de modo a promover o consumo do mel e a valorizar o produto junto ao consumidor.

Dos méis analisados, os méis de *Anadenanthera* (angico) foram os que apresentaram, em média, o teor mais alto em substâncias fenólicas totais e a maior capacidade antioxidante.

Pode ser observado que alguns parâmetros físico-químicos, como a intensidade de cor, o pH e a acidez, apresentam relação com as características orgânicas das amostras, como, por exemplo, a atividade antioxidante e teor de polifenóis. Também há, possivelmente, a interferências de alguns fatores orgânicos nas análises físico-químicas, como o conteúdo das substâncias fenólicas na acidez observada, e na sua complexação com minerais, que pode ter resultado no aumento da atividade antioxidante e na formação de HMF, o que, em consequência, acarretou o aumento no teor de água livre e umidade de alguns méis analisados.

Além desses fatores, foi possível observar que a capacidade antioxidante dos méis também pode variar de acordo com a região, origem floral, e até mesmo dentro de uma mesma origem floral. A sua composição pode variar dependendo do clima e de fatores de tensão ambiental, como umidade, temperatura e até a composição do solo.

De uma forma geral, observou-se uma conformidade da maior parte das amostras para os parâmetros físico-químicos com relação aos limites estabelecidos pela legislação brasileira. Mesmo assim, sugere-se uma maior atividade de fiscalização e a padronização de métodos de produção e armazenamento do produto.

Devido às diferentes condições climáticas e florísticas das regiões onde o mel é produzido, tem sido verificada uma grande variação em sua composição química (por exemplo, no conteúdo de substâncias fenólicas) e também nas características físico-químicas. Dessa forma, há a necessidade de uma reavaliação e readaptação da legislação nacional vigente.

O mel é um produto de composição bastante diversificada, e seu consumo tem sido associado a uma boa qualidade alimentar por conta de suas reconhecidas propriedades biológicas. No entanto, análises que atestem sua idoneidade e qualidade são necessárias para proporcionar maior segurança ao consumidor, e assim também popularizar ainda mais esse valioso produto.

A atividade antioxidante está bastante relacionada com as substâncias fenólicas, por haver um aumento desta propriedade com a quantidade de polifenóis. No entanto, a capacidade antioxidante não pode ser prevista ou atribuída somente a estes parâmetros, pois as enzimas, aminoácidos, proteínas, vitaminas e ácidos orgânicos também são substâncias presentes no mel que podem apresentar atividade antirradicalar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULRHMAN, M. **Honey Injections Used to Treat Pneumonia**. Apitherapy News, 2008. Disponível em: <http://apitherapy.blogspot.com/2008/06/honey-injections-used-to-treat.html>. Acesso em: 03/6/2010.
- ACKER, S. A. B. E.; vank BALEN, G. P.; DEN BERG, D.J., BAST, A.; van der VIJGH, W. J. F. Influence of Iron Chelation on the Antioxidant Activity of Flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, 56: 935-943, 1998.
- ADAMS, C. J., MANLEY-HARRIS, M. e MOLAN, P. C. The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. **Carbohydr. Res.**, 344(8):1050-1053, 2009.
- AGUIAR, R. M.; REZENDE, L. C.; QUEIROZ, C.A.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Relação estrutura-atividade antioxidante de quercetina e seus derivados glicosilados. **32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009.
- 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: 1383-1392, 2007.
- AL, M. L.; DANIEL, D.; MOISE, A.; BOBIS, O.; LASLO, L.; BOGDANOV, S. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. **Food Chemistry**, 112: 863-867, 2009.
- 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.
- ALENCAR, S. M. *Tese de doutorado*. Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil. UNICAMP, São Paulo, **2002**.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; TULIPANI, S.; ROMANDINI, S.; BERTOLI, E.; BATTINO, M. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. **Mediterr. J. Nutr. Metab.**, 3:15-23, 2010.
- AL-WAILI, N. S. Intravenous and Intrapulmonary Administration of Honey Solution to Healthy Sheep: Effects on Blood Sugar, Renal and Liver Function Tests, Bone Marrow Function, Lipid Profile, and Carbon Tetrachloride-Induced Liver Injury. **J. Med. Food**, 6(3): 231-247, 2003.
- ANACLETO D. A.; SOUZA, B.A.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A.C.C.C. Composição de amostras de mel de abelha Jataí (*Tetragonisca angustula latreille*, 1811), **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 29(3): 535-541, 2009.
- ANAM, O. O.; DART, R. K. Influence of Metal Ions on Hydroxymethylfurfural Formation in Honey. **Analytical Proceedings Including Analytical Communications**, 32: 515-517, 1995.

ANDRADE, P. B. AMARAL, M. T., CUNHA, A. P.da. Modification of AOAC method for the determination of hydroxymethylfurfural in dark honeys. **Acta-Technologiae-et-Legis-Medicamenti**. 6(3):289-293; 1995.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 66(1): 232-240, 2007.

ANVISA, **Resolução - CNNPA nº 12**, D.O. de 24/07/1978. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_biscoitos.htm. Acesso em 03/06/2010.

AOAC, 2005. Official Methods of Analysis. Disponível em: <http://www.aoac.org/dietsupp6/Dietary-Supplement-web-site/Jul2006.htm>. Acesso em 10/06/2010.

ARAUCO, E. M. R. Mel. FMVZ, UNESP, Botucatu, 2008. Disponível em: <http://dgta.fca.unesp.br/carnes/Alunos%20PG/Zootecnia/Roca318.pdf>. Acesso em 07/06/2010.

AYDA, R. **Reaction Schemes for Glycation**. The University of Warwick. In: 2. Amadori Rearrangement, 2007. Disponível em: http://www2.warwick.ac.uk/fac/med/research/csri/proteindamage/imars_chem/schemes/. Acesso em 05/6/2010.

BANERJEE, A.; DASGUPTA, B. *In vitro* study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. **Food Chemistry**, 90: 727-733, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse Oxidativo: Relação entre a geração de espécies reativas e a defesa dos organismos. **Química Nova**, 29: 113-123, 2006.

BARTH, O. M. **O pólen no mel brasileiro**. Rio de Janeiro: Lúxor, 1989. pág.150.

BARTH, M. O. Melissopalinologia no Brasil: uma revisão sobre análises palinológicas de mel, própolis e bolotas de pólen de abelhas. **Sci. Agric.** (Piracicaba, Braz.), 61(3): 342-350, 2004.

BEKEDAM, E. K. *Tese de doutorado*. Coffee Brew Melanoidins. Structural and Functional Properties of Brown-Colored Coffee Compounds, Universidade de Wageningen, Holanda, **2008**.

BELITZ, H.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. Food Chemistry. 4ª ed. Springer, Berlin, 2009. pág. 883

BERG, A. V. D. *Monografia*. The Production of "Good" Creamed Honey. Universidade de Queensland, **1998**.

BERNARDINO, D. C. S. Crescimento e Qualidade de mudas de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan em resposta à saturação por bases do substrato. **R. Árvore**, Viçosa-MG, 29 (6): 863-870, 2005.

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

BOGDANOV, S. A Short History of Honey. The Book of Honey, capítulo 1, **Bee Product Science**, 2009a. Disponível em: <<http://www.bee-exagon.net/files/file/fileE/Honey/HistoryHoney.pdf>>. Acesso em 07/06/2010.

BOGDANOV, S.; JURENDIC, T.; SIEBER, R.; GALLMANN, P. Honey for Nutrition and Health: a Review. **American Journal of the College of Nutrition**, 27: 677-689, 2008.

BOGDANOV, S. **Honey Composition**. Book of Honey, Bee Product Science, 2009.

BOGDANOV, S. Nature and Origin of the Antibacterial Substances in Honey. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, 30: 748-753, 1997.

BOGDANOV, S.; HALDIMANN, M.; LUGINBÜHL, W. e GALLMANN, P. Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects. **Journal of Apicultural Research and Bee World**, 46(4): 269-275, 2007.

BOHREN, C. **Ambrósia - Ameaça para a saúde e para a biodiversidade (*Ambrosia artemisiifolia* L.)**. Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil, 2008. Disponível em: http://www.ewrs.org/IW/doc/ambrosia_portugese.pdf. Acesso em 08/06/2010.

BOINES, G. J.; HOROSCHAK, S. Hesperidin and Ascorbic Acid in the Prevention of Upper Respiratory Infections. **International Record of Medicine & G. P. Clinics**, 73-76, 1956.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E. e BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, 28: 25-30, 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 01/01/2010.

BUKHARI, S. B.; MEMON, S.; TAHIR, M. M.; BHANGER, M. I. Synthesis, characterization and investigation of antioxidant activity of cobalt-quercetin complex. **Journal of Molecular Structure**, 892, 39-46, 2008.

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 31/12/2009.

CAMPOS, G.; DELLA-MODESTA, R. C.; SILVA, T. J. P.; BAPTISTA, K. E.; GOMIDES, M. F.; GODOY, R. L. Classificação do mel em floral ou mel de melato. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 23(1), 1-5, 2003.

CAMPOS, M.; MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; CUNHA, A. P. An Approach to the Characterization of Bee Pollens via their Flavonoid/Phenolic Profiles. **Phytochemical Analysis**, 8, 1997, pág. 181-185.

CAMPOS, M. G.; WEBBYB, R. F.; MARKHAMB, K. R. The Unique Occurrence of the Flavone Aglycone Tricetin in Myrtaceae Pollen. **Z. Naturforsch**, 57c, 2002, pág. 944-946.

CANTERLE, L. P. *Dissertação de mestrado*. Erva-mate e atividade antioxidante. UFSM, Santa Maria, **2005**.

CARAVACA, A. M. G. *Tese de Doutorado*. Caracterización de Alimentos Mediante Metodologías Separativas Avanzadas y Aplicaciones a Tecnología de Alimentos. In: Bloque II: Miel. Universidade de Granada, Granada, **2009**, pág. 269 a 319.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, 30 (2), 441-449, 2007.

CHANG, C. C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, 10 (3), 178-182, 2002.

CHAVES, M. H. ; SOUSA, C. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JR.; G. M.; AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S. AUAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, 30(2), 351-355, 2007.

CHEN, L.; MEHTA, A.; BERENBAUM, M.; ZANGERL, A. R.; ENGESETH, N. J. Honeys from Different Floral Sources as Inhibitors of Enzymatic Browning in Fruit and Vegetable Homogenates. **J. Agric. Food Chem.** 48, 4997-5000, 2000.

CHICHESTER, C. O. e SCHWEIGERT, B. S. **Chemistry of Maillard Reactions**. Academic Press, California, 32, 1-275, **1988**.

CODEX STANDARD. **Codex Standard for Honey** (CODEX STAN. 12-1981), 1981. Disponível em: <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/programa_calidadmarco_regulatorio/normativa/codex/stan/CODEX_STAN_12.htm> Acesso em 07/06/2010.

COUTO, R. O.; VALGAS, A. B.; BARA, M. T. F.; de PAULA, J. R. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (*Myrtaceae*). **Revista Eletrônica de Farmácia**, 6(3), 59-69, 2009.

CRANE, E. The World History of Beekeeping and Honey Hunting. **Taylor & Francis**, New York, **1999**, pág. 8.

CRANE, E. **O livro do mel**. 2ª edição. São Paulo: Nobel, 1985. pág. 226.

CRESPAM, C. C., SCHERER, F. L. **Nem tudo são flores na produção e na exportação de mel: barreiras técnicas em foco**. 5º Congresso IFBAE, Genebra, 2009. Disponível em: <http://www.ifbae.com.br/congresso5/pdf/B0063.pdf>. Acesso em 01/01/2010.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, 5 (1), 33-40, 2004

DELGADO-ANDRADE, C. RUFIAN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J., Hydroxymethylfurfural in commercial biscuits marketed in Spain. **Journal of Food and Nutrition Research**, 48(1), 14-19, 2009.

DIAS, L. F. T.; MELO, E. S.; HERNANDES, L. S.; BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 19(1B), 309-314, 2009.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH'. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(2), 446-452, 2006.

DUBEY, L.; MASKEY, A.; REGMI, S. Bradycardia and Severe Hypotension Caused by Wild Honey Poisoning. **Hellenic Journal of Cardiology**, 50, 426-428, 2009.

EIRIN, S. M. *Tese de doutorado*. Contribuição al estabelecimiento de las bases científicas para el uso de fracciones polifenólicas y fibra dietética antioxidante em la prevención del cáncer. Universidade de Barcelona, **2009**.

EL-ETRE, A. Y.; ABDALLAH, M. Natural honey as corrosion inhibitor for metals and alloys. II. C-steel in high saline water. **Corrosion Science**, 42, 731-738, 2000.

EL-SABBAHY, S. A Study Of The Antibacterial Effects Of Honey, **2008**.

ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. **Analytica Chimica Acta**, 427, 119-127, 2001.

FENNEMA, O. R.; PARKIN, K.L. ; DAMODARAN, S. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª Ed.; Artmed. Porto Alegre. 85-87; **2010**

FERREIRA, M., ANDRADE, P., OLIVEIRA, M., FERREIRA, I., LEITÃO, R., SEABRA, R., Os compostos fenólicos como possíveis marcadores da autenticidade dos produtos de origem vegetal, **Ciência y Tecnologia Alimentaria**, 1, 4, 56-63, 1997.

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.

FESSENDEN, R. **Honey - More than Just a Sweetener, Naturally**. AAS Journal, 2007. Disponível em: <<http://www.apitherapy.org/pdfs/Website.Article.Fessenden.HoneyFood2.pdf>>. Acesso em 07/06/2010.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Biochemical Laboratory of Harvard Medical School**, Boston, **1927**.

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**, XII(2), 239-243, 1912.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C. Kinetic and thermodynamic parameters for the equilibrium reactions of phenols with the DPPH radical. The Royal Society of Chemistry. **Chem. Commun.**, 3252–3254, 2006.

FRANKEL, S.; ROBINSON, G. E.; BERENBAUM, M. R. Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. **Journal of Apicultural Research**, 37(1), 27-31, 1998.

GALVÃO, E. L.; da SILVA, D. C. F.; da SILVA, J. O.; MOREIRA, A. V. B.; SOUSA, E. M. B. D. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 28(3), 551-557, 2008

GARAMBONE, E.; ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. **Alim. Nutr.**, 18(2), 229-235, 2007.

GATES, M. A., TWOROGGER, S. S.; HECHT, J. L.; VIVO, I. D.; ROSNER, B.; HANKINSON, S. E. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. **Int. J. Cancer**: 121, 2225–2232, 2007.

GELLER, M. J. Akkadian Healing Therapies in the Babylonian Talmud. **Max Planck Institute for the History of Science**, 2004, pág. 14 e 28.

GHELDOLF, N.; WANG, X. H.; ENGESETH, N. J. Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. **J. Agric. Food Chem.**, 50, 5870-5877, 2002.

GONÇALVES, L. S. Principais Impactos Biológicos Causados pela Africanização das Abelhas *Apis mellifera* e Perspectivas da Apicultura Brasileira. In: **Anais Contabilidade Ambiental do Encontro sobre Abelhas**, III, Ribeirão Preto-SP, 31-36, 1998.

GONZALEZ, J. M. e LAIRD, D. A. Smectite-catalyzed dehydration of glucose. **Clays and Clay Minerals**, 54 (1), 38-44, 2006.

GONZÁLEZ-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. **J. Agric. Food Chem.** 53, 2574-2580, 2005.

GUO, M.; PEREZ, C.; WEI, Y.; RAPOZA, E.; SU, G.; BOU-ABDALLAH, F.; CHASTEEN, N. D. Iron-binding properties of plant phenolics and cranberry's bio-effects. **Dalton Trans.**, 4951- 4961, 2007.

HARBORNE, J. B. *et al.* Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants. 2^a ed. London: Taylor & Francis; 1999.

HEIM, K. E. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 13, 572-584, 2002.

HENRIQUES, A. F.; JENKINS, R. E.; BURTON, N. F.; COOPER, R. A. The intracellular effects of manuka honey on *Staphylococcus aureus*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 29, 45–50, 2010.

HOOPER, L. KROON, P. A.; RIMM, E. B.; COHN, J. S.; HARVEY, I; LE CORNU, K. A.; RYDER, J. J.; HALL, W. L.; CASSIDY, A Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Am. J. Clin. Nutr.**, 88, 38-50, 2008.

HOWARD, D. L. **Dry Skin - It's a sure thing, a look at epidermal lipids**. Les Nouvelles Esthétiques, 2005. Disponível em: <http://www.dermalinstitute.com/E_LIBRARY/e_library_images/articlepdfs/May05_DrySkin_Howard.pdf>. Acesso em 07/06/2010.

<http://161.58.48.157/media/imagegallery.asp>. *National Honey Board*. Acesso em: 05/06/2010.

<http://class.fst.ohio-state.edu/fst605/605p/Maillard.pdf>. Acesso em: 04/06/2010.

<http://www.airborne.co.nz/Enzymes.html>, 1999. Acesso em 06/06/2010.

<http://www.baltic-analytics.de/index.php?id=40&L=>. Acesso em 06/06/2010.

<http://www.biology.buffalo.edu/courses/bio401/KiongHo/Lecture31.ppt#301,1,Enzyme> (Basic Principle), 2004.

<http://www.bmglabtech.com/technology/tandem.cfm>. Acesso em 10/06/2010.

<http://www.naturalsolution.co.kr/tech21e.html>. Acesso em 10/06/2010.

<http://www.rain-tree.com/Plant-Images/copaiba-pic.htm>, 2006.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **J. Agric. Food Chem.**, 53, 1841-1856, 2005.

HUANG, Z. **Foraging**. 2002. Disponível em <http://www.cyberbee.net/gallery/view_photo.php?set_albumName=foraging&id=DSCN0724>. Acesso em 01/01/2010.

Informe Técnico da ANVISA n° 37/2008. **Botulismo Intestinal**. In: Alimentos. ANVISA, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/37_280708.htm>. Acesso em 05/06/2010.

IURLINA, M. O.; SAIZ, A. I.; 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, 2009, pág. 1141-1149

JAGANATHAN, S. K.; MANDAL, M. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Article ID 830616, 1-13, 2009.

JALALI, F. S. S.; TAJIK, H.; SAIFZADEH, S.; FARTASH, B. Topical Application of Natural Urmia Honey on Experimental Burn Wounds in the Dog: Clinical and Microbiological Studies. **Iranian Journal of Veterinary Surgery (IJVS)**, 2 (2), 13-20, 2007.

JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 43(1), 136-147, 2007.

JEREZ, M.; TOURINO, S.; SINEIRO, J.; TORRES, J. L.; NUNEZ, M. J. Procyanidins from pine bark: Relationships between structure, composition and antiradical activity. **Food Chemistry**, 104, 518–527, 2007.

JONGBERG, S.; ORLIEN, V.; SKIBSTED, L. H. Elimination of matrix interferences in biosensor analysis of streptomycin in honey. **Eur Food Res Technol**, 228:659–664, 2009.

KASKONIENE, V. MARUSKA, A.; KORNYSOVA, O. Quantitative and qualitative determination of phenolic compounds in honey, **Cheminé Technologija**, 52 (3), 54-80, 2009.

KATO, Y.; WATANABE, K.; SATO, Y. Effect of Some Metals on the Maillard Reaction of Ovalbumin. **J. Agric. Food Chem.**, 29, 540-543, 1981.

KEUSCH, P. Anthocyanins as pH-Indicators and Complexing Agents. 2003. Disponível em: <www.chemie.uni-regensburg.de/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/p26_anthe.htm> Acesso em 10/06/2010.

KHOKHAR; S; APENTEN, R. K. O. Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure-activity relations. **Food Chemistry**, 81, 133-140, 2003.

KISS, J. **Mel Viajante**. Revista Globo Rural, 2008. Disponível em: http://globorural.globo.com/edic/278/mel_11.jpg. Acesso em 06/06/2010.

KLEMPERER, W. G. **Keggin structure**, 2007. Disponível em: <<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Kegginstructure.jpg>>. Acesso em 10/06/2010.

KNOX, A. Harnessing honey's healing power. *BBC News*, 2004. Disponível em: Disponível em: <http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/3787867.stm>. Acesso em 08/02/10.

KOHLMANN, L. **Campanha vai estimular o consumo do mel**. Canal Rural, 2009. <http://www.clicrbs.com.br/canalrural/jsp/default.jsp?uf=1&local=1&id=2758866&action=noticias>. Acesso em 31/12/2009

KOSHIO, S.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Aplicação da CLAE para determinação do ácido 10-hidroxi-2-decenóico (10-HDA) em geléia real pura e adicionada a mel brasileiro. **Química Nova**, 26(5), 670-673, 2003.

KOSTYUK, V. A. POTAPOVICH, A. I.; KOSTYUK, T. V.; CHERIAN, M. G. Metal complexes of dietary flavonoids: evaluation of radical scavenger properties and protective activity against oxidative stress in vivo. **Cellular and Molecular Biology**, 53(1), 61-68, 2007.

KWAKMAN, P. H. S. *et al.* **How honey kills bacteria**. The FASEB Journal article, v. 24, mar, 2010. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/cgi/rapidpdf/fj.09-150789v1.pdf>>. Acesso em 08/06/2010.

LEWKOWSKI, J. **Synthesis, chemistry and applications of 5-hydroxymethylfurfural and its derivatives**. ARKIVOC, 17-54, 2001 (i).

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**, p.142.

LIANDA, R. L. P. *Tese de doutorado*. Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência. UFRRJ, Seropédica, **2009**, p. 156.

LIANDA, R. L. P.; CASTRO, R. N. Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellifera*. **Química Nova**, 31(6), 1472-1475, 2008.

LIANG, X. L. Selective oxidation of glucose to gluconic acid over argon plasma reduced Pd/Al₂O₃. **Green Chem.**, 10, 1318–1322, 2008.

LLOYD, J. U. *Copaifera officinalis*. The Western Druggist, Chicago, 1-13, **1898**.

LOTHROP, R. E. The potential alkalinity of honey: its acid-base value as a food. **The Journal of Nutrition**, 11(6), 511-514, 1936.

LOTHROP, R. E.; PAINE, H. S. Diastatic Activity of Some American Honeys. **Industrial and Engineering Chemistry**, 23(1), 71-74, 1931.

LOUVEAUX, J., A. MAURIZIO & G. VORWOHL. Methodik der Melissopalynologie. *Apidologie*, 1: 193-209, 1970.

LUCAS, D. S. OphthaCare Eye Drops in Acute and Chronic Conjunctivitis. **IJCP's Medinews**, 16, 2000.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Química Nova**, 32(4), 946-949, 2009.

MAGALHÃES, E. O.; MAGALHÃES, D. V.; BORGES, I. D'ALENCAR, S. A. **Perfil do consumidor de mel de abelhas no município de Itabuna, Bahia**, Brasil, 2007. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/92/artigo4.htm>>. Acesso em 31/12/2009.

MAILLARD, M. N.; BILLAUD, C.; CHOW, Y. N.; ORDONAUD, C.; NICOLAS, J. Free radical scavenging, inhibition of polyphenoloxidase activity and copper chelating properties of model Maillard systems. **LWT**, 40, 1434–1444, 2007.

MAKAWI, S. Z. A. Identification and Quantification of 5-Hydroxymethyl Furfural HMF in Some Sugar-Containing Food Products by HPLC. **Pakistan Journal of Nutrition**, 8(9), 1391-1396, 2009.

- MANDEL, S. A.; AMIT, T.; KALFON, L.; REZNICHENKO, L.; YODIM, M. B. H. Targeting Multiple Neurodegenerative Diseases Etiologies with Multimodal-Acting Green Tea Catechins. **The Journal of Nutrition**, 1578S-1583S, 2008.
- MARCHINI, L. C.; REIS, V. D. A.; MORETI, A. C. C. C. M. Composição físico-química de amostras de pólen coletado por abelhas Africanizadas *Apis mellifera* (*Hymenoptera:Apidae*) em Piracicaba, Estado de São Paulo. **Ciência Rural**, 36(3), 949-953, 2006.
- MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. L. Inhibited Oxidation of Lipids II: Comparison of the Antioxidative Properties of Some Hydroxy Derivatives of Benzoic and Cinnamic Acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**. 94(11), 428 - 432, 2006.
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Braz. J. Food Technol.**, 10(2), 96-103, 2007.
- MARTOS, I.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Identification of Flavonoid Markers for the Botanical Origin of Eucalyptus Honey. **J. Agric. Food Chem.**, 48, 1498-1502, 2008.
- MASELEV, D.; KUNTIC, V. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonóides *via* metal-flavonoid complexing reactions. **J. Serb. Chem. Soc.** 72 (10), 921-939, 2007.
- MASSON, B. **O Mel**. Coleção Saúde e Curas Naturais. Ediouro, 1986.
- MASTROCOLA, D. e MUNARI, M. Progress of the Maillard Reaction and Antioxidant Action of Maillard Reaction Products in Preheated Model Systems during Storage. **J. Agric. Food Chem.** 2000, 48, 3555-3559.
- MCPHAIL, D. B.; HARTLEY, R. C.; GARDNER, P. T.; DUTHIE, G. G. Kinetic and Stoichiometric Assessment of the Antioxidant Activity of Flavonoids by Electron Spin Resonance Spectroscopy. **J. Agric. Food Chem.** 51, 1684-1690, 2003.
- MEC. *Anadenanthera colubrina*. Webbee, UNESP, Presidente Prudente, 2008. Disponível em: <http://objetoseducacionais2.mec.gov.br/handle/mec/9546>. Acesso em 06/06/2010.
- MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chem**, 91, 571-577, 2005.
- MENDES, C. G. As análises de mel: revisão. Revista Caatinga, Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA). **Caatinga**, 22(2), 07-14, 2009.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant acitivity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, 15(2), 127-130, 2001.
- MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Plantas medicinais: a coerência e a confiabilidade das indicações terapêuticas. **Caderno de Farmácia**, 5(1/2), 93-119, 1989.

MERMELSTEIN, N. H. Determining Antioxidant Activity. **Food Technology**, 66, 2008.

MODESTA, R. C. D. A cor do mel. *Embrapa Agroindústria de Alimentos*, 2007. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=23565>. Acesso em 06/06/2010.

MOLAN, P. C. Honey as a topical antibacterial agent for treatment of infected wounds. **World Wide Wounds**, Nova Zelândia, 2001. Disponível em: <http://www.worldwidewounds.com/2001/november/Molan/honey-as-topical-agent.html>. Acesso em: 21/5/2010

MOLAN, P. C. Using honey in wound care. **International Journal of Clinical Aromatherapy**, 2006, v. 3, i. 2.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín J. Sci. Technol.**, 26(2), 211-219, 2004.

MOYNA, G. **Carbohydrates**. In: Lesson 33, 1999. Disponível em: <http://tonga.usip.edu/gmoyna/biochem341/lecture33.html>. Acesso em: 03/6/2010

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, 1054, 95-111, 2004.

NAKAJIMA, A.; YAMAKUNI, T.; HARAGUCHI, M.; OMAE, N.; SONG, S.; KATO, C.; NAKAGAWASAI, O.; TADANO, T.; YOKOSUKA, A.; MIMAKI, Y.; SASHIDA, Y.; OHIZUMI, Y. Nobiletin, a Citrus Flavonoid That Improves Memory Impairment, Rescues Bulbectomy-Induced Cholinergic Neurodegeneration in Mice. **J. Pharmacol. Sci.**, 105, 122-126, 2007.

NAMIAS, N. Honey in the Management of Infections. University of Miami School of Medicine, Miami, Florida, **Surgical Infections**, 4(2), 219-226, 2003.

NATELLA, F.; NARDINI, M.; DI FELICE, M.; SCACCINI, C. Benzoic and Cinnamic Acid Derivatives as Antioxidants: Structure-Activity Relation. **J. Agric. Food Chem.** 47, 1453-1459, 1999.

NATIONAL HONEY BOARD. **Honey: A Reference Guide to Nature's Sweetener**. National Honey Board Food Technology, Longmont, 2005. Disponível em: [<Honey: A Reference Guide to Nature's Sweetener>](#). Acesso em 08/06/2010.

NATIONAL HONEY BOARD. **Honey-Health and Therapeutic Qualities**. National Honey Board Food Technology, 2003. Disponível em: <http://www.honeystix.com/HoneyStix/compendium.pdf>. Acesso em 07/06/2010.

NATIONAL HONEY BOARD. **pH and Acids in Honey**. National Honey Board Food Technology, 2006. Disponível em: <http://www.honey.com/images/downloads/ph-acidsinhoney.pdf>. Acesso em 07/06/2010.

NATIONAL HONEY BOARD. **The Honey Files: A Bee's Life**. National Honey Board Food Technology, Firestone, 2001, pág. 45. Disponível em: http://extension.usu.edu/aic/teachers/pdf/honey_files.pdf. Acesso em 07/06/2010.

NUNES, F. M.; COIMBRA, M. A. Role of hydroxycinnamates in coffee melanoidin formation. **Phytochem. Rev.**, 9, 171-185, 2010.

NUNES, T. B. A. **Adulteração e influência do manejo na qualidade do mel**, UEG, Enciclopédia Biosfera, n. 01, 2005. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2005/20057a.pdf>>. Acesso em 08/06/2010.

ODDO, L. P.; PIRO, R. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. **Apidologie**, 35, S38-S81, 2004.

ODDO, L. P.; HEARD, T. A.; RODRIGUEZ-MALAVAR, A.; PEREZ, R. A.; FERNANDEZ-MUINO, M.; SANCHO, M. T.; SESTA, G.; LUSCO, L.; VIT, P. Composition and Antioxidant Activity of *Trigona carbonaria* Honey from Australia. **Med Food**, 11 (4), 789-794, 2008.

OETTER, M. **Química de alimentos. Aula: escurecimento não enzimático**. USP, 2009. Disponível em: <www.esalq.usp.br/departamentos/lan/pdf/Quimica%20de%20Alimentos%20-%20Escurecimento%20nao%20enzimatico.pdf>. Acesso em 23/06/2010.

OFFICE OF COMPLEMENTARY MEDICINES. **Honey**, Scientific Report. 1998, pág. 3 e 11. Disponível em: <<http://www.tga.gov.au/docs/pdf/cmec/honeysr.pdf>>. Acesso em 07/06/2010.

OLAITAN, B. B.; ADELEKE, O. E. e OLA. I. O. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **African Health Sciences**, 7(3), 159-165, 2007.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, 32(3), 689-702, 2009.

OLIVEIRA, F.; COSTA, S. M. A. L.; TARSITANO, M. A. A.; SANT'ANA, A. L. Produção de mel na região noroeste do estado de São Paulo: um estudo de caso de produtor familiar. **Informações Econômicas**, SP, 34(2), fev. 2004.

OSACHLO, L. *Monografia*. Aplicação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle no Processamento Industrial de Mel de Abelhas *Apis mellifera*. UnB, Brasília, 2004, pág. 13.

OSMAN, O. F. *et al.* Honey Compound for Wound Care: a Preliminary Report. **Annals of Burns and Fire Disasters**, XVI(3), 1-7, 2003.

OTILIA, B.; MARGHITAS, L.; KRISZTINA, R. I.; MIHAELA, N.; DEZMIREAN, D. Honeydew honey: correlations between chemical composition, antioxidant capacity and antibacterial effect. **Lucrări științifice Zootehnie și Biotehologii**, 41(2), 271-277, 2008.

OUCHEMOUKH, S.; LOUAILECHE, H.; SCHWEITZER, P. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. **Food Control**, 18, 2007, pág. 52-58.

OVERTON, S. V.; MANURA, J. J. **Flavor and Aroma in Natural Bee Honey**. Scientific Instrument Services, 1999. Disponível em: <http://www.sisweb.com/referenc/applnote/app-25-a.htm>. Acesso em 06/06/2010.

PAULINO, N. *Tese de doutorado*. Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato padronizado de própolis P1 e de seu principal constituinte ativo, artepillin C. UFSC, Florianópolis, **2005**, pág. 19.

PEREIRA, A. C. Identification of the antimicrobial substances produced by *Solanum palinacanthum* (Solanaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 80(3), 427-432, 2008.

PEREIRA, D. M.; OLIVEIRA, D. F.; SILVA, G. H.; FIGUEIREDO, H, C. P.; CAVALHEIRO, A. J.; CARVALHO, D. A.; SOUZA, L. P.; CHALFOUN, S. M. Phenolics: From Chemistry to Biology. **Molecules**, 14, 2202-2211, 2009.

PÉREZ, R. A. Amino Acid Composition and Antioxidant Capacity of Spanish Honeys. **J. Agric. Food Chem.** 55, 360-365, 2007.

PÉREZ, R. A.; IGLESIAS, M. T.; PUEYO, E.; GONZÁLEZ, M.; LORENZO, C. Amino Acid Composition and Antioxidant Capacity of Spanish Honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55, 360-365, 2007.

PERRON, N. R.; BRUMAGHIM, J. L. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. **Cell Biochem. Biophys.**, 53, 75–100, 2009.

PHILIP, D. Honey mediated green synthesis of gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A**, 73, 650–653, 2009.

PHILIP, D. Honey mediated green synthesis of silver nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A**, 75, 1078–1081, 2010.

PHILLIPS, K. M.; CARLSEN, M. H.; BLOMHOFF, R. Total Antioxidant Content of Alternatives to Refined Sugar. **Journal of the American Dietetic Association**, 109, 64-71, 2009.

PICHICHERO, E.; CANUTI, L.; CANINI, A. Characterization of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 89, 609-616(8), 2009.

PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, 63(7), 63, 1035-1042, 2000.

PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, 25(2), 273-286, 2002.

PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. **Trends in Analytical Chemistry**, 28(7), 893-902, 2009.

RADOJCIC, I.; BERKOVIC, K.; VORKAPIC-FURAC, J. Natural honey and black radish juice as tin corrosion inhibitors. **Corrosion Science**, 50, 1498–1504, 2008.

RAGAZANI, A. V. F., ITURRINO, R. P. S.; GARCIA, G. R.; DELFINO, T. P. C.; POIATTI, M. L.; BERCHIELLI, S. P. Esporos de *Clostridium botulinum* em mel

comercializado no estado de São Paulo e em outros estados brasileiros. **Ciência Rural**, 38(2), 396-399, 2008.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, 29(4), 755-760, 2006.

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, pág. 23.

REIS, M. C. P.; PEREIRA, M. T. C. L.; HAEFELI, A. M. P.; LEDA, P. H. O.; AMORIM, H. F.; BOORHEM, R. L. Momento Terapêutico, Programa de Fitoterapia. SMS, **Prefeitura da Cidade do Rio de Janeiro**, 2002, pág. 32

ROSENBLAFF, M.; PELUSO, J. V. Determination of tannins in ripening fruits. Phytochemistry of tannins by photolorimerfer. **J. Assoc. Chemists** 2(4), 371-83, 1963. *Offic. Agr. Chemists* 24:170-81 (1941).

ROSLIZA R.; NIK, W. B. W.; IZMAN, S.; PRAWOTO, Y. Anti-corrosive properties of natural honey on Al–Mg–Si alloy in seawater. **Current Applied Physics**, 10, 923–929, 2010.

RUFÍAN-HENARES, J. A.; MORALES, F. J. Functional properties of melanoidins: In vitro antioxidant, antimicrobial and antihypertensive activities, **Food Research International**, 40, 995–1002, 2007.

SAJJAANANTAKUL, T.; RUANGCHAKPET, A. Effect of Browning on Total Phenolic, Flavonoid Content and Antioxidant Activity in Indian Gooseberry (*Phyllanthus emblica* Linn.). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**, 41, 331–337, 2007.

SANDE, S. O.; CREWE, R. M.; RAINA, S. K.; NICOLSON, S. W.; GORDON, I. Proximity to a forest leads to higher honey yield: Another reason to conserve. **Biological Conservation**, 142, 2703-2709, 2009.

SAXENA, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. **Food Chemistry**, 118, 391-397, 2010.

SCHMID, D.; BELSER, E.; MEISTER, S. Use of Soy Isoflavones for Stimulation of Skin Collagen Synthesis. Mibelle Biochemistry, Switzerland, 2008. Disponível em: <<http://www.mibellebiochemistry.com/publications/isoflavones.php>>. Acesso em 08/06/2010.

SCHRAMM, D. D.; KARIM, M.; SCHRADER, H. R.; HOLT, R.R.; CARDETTI, M. e KEEN, C. L. Honey with High Levels of Antioxidants Can Provide Protection to Healthy Human Subjects. **J. Agric. Food Chem.** 51, 1732-1735, 2003.

SEIJAS, J. A.; VÁZQUEZ-TATO, M. P.; CARVALLIDO-REBOREDO, M. R. **Prediction of Flavone UV-Vis spectrum: semiempirical versus ab-initio methods**. Universidad de Santiago de Compostela, 2008. Disponível em: <<http://www.usc.es/congresos/ecsoc/10/CC/g012/index.htm>>. Acesso em 10/06/2010.

SERAVALLI, E. A. G. e RIBEIRO, E. P. **Química de Alimentos**. 2ª Ed. Edidota Blucher, São Paulo. 50-57; **2007**.

SESTA, G.; PIANA, M. L.; ODDO, L. P.; LUSCO, L.; BELLIGOLI, P. Methyl anthranilate in Citrus honey. Analytical method and suitability as a chemical marker. **Apidologie**, 39, 334-342, 2008.

SHIPAR, A. H. Formation of the Heyns rearrangement products in dihydroxyacetone and glycine Maillard reaction: A computational study. **Food Chemistry**, 2006, 97, 231-243

SHTILMAN, A. **Citrus Flowers and Bee 1**. Flickr, 2009. Disponível em: <http://www.flickr.com/photos/assafs/3387103904>. Acesso em 01/01/2010.

SIESS, M. H.; LE BON, A.; CANIVENC-LAVIER, M.; AMIOT, M.; SABATIER, S. S.; AUBERT, S. Y.; SUSSCHETET, M. Flavonoids of Honey and Propolis: Characterization and Effects on Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes and Benzo[a]pyrene-DNA Binding in Rats. **J. Agric. Food Chem.**, 44, 2297-2301, 1996.

SILVA, R. A. da; MAIA, G. A.; DE SOUSA, P. H. M. e DA COSTA, J. M. C. Composição e Propriedades Terapêuticas do Mel de Abelha. **Alim. Nutr**, 17(1), 113-120, 2006.

SILVA, S.; GOMES, L.; LEITÃO, F.; COELHO, A. V.; BOAS, L. V. Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of *Olea europaea* L. Fruits and Leaves. **Food Science and Technology International**, 12, 385- 395, 2006

SIMÕES, M. T., TEIXEIRA, P. **PAA gera renda e incentiva preservação do meio ambiente**. CONAB, 2009. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=73&NSN=1050>>. Acesso em 01/01/2010.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JUNIOR, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Phenolics Determination**, 144-158, 1965.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**; 15(1), 71-81, 2002.

SOCHA, R.; JUSZCZAK, L.; PIETRZYK, S.; FORTUNA, T. Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys. **Food Chemistry**, 113, 568–574, 2009.

SROKA, Z.; CISOWSKI, W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. **Food and Chemical Toxicology**, 41, 753-758, 2003.

TALHOUT, R. OPPERHUIZEN, A.; van AMSTERDAM, J. G. C. Sugars as tobacco ingredient: Effects on mainstream smoke composition. **Food and Chemical Toxicology**, 44, 1789–1798, 2006.

TIWARI, A. K. Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. **Current Science**, 81(9), 1179-1187, 2001.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A. FERRERES, F.; GARCIA-VIGUEIRA, C.; TOMÁS-LORENTE, F.; Hesperetin: A marker of the floral origin of citrus honey. **J. Sci. Food Agric**. 61, 121–123, 2006.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A. *et al.* 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.

UNIV. PORTO, 2004. Disponível em: <<http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0304/Acrilamida/questao5.htm>> Acesso em 10/06/2010.

VANKAR, P. S. **Dyeing of cotton, wool and silk with extract of *Allium cepa***. Disponível em: <http://sight.cjb.net/Insight/ViewContentServlet?contentType=Art>. Acesso em 04/06/2010.

VARGAS, T. *Dissertação de Mestrado*. Avaliação da Qualidade do Mel Produzido na Região dos Campos Gerais do Paraná. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, **2006**, pág. 8, 9 e 13.

VIANNA, C. A. F. J. *Dissertação de Mestrado*. Substâncias Fenólicas e Avaliação da Atividade Antioxidante em méis de *Apis mellifera*. PPGQO-UFRRJ. **2010**, p.120.

VIT, P.; RODRÍGUES-MALAVAR, A.; ROUBIK, D. W.; MORENO, E.; SOUZA, B. A.; SANCHOS, M. T.; FERNÁNDEZ-MUIÑOS, M.; ALMEIDA-ANACLETO, D.; MARCHINI, L. C.; GIL, F.; GONZÁLEZ, C.; AGUILERA, G.; NIEVES, B. Expanded parameters to assess the quality of honey from Venezuelan bees (*Apis mellifera*), **Journal of ApiProduct and ApiMedical**, Science; 1 (3), 72-81, 2009.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LOPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly. **Journal of Food Science**, 73(9), 117-124, 2008.

VOLP, A. C. P. Flavonóides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde. **Rev Bras Nutr Clin**, 23(2), 141-9, 2008.

VOLPICELLO, M. **Bee in flower of eucalyptus**. Trekearth. Disponível em: www.trekearth.com/gallery/photo467815.htm, 2006. Acesso em 06/06/2010.

WIESE, H. Novo Manual de Apicultura. Guaíba-RS: Editora Agropecuária LTDA. pág. 292. 1995.

WHITE J.W. **Composition of honey**. En: Crane E., ed. Honey, a comprehensive survey. London: Bee research Association and Chalfont St Peter, 157-206, **1975**.

WHITE, J. W.; BRYANT, V. M. Assessing Citrus Honey Quality: Pollen and Methyl Anthranilate Content. **J. Agric. Food Chem.** 44, 3423-3425, 1996.

WIECHOCZEK, 2000 - **Spaltung von Saccharose - ohne Enzyme und trotzdem schonend**. Disponível em: <http://www.chemieunterricht.de/dc2/iat/dc2it_26.htm>. Acesso em 08/06/2010.

WINSTON, M. L. **The Biology of the Honey Bee**. Harvard University Press, Massachusetts, 1987, pág. 4, 5, 57 e 120.

WOLSKI, T.; TAMBOR, K.; RYBAK-CHMIELEWSKA; KEDZIA, B.; Identification of honey volatile components by Solid Phase Microextraction (SPME) and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (CG/MS). **Journal of Apicultural Science**, 50 (2), 115-125, 2006.

WOUND CENTRAL, **Resources for the Wound Care Clinician**. *Wound Central Store*, 2007. Disponível em: <http://woundcentral.com/Medihoney.html>. Acesso em 06/06/2010.

WU, H. Contribution to the chemistry of phosphomolybdic acids, phosphotungstic acids, and allied substances. **Biochemical Laboratory of Harvard Medical School**, Boston, 1920.

XEYLA, R. **Exportação de mel brasileiro bate recorde**. ASN - Agência Sebrae de Notícias, Distrito Federal, 2009. Disponível em: <www.agenciasebrae.com.br/noticia_pdf.kmf?noticia=9026648>. Acesso em 01/01/2010.

YONG, J. *Monografia*. Solubility of Glucose Monohydrate in Honey. Universidade de Queensland, **2003**.

ZALIBERA, M. *et al.* Antioxidant and radical-scavenging activities of Slovak honeys - An electron paramagnetic resonance study. **Food Chemistry**, 110, 512-521, 2008.

7. ANEXO: ANÁLISE DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS, COR E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Amostra	Fenólicos mgE _{AG} /100g	Flavonóides mgE _{QC} /100g	Atividade Antioxidante			Cor	Mesorregião
			CE ₅₀	(AA)mgE _{QC} /500g	%AA		
1	88,80 ± 0,21	7,63 ± 0,01	42,15 ± 1,83	23,13 ± 0,92	69,24 ± 0,27	Média	Sul Fluminense
2	92,71 ± 0,37	4,98 ± 0,02	27,55 ± 2,18	35,39 ± 2,95	79,24 ± 1,05	Média	Sul Fluminense
3	106,61 ± 0,72	7,18 ± 0,02	18,21 ± 1,26	53,54 ± 3,49	80,80 ± 1,18	Média	Centro Fluminense
4	58,26 ± 0,07	11,01 ± 0,00	53,13 ± 1,00	18,35 ± 0,39	55,86 ± 2,28	Clara	-
5	132,05 ± 0,35	10,07 ± 0,01	21,09 ± 0,49	46,24 ± 1,02	83,63 ± 0,68	Escura	-
6	109,92 ± 0,07	11,86 ± 0,02	18,03 ± 0,15	54,06 ± 0,45	50,45 ± 0,45	Escura	Centro Fluminense
7	71,51 ± 0,25	10,48 ± 0,06	27,46 ± 0,95	35,51 ± 1,03	46,23 ± 1,86	Média	-
8	87,70 ± 0,24	4,34 ± 0,02	30,28 ± 1,47	32,20 ± 1,60	70,00 ± 1,89	Média	Metropolitana
9	75,87 ± 0,39	2,58 ± 0,00	41,01 ± 2,67	23,78 ± 1,46	52,58 ± 1,46	Clara	-
10	76,12 ± 0,58	2,55 ± 0,02	35,11 ± 3,65	27,77 ± 2,69	59,03 ± 2,41	Clara	Centro Fluminense
11	80,81 ± 0,70	2,45 ± 0,02	40,29 ± 0,91	24,20 ± 0,53	63,71 ± 0,25	Clara	Centro Fluminense
12	81,05 ± 0,46	2,35 ± 0,00	29,67 ± 3,73	32,86 ± 3,82	59,68 ± 1,43	Clara	Centro Fluminense
13	97,11 ± 0,53	5,21 ± 0,02	25,22 ± 0,40	38,66 ± 0,62	80,76 ± 1,50	Média	Centro Fluminense
14	139,15 ± 0,14	10,85 ± 0,09	18,49 ± 1,05	52,72 ± 3,57	86,73 ± 1,90	Média	Centro Fluminense
15	141,06 ± 0,31	10,91 ± 0,06	14,66 ± 0,11	66,50 ± 0,48	86,15 ± 1,13	Média	Metropolitana
16	83,38 ± 0,46	3,30 ± 0,00	29,65 ± 0,78	32,88 ± 0,90	80,57 ± 0,24	Média	Centro Fluminense
17	102,90 ± 0,31	7,06 ± 0,05	27,29 ± 0,73	35,73 ± 0,95	86,10 ± 1,10	Média	Sul Fluminense
18	112,53 ± 1,00	7,52 ± 0,02	23,85 ± 0,91	40,88 ± 1,64	90,26 ± 1,94	Média	Sul Fluminense
19	81,21 ± 0,24	11,59 ± 0,03	47,35 ± 2,65	20,59 ± 1,15	76,03 ± 3,22	Média	-
20	137,03 ± 0,25	9,07 ± 0,06	11,86 ± 1,33	82,21 ± 8,48	84,40 ± 2,12	Escura	Sul Fluminense
21	95,81 ± 0,35	4,30 ± 0,00	29,58 ± 0,28	32,97 ± 0,31	78,01 ± 2,34	Média	Sul Fluminense
22	125,04 ± 0,56	5,98 ± 0,01	11,3 ± 0,91	86,27 ± 3,87	91,21 ± 2,01	Média	Metropolitana
23	125,57 ± 1,35	5,98 ± 0,02	11,89 ± 0,26	82,01 ± 1,63	91,63 ± 0,24	Média	Metropolitana
24	142,33 ± 0,51	7,52 ± 0,05	10,69 ± 0,40	91,18 ± 3,30	89,33 ± 0,61	Escura	Metropolitana
25	110,20 ± 1,27	7,89 ± 0,05	14,38 ± 0,65	67,80 ± 3,00	89,50 ± 1,61	Escura	Sul Fluminense
26	78,93 ± 0,25	2,55 ± 0,02	32,14 ± 0,75	30,34 ± 0,70	82,00 ± 0,40	Clara	Baixada
27	132,63 ± 0,46	9,92 ± 0,02	13,09 ± 0,44	74,47 ± 2,17	79,24 ± 0,43	Escura	Baixada
28	108,45 ± 0,14	6,65 ± 0,03	22,66 ± 0,39	43,04 ± 0,74	90,61 ± 1,41	Média	Noroeste Fluminense
29	121,78 ± 0,93	4,12 ± 0,03	13,57 ± 2,48	71,87 ± 11,94	95,62 ± 0,49	Média	Metropolitana
30	131,65 ± 0,99	8,43 ± 0,03	16,19 ± 0,85	60,20 ± 3,28	93,14 ± 0,48	Média	Metropolitana
31	60,18 ± 0,21	1,99 ± 0,02	38,4 ± 2,90	25,39 ± 2,02	53,55 ± 1,14	Clara	Sul Fluminense
32	119,38 ± 0,56	9,27 ± 0,06	14,47 ± 0,69	67,39 ± 3,36	96,35 ± 3,31	Escura	Sul Fluminense
33	100,78 ± 0,12	5,51 ± 0,04	30,55 ± 1,14	31,91 ± 1,18	79,59 ± 0,88	Média	Sul Fluminense
34	88,10 ± 0,25	5,54 ± 0,03	26,61 ± 0,98	36,64 ± 1,32	75,12 ± 0,84	Média	Sul Fluminense
35	95,52 ± 0,74	6,11 ± 0,00	24,39 ± 2,45	39,98 ± 3,58	77,05 ± 1,28	Média	Sul Fluminense
36	99,32 ± 0,42	6,00 ± 0,07	29,6 ± 0,58	32,94 ± 0,65	90,57 ± 1,23	Média	Metropolitana
37	100,25 ± 0,92	6,11 ± 0,02	24,86 ± 0,45	39,22 ± 0,71	79,23 ± 2,71	Média	Metropolitana
38	94,30 ± 0,44	5,83 ± 0,04	27,63 ± 1,53	35,28 ± 1,82	79,23 ± 0,51	Média	Metropolitana
39	92,59 ± 0,12	5,87 ± 0,03	18,03 ± 0,88	54,08 ± 2,68	76,00 ± 0,53	Média	Metropolitana
40	91,04 ± 0,80	5,14 ± 0,01	18,1 ± 0,67	53,88 ± 1,82	73,11 ± 1,66	Média	Centro Fluminense
41	102,94 ± 0,14	5,23 ± 0,03	18,21 ± 1,48	53,54 ± 4,07	79,54 ± 1,08	Média	Centro Fluminense
42	99,72 ± 0,46	5,29 ± 0,00	19,42 ± 1,02	50,21 ± 2,53	79,17 ± 0,42	Média	Centro Fluminense
43	100,87 ± 0,39	5,50 ± 0,02	17,85 ± 0,26	54,62 ± 0,82	72,78 ± 1,74	Média	Centro Fluminense
44	100,25 ± 0,07	5,38 ± 0,00	18,14 ± 1,20	53,73 ± 3,04	74,86 ± 2,95	Média	Metropolitana
45	101,11 ± 0,07	5,35 ± 0,04	18,23 ± 0,68	53,49 ± 2,15	77,64 ± 1,68	Média	Metropolitana
46	102,09 ± 0,46	5,21 ± 0,00	24,12 ± 1,65	40,43 ± 2,92	78,10 ± 0,41	Média	Metropolitana
47	102,54 ± 0,63	5,32 ± 0,02	23,12 ± 0,60	42,17 ± 1,15	76,86 ± 2,30	Média	Metropolitana
48	112,04 ± 0,74	3,63 ± 0,03	20,64 ± 1,75	47,23 ± 4,36	78,79 ± 1,86	Média	Metropolitana
49	106,53 ± 0,32	3,62 ± 0,03	23,76 ± 0,60	41,03 ± 1,02	75,00 ± 1,52	Média	Noroeste Fluminense
50	111,71 ± 0,74	8,74 ± 0,03	10,33 ± 0,21	94,39 ± 2,06	93,34 ± 1,31	Escura	Metropolitana
51	75,34 ± 0,92	3,26 ± 0,01	29,33 ± 2,30	33,24 ± 2,87	63,67 ± 1,13	Média	Centro Fluminense
52	98,30 ± 1,03	5,50 ± 0,05	17,01 ± 1,24	57,32 ± 4,43	85,74 ± 0,63	Escura	Centro Fluminense
53	71,23 ± 0,95	2,16 ± 0,01	41,4 ± 1,50	23,55 ± 0,93	53,67 ± 2,00	Clara	-
54	70,29 ± 0,70	2,85 ± 0,02	34,99 ± 1,42	27,87 ± 1,04	53,56 ± 2,11	Média	-
55	103,43 ± 0,28	7,05 ± 0,04	14,2 ± 0,47	68,65 ± 2,41	84,63 ± 1,65	Escura	Sul Fluminense
56	131,97 ± 0,24	5,21 ± 0,02	7,35 ± 0,28	132,70 ± 4,77	97,46 ± 1,12	Escura	Metropolitana
57	144,12 ± 0,98	5,15 ± 0,04	7,61 ± 0,19	128,15 ± 3,06	96,01 ± 0,89	Escura	Metropolitana
58	152,52 ± 0,96	8,82 ± 0,04	7,05 ± 0,67	138,31 ± 12,61	93,79 ± 0,88	Escura	Metropolitana
59	84,52 ± 0,32	4,09 ± 0,01	17,94 ± 1,12	54,34 ± 2,81	83,26 ± 2,09	Média	Metropolitana
60	128,67 ± 0,53	5,70 ± 0,03	9,56 ± 0,47	101,99 ± 5,48	91,43 ± 0,41	Escura	Metropolitana