

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

DISSERTAÇÃO

**Perfil Físico-químico, Composição Química e Capacidade
Antioxidante de méis produzidos por Abelhas Sem Ferrão**

JULIANA PAES LEME DE MELLO SOUSA

Seropédica, Rio de Janeiro

Junho de 2014



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

JULIANA PAES LEME DE MELLO SOUSA

Sob a Orientação da Professora

Dra. Rosane Nora Castro

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

Seropédica, Rio de Janeiro
Junho de 2014

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

JULIANA PAES LEME DE MELLO SOUSA

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 30/06/2014

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

Prof. Dr. Luciano Ramos Suzart (DEQUIM-UFRRJ)
Membro Titular

Prof. Dr. Ricardo Moreira Borges (IPPN-UFRRJ)
Membro Titular

Prof^ª.Dra.Maria Cristina Affonso Lorenzon (IZ-UFRRJ)
Membro Suplente

“Olha para este livro do qual não entendes nada:
Para muitos outros, com exceção de tu mesmo,
Ele continuará sendo para sempre inteligível,
Mas um dia discernirá em suas páginas
O que ninguém além de ti verá”

Nicholas Flamel

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ivaldo e Nilcéa, que sempre me apoiaram e incentivaram em todos os momentos da minha vida e me deram a base para esta finalizando esta etapa tão importante.

Ao meu marido Leandro, pelo companherismo, incentivo e paciência ao longo de toda essa trajetória.

A toda minha família que sempre me apoiaram e incentivaram na conquista deste título.

À Profª Rosane Nora Castro, pela orientação, dedicação, carinho e paciência.

Aos professores Mário Geraldo, Victor M. Rumjanek, Carlos Maurício, Aurélio Baird, João Batista, Arthur e Douglas pelas aulas que contribuíram para minha formação profissional.

À amiga Luiza Sant'Ana pela amizade, companheirismo e por todo incentivo e ajuda desde do processo seletivo até na parte das análises, apresentações e desenvolvimento desta dissertação.

À amiga Fernanda Salgueiro pela amizade e pelas inúmeras ajudas nas análises de CLAE-DAD e principalmente na parte de quimiometria.

À amiga Aline Lira pela amizade e pela ajuda nas análises quimiométricas.

À Prof. Maria Cristina Affonso Lorenzon pelo fornecimento das amostras de méis *M. fasciculata* e *Tetragonisca angustula*.

Ao colega Carlos Alberto Vianna pelo fornecimento das amostras de méis *Scaptotrigona sp* (abelha canudo).

Aos demais amigos Wellison, Leonardo, Vítor, Nathália, Francis e Tatiany, pelo convívio no Laboratório 48B no DEQUIM-UFRRJ.

Às amigas Paula Nascimento Lopes e Patrícia Dantas que sempre guardarei ótimas lembranças.

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

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

À CNPQ, pelo apoio financeiro.

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

SUMÁRIO

Índice de Tabelas	i
Índice de Figuras	ii
Índice de Esquemas	iv
Índice de Abreviatura e Siglas	v
Resumo	vi
Abstract	vii
1 – INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Breve histórico sobre as abelhas sem ferrão e a meliponicultura	2
2.2. Os Meliponíneos	6
2.2.1. <i>Melipona compressipes fasciculata</i> Smith, 1854	12
2.2.2. <i>Scaptotrigona sp</i> (canudo)	13
2.2.3. <i>Tetragonistica angustula</i> (Latreille 1811)	13
2.3. O mel das abelhas sem ferrão	15
2.4. Caracterização do mel	17
2.4.1 Umidade	19
2.4.2. pH	20
2.4.3. Acidez livre	21
2.4.4. Hidroximetilfurfural	21
2.4.5. Açúcares Redutores	22
2.4.6. Proteína	23
2.4.7. Cor do mel	24
2.5. Propriedades terapêuticas do mel de abelhas sem ferrão	25
2.6. Metabólitos secundários do mel de abelhas sem ferrão	27
2.7 Métodos de caracterização do mel	29
3 - OBJETIVO GERAL	32
3.1 Objetivos Específicos	32
4 - PARTE EXPERIMENTAL	33
4.1. Material e Métodos	33
4.2. Amostras de Méis	34
4.3. Análises Físico-químicas do melde abelhas sem ferrão	35
4.3.1. Determinação da Umidade	35
4.3.2. Determinação espectrofotométrica da cor do mel	36
4.3.3. Determinação do teor de HMF no mel	36
4.3.3.1. Preparo dos Reagentes	36
4.3.3.2 Procedimento experimental	37
4.3.4. Determinação do pH e Acidez Livre	37
4.3.5. Determinação de Açúcares Redutores e Sacarose Aparente	38
4.4. Determinação de fenólicos totais com reagente de Folin-Denis	38
4.4.1. Preparo do reagente de Folin-Denis	38
4.4.2. Procedimento Experimental	39
4.4.3. Construção da curva analítica do ácido gálico	39
4.5. Determinação de flavonoides totais com cloreto de alumínio	40
4.5.1. Construção da curva analítica da quercetina	41
4.6. Determinação do teor de aminoácidos livres	41
4.6.1. Construção da curva analítica de <i>L</i> -leucina	42
4.7. Determinação do conteúdo de proteínas totais	43
4.7.1. Construção da curva analítica de albumina sérica bovina (ASB)	44
4.8. Determinação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH	44
4.8.1. Determinação do CE ₅₀ para amostra de mel e extratos	45
4.9. Avaliação da Capacidade Antioxidante pelo Método de Redução do Ferro	46
4.9.1. Construção da curva analítica com sulfato ferroso	47
4.10. Determinação da Capacidade Antioxidante pelo Radical-Cátion ABTS ^{•+}	48
4.10.1 - Construção da curva analítica com Trolox	48
4.11. Preparo dos Extratos de Mel	49

4.12. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)	50
4.12.1 - Construção das Curvas Analíticas com os padrões	51
4.13. Tratamento Quimiométrico	52
4.14. Tratamento estatístico dos dados	52
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1. Caracterização físico-química do mel de abelha sem ferrão	53
5.1.1. Avaliação do teor de HMF	55
5.1.2. Avaliação de pH	56
5.1.3. Acidez Total	57
5.1.4. Açúcares Totais	58
5.1.5. Umidade	60
5.1.6. Cor	61
5.2. Determinação de aminoácido livre e proteína total no mel de abelha sem ferrão	62
5.3. Teor de substâncias polifenólicas das amostras de mel de abelha sem ferrão	64
5.3.1. Teor em fenóis totais	66
5.3.2. Teor de flavonoides totais	68
5.4. Avaliação da Capacidade Antioxidante das amostras de mel	70
5.5. Preparo dos extratos das amostras de mel de abelha sem ferrão	76
5.6. Determinação do teor de polifenóis totais dos extratos de mel de abelha sem ferrão	78
5.7. Avaliação da Capacidade Antioxidante dos extratos de mel de abelha sem ferrão	80
5.8 Composição química dos extratos de mel por CLAE-DAD	82
5.9 Análise Multivariada dos dados	94
5.9.1 Correlação entre os parâmetros avaliados	95
5.9.2. Análise quimiométrica aplicada aos resultados das análises dos méis de abelhas sem ferrão	97
5.9.3. Análise quimiométrica aplicada aos dados de CLAE-DAD dos extratos de méis abelhas sem ferrão	102
5.9.4. Análise quimiométrica aplicada aos dados de RMN de ¹ H dos extratos de méis abelhas sem ferrão	105
6- CONCLUSÕES	109
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
8- ANEXOS	131

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Principais espécies de abelhas sem ferrão criadas nas diferentes regiões do Brasil (Villas-Bôas & Jerônimo, 2012).	11
Tabela 2. Características físico-químicas utilizadas para controle de qualidade de méis de <i>Apis</i> e meliponíneos (CARVALHO <i>et al.</i> , 2013)	19
Tabela 3. Amostras de méis de abelhas sem ferrão estudadas neste trabalho.	35
Tabela 4. Classificação do mel de acordo com escala de Pfund (Naab <i>et al.</i> , 2008).	36
Tabela 5 - Resultados obtidos a partir da curva analítica preparada com diferentes padrões.	52
Tabela 6. Valores médios e os desvios padrões dos parâmetros físico-químicos e cor para os diferentes méis de meliponíneos.	54
Tabela 7. Valores médios e os desvios padrões dos conteúdos de aminiácidos livres e proteínas totais das vinte amostras de méis estudadas.	63
Tabela 8. Valores médios e os desvios padrões dos teores totais de fenólicos e flavonoides das vinte amostras de méis estudadas.	65
Tabela 9. Capacidade antioxidante das amostras de méis de abelha sem ferrão.	72
Tabela 10– Valores médios e desvios padrão dos rendimentos dos extratos dos méis de <i>Scaptotrigona sp.</i> , <i>Melipona fasciculata</i> e uma amostra de espécie não identificada .	77
Tabela 11– Teor em polifenóis totais dos extratos de mel de abelha sem ferrão.	78
Tabela 12– Capacidade antioxidante dos extratos de mel de abelha sem ferrão.	80
Tabela 13 – Avaliação da atividade antioxidante (CE ₅₀) dos compostos fenólicos utilizados como padrão pelo método DPPH (SALGUEIRO <i>et al.</i> , 2014).	82
Tabela 14– Tempos de retenção e máximos de absorção no UV das substâncias utilizadas como padrão no CLAE-DAD.	84
Tabela 15: Substância identificadas por CLAE-DAD para os três tipos de extratos de méis de abelha sem ferrão estudados nesse trabalho.	85
Tabela 16 – Conteúdo das substâncias identificadas nos extratos de mel de abelhas sem ferrão (mg/100 mg de extrato).	92
Tabela 17 - Matriz de correlação entre as variáveis analisadas para as amostras de méis de abelhas sem ferrão e <i>Apis mellifera</i> .	96
Tabela 18 – Valores médios e os desvios padrões dos parâmetros físico-químicos para os méis estudados e para o mel artificial. (SALGUEIRO, 2012)	136
Tabela 19 – Valores médios e os desvios padrões dos teores de fenólicos e flavonóides totais, das amostras de méis estudadas e para o mel artificial. (SALGUEIRO, 2012).	136
Tabela 20 – Valores médios e os desvios padrões dos conteúdos de aminiácidos livres e proteínas totais, das amostras de méis estudadas e para o mel artificial. (SALGUEIRO, 2012).	136
Tabela 21 - Capacidade antioxidante das onze amostras de mel e do mel artificial. (SALGUEIRO, 2012).	137
Tabela 22 – Teor em polifenólicos total dos extratos de mel. (SALGUEIRO, 2012).	137
Tabela 23 - Capacidade antioxidante dos extratos de mel. (SALGUEIRO, 2012).	138
Tabela 24 - Capacidade antioxidante dos méis, e seus respectivos extratos, com suas médias e desvios padrões. (SALGUEIRO, 2012).	138
Tabela 25 - Substâncias fenólicas identificadas nos méis assa peixe, cambará e morrão de candeia. (SALGUEIRO, 2012).	138

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

Figura 1. Objetivos da meliponicultura (VILAS-BOAS, 2012)	6
Figura 2. Abelha urucu nordestina na região de potes de mel (A). Potes de mel de <i>Tetragonisca angustula</i> L. (B) (Foto de Morgado, L.N).	8
Figura 3. Colônia de jandaíra (<i>M. subnitida</i>) instalada em tronco de árvore (A). Entradas de colônia de canudo (<i>Scaptotrigonasp</i>) (B) (VILAS-BOAS, 2012).	8
Figura 4. Entrada de colônia da abelha cupira (<i>Partamona</i> sp.), construída com barro (A). Geoprópolis avermelhado produzido pela abelha jandaíra (<i>Melipona fulva</i>) no estado do Amazonas (B). (VILAS-BOAS, 2012).	9
Figura 5. A abelha tiúba (<i>Melipona fasciculata</i>), espécie nativa sem ferrão, vem sendo criada na baixada maranhense para a produção de mel (Foto de Giorgio Venturineri).	12
Figura 6. Operária de <i>Scaptotrigona</i> sp ou canudo-amarela (Foto de Giorgio Venturineri).	13
Figura 7. Abelhas <i>T. angustula</i> (jataí) no ninho (http://www.ninha.bio.br/biologia/jatai.html)	14
Figura 8 - Mecanismo de formação do HMF (5-hidroxi metilfurfural). (BOGDANOV, 2009b)	22
Figura 9. Aspecto do mel cristalizado no pote de <i>Melipona mandaçaia</i> .	23
Figura 10. Variação de cor em mel.	24
Figura 11. Ácidos e flavonoides identificados por CLAE-DAD em mel Português (ESTEVINHO <i>et al.</i> , 2008).	28
Figura 12. Ácidos fenólicos encontrados em mel de <i>M. subnitida</i> (SILVA <i>et al.</i> , 2013).	28
Figura 13. Substâncias identificadas em mel de <i>Melipona s. merrillae</i> .	29
Figura 14. Determinação de fenólicos totais com reagente de Folin-Denis.	39
Figura 15. Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico <i>versus</i> as absorbâncias (760 nm) para os ensaios de Folin-Denis.	40
Figura 16. Determinação de flavonoides totais com cloreto de alumínio.	41
Figura 17. 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.	41
Figura 18. Determinação de aminoácidos livres no mel.	42
Figura 19. Curva analítica das médias das concentrações da solução de L-leucina <i>versus</i> as leituras de absorbâncias (507 nm), após o ensaio com solução de cádmio- ninidrina.	43
Figura 20- Determinação do conteúdo de proteínas totais no mel.	43
Figura 21. Curva analítica das médias das concentrações da solução de albumina sérica bovina (ASB) <i>versus</i> as leituras de absorbâncias (595 nm), após o ensaio com reagente de Bradford.	44
Figura 22. Ensaio da atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA.	45
Figura 23. Determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP).	47
Figura 24. Curva analítica das médias das concentrações da solução aquosa de FeSO ₄ .7H ₂ O <i>versus</i> as leituras de absorbâncias (593 nm), após o ensaio com reagente de FRAP.	48
Figura 25. Curva analítica das médias das concentrações da solução etanólica de Trolox <i>versus</i> as leituras de absorbâncias (760 nm), após o ensaio com reagente de ABTS.	49
Figura 26. Reação de ácido gálico com molibdênio, no método de Folin-Ciocalteu (De OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2009)	66
Figura 27. Complexação da quercetina com cloreto de alumínio (MABRY <i>et al.</i> 1970).	69
Figura 28. Redução do radical livre DPPH pelo flavonoide antioxidante quercetina (qnint.sbg.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=UF)	73
Figura 29. Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe ³⁺ (adaptado de RUFINO <i>et al.</i> , 2006).	74
Figura 30. A oxidação de ABTS por persulfato de potássio para gerar catião radical ABTS ^{•+} e a sua reação com um composto anti-radicalar (AOH) (de Oliveira <i>et al.</i> , 2014).	75
Figura 31. Estruturas das substâncias usadas como padrões.	84
Figura 32. Substâncias identificadas nos extratos ESC1, ESC2, ESC3 e ESC4 de <i>Scaptotrigona</i> sp por CLAE_DAD (condições parte experimental pag..x)	87
Figura 33. Substâncias identificadas nos extratos ESC5, ESC6, ESC7 e ESC de <i>Scaptotrigona</i> sp por CLAE_DAD (condições na parte experimental).	88
Figura 34. Substâncias identificadas no extrato EMF1 de <i>M. fasciculata</i> por CLAE-DAD.	90
Figura 35. Substâncias identificadas no extrato ENI1 (espécie não identificada) por CLAE.	90
Figura 36. Gráfico de <i>scores</i> de PC-1 x PC-2 aplicados aos dados de pH, acidez, HMF, Pfund, aminoácidos, proteínas, ácidos fenólicos, flavonoides, FRAP, DPPH, ABTS das amostras de <i>Tetragonisca angustula</i> (TA), <i>Scaptotrigona</i> sp (SC), espécie não identificada (NI1) e <i>M. fasciculata</i> (MF1).	99

- Figura 37.** Gráfico *de loadings* das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de pH, acidez, HMF, Pfund, aminoácidos, proteínas, ácidos fenólicos, flavonoides, FRAP, DPPH, ABTS das amostras de *Tetragonisca angustula* (TA), *Scaptotrigona sp* (SC), espécie não identificada (NI1) e *M. fasciculata* (MF1). 100
- Figura 38.** Gráfico *de scores* de PC-1 x PC-2 dos dados de pH, acidez, HMF, Pfund, Aminoácidos, Proteínas, Ácidos fenólicos, Flavonoides, FRAP, DPPH, ABTS divididos em 4 diferentes espécies de abelhas. 101
- Figura 39.** Gráfico *de loadings* das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de pH, acidez, HMF, Pfund, Aminoácidos, Proteínas, Ácidos fenólicos, Flavonoides, FRAP, DPPH, ABTS. 102
- Figura 40.** Gráfico *de scores* de PC-1 x PC-2 a partir da matriz de dados obtida por CLAE-DAD dos extratos. 103
- Figura 41.** Gráfico *de loadings* das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de CLAE-DAD dos extratos de méis de *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão. 104
- Figura 42.** Sobreposição de todos os espectros: oito de *Scaptotrigona sp* (SC), *Melipona fasciculata* (MF1) e um de espécie de abelha não identificada (NI1). 107
- Figura 43.** Gráfico *de scores* de PC-1 x PC-2 dos dados de RMN ¹H dos dez extratos de méis de abelhas sem ferrão e dos onze extratos de méis de *Apis mellifera*. 108
- Esquema 1 -** Modelo esquemático do preparo dos extratos do mel. 50

ABREVIATURAS E SIGLAS

%AA	percentual de atividade antioxidante
CE ₅₀	concentração efetiva para redução de 50% dos radicais
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
HMF	Hidroximetilfurfural
meq/kg	mili-equivalentes por quilograma
mgEAG	miligramas em equivalente de ácido gálico
mgEQ	miligramas em equivalente de quercetina
nm	nanômetros
PCA	análise de componentes principais
PCs	componentes principais
pág.	página
RMN de ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
t _R	tempo de retenção
UV	ultravioleta
UV-Vis	ultravioleta e visível
μM	micromolar
μm	micrômetros

RESUMO

SOUSA, Juliana Paes Leme de Mello. PERFIL FÍSICO-QUÍMICO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE MÉIS PRODUZIDOS POR ABELHAS SEM FERRÃO. Seropédica, UFRRJ, 2014. 134p. Dissertação de mestrado em Química, Química de Produtos Naturais.

As duas principais linhas de estudo na criação de abelhas, atualmente, são a Apicultura e a Meliponicultura. Apesar da baixa produtividade, a Meliponicultura tem sido muito estudada recentemente devido as características peculiares do mel de meliponídeos, se diferenciando principalmente no sabor e aroma, atingindo valores superiores no mercado. A legislação brasileira que regulamenta a padronização do mel só atende às características dos méis de *Apis*, não contemplando os de meliponídeos. Visando ampliar e produzir conhecimento sobre o mel de abelhas sem ferrão, neste estudo foram analisadas vinte amostras de méis de abelhas sem ferrão, sendo oito de *Scaptotrigona sp* do município de Belterra-Pará, uma *Melipona fasciculata* do estado do Maranhão, dez de *Tetragonisca angustula* de Ilha Grande - Rio de Janeiro e uma de espécie não identificada da cidade de Inhangapi – Pará. O objetivo desse trabalho foi avaliar a composição físico-química quanto os parâmetros: teor de HMF, pH, acidez livre, umidade, açúcares (redutores e não redutores) e a cor, determinar o conteúdo de aminoácidos livres, proteínas, fenólicos e flavonoides totais, identificar o perfil cromatográfico de ácidos fenólicos e flavonoides através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Além de avaliar a capacidade antioxidante desses méis através dos métodos de captura dos radicais (DPPH e ABTS) e pelo poder de redução do ferro (FRAP). Na tentativa de desenvolver um método para classificar os méis de diferentes regiões e espécies de abelhas sem ferrão daqueles méis provenientes de abelhas africanizada, a análise multivariada (PCA) foi aplicada aos resultados obtidos para as análises físico-químicas, de RMN de ^1H e CLAE-DAD.

Palavras chaves: Mel de abelhas sem ferrão, Análises físico-química, Capacidade antioxidante, Quimiometria.

ABSTRACT

SOUSA, Juliana Paes Leme de Mello. PHYSICOCHEMICAL PROFILE, CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT CAPACITY OF HONEY PRODUCED BY STINGLESS BEES. Seropédica, UFRRJ, 2014. 134 p. Dissertação de mestrado em Química, Química de Produtos Naturais.

Currently, the two main lines of study on Beekeeping are apiculture and meliponiculture. Despite the low productivity, meliponiculture has been much studied recently due to the peculiar characteristics of stingless bee honey, differing mainly in flavor and aroma, reaching higher price values on market. The Brazilian legislation that regulates honey standards are only related to *Apis* honey, not contemplating stingless bee honey. Aiming to expand and produce knowledge on stingless bee honey, it was analyzed twenty stingless bee honey samples, eight being from *Scaptotrigona sp*, from the city of Belterra - Pará, one *Melipona fasciculata*, from Maranhão, ten from *Tetragonisca angustula*, from Ilha Grande – Rio de Janeiro, one species not identified from the city of Inhangapi – Pará. This study aims to analyze the physicochemical composition for the following parameters: HMF content, pH, free acidity, moisture, sugar content (reducing and non-reducing) and color; determine free amino acids and total protein contents, phenolic and flavonoid contents, identify the chromatographic profile of phenolic acids and flavonoids by High performance liquid chromatography (HPLC). It was also determined the antioxidant capacity of the honeys by the method of radical capture (DPPH and ABTS) and ferric reducing ability (FRAP). It was discriminated honeys from different geographic areas and species of bees (stingless and *Apis mellifera* bees) by multivariate analysis (PCA), using RMN-¹H and HPLC-DAD data.

Key words: Stingless bee honey, physicochemical analysis, antioxidant capacity, Chemometrics

1. INTRODUÇÃO

O mel é o produto mais importante da atividade apícola no Brasil, do ponto de vista quantitativo e econômico. A história do uso do mel está paralela à história do homem, e em cada cultura a evidência disto pode ser encontrada no seu uso como uma fonte de alimento e como um símbolo empregado em cerimônias religiosas, mágicas e terapêuticas (CRANE, 1987). A sua utilização vai além do uso como alimento, também como medicamento, devido às suas propriedades antissépticas, antibacterianas, antiproliferativa, anticancerígena, como conservante de frutas e grãos, e até mesmo como oferenda aos deuses (SILVA, QUEIROZ e FIGUEIRÊDO, 2004). A composição do mel depende, basicamente, da composição do néctar da espécie vegetal produtora e da espécie de abelha que o produz, conferindo-lhe características específicas, enquanto que as condições edafoclimáticas e o manejo do apicultor têm menor influência nesta composição (WHITE JÚNIOR, 1978).

Quando se fala em abelhas produtoras de mel a espécie mais conhecida é a *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, apesar de o Brasil possuir uma diversificada fauna de abelhas como os meliponíneos ou abelhas indígenas sem ferrão (ASF). Essas abelhas são dóceis, de fácil manejo e necessitam de pouco investimento para a sua criação. As espécies de abelhas sem ferrão elaboram méis diferenciados, que apresentam características químicas, físicas e organolépticas peculiares, além de possuírem um valor comercial mais elevado em relação aos méis das abelhas africanizadas (*A. mellifera*). Dentre todos os gêneros dos meliponíneos, o *Melipona* é o mais variado e é na Amazônia que encontramos a maior diversidade (ALMEIDA-MURANDIAN *et al*, 2007; SOUZA *et al.*, 2004).

A meliponicultura é a criação de abelhas do gênero Meliponíneos, que são as abelhas nativas, originárias desta parte do continente sul-americano (também comumente conhecidas por abelhas indígenas, ou sem ferrão). Embora existam centenas de espécies no Brasil, as principais são a Uruçu verdadeira, Uruçu amarela, Jataí, Mandaçaia e Tiúba amarela. A utilização das abelhas silvestres nativas, bem como a implantação de meliponários são regulamentadas pela resolução Conama nº 346, publicada em 17 de agosto de 2004 no Diário Oficial da União. O mel das abelhas sem ferrão é saboroso, diferenciado e reconhecido por suas importantes propriedades funcionais sobre a saúde humana. Uma importante característica da meliponicultura é quanto às necessidades de sua mão de obra, sobretudo quando comparada à apicultura. Esta, apesar de especializada e de demandar conhecimentos sobre a biologia e comportamento das abelhas, a meliponicultura pode ser

executada por qualquer tipo de pessoa, já que não exige força física e dedicação demorada ao manejo.

No Brasil, os padrões de qualidade para mel são estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000), a qual fixa padrões de identidade e qualidade para méis florais e de melato. Nesta normativa consta a definição e classificação do mel de abelha *Apis* (critérios específicos de qualidade com limites mínimos e máximos os quais o mel deve se adequar), não contemplando o mel das abelhas indígenas que apresentam diferenças em alguns parâmetros físico-químicos.

Os trabalhos de análises físico-químicas de méis são realizados com o objetivo de comparar os resultados obtidos com padrões ditados por órgãos oficiais internacionais ou com os estabelecidos pelo próprio país, deixando clara não só uma preocupação com a qualidade do mel produzido internamente, como também, tornando possível a fiscalização de méis importados com relação às suas alterações (CARVALHO *et al.*, 2005). No sentido de reduzir esse déficit de informações, diversas instituições de pesquisa nacionais e internacionais tem se mobilizado para a construção de uma base de dados que subsidie uma normalização futura, uma vez que os critérios de qualidade atualmente definidos para o mel das abelhas *Apis mellifera* não atendem por completo à diversidade encontrada nos méis dos meliponíneos.

Este trabalho tem como propósito determinar as características físico-químicas de amostras de méis de abelhas sem ferrão, bem como avaliar seu perfil químico e sua capacidade antioxidante, e compará-los aos méis de *Apis mellifera*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Breve histórico sobre as abelhas sem ferrão e a meliponicultura

As abelhas são descendentes de vespas *Sphecidae*, que possuem o hábito de se alimentarem de outros artrópodes, como aranhas e insetos. Segundo relatos, as abelhas acidentalmente deixaram de alimentar-se de artrópodes para alimentarem-se de mel e pólen das flores quando surgiram às Angiospermas, há cerca de 135 milhões de anos. Assim, com esse processo evolutivo, várias espécies de abelhas foram aparecendo e hoje são conhecidas cerca de 20 mil espécies, mais se acredita que existam umas 40 mil espécies não descritas,

onde somente 2% dessas abelhas são sociais (MICHENER, 2000). Acredita-se que o surgimento e a proliferação das abelhas na superfície da terra aconteceram em íntima relação com o aparecimento das Angiospermas a milhares de anos (IMPERATRIZ-FONSECA & KLEINERT GIOVANNINI, 1993). As relações entre visitantes florais e Angiospermas estão baseadas numa troca de recompensas onde o pólen e o néctar são os principais recursos oferecidos pelas flores, destes o pólen é o alimento essencial à vida das abelhas por ser a única fonte de proteína para as larvas e operárias jovens, fornecendo ainda lipídios, vitaminas e sais minerais (PESSON, 1984). Acredita-se que aproximadamente 2/3 das angiospermas existentes no planeta, dependam das abelhas para polinização (BARTH, 1991; BORG-KARLSON *et al.*, 1996).

A criação de abelhas nativas muitas vezes tem raízes culturais e com as técnicas de manejo passadas de pais para filhos. É uma atividade muito antiga, sendo a apicultura realizada por civilizações anteriores há era cristã (COLETTTO-SILVA, 2005). Em relação às abelhas sem ferrão, os Maias, dentre as culturas indígenas mesoamericanas, destacaram-se pela quantidade e qualidade das informações sobre criação dos meliponíneos (BIESMEIJER, 1997).

No Brasil, até o século XIX, essas abelhas eram a única fonte de mel destinado a alimentação pelos índios e brancos e de cera para confecção de velas pelos jesuítas (BUARQUE DE HOLANDA, 1957; CORTOPASSI-LAURINO, 2002). Camargo & Posey (1990) relataram que os índios Kaiapó detinham o conhecimento sobre as flores fornecedoras de néctar de qualidade, que era coletado pelas abelhas sem ferrão, responsáveis pela produção do mel de boa consistência e sabor.

A criação das abelhas sem ferrão tem sido atividade praticada desde o período pré-colombiano na região Neotropical (KEVAN, 1999), principalmente para a obtenção de produtos com fins alimentícios, comerciais e religiosos (POSEY, 1983; DeFLORIART, 1999; RODRIGUES, 2005; ALMEIDA, 2007)

A prática de criar abelhas sem ferrão (tribo *Meliponini* e tribo *Trigonini*) é chamada de meliponicultura, sendo o nome dado ao criador destas abelhas de meliponicultor (AQUINO, 2006). A palavra meliponicultura foi usada pela primeira vez em 1953, pelo pesquisador Paulo Nogueira Neto. Segundo Venturieri (2007) a meliponicultura pode ser definida como a criação de abelhas sem ferrão associada com as espécies que fabricam e armazenam maior quantidade de mel. Devido à preferência pelos criadores do gênero *Melipona*, o termo meliponicultura continua a ser usado mesmo para criações de outros gêneros. Dorneles *et al* (2009) definiram que a meliponicultura é a criação racional de

abelhas sem ferrão para fins comerciais e que se trata de uma prática que se encontra em ascensão, principalmente no norte, sudeste e nordeste do Brasil.

Os índios foram os meliponicultores pioneiros, mas com o passar do tempo cada vez mais tem se despertado o interesse de pequenos e médios produtores, assim como agricultores de base familiar em desenvolvê-la. No entanto, esta prática com o passar do tempo quase não evoluiu tecnologicamente, de modo que ainda hoje é desenvolvida de forma artesanal, cujo conhecimento é transmitido de uma geração para outra, diferente da atividade da apicultura que ao longo dos anos foi beneficiada com tecnologias modernas de manejo e mão de obra especializada. Porém, desde a década passada, a meliponicultura vem sendo considerada como uma alternativa sustentável para famílias rurais do Brasil, de modo que vem se tornando uma prática crescente no país (SOUZA, 2006).

Dentro do conceito de se desenvolver práticas agrícolas economicamente viáveis, ecologicamente sustentáveis e socialmente justas, a meliponicultura se enquadra excelentemente dentro dos conceitos de diversificação e melhor uso das terras, pois é de fácil manejo e necessita de pouco investimento para a sua produção. Esta é uma atividade que pode ser integrada a plantios florestais, de fruteiras e/ou culturas de ciclo curto, podendo contribuir, através da polinização, com o aumento da produção agrícola e regeneração da vegetação natural (VENTURIERI & PEREIRA, 2003). Outra importante característica da meliponicultura, porém de caráter social, é quanto à necessidade de mão de obra para desenvolver sua criação. Apesar de especializada e demandar conhecimentos sobre a biologia e o comportamento das abelhas pode ser executados por mulheres, jovens e idosos, já que não exige força física e dedicação demorada ao manejo. As abelhas são animais que buscam livremente o seu sustento na natureza, não exigindo alimentação diária ou cuidados veterinários.

Atualmente, a meliponicultura tem passado por um “redescobrimto”, coincidindo com o aumento de estudos sobre aspectos da biologia e comportamento, daqueles que visam à caracterização dos produtos das colônias em relação a seus constituintes nutricionais e farmacológicos (SOUZA, 2007), sendo a caracterização do mel uma das principais vertentes de trabalho.

Kerr e colaboradores (1996) apresentaram 17 justificativas incentivando a prática da meliponicultura como sendo importante ecológica, econômica e culturalmente, a saber:

- As abelhas sem ferrão produzem o melhor mel que se conhece, tem apenas 70% de açúcar e o perfume da flor concentrado, além de ser levemente ácido, o que não o torna enjoativo.

- São responsáveis por 40% a 90% da polinização da flora nativa, conforme o ecossistema.
- Representam uma fonte de renda adicional para o pequeno produtor.
- Das 300 espécies de meliponíneos, cerca de 100 estão em perigo de extinção.
- A necessidade de troca de rainhas ou a fecundação de rainhas em meliponários de amigos representam uma maneira de promover a amizade e a cooperação.
- Traz aos filhos e amigos dos meliponicultores bons conhecimentos biológicos e idéias de conservação da natureza.
- Uma parte da cultura dos sertanejos, silvícolas e camponeses poderá ser perpetuada e incrementada, até tornar-se fonte de renda, de conhecimentos científicos e de agricultura sustentável.
- A cada dia que passa são necessários mais estudos farmacológicos dos seus produtos (mel, geoprópolis, cera, pólen, bactérias dos alimentos, líquido alimentar) que há tempos são utilizados pelos índios e sitiantes.
- É um incentivo ao desenvolvimento de tecnologias para aprimorar sua criação, como: colmeias racionais, número mínimo de colmeias por meliponário, troca de rainhas, transporte de rainhas, seleção genética, técnicas de divisão, extração do mel, etc.
- Seu principal produto, o mel, poderá retornar às mesas como alimento calórico superior ao açúcar cristalizado ou refinado.
- A análise do pólen coletado pelas abelhas é um forte indicativo das espécies vegetais remanescentes em seu habitat e que dependem de sua polinização, o que auxiliará diretamente nos programas de reflorestamento.
- São partes integrantes do nosso ecossistema e da biodiversidade mundial.
- Como as abelhas são sem ferrão poderão ser utilizadas, até por crianças, na polinização de várias flores de espécies úteis ao homem.
- A presença de meliponíneos numa mata ou capoeira, por pequena que seja, indica condições de sobrevivência para outros seres vivos.
- Os meliponíneos, que são as principais abelhas de mel nativas, ao polinizarem as flores da região, promovem abrigo e alimento a muitas espécies.
- Podem levar automaticamente a um conhecimento da flora apícola com consequências imediatas no interesse pela flora nativa, conservação e perpetuação das espécies; e

- É um excelente material de pesquisa visto que seu sistema de determinação de castas em algumas espécies precisa ser molecularmente esclarecido; suas enzimas foram pouco estudadas; seus órgãos de sentido permanecem pouco conhecidos; tudo isso podendo servir como um avanço nas ciências básicas.

A criação destas abelhas vai além dos lucros financeiros oriundos de seus produtos, é de grande importância econômica como agentes polinizadores, visando a manutenção de espécies vegetais, o equilíbrio ecológico nos ecossistemas e a produção de mel e geoprópolis (KERR, 1987). A meliponicultura é uma atividade vital porque além de permitir a manutenção das espécies de abelhas e plantas, gera renda ao homem do campo (AIDAR 1996).

Assim, são vários os objetivos que podem ser buscados com a meliponicultura. E segundo Vilas-Boas (2012), a **figura 1** a seguir, resume alguns deles, separados em produtos diretos ou indiretos.

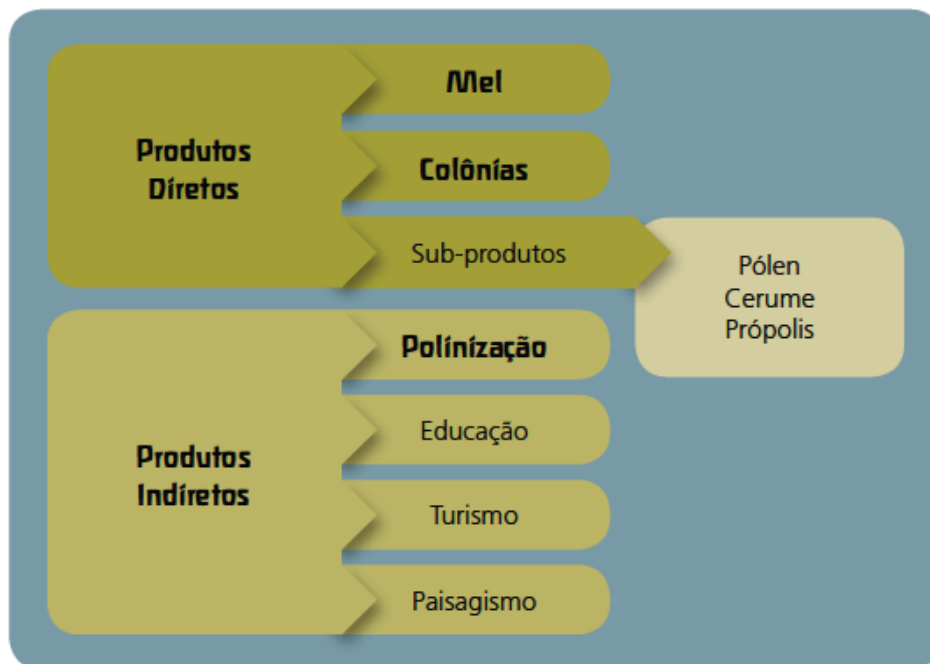


Figura 1. Objetivos da meliponicultura (VILAS-BOAS, 2012)

2.2. Os Meliponíneos

As abelhas estão inseridas na ordem Himenóptera e reunidas na superfamília Apoidea, que é subdividida em 8 famílias: Colletidae, Andrenidae, Oxaeidae, Halictidae, Melittidae, Megachilidae, Anthophoridae e Apidae. Os meliponíneos encontram-se na

superfamília Apoidea, família Apidae, subfamília Apinae, tribo Apini e sub-tribo Meliponini (SILVEIRA *et al.*, 2002; KERR & NASCIMENTO, 1996; NOGUEIRA-NETO, 1997). A tribo Meliponini é constituída apenas pelo gênero *Melipona*, encontrada exclusivamente nas regiões neotropicais, e *Trigonini*, que agrupa diversos gêneros distribuídos em toda área dos trópicos (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Os meliponíneos são abelhas que apresentam tamanho que varia de muito pequeno a médio, em geral muito robustas e possuem um ferrão (órgão de defesa) atrofiado, sendo assim, incapazes de ferocar (SILVEIRA *et al.*, 2002). Por isso são denominadas popularmente como “abelhas sem ferrão” ou também “abelhas indígenas” ou “abelhas nativas” em virtude da criação realizada pelos indígenas por muitos séculos (RODRIGUES, 2005). Por este motivo, muitas das denominações científicas desse grupo de abelhas são de origem linguística indígena, o tupi (NOGUEIRA-NETO, 1970).

Estima-se que no mundo existam mais de 20 mil espécies de abelhas, sendo que são conhecidas cerca de 400 espécies de meliponíneos, distribuídos em aproximadamente 40 gêneros. Contudo, a maior parte da população humana não possui conhecimento sobre esta grande diversidade. De acordo com KERR *et al* (1996), nas florestas brasileiras as abelhas indígenas, mais conhecidas como abelhas sem ferrão, constituem-se nos principais agentes polinizadores de 40% a 90% das plantas floríferas nas regiões tropicais, e são representadas por vários gêneros e centenas de espécies em toda a região tropical do mundo, bem como nas regiões subtropicais do hemisfério sul.

As abelhas sem ferrão apresentam comportamento tipicamente eussocial, embora algumas poucas espécies vivam de alimento roubado de colônia de outras espécies. Suas colônias são perenes, ou seja, estão ativas durante todo ano, e podem ser bastante numerosas (SILVEIRA *et al.* 2002; MICHENER, 2007).

Uma colônia de abelhas sem ferrão é constituída por dois elementos principais: o ninho e os potes de alimento; além de estruturas auxiliares, como o invólucro, o batume, a entrada e o túnel de ingresso. Os potes de alimento geralmente são elipsóides (em formato de ovo), construídos de cerume, e podem apresentar tamanhos variados conforme a espécie (**Figura 2**). Pólen e mel são armazenados separadamente. Portanto, em uma colônia de abelhas sem ferrão, podemos encontrar dois tipos de potes de alimento: potes de pólen e potes de mel.

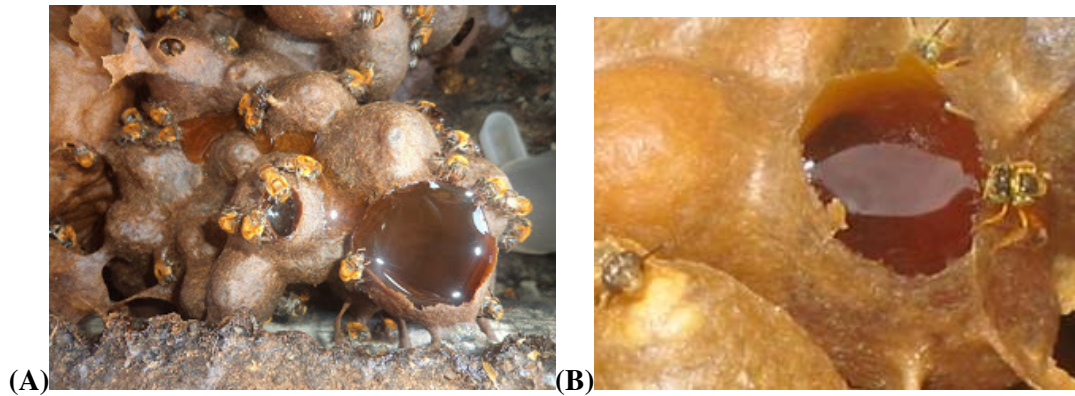


Figura 2. Abelha urucu nordestina na região de potes de mel (A)
Potes de mel de *Tetragonisca angustula* L. (B) (Foto de Morgado, L.N)

Os meliponíneos apresentam características biológicas bastante variáveis, passando pela morfologia, hábitos de nidificação e interações comportamentais complexas entre rainhas e operárias. Segundo Silva e Cunha (2013) essas abelhas possuem uma biodiversidade, sendo bem mais rica e mais especializada que as do gênero *Apis*, pois no primeiro caso possuem 52 gêneros com um total de mais de 400 espécies distribuídas em todo mundo e, no segundo caso, apenas 8 espécies.

Segundo Alonso (1998), as abelhas sem ferrão vivem em condições naturais de campo, e alojam seus sítios de nidificação em oco do caule de árvores, tijolos ociosos, em fendas de rochas e paredes, cavidades nos solos e interiores de cupinzeiros, podendo existir ninhos expostos ou semi expostos (KERR 1999). Na maioria das vezes, os meliponíneos constroem seus ninhos em ocios de árvores ou em locais de difícil acesso para defender suas colônias. (KERR *et al.*, 1996; MICHENER, 2000)(**Figura 3**).

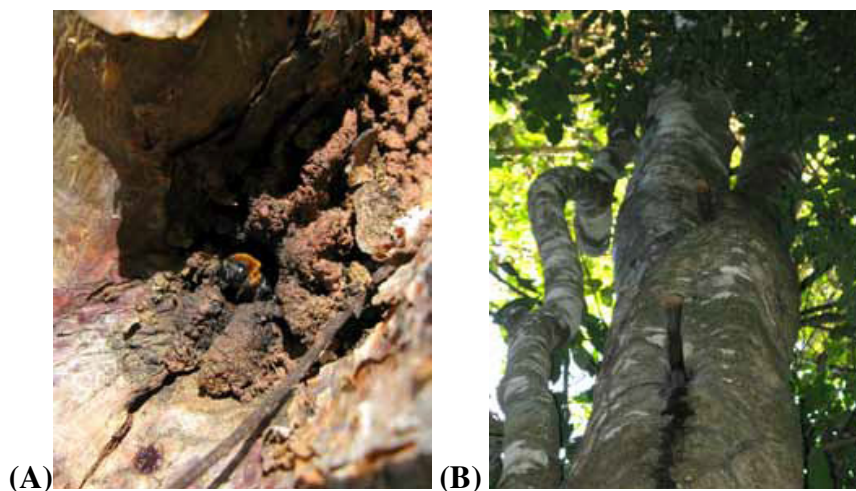


Figura 3. Colônia de jandaíra (*M. subnutida*) instalada em tronco de árvore (A). Entradas de colônia de canudo (*Scaptotrigona* sp) (B) (VILAS-BOAS, 2012).

Para auxiliar na construção do ninho essas abelhas utilizam uma série de materiais encontrados na natureza, como o barro, a cera e a resina para o acabamento da entrada do ninho. A combinação cera e resina, chamada de cerume, não são casuais, pois une as características de maleabilidade e isolamento térmico da cera ao poder antibiótico das resinas. Além dessas substâncias, algumas espécies de abelhas fazem o uso do geoprópolis (barro adicionado de resina) para impermeabilização do ninho (NOGUEIRA-NETO, 1997; SAKAGAMI, 1982; MICHENER, 1974) (**Figura 4**). Outros materiais, detritos vegetais e até mesmo fezes secas de outros animais, principalmente mamíferos, também podem ser utilizados no processo de nidificação (MICHENER, 2007).

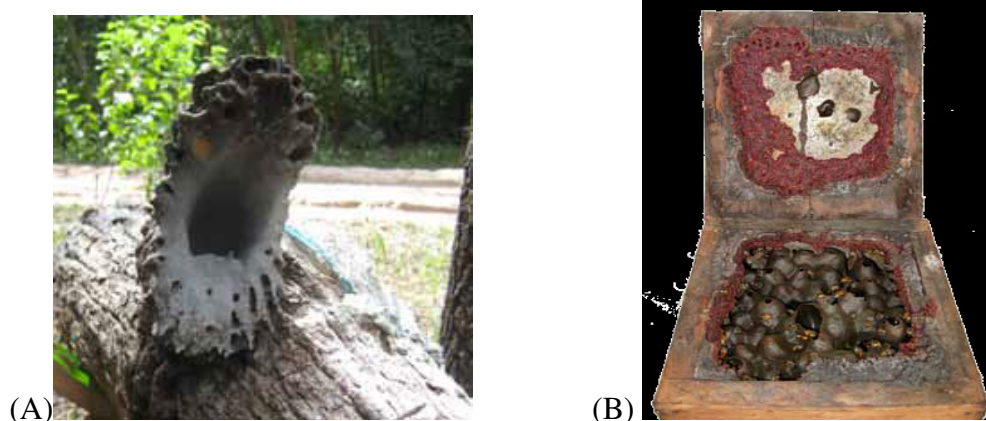


Figura 4. Entrada de colônia da abelha cupira (*Partamona* sp.), construída com barro (A). Geoprópolis avermelhado produzido pela abelha jandaíra (*Melipona fulva*) no estado do Amazonas (B). (VILAS-BOAS, 2012)

Comumente, a arquitetura da entrada e o interior dos ninhos variam de acordo com a espécie, podendo ser de enormes aberturas feitas de barro ou canudos de cera, os quais são fechados à noite (ALONSO, 1998). Estas características auxiliam na identificação e reconhecimento das espécies, sendo uma característica marcante de determinado gênero ou espécie (ROUBIK, 2006)

Segundo Nogueira-Neto (1997), os meliponíneos (Meliponini) vivem em grande parte das regiões de clima tropical do planeta, apresentando grande riqueza de espécies nos trópicos das regiões Neotropical e Indo-Malaia, com alguns táxons restritos às zonas subtropicais do hemisfério sul. Ocupam também algumas importantes regiões de clima temperado subtropical. Assim, essas abelhas são encontradas na maior parte da América Neotropical, ou seja, distribuem-se na maioria do território Latino-Americano, indo desde o Rio Grande do Sul até o México, além da Austrália, Indonésia, Malásia, Índia e África (PRONI, 2000).

No Brasil, são encontradas mais de 192 espécies, distribuídas em 27 gêneros. (NOGUEIRA-NETO, 1997; CRANE 2004). Estas abelhas são nativas e estão presentes em todo o território nacional, embora as espécies difiram de região para região, algumas destas muito populares e criadas especialmente para produção de mel, sobretudo na região Norte e Nordeste (ALVES *et al.*, 2007). Dentre elas conhecidas popularmente, destacam-se as espécies que são criadas racionalmente como *Tetragonisca angustula* (jataí), *Melipona quadrifasciata* (mandaçaia), *Melipona bicolor* (guaraipo ou pé-de-pau), *Melipona rufiventris* (uruçu amarela), *Melipona compressipes* (tiúba), *Melipona subnitida* (jandaíra), *Nannotrigona testaceicornis* (iraí) e espécies conhecidas pela sua agressividade com *Trigona spinipes* (Cachorrinho). (NOGUEIRA-NETO, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2002).

As localidades de maior ocorrência destas espécies são: Fortaleza, Cascavel, Maranguape e Baturité, no Estado do Ceará; Mossoró, Areia Branca, Caicó, Currais Novos, Jardim do Seridó e Parelhas, no Rio Grande do Norte; Araripina e áreas da Chapada do Araripe, em Pernambuco (divisa com Ceará); Rodelas, Paulo Afonso, Glória, Miguel-Calmon e várias localidades do Raso da Catarina, na Bahia (FERREIRA, 2007).

Como espécies mais comuns encontradas no Paraná, destacam-se: a Jataí (*Tetragonistica angustula*), que possui grande produtividade e qualidade de mel e características úteis para exploração racional; a Mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) possui poucos exemplares na natureza; as Mirins (*Plebeia* spp.) abelhas de pequeno porte, possuem facilidade de escolha de locais para nidificação, por isso sua presença é mais comum no estado; Tubuna (*Scaptotrigona bipunctata*), um pouco agressiva, mas com abundância de mel (SILVA & CUNHA, 2013).

Como a diversidade de espécies de meliponíneos é grande no Brasil, encontra-se com frequência mais de uma espécie com o mesmo nome popular. Assim é que denominações como "Mirim", "Mosquito", "Jandaíra", "Mandaçaia" e "Uruçu" são comuns em todo o país, mas a espécie de abelha a que se referem é diferente entre regiões, estados ou mesmo localidades brasileira (**Tabela 1**).

As abelhas sem ferrão são extremamente dependentes do ambiente onde vivem fato relacionado à íntima ligação com os recursos florais disponíveis em diferentes regiões e a climas específicos (KERR & FILHO, 1999, SILVEIRA *et al.*, 2002). Os ecossistemas brasileiros, em especial o amazônico, possuem muitas características que favorecem a criação das abelhas. Dentre elas, podem-se citar: clima quente, flora rica em espécies fornecedoras de mel, pólen e resina e, principalmente, uma floração mais distribuída ao longo do ano. Nos Estados do Pará são conhecidas cerca de 70 espécies diferentes de

abelhas sem ferrão, mas nem todas produzem méis indicados ao consumo humano ou em quantidade suficiente para o seu aproveitamento comercial (MAGALHÃES, 2010). Segundo Magalhães (2010) as espécies mais criadas entre os agricultores do Pará são: uruçú-amarela (*Melipona flavolineata*), uruçú-cinzenta (*M. fasciculata*) e jataí (*Tetragonisca angustula*).

Tabela 1- Principais espécies de abelhas sem ferrão criadas nas diferentes regiões do Brasil (Villas-Bôas & Jerônimo, 2012).

Região	Nome Científico	Nome(s) populare(s)	Estados
Norte	<i>Melipona compressives</i>	Jupará, Jandaíra, Jandaíra-preta	AC, AM, AP, PA, RO, RR, TO
	<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba, Uruçú-Cinzenta	PA, TO
	<i>Melipona seminigra</i>	Uruçú-boca-de-renda, Jandaíra-amarela	AM, PA
	<i>Scaptotrigona sp</i>	Canudo	AC, AM, AP, PA, RO, RR, TO
Nordeste	<i>Melipona asilvai</i>	Monduri, Rajada	AL, BA, CE, PB, PE, PI, RN, SE
	<i>Melipona fasciculata</i>	Tiúba	MA, PI
	<i>Melipona mandacaia</i>	Mandaçaia	AL, BA, CE, PB, PE, PI, RN, SE
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	AI, BA, PB, PE, SE
	<i>Melipona scutellaris</i>	Uruçú, Uruçú-Nordestina, Uruçú-verdadeira	AL, BA, CE, PB, PE, RN, SE AI, BA, CE, MA, PB, PE, PI, RN,
	<i>Melipona subnitida</i>	Jandaíra, Uruçú	SE
Centro-Oeste	<i>Melipona compressives</i>	Jandaíra, Uruçú	GO, MS, MT
	<i>Melipona rufiventris</i>	Uruçú-amarela	GO, MS, MT
	<i>Melipona seminigra</i>	Uruçú	MT
	<i>Scaptotrigona sp</i>	Canudo	GO, MS, MT
	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	GO, MS, MT
Sudeste	<i>Melipona bicolor</i>	Guarupú, Guaraipo	ES, MG, RJ, SP
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	ES, MG, RJ, SP
	<i>Melipona rufiventris</i>	Uruçú-amarela	MG, SP
	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	ES, MG, RJ, SP
Sul	<i>Melipona bicolor</i>	Guarupú, Guaraipo	PR, RS, SC
	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Mandaçaia	PR, RS, SC
	<i>Melipona mondury</i>	Monduri	PR, RS, SC
	<i>Tetragonisca angustula</i>	Jataí	PR, RS, SC

Os meliponíneos vêm despertando o interesse de cientistas e agricultores há pouco mais de um século. Eles estão interessados em produtos como mel e pólen e mais recentemente o estudo da biologia, manejo e o trabalho de polinização realizado por esse grupo de abelhas (NOGUEIRA-NETO, 1997; SILVEIRA *et al.*, 2002).

A seguir serão apresentadas algumas das características básicas das abelhas sem ferrão que foram objetos desse estudo.

2.2.1. *Melipona compressipes fasciculata* Smith, 1854

A denominação popular varia de região para região, a *Melipona compressipes fasciculata* é a tiúba no Maranhão, uruçú cinzenta no Pará e Amapá, e jupará no Acre e Amazonas.

Melipona fasciculata Smith (tiúba) vem sendo cultivada há séculos pela população indígena, é boa produtora de mel, além de produzir o geoprópolis. Ambos os produtos possuem boa aceitação pela população e valor comercial (KERR, 1987; NOGUEIRA-NETO, 1997; CÂMARA et al., 2004).

O Maranhão abriga uma grande variedade de ecossistemas (restinga, manguezais, cocais, caatingas, cerrado, floresta tropical úmida) que proporcionam em seu território a presença de uma grande diversidade de espécies de abelhas. Dentre as quais se destacam os meliponídeos, sendo abelha tiúba (*M. fasciculata*) uma das preferidas dos criadores dessa região devido a sua rusticidade, boa desenvoltura as condições climáticas da região e ao potencial de produção das suas colmeias. A criação dessa espécie tem desempenhado um importante papel econômico como fonte de renda, principalmente, para várias famílias de baixo poder aquisitivo do interior do Estado (MARTINS et al., 2011).

Na natureza, as abelhas tiúba constroem seus ninhos em ocos de árvores, sendo a entrada da colmeia feita de uma mistura de barro e resina (**Figura 5**).



Figura 5. A abelha tiúba (*Melipona fasciculata*), espécie nativa sem ferrão, vem sendo criada na baixada maranhense para a produção de mel (Foto de Giorgio Venturineri).

O ninho é formado por um conjunto de favos horizontais, utilizados para criação da prole, um invólucro que protege este ninho, um conjunto de potes de mel e de pólen, em geral fora do invólucro, com algumas pequenas bolas grudentas de resina aderentes aos

favos ou invólucros para defesa, estando acima e abaixo os batumes de barro e resina que marcam os limites superior e inferior do oco ocupado (KERR, CARVALHO, NASCIMENTO, 1996).

O manejo dessas abelhas é feito com informações que os criadores adquiriram e vão passando de geração a geração, sendo poucos os que recebem um apoio técnico especializado. Embora ela seja uma espécie amplamente manipulada pelo homem, pouco se conhece sobre o seu hábito alimentar.

2.2.2. *Scaptotrigona* sp (canudo)

São muitas as espécies e subespécies desse tipo de abelha que ocorrem com grande frequência na região Amazônica. Habitam naturalmente região litorânea, como também são comumente encontradas em reduto dentro da mata mais densa e algumas regiões serranas.

As abelhas canudo-amarela (*Scaptotrigona* sp) são de pequenos porte, bastante populosas e defensivas (**Figura 6**). Um das espécies mais produtivas da Amazônia, largamente criada no município de Belterra-Pará.



Figura 6. Operária de *Scaptotrigona* sp ou canudo-amarela
(Foto de Giorgio Venturineri)

2.2.3. *Tetragonistica angustula*(Latreille 1811)

As abelhas da espécie *Tetragonistica angustula* são de pequeno porte, e popularmente conhecidas como Jataí (**Figura 7**). Entre as abelhas indígenas sem ferrão, a jataí (*T. angustula*), pode ser considerada a mais conhecida no Brasil, produzindo um dos méis mais consumidos e alcançando elevado preço no mercado. Esta abelha possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todo o território nacional e, apesar da baixa

quantidade de mel produzido por colônia, já vem sendo manejada há muito tempo em diversas regiões do país, caracterizando-se como espécie protagonista da meliponicultura nas regiões sudeste e sul. Muitos produtores chegam a ter centenas de colmeias de jataí (Villas-Bôas & Malaspina, 2005.)

São muito fáceis de serem encontradas, especialmente porque conseguem construir seu ninho em uma grande variedade de cavidades, como, por exemplo, dentro de muros e paredes de casas. Seu mel é um dos mais apreciados entre todas as abelhas sem ferrão, contudo, sua produção é muito pequena. Possuem ampla distribuição geográfica, ocorrendo naturalmente nos estados do Amazonas, Amapá, Bahia, Espírito Santo, Maranhão, Minas Gérias, Paraíba, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. É facilmente localizada na natureza, pois constrói seu ninho em locais de fácil visualização, devido ao aspecto característico da entrada do ninho formando um tubo construído com cerume mole. O invólucro é presente e desenvolvido em volta dos favos e os potes de alimentos são pequenos. A produção de mel por colônias pode variar de 0,5 a 1,5 litro de mel/ano e é uma das abelhas mais criadas no Estado de São Paulo (NOGUEIRA-NETO).



Figura 7. Abelhas *T. angustula* (jataí) no ninho (<http://www.ninha.bio.br/biologia/jatai.html>)

2.3. O mel das abelhas sem ferrão

A utilização do mel na nutrição humana não deveria se limitar apenas à sua característica adoçante, mas, principalmente, por ser um alimento de alta qualidade, rico em energia e inúmeras outras substâncias benéficas ao equilíbrio dos processos biológicos do nosso corpo. O mel é bastante apreciado por seu sabor característico e por seu valor nutricional. A qualidade nutricional do mel como as vitaminas, minerais, valor energético elevado, suas propriedades medicinais e propriedades sensoriais atrai cada vez um número maior de consumidores (ESCOBAR & XAVIER, 2013).

O mel produzido por meliponíneos possui características muito distintas quando comparados ao mel produzido pela abelha do gênero *Apis*. Além disso, é um valioso produto, com uma longa tradição de consumo nas áreas de ocorrência dessas abelhas ao qual são atribuídos vários usos medicinais, além de possuir elevados preços de comercialização, apresentando demanda crescente no mercado. Entretanto ele não é incluído nas normas nacional ou internacional que regulam o mel, devido ao pouco conhecimento sobre a composição desse produto e da diversidade de espécies de abelhas existentes (ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2007).

As abelhas sem ferrão produzem méis de sabores variados e muito apreciados por quem conhece. Enquanto coletam néctar para produzi-lo, essas abelhas polinizam flores e ajudam a biodiversidade. Como muitas dessas espécies produzem mel saboroso, é muito grande a procura pelos próprios meleiros, que retiram o mel destruindo a colmeia, assim contribuindo para a extinção dessas abelhas em algumas regiões.

A falta de padrões oficiais que regulamentem o mel de abelhas sem ferrão, o problema de adulteração deste produto, a diversidade de espécies de abelhas produtoras e o pouco conhecimento sobre a flora explorada são questões que devem ser investigadas para se conseguir informações corretas sobre a composição química e características gerais sobre o produto.

Diversos grupos de pesquisas tem buscado a construção de uma base de dados consistente para a proposição de padrões de qualidade como subsídio a caracterização do mel de abelhas sem ferrão. Nesses estudos são utilizados métodos de rotina aplicados ao controle de qualidade de méis de abelhas *Apis*, tais como: açúcares redutores, sacarose aparente, acidez livre, cinza, atividade diastásica, hidroximetilfurfural e conteúdo de umidade.

Os resultados obtidos para as análises desses méis têm indicado que a tentativa de aplicar as padronizações nacionais, ou mesmo internacionais, estabelecidas para mel de *A. mellifera* têm gerado problemas quanto à avaliação da qualidade do mel *in natura* produzido pela abelha sem ferrão. Estudos realizados para caracterizar o mel de abelhas jataí têm demonstrado que alguns requisitos, como umidade e açúcares redutores, encontraram-se em desacordo com o que a legislação determina.

Comparado ao mel de *A. mellifera*, as características mais relevantes do mel de meliponíneos são: os maiores valores de água, acidez livre, condutividade elétrica, maltose e nitrogênio e menores valores de diastase em mel de espécies de *Melipona* (VIT *et al*, 2004; BOGDANOV *et al.*, 1996). Uma das grandes vantagens do mel das abelhas sem ferrão refere-se ao teor de açúcar do mel das melíponas e trigonas, menor que o mel das *Apis*, chegando a 70 %. Tem maior concentração de levulose, um açúcar mais doce que a sacarose. Já o teor de água é maior, variando entre 23 e 30 %, conforme a espécie. Sua cor varia do quase transparente ao âmbar, e o aroma, sabor e níveis de açúcares dependem do paladar, da espécie, da época, da região e, principalmente, da florada (SOUZA *et al.*, 2009).

Embora o mel seja composto principalmente de uma solução supersaturada de açúcar, ele também apresenta uma fração menor de diferentes constituintes, tais como vitaminas, minerais, enzimas, substâncias polifenólicas como ácidos fenólicos e flavonoides, aminoácidos livres e numerosos compostos voláteis (AYOUB, *et al*, 2009;. BARONI, *et al*, 2006). No entanto, esta menor fração da composição total tem sido apontada como a responsável pelas propriedades organolépticas e nutricionais do mel, tanto de *Apis* quanto de melipona (MANYI-LOH *et al.*, 2011a).

A composição do mel está fortemente associada à sua origem botânica e também com a área geográfica, porque o solo e o clima determinam a característica da flora (KÜCÜK *et al.*, 2007). Dependendo da origem botânica, o mel pode ser classificado como: floral, quando ele é derivado do néctar das plantas, ou não-floral (melato) quando ele é derivado de depósitos doces secretados pelas partes vivas de plantas ou excretado por insetos sugadores (MANYI-LOH, 2011b). De acordo com a origem entomológica, vários tipos de abelhas produzem e armazenam mel em favos de cera de abelha (*Apis cerana*, *Apis dorsata*, *Apis florea*, *Apis mellifera*) (MICHENER, 2000) ou em potes de cerume pela grande biodiversidade de abelhas sem ferrão (*Meliponini*) (CAMARGO e PEDRO, 2007).

Segundo Carvalho e colaboradores (2013), entende-se por mel floral das espécies de abelha sem ferrão do gênero *Melipona*, o produto alimentício produzido por estas abelhas, a partir do néctar das flores, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com

substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos potes dentro das colônias. O mel das espécies de abelha sem ferrão do gênero *Melipona* é uma solução concentrada de açúcares com predominância de glicose e frutose. Contém ainda uma mistura complexa de outros carboidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos e grãos de pólen, podendo conter cerume procedente do processo de extração por sucção.

Apesar do mel produzido a partir da meliponicultura apresentar uma quantidade menor, quando comparada com a produção das abelhas *A. mellifera*, possui um grande diferencial que são sabor e aromas únicos, o que valoriza muito esse produto no mercado (CARVALHO *et al.*, 2003).

A diversidade de espécies com potencial de produção, suas especificidades comportamentais e preferências proporcionam características distintas aos produtos das abelhas sem ferrão em relação aos produtos da espécie melífera. Essas particularidades dos produtos meliponícolas, especialmente do mel, tem motivado diversos estudos para a sua caracterização físico-química e microbiológica (EVANGELISTA-RODRIGUES *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2006; DARDÓN e ENRÍQUEZ, 2008; VIT *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2012; LAGE *et al.*, 2012), além de adequação de métodos de colheita, beneficiamento e armazenamento (CARVALHO *et al.*, 2009; VILLAS-BÔAS, 2012).

2.4. Caracterização Físico-química do mel

A presença e quantidade de diversas substâncias definem as características físico-químicas do mel, a exemplo dos glicídios, enzimas, aminoácidos, ácidos, água, minerais, flavonoides, vitaminas, pigmentos, cera, grãos de pólen e outras substâncias biologicamente ativas (HOOPER, 1981). Os percentuais destas substâncias podem variar a depender da origem da matéria-prima, condições edafoclimáticas, manejo das colônias e armazenamento (CODEX ALIMENTARIUS, 2001; WHITE JÚNIOR, 1978).

A Legislação Brasileira regulamenta a padronização do mel para fins comerciais, atendendo as necessidades da apicultura, mas não em relação à meliponicultura, promovendo assim a necessidade da elaboração de uma legislação que atenda por completo as necessidades dessa atividade (ALVES *et al.*, 2005). Segunda essa legislação que determina a identidade e requisitos mínimos de qualidade do mel *Apis* destinado ao consumo humano direto, define parâmetros: quanto à maturidade (açúcares redutores, umidade,

sacarose aparente), a pureza (sólidos insolúveis em água, minerais ou cinzas e pólen), e a deterioração (acidez livre, atividade diastásica e HMF) (BRASIL, 2000).

De acordo com as legislações, brasileira e internacional vigentes, Brasil (2000), Mercosul, (1999) e Codex Alimentarius (2001), não há exigências da realização de análises microbiológicas para avaliação de controle de qualidade de mel, estabelecem apenas que seja seguidas boas práticas de higiene durante todo o processo de manipulação com o produto.

Tradicionalmente, as pesquisas de análises físico-químicas são as mais aplicadas para determinar a qualidade e caracterizar a composição dos alimentos. De maneira geral, o mel produzido pelas espécies de meliponíneos apresenta diferenças em alguns parâmetros físico-químicos quando comparados ao mel produzido por *A. mellifera*, principalmente com relação à sua umidade, que é bastante elevada, tornando-o menos denso que o mel das abelhas africanizadas, e mais suscetível a fermentação.

Trabalhos sobre as características dos méis de meliponíneos são escassos, considerando o número de espécies existentes, e em geral, utilizam os parâmetros de qualidade aplicados aos méis de *Apis*, tais como: teor de HMF, atividade diastásica, conteúdos de cinza, acidez, umidade e teor de açúcares (ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2013; MONTE *et al.*, 2013; HOLANDA *et al.*, 2012; ALVES *et al.*, 2005).

Segundo Carvalho e colaboradores (2013) levantamentos recentes realizados no Brasil, em especial na região Nordeste, revelaram que as espécies de abelhas sem ferrão com maior número de amostras de mel analisadas são as pertencentes ao gênero *Melipona*, notadamente as espécies *M. scutellaris*, *M. quadrifasciata anthidioides* e *M. mandacaia*. Somente no Estado da Bahia, foram computadas mais de 1.000 amostras analisadas de mel, pertencentes a diversos gêneros, subsidiando diversos trabalhos acadêmicos (SODRÉ, 2005; SANTOS, 2010; MOURA, 2011; OLIVEIRA, 2011; VIEIRA, 2011; CLARTON, 2012; OLIVEIRA, 2012; e VÉRAS, 2012).

Procurando ajustar essas condições às espécies de meliponíneos do Brasil, Villas-Bôas e Malaspina (2005) apresentaram uma sugestão de faixa de variação dos principais parâmetros físico-químicos para o mel das abelhas sem ferrão e *A. mellifera*. Adicionalmente, outras variações obtidas por diversos autores quanto ao perfil físico-químico de amostras de mel produzidas por *Melipona* e outros gêneros de abelhas sem ferrão também foram apresentados por Souza *et al.* (2006) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Características físico-químicas utilizadas para controle de qualidade de méis de *Apis* e meliponíneos (CARVALHO *et al.*, 2013).

Parâmetros físico-químicos	A	B	C	D
Umidade (%)	Máximo de 20	Máximo de 30	Máximo de 35	27,2
Açúcares Redutores (%)	Mínimo de 65	Máximo de 50	Máximo de 50	69,1
Sacarose aparente (%)	Máximo de 6	Máximo de 6	Máximo de 6	2,2
Cinzas (%)	Máximo de 0,6	Máximo de 0,5	Máximo de 0,6	0,2
Acidez (meq.Kg ⁻¹)	Máximo de 50	Máximo de 85	Máximo de 70	41,8
Atividade diastásica (Göthe)	Mínimo de 8	Máximo de 3	Máximo de 3	3,1
Hidroximetilfurfural(mg.Kg ⁻¹)	Máximo de 60	Máximo de 40	Máximo de 40	16
Sólidos insolúveis (%)	Máximo de 0,1	-	Máximo de 0,4	-

Valores Limites propostos: mel de *Apis mellifera* (A = Brasil, 2000), mel de *Melipona* (B = Vit *et al.*, 2004), meliponíneos do Brasil (C = Villas-Bôas e Malaspina, 2005) e valor médio da variação encontrada para *Melipona* spp. em nível mundial (D = Souza *et al.*, 2006).

É sabido que apesar da importância dos méis das abelhas sem ferrão, pouco se conhece em termo de sua composição e ainda são insuficientes os estudos sobre suas características físico-químicas, que muitas vezes são associadas às características do mel das abelhas africanizadas. Assim, se faz necessário estudar esse produto, porque os hábitos das abelhas nativas se diferenciam das abelhas africanizadas, podendo alterar também a composição do produto (SOUZA, 2006).

Muitos dos parâmetros físico-químicos são analisados com o objetivo de compará-los com padrões definidos por órgãos oficiais que são estabelecidos pelos países, garantindo de alguma forma a qualidade e a fiscalização do mel. As análises físico-químicas indicadas pela legislação brasileira para o controle de qualidade do mel puro de *Apis mellifera* são: quanto à maturidade (açúcares redutores, umidade, sacarose aparente), pureza (sólidos insolúveis em água, minerais ou cinzas e pólen), e deterioração (acidez livre, atividade diastásica e HMF) (BRASIL, 2000). Outros parâmetros podem ser utilizados no sentido de fornecer informações que possam colaborar no conhecimento deste produto. Os mais conhecidos serão apresentados a seguir.

2.4.1. Umidade

A umidade no mel é uma característica importante por influenciar na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização e sabor (SEEMANN & NEIRA,

1988), e pode ser alterado após a sua retirada da colmeia, em função das condições de armazenamento depois da extração.

A água presente no mel é o segundo constituinte em quantidade, podendo variar para o mel de *Apis*, antes da completa desidratação, entre 15,00 e 21,00% do conteúdo total, dependendo do clima, origem floral e condições de coleta. Normalmente, o mel maduro tem menos de 18,60% de umidade (HORN *et al.*, 1996), tendo uma grande relação com deterioração, já que quando encontrada acima de um limite máximo (20%) o mel estará sujeito à fermentação (FRÍAS & HARDISSON, 1992).

Certos microrganismos osmofílicos (tolerantes ao açúcar) quando presentes no mel multiplicam-se com o aumento da umidade, favorecendo o seu processo de fermentação. Estes microrganismos estão presentes nos corpos das abelhas, no néctar, no solo, nas áreas de extração e armazenamento do mel (WHITE JÚNIOR, 1978).

2.4.2. pH

O pH determinado no mel refere-se aos íons hidrogênio presentes numa solução e pode influenciar na formação de outros componentes, como na velocidade de produção do hidroximetilfurfural (VIDAL & FRAGOSI, 1984).

Em geral, todos os méis apresentam pH baixo, sendo formados por ácidos orgânicos, alguns voláteis e outros inorgânicos (SIMAL & HUIDOBRO, 1984). Esta característica do mel pode ser influenciada pela sua origem, sendo geralmente inferior a 4,00 para mel de origem floral e superior a 4,50 para os méis de melato (FRÍAS & HARDISSON, 1992). Pode ainda ser influenciado pela concentração de diferentes ácidos, do cálcio, sódio, potássio e outros constituintes das cinzas (SEEMANN & NEIRA, 1988). Os méis brasileiros de *Apis* têm o valor de pH variando de 3,20 a 4,60, enquanto os de meliponíneos variam de 3,20 a 4,80 (CORTOPASSI-LAURINO & GELLI, 1991).

O pH do mel não está diretamente relacionada com a acidez por causa da ação de tamponamento dos vários ácidos e minerais presentes. Este parâmetro é de grande importância durante a extração e armazenamento do mel porque influencia a sua textura, estabilidade e vida de prateleira (GOMES *et al.*, 2009).

De acordo com a legislação vigente, atualmente não há indicação de análise de pH como obrigatória para a qualidade do mel. Embora não seja obrigatória no controle de qualidade, tem-se observado na literatura que este parâmetro vem sendo apresentado porque

contribui como uma variável que auxilia no controle microbiológico do mel. Um baixo valor de pH (faixa de pH 3,37 – 4,83) inibe a presença e o crescimento de microorganismos (TERRAB *et al.*, 2002).

2.4.3. Acidez

O mel contém ácidos que contribuem para sua estabilidade frente ao desenvolvimento de microrganismos.

A acidez do mel é resultado da presença de ácidos orgânicos, representada predominantemente pelo ácido glicônico produzido a partir da D-glicose por uma reação catalisada pela enzima glicose oxidase que converte primeiro a glicose na lactona (gliconolactona) que por sua vez sofre hidrólise e da origem ao ácido glicônico. Dessa forma existe um equilíbrio entre as concentrações desses dois últimos compostos (ALVES *et al.*, 2012). A acidez pode ser explicada também pela ação das bactérias durante a maturação do mel (RUIZ-ARGUESSO & RODRIGUES-NAVARRO, citados por WHITE Jr, 1989) e ainda a quantidade de minerais presentes no mel (WHITE JR, 1989).

Todos os outros ácidos (acético, benzóico, butírico, cítrico, fenilacético, fórmico, isovalérico, láctico, maléico, oxálico, propiônico, piroglutânico, succínico e valérico) estão presentes em quantidades menores (CRANE, 1983).

A acidez do mel tem sua origem na variação dos ácidos orgânicos causada pelas diferentes fontes de néctares, pela ação da enzima glicose-oxidase, pela ação das bactérias durante a maturação do mel e pelas quantidades de minerais presentes no mel (HORN *et al.*, 1996). Estes ácidos estão dissolvidos em solução aquosa no mel e produzem íons de hidrogênio que promovem a sua acidez ativa permitindo, assim, indicar as condições de armazenamento e o processo de fermentação (CORNEJO, 1988).

De acordo com Frías & Hardisson (1992) quando o mel é aquecido em excesso forma-se o hidroximetilfurfural por decomposição de certos açúcares os quais, por sua vez, se decompõem nos ácidos levulínicos e fórmico, contribuindo ambos para valores maiores de acidez.

2.4.4. Hidroximetilfurfural

O hidroximetilfurfural, comumente chamado de HMF, talvez seja o constituinte secundário do mel mais discutido. Sua formação está relacionada à reação de certos açúcares com ácidos, principalmente pela decomposição da frutose (**Figura 8**) (BOGDANOV, 2009b;

WHITE JÚNIOR, 1976). Normalmente, uma pequena quantidade de HMF é encontrada nos méis de *Apis* recém-coletados (HORN *et al.*, 1996). Sua presença é um indicador de qualidade do mel. Quando presente em níveis elevados indica uma queda no valor nutritivo do mel pela destruição, por meio de aquecimento, de algumas vitaminas e enzimas que são termolábeis (VERÍSSIMO, 1988).

A determinação de hidroximetilfurfural (HMF) é um parâmetro amplamente utilizado para avaliar o grau de frescor e/ou superaquecimento do mel. A quantidade do HMF observada numa análise de mel pode ser utilizada como indicador de qualidade, sendo que os valores aumentam mais rapidamente em méis submetidos a altas temperaturas, armazenamento prolongado, adição de açúcar invertido, além também de ser afetado pela acidez, pH, água e minerais presentes no mel. (CRANE, 1985; SALINAS *et al.*, 1991; SEEMANN & NEIRA, 1988).

Nos países subtropicais os méis podem ter naturalmente um alto conteúdo de HMF sem que o mesmo tenha sido superaquecido ou adulterado, em função das altas temperaturas da região (WHITE JÚNIOR, 1992).

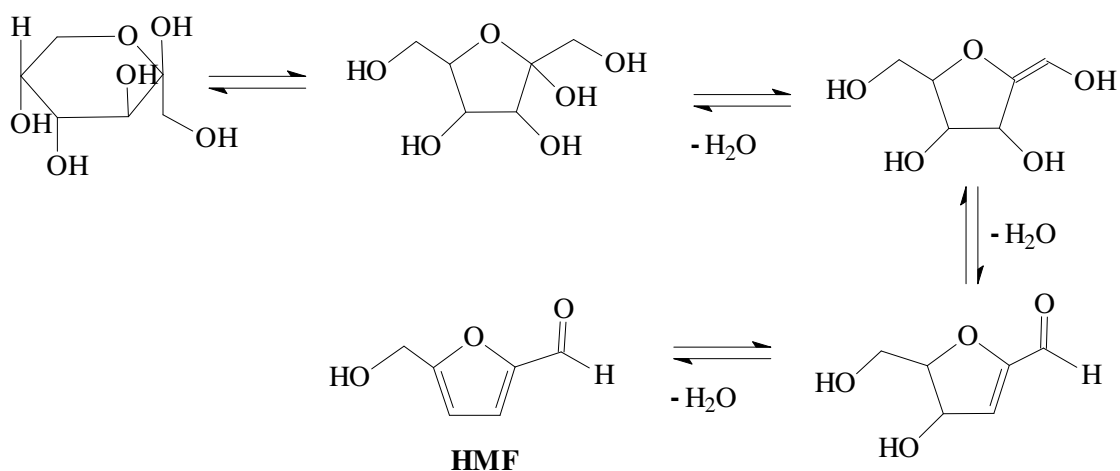


Figura 8 - Mecanismo de formação do HMF (5-hidroximetilfurfural). (BOGDANOV, 2009b)

2.4.5. Açúcares Redutores

O mel é rico em açúcares, sendo encontrada glicose, frutose, sacarose, maltose, isomaltotetraose, dentre outros (CRANE, 1983).

Os açúcares são os principais componentes do mel, onde os monossacarídeos (frutose e glicose) estão em torno de 85,00 a 95,00%, e o restante são dissacarídeos

(sacarose e maltose). Os açúcares redutores tem capacidade de reduzir íons de cobre em solução alcalina (MARCHINI et al., 2004), destes a glicose, por ter pouca solubilidade, determina à tendência a cristalização do mel (**Figura 9**), assim, sua precipitação aumenta o teor de umidade da fase aquosa que permite que células de leveduras osmofílicas se multipliquem e provoquem fermentação. A frutose existe em grande quantidade no mel e, por ter alta higroscopicidade, possibilita a doçura do mel (SOUZA, 2003; CARVALHO, *et al.*, 2005). A proporção média de frutose no mel de *Apis* é de 39,30%, enquanto que a de glicose é de 32,90%, sendo que mel com altas taxas de frutose podem permanecer líquido por longos períodos (DANTAS, 2003).

Os demais açúcares do mel são representados por dissacarídeos e trissacarídeos (WHITE JÚNIOR, 1979). Dentre os dissacarídeos, a sacarose representa em média 2,00 a 3,00% dos carboidratos para os méis de *Apis* e quando superior a este valor, geralmente indica um mel verde ou adulterado. O teor elevado deste açúcar significa na maioria das vezes uma colheita prematura do mel, isto é, um produto em que a sacarose ainda não foi totalmente transformada em glicose e frutose pela ação da invertase ou de ácidos diluídos (AZEREDO *et al.*, 1999).



Figura 9. Aspecto do mel cristalizado no pote de *Melipona mandaçaia*.

2.4.6. Proteínas

Apesar do pouco conhecimento sobre as características proteicas, a ocorrência de proteína em mel é utilizada na detecção de adulteração desse produto (CRANE, 1975).

Dentre os aminoácidos encontrados no mel, a prolina é o que está presente em maior quantidade, representando cerca de 50,00 a 85,00% do total para mel de *Apis* (WHITE JÚNIOR & RUDYJ, 1978). Estes aminoácidos são produtos da quebra da proteína e existem em quantidades mínimas em méis normais, estando sua origem mais relacionada às abelhas do que às plantas (CRANE, 1983).

Para amostras de méis de *Tetragonisca angustula*, provenientes de Campo Grande/MS, Denadai e colaboradores (2002) constataram valor médio de 0,90% para a proteína. Já para amostras de *Melipona* (*M. compressipesmanaosensis*, *M. rufiventris paraensis*, *M. seminigra merrillae*) da região amazônica, Souza *et al.* (2004b) encontraram valores variando de 0,20 a 0,80%.

2.4.7. Cor do mel

A cor do mel é um fator determinante no mercado mundial. Há uma tendência dos méis claros serem os preferidos pelos consumidores, conseqüentemente, têm um maior valor comercial que os escuros (**Figura 10**). O sabor e o aroma dos méis, como de qualquer outro gênero alimentício, são muito mais difíceis de serem avaliados quantitativamente que a cor. Existe uma relação imperfeita entre a cor e o sabor, pois acredita-se que os méis com sabor agradável são sempre claros, enquanto que os méis escuros têm, normalmente, um sabor forte (WOOTTON *et al.*, 1976; CRANE, 1983; GONZÁLES *et al.*, 1999).



Figura 10. Variação de cor em mel.

Durante o armazenamento pode ocorrer o escurecimento do mel e, paralelamente, mudanças em suas propriedades organolépticas, influenciando na sua qualidade e aromas originais (AUBERT & GONNET, 1983).

De acordo com Milum (1948), o escurecimento do mel durante a estocagem depende da cor inicial deste produto. Este escurecimento tem relação com a origem botânica, o processamento, o armazenamento, os fatores climáticos durante o fluxo do néctar e a temperatura na qual o mel amadurece na colmeia (SMITH, 1967; SEEMANN & NEIRA, 1988). Alguns componentes do mel também são determinantes para o escurecimento deste produto como: proporção de frutose/glicose, o conteúdo de nitrogênio e aminoácidos livres, as substâncias polifenólicas, o conteúdo de minerais e a instabilidade

da frutose em solução ácida (LYNN *et al.*, 1936; SCHADE *et al.*, 1958; BATH & SINGH, 1999).

2.5. Propriedades terapêuticas do mel de abelhas sem ferrão

O mel contém cerca de 200 substâncias, além de açúcares e água. Há um particular interesse nos polifenóis (ácidos fenólicos, flavonoides e seus derivados), terpenos, esteroides e aminoácidos, que são considerados como uma parte importante da medicina tradicional (KÜCÜK *et al.*, 2007; AHN, 2007).

O mel produzido pelas abelhas sem ferrão é um alimento que contém propriedades necessárias a nutrição humana, como carboidratos, proteínas, minerais e vitaminas. Esse mel possui, também, uma elevada atividade antibacteriana e, é tradicionalmente utilizado em terapias populares contra doenças pulmonares, resfriados, gripe, fraqueza e infecções de olhos em várias regiões do país (DRUMOND, 2007; POSEY 1987). Devido a suas aptidões curativas este produto tem apresentado uma demanda crescente no mercado, alcançado preços bem mais elevados do que o preço do mel das abelhas do gênero *Apis* (KERR & NASCIMENTO, 1996). Essas inúmeras substâncias presentes nos méis possuem propriedades medicinais que são associadas às plantas das quais foi extraído o néctar, daí serem utilizados na indústria farmacêutica e medicinal, tanto na composição de medicamentos como agentes profiláticos e suplementos dietéticos (SOCHA *et al.*, 2009). As diferentes características dos méis são devidas a um grande número de pequenos componentes provenientes do néctar e das próprias abelhas que conferem ao mel o seu aroma particular e algumas das suas atividades antioxidantes (TOSI *et al.*, 2008).

Além das propriedades nutricionais, a utilização do mel na medicina popular se deve também às suas propriedades farmacológicas. O crescente interesse no mel produzido por meliponíneos é devido a sua composição, que tem sido associado com propriedades antisséptica, antimicrobiana, anti-inflamatória, e cicatrizante de feridas (SILVA *et al.*, 2013; VIT & TOMÁS-BARBERÁN, 1998).

É reconhecido que a maioria dos méis tem atividade antibacteriana e que esta atividade é dependente de fatores físicos e químicos. A viscosidade de mel é suficientemente alta para criar uma barreira física que inibe a contaminação da ferida por agentes infecciosos presentes no ar. Devido alta concentração de açúcar, o mel elimina a maioria das bactérias por osmose. A atividade antibacteriana pode também ser parcialmente atribuída à acidez do mel, ou a presença de componentes fitoquímicos como flavonoides e os ácidos fenólicos e, mais significativamente, a ação do peróxido de hidrogênio produzido no mel, devido à

presença da enzima glicose-oxidase secretado pelas glândulas hipofaringêas das abelhas (MOLAN, 1992)

Entre os componentes químicos presentes no mel que poderiam ser responsáveis pela atividade antibacteriana, os flavonoides e ácidos fenólicos são os mais estudados. Pesquisas têm verificado a atividade antibacteriana de derivados fenólicos presentes no mel (SNOW & MANLEY-HARRIS, 2004). Weston e colaboradores (2000) descobriram que o seringato de metila foi o principal constituinte da fração fenólica do mel de manuka da Nova Zelândia responsável pela atividade antibacteriana. Eles relacionaram tal atividade à capacidade dos fenólicos de formarem complexos solúveis com proteínas e com a parede celular de bactérias. Propriedades cicatrizante (KUMAR *et al.*, 1993) e antioxidante (PONTE, 2003) estão também relacionadas a este derivado apícola.

Nesse sentido, diversos autores avaliaram o efeito antimicrobiano de méis produzidos por espécies de abelhas indígenas sem ferrão, provenientes de diferentes países. Torres *et al.* (2004) evidenciaram a ação do mel de *Tetragonisca angustula*, proveniente da Colômbia, frente a bactérias Gram-positivas (*Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* e *Micrococcus luteus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae*). Já os fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* e *Trichoderma viride* não foram sensíveis ao tratamento com o mel da referida espécie. Dardón & Enríquez (2008) comprovaram o efeito antimicrobiano de amostras de mel de nove espécies de meliponíneos da Guatemala para diversas bactérias e leveduras. Guerrini *et al.* (2009) demonstraram o potencial antibacteriano do mel de abelhas nativas do Equador para *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* subsp. *aureus*. Boorn *et al.* (2010) comprovaram que o mel de *T. carbonaria* apresentou amplo espectro de atividade antibacteriana. Entretanto, a atividade contra *Candida* mostrou-se limitada.

Estevinho e colaboradores (2008) avaliaram a atividade antibacteriana dos extratos de mel do Nordeste de Portugal usando três bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lentus*) e três bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*). Nos ensaios biológicos, os resultados mostraram que o *S. aureus* foram os microrganismos mais sensíveis e *B. subtilis*, *S. lentus*, *K. pneumoniae* e *E. coli* foram cada um moderadamente sensível à atividade antimicrobiana dos extratos de mel. No entanto, nenhuma atividade antimicrobiana foi observada no ensaio com *P. aeruginosa*.

No Brasil, diversos estudos sobre a atividade antimicrobiana de méis de abelhas nativas também tem sido realizados. Gonçalves e colaboradores (2005) testaram a atividade

antimicrobiana do mel de *Nannotrigona testaceicornis* “*in vitro*”, por meio de difusão de Agar, e observaram que os microrganismos *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus spp* foram sensíveis ao mel testado. Alves *et al.* (2008) comprovaram que o uso tópico de mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas da pele de ratos estimulou a resposta imunológica, reduziu significativamente a infecção por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, bem como o tempo de cicatrização. Borsato e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antibacteriana e antifúngica de 21 méis de diferentes meliponíneos provenientes do Estado do Paraná, que apresentaram atividade para cepas de *E. coli*, *S. aureus* e *C. albicans*. Em estudos realizados por Pimentel e colaboradores (2013) para mel produzido pelas abelhas sem ferrão (*M. compressipes manaosensis*) e mel comercial de *Apis* (eucalipto) oriundos de Manaus, eles encontraram que os méis de *Apis* apresentaram maior atividade antibacteriana, inibindo apenas o crescimento das bactérias Gram positiva. No entanto, o mel produzido pelas abelhas sem ferrão apresentou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativas.

2.6. Metabólitos secundários do mel de abelhas sem ferrão

Centenas de substâncias bioativas já foram encontradas em méis de espécies *Melipona* em diferentes países (ODDO *et al*, 2008.; OLIVEIRA *et al*, 2012.; SILVA *et al.*, 2013). Entre as substâncias com atividade biológica que estão presentes no mel destacam-se aquelas que apresentam capacidade antioxidante, como os ácidos fenólicos e flavonoides, as enzimas glicose-oxidase e catalase, que receberam atenção especial dos grupos de pesquisa, devido ao seu papel na prevenção de doenças associadas com o *stress oxidativo* (ALJADI & KAMARUDDIN, 2004).

Trabalhos relatados na literatura tem descrito que as substâncias fenólicas presentes no mel vêm a partir do néctar de flores, pólen e própolis e, normalmente são compostas por ácido benzoico, ácido cinâmico e seus ésteres, e alguns flavonoides (ESTEVINHO *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2013a).

Os resultados obtidos por Estevinho *et al.* (2008) a partir da identificação parcial de substâncias fenólicas no mel português por CLAE-DAD, demonstrou que os ácidos *p*-hidroxibenzóico (1) e cinâmico (2), e os flavonoides naringenina (3), pinocembrina (4) e crisina (5) foram as substâncias presentes na maioria das amostras analisadas (**Figura 11**)

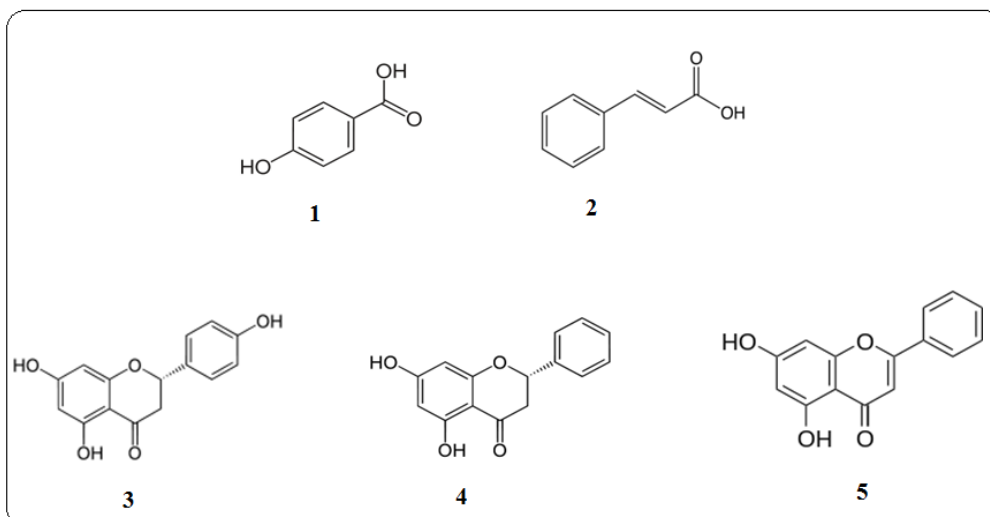


Figura 11. Ácidos e flavonoides identificados por CLAE-DAD em mel Português (ESTEVINHO et al., 2008)

Em outro trabalho, Silva e colaboradores (2013) estudaram o perfil fenólico da fração acetato de etila do mel de *M. subnitida* coletadas no Estado da Paraíba e relatou uma forte relação entre os resultados de atividade antioxidantes com DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) e ABTS (ácido 2,2-azino-*bis*-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) e as substâncias fenólicas: ácido 3,4-diidroxibenzoico (**6**) (ácido protocatecuico), ácido gálico (**7**) e ácido vanílico (**8**) (**Figura 12**).

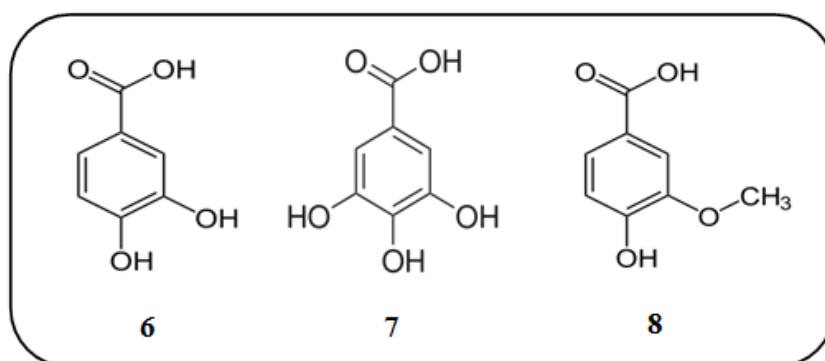


Figura 12. Ácidos fenólicos encontrados em mel de *M. subnitida* (SILVA et al., 2013)

Em outro trabalho realizado por Silva e colaboradores (2013a) para mel produzidas por *Melipona (Michmelia) seminigra merrillae*, coletados em municípios distribuídos na região central e sul do estado do Amazonas, no Brasil, foram analisadas o conteúdo e perfil de substâncias fenólicas e antioxidantes. Catorze substâncias foram identificadas, entre elas, o ácido *cis, trans*-abscísico (**9**) (ABA), o flavonoide taxifolina (**10**), que segundo os autores

não tinha sido descrito em méis de abelhas sem ferrão, além de catecol (**11**), sendo relatado em amostras de mel do Brasil pela primeira vez (**Figura 13**).

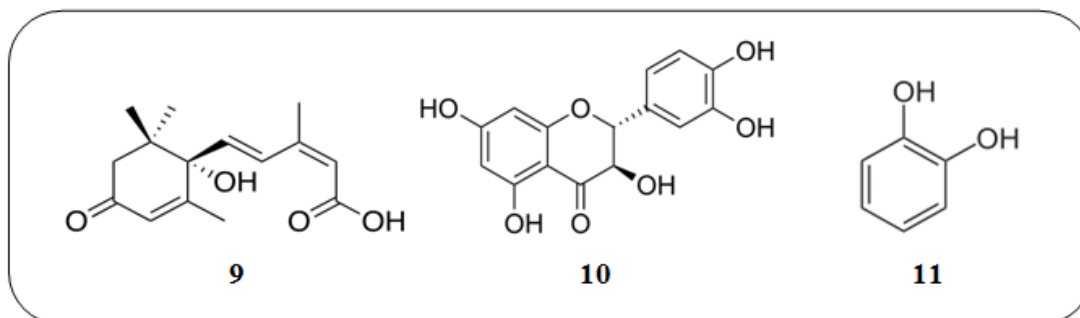


Figura 13. Substâncias identificadas em mel de *Melipona s. merrillae*.

Os polifenóis são substâncias naturais - metabólitos secundários de plantas - com estruturas fenólicas variáveis, e são os antioxidantes mais abundantes em nossa dieta. Eles são comuns nas frutas (maçãs, amoras, mirtilos, melão, romã, cerejas, uvas, peras, ameixas, framboesas, morango), vegetais (brócolis, aipo, cebola, salsa), grãos, cereais, casca, raízes (como a cenoura), azeite, legumes secos, chocolate, mel e bebidas, como chá verde e branco, café, sucos de frutas e vinho tinto (MANACH *et al*, 2004; SCALBERT *et al*, 2005).

Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais, e algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários formados pela ação destes antioxidantes são relativamente estáveis, devido a ressonância do anel aromático apresentado em suas estruturas.

2.7 Métodos de caracterização do mel

Cada mel é único na sua composição química, a quantidade e a combinação dos vários componentes dão a cada mel características organolépticas únicas e individuais. O controle e a caracterização da qualidade e origem botânica dos méis são de grande importância e interesse na meliponicultura e na apicultura.

Quando se discute a caracterização do mel, também descrita como autenticidade do mel, tem que se pensar em dois aspectos diferentes: autenticidade em relação à produção de mel, e autenticidade em relação à descrição da origem geográfica e botânica. Para identificar

a autenticidade de méis várias abordagens têm sido usadas. Hoje, as técnicas mais importantes para determinar ou certificar a origem botânica e geográfica de méis são as análises melissopalínológicas, parâmetros físico-químicos, perfil químico e a avaliação das características organolépticas. A identificação da origem floral de méis é uma tarefa difícil e não existe atualmente um método que forneça resultados precisos e inequívocos. Existem muitas espécies de abelhas produtoras de méis e fontes florais, e estas são influenciadas pelo clima, solo, temperatura e condições de crescimento.

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

A avaliação da qualidade do mel pela análise polínica e mesmo sensorial são métodos às vezes demorados e que dependem muito do treinamento do analisador. Além disso, alguns tipos de adulterações (por exemplo, a adição de açúcar concentrado) dificilmente podem ser detectados com estes métodos.

Embora o mel seja composto principalmente por açúcares e água, as frações químicas menores, na verdade, são as que determinam a sua origem floral e também o seu valor comercial. Essas frações menores são fortemente dependentes da origem botânica ou do néctar da planta (YAO *et al.*, 2004). Assim, o desenvolvimento de metodologias analíticas para a tipificação do mel vem recebendo muita atenção no meio científico nos últimos anos; e as técnicas analíticas instrumentais têm surgido como alternativas promissoras, muitas vezes por apresentar baixo consumo de reagentes e de amostra, rapidez e robustez nas análises e alta resolução na separação, identificação e quantificação de diversas substâncias (KAŠKONIENE & VENSKUTONIS, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2014).

Nas últimas décadas, os métodos de controle de qualidade em conjunto com análise estatística multivariada, têm sido usados com sucesso para classificar o mel de diferentes regiões geográficas, detectarem adulteração e descreverem suas características químicas (CORDELLA *et al.*, 2003; PUSCAS *et al.*, 2013). Elas baseiam-se, por exemplo, na determinação do perfil químico dos flavonoides, substâncias voláteis, aminoácidos e na composição de carboidratos.

Recentemente, têm também sido propostos técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) para identificar e classificar o mel de diferentes origens florais e geográficas. Uma das principais vantagens desta técnica é que a informação estrutural e quantitativa pode ser obtida numa grande variedade de espécies químicas em uma única experiência de RMN. Outra vantagem dessa técnica comparada a outros métodos analíticos são: a abordagem não-invasiva e relativamente fácil, aquisição de dados rápida (CALIGIANI *et al*, 2007), e a utilização de pequena quantidade de amostra. Como o RMN é uma técnica poderosa usada para obter informação estrutural (BLAU *et al*, 2008; VALENTE *et al*, 2008), pode portanto ajudar a compreender a estrutura de componentes em complexos sistemas como o do mel (CAZOR, *et al*, 2006). Esta técnica é frequentemente aplicada a amostras de alimentos que podem ser diretamente analisados como líquidos, mas a extração é muito simples e procedimentos para preparo da amostra pode também ser usado.

Em trabalhos realizados por Consonni e Cagliani (2008) mostraram que a composição de diferentes carboidratos pode ser usada para distinguir méis de diferentes origens geográficas e propôs a possibilidade de separar mel de acácia de polifloral. O espectro de RMN de ^{13}C foi sugerido como a melhor forma de examinar a composição de carboidratos.

Como a riqueza de informação fornecida pelo espectro de RMN torna sua interpretação complexa para ser analisada ou comparada a olho nu, a análise multivariada pode, portanto, ser aplicada diretamente sobre os dados espectrais para extrair as informações úteis. Diversos trabalhos têm demonstrado à alta eficiência destes métodos acoplados a espectroscopia para classificar amostras de méis ou para detectar alguma adulteração.

A combinação da quimiometria com dados de RMN também pode dar resultados interessantes para fins de autenticação de alimentos em geral, tal como já foi demonstrado por diferentes autores (BERETTA *et al*, 2008; BOFFO *et al*, 2009; BOFFO, *et al*, 2009a; CONSONNI & CAGLIANI, 2008; PRESTES *et al*, 2007.; SCHIEVANO *et al*, 2010). Lolli e colaboradores (2008) utilizaram experimentos bidimensionais por RMN (HMBC) juntamente com análise estatística multivariada, para classificarem amostras de diferentes origens botânicas.

Técnicas quimiométricas têm sido amplamente utilizadas como as mais poderosas ferramentas para caracterizar e classificar as amostras para a análise da origem geográfica e botânica, como a análise de componentes principais (PCA), mínimos quadrados parciais (PLS), análise parcial de discriminação por quadrados mínimos (PLSDA) e modelagem

suave independente da analogia de classes (SIMCA) (DI *et al*, 2002; EUI-CHEOL *et al*, 2010).

Portanto, a busca de métodos que possam ser mais rápidos e adequados para a caracterização do mel nas análises de rotina, particularmente quando estão envolvidas muitas amostras em um curto período de tempo, estão sendo realizados com o auxílio de novas técnicas instrumentais, tais como espectroscopia de absorção atômica (AAS) (HERNÁNDEZ *et al.*, 2005), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (ZHOU *et al.*, 2014, AHMED *et al*, 2014; SALGUEIRO *et al*, 2014), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) (KUS´ *et al*, 2014), Espectrometria de Massas com Ionização por "Electrospray" (ESI-EM) (BERETTA *et al.*,2007), Ressonância Magnética Nuclear (JAMRÓZ *et al*, 2013; TUBEROSO *et al.*, 2010), Espectroscopia de Fluorescência (SERGIEL *et al*, 2014), e Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (ALMEIDA-MURADIAN *et al*, 2013).

3. Objetivo Geral

Visando ampliar e produzir conhecimento sobre o mel de abelhas nativas sem ferrão, faz-se necessário analisar estes méis de forma a determinar sua identidade, conhecer sua composição e avaliar seus efeitos na saúde quando adotados na dieta da população. Assim, esse trabalho tem como objetivos avaliar a composição físico-química, identificar biomarcadores potenciais e estudar a capacidade antioxidante *in vitro* de diferentes amostras de méis elaborados por abelhas nativas.

3.1. Objetivos Específicos

- Analisar as amostras de mel de diferentes espécies de abelhas nativas quanto aos seguintes parâmetros físico-químicos: cor e o teor de HMF utilizando método espectrofotométrico, pH, acidez livre, açúcares (redutores e não redutores) e umidade.

- Determinar o conteúdo de aminoácidos livres pelo método de cádmio- ninidrina, e proteínas totais pelo método de Bradford das amostras de méis *in natura*.

- Determinar o conteúdo de fenólicos totais pelo método colorimétrico de Folin-Denis e o conteúdo de flavonoides totais, através do método de complexação com cloreto de alumínio das amostras de méis e dos seus extratos.

- Realizar estudo da capacidade antioxidante para as amostras de méis *in natura* e dos extratos pelos métodos de captura de radicais livres (DPPH e ABTS) e pelo poder de redução do ferro (FRAP).

- Identificar e quantificar as principais substâncias presentes nos extratos dos méis através de cromatografia líquida em fase reversa (CLAE).

- Aplicar os métodos de análise exploratória (PCA) aos resultados das análises físico-químicas, de RMN de ^1H e CLAE-DAD para verificar quais substâncias são responsáveis pela diferenciação dos méis.

- Aplicar análise multivariada para discriminar os méis produzidos por diferentes espécies de abelha (meliponíneos x *mellifera*).

4. Parte Experimental

4.1. Material e Métodos

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

Os reagentes: carbonato de sódio anidro, cloreto de alumínio hexaidratado, tungstato de sódio diidratado, ácido fosfomolibdico, ácido fosfórico, ferrocianeto de potássio, acetato de zinco, bissulfito de sódio foram comprados da VETEC (RJ, Brasil). Enquanto os reagentes 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ), 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) [ABTS] e Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich (USA). Os padrões de ácido gálico, HMF, ácido protocatecuico, ácido *p*-hidroxi-benzoico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido benzóico, naringerina, ABA (ácido abscísico), ácido vanílico, luteolina e canferol utilizados em CLAE-DAD foram obtidos pela Sigma-Aldrich (USA).

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

As leituras de absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (NOVA 2000 UV, Novainstruments, São Paulo) e as determinações de pH foram realizadas em pHmêtro (Analyser pH 300, Fisatom, São Paulo). Os ensaios com DDPH foram

determinados em leitor de microplacas ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorvent Assay), modelo 680 Microplate Reader (Bio-Rad, São Paulo, Brasil).

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), modelo Prominence da marca Shimadzu, constituído por duas bombas série LC-20AT, detector de arranjo de diodos (série SPD-M20A), autoinjeter (SIL-10A) e forno de coluna CTO-20A (Shimadzu). O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito através do software LCSolution (Shimadzu). A fase móvel utilizada na análise por CLAE foi composta de água ultrapura, metanol e ácido acético graus espectroscópicos (VETEC, RJ, Brasil). A fase móvel foi filtrada através de uma membrana de nylon 0,45 µm (Sartorius) para remover todas as impurezas.

Os espectros de RMN ^1H foram registrados em um espectrômetro Bruker Avance 500 MHz (Bruker Biospin GmbH Rheinstetten, Karlsruhe, Alemanha) equipado com uma sonda 5 mm e gradiente. Os extratos foram solubilizados em 600 µL de metanol deuterado (Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 99,9 átomo% D, Andover, Estados Unidos). Todos os espectros foram registrados a 298 ± 0.1 K, com 10330 Hz de largura espectral, 32 k pontos de dados, 16 transientes e ganho do receptor constante.

4.2. Amostras de Mel

Nesse trabalho foram analisadas vinte amostras de méis de diferentes espécies de abelha indígena, sendo oito de *Scaptotrigona* sp (abelha canudo) do município de Belterra-Pará, uma de *Melipona fasciculata* (abelha tiúba) do estado do Maranhão, dez de *Tetragonisca angustula* (abelha jataí) do município de Ilha Grande - Rio de Janeiro e uma amostra cuja a espécie não foi indicada pelo meliponicultor, do município de Inhangapi – Pará (**Tabela 3**). Todas as amostras de méis foram obtidas de forma asséptica pelos produtores diretamente das colmeias, na forma centrifugada e foram mantidos em frascos de vidro ou plástico bem fechado sob refrigeração antes das análises.

Tabela 3 - Amostras de méis de abelhas sem ferrão estudadas neste trabalho.

Código das Amostras	Espécie de abelhas	Local	Ano da coleta
SC1	<i>Scaptotrigona sp</i>	Belterra- Pará	2011
SC2	<i>Scaptotrigona sp</i>	Belterra- Pará	2012
SC3	<i>Scaptotrigona sp</i>	Belterra- Pará	2011
SC4	<i>Scaptotrigona sp</i>	Belterra- Pará	2012
SC5	<i>Scaptotrigona sp</i>	Belterra- Pará	2013
SC6	<i>Scaptotrigona sp</i>	Belterra- Pará	2013
SC7	<i>Scaptotrigona sp</i>	Belterra- Pará	2013
SC8	<i>Scaptotrigona sp</i>	Belterra- Pará	2013
MF1	<i>Melipona fasciculata</i>	São L.Maranhão	2012
NI1	Não Identificada	Inhangapi- Pará	2012
TA1	<i>Tetragonisca angustula</i>	Ilha Grande-RJ	2006
TA2	<i>Tetragonisca angustula</i>	Ilha Grande-RJ	2006
TA3	<i>Tetragonisca angustula</i>	Ilha Grande-RJ	2006
TA4	<i>Tetragonisca angustula</i>	Ilha Grande-RJ	2006
TA5	<i>Tetragonisca angustula</i>	Ilha Grande-RJ	2006
TA6	<i>Tetragonisca angustula</i>	Ilha Grande-RJ	2006
TA7	<i>Tetragonisca angustula</i>	Ilha Grande-RJ	2006
TA8	<i>Tetragonisca angustula</i>	Ilha Grande-RJ	2006
TA9	<i>Tetragonisca angustula</i>	Ilha Grande-RJ	2006
TA10	<i>Tetragonisca angustula</i>	Ilha Grande-RJ	2006

No âmbito deste trabalho não foram realizadas análises físico-químicas bem como da capacidade antioxidante de méis de *Apis mellifera*, no entanto, foram utilizados dados obtidos e cedidos gentilmente por Salgueiro (2012) e publicados recentemente (SALGUEIRO *et al*, 2014) por serem de interesse para aplicação da análise multivariada na comparação com os dados dos méis de abelha sem ferrão.

4.3. Análises Físico-químicas do mel de abelhas sem ferrão

Os procedimentos analíticos foram realizados de acordo às diretrizes e metodologias recomendadas pela legislação brasileira (BRASIL, 2000) e os parâmetros analisados foram teor de umidade, cor, HMF, pH, acidez, açúcares redutores e não redutores.

4.3.1. Determinação da Umidade

Pela Legislação Vigente, o teor máximo de umidade permitido para méis de flores ou de melato é de 20%. O princípio deste método consiste na determinação do índice de

refração do mel a 20°C que é convertido para o conteúdo de umidade através de uma tabela de referência, a qual fornece a concentração como uma função do índice de refração.

Pesou-se 5g de mel e colocou-se no refratômetro sendo anotado o valor dado chamado de índice de refração. Com o índice de refração auxiliado pela Tabela de Chataway, calculou-se a umidade do mel.

4.3.2. Determinação espectrofotométrica da cor do mel

Para determinação da cor do mel foi utilizado o método descrito por Naab *et al.*, (2008) obedecendo a escala Pfund (Tabela 4). Este método consiste na medida de absorvância a 635nm (Abs_{635}) de uma solução 50% (m/v) de mel em água. A amostra é diluída e homogeneizada em banho de ultrassom e os testes realizados com três repetições. As médias das absorvâncias foram convertidas para a escala Pfund, e a cor é expressa em mmPfund, e calculada através da seguinte fórmula:

$$\text{Cor} = (371,39 \times Abs_{635}) - 38,7$$

Tabela 4 – Classificação do mel de acordo com escala de Pfund (Naab *et al.*, 2008).

Coloração	mmPfund	Abs ₆₂₅
Branco d'água	0 – 8	0,104 – 0,125
Extra branco	8,1 – 16,5	0,125 – 0,148
Branco	16,6 – 34	0,148 – 0,195
Extra âmbar claro	34,1 – 50	0,195 – 0,238
Âmbar-claro	50,1 – 85	0,238 – 0,333
Âmbar	85,1 – 114	0,333 – 0,411
Âmbar escuro	114,1 ou mais	0,411 ou mais

4.3.3. Determinação do teor HMF no mel

A determinação do teor de 5-hidroximetilfurfural (HMF) nos méis foi realizada segundo a metodologia descrita na Instrução Normativa recomendada pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 2000).

4.3.3.1. Preparo dos Reagentes

No preparo da solução de Carrez I, foram dissolvidos 15 g de ferrocianeto de potássio em água destilada e o volume completado para 100 mL, em balão volumétrico. Já

para a solução de Carrez II, foram dissolvidos 30g de acetato de zinco em água destilada e o volume completado para 100 mL, em balão volumétrico.

A solução de bissulfito de sódio a 0,2% m/v foi preparada dissolvendo-se 0,2g de bissulfito de sódio em água destilada, e o volume diluído para 100 mL, em balão volumétrico.

4.3.3.2. Procedimento experimental

Solubilizou-se 5 g do mel em um béquer com 25 mL de água destilada, em seguida, transferiu-se a mistura para balão volumétrico de 50 mL. Logo após, foi adicionado e misturado 0,5 mL de solução de Carrez I e depois 0,5 mL de solução de Carrez II, completando-se o volume com água. A mistura foi filtrada em papel filtro qualitativo, descartando-se os primeiros 10 mL do filtrado. Em seguida, 5 mL da solução foi transferida para dois tubos de ensaio, onde foram adicionados 5 mL de água em um dos tubos (amostra) e 5 mL de solução de bissulfito de sódio 0,2% no outro (referência). As soluções foram homogeneizadas e as leituras determinadas no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 284 e 336 nm em cubeta de quartzo de 1cm. Para cada amostra, o mesmo procedimento foi repetido no mínimo três vezes. Se a absorvância for maior que 0,6 a solução da amostra deverá ser diluída com água e a solução de referência diluída com solução de bissulfito de sódio 0,10%, na mesma proporção.

A determinação do HMF é calculada pela aplicação da equação abaixo:

Equação :
$$\frac{(A_{284} - A_{336}) \times 149,7 \times 5}{P} = \text{HMF mg/Kg}$$
 onde:

A_{284} = leitura da absorvância a 284 nm

A_{336} = leitura da absorvância a 336 nm

P = massa da amostra de mel em g

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

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

Onde: Peso molecular do HMF = 126

absortividade molar do HMF a 284nm = 16830

mg/g = 1000

centilitro/litro = 10

g/Kg = 1000

gramas de mel = 5

4.3.4. Determinação do pH e Acidez Livre

Para cada amostra solubilizou-se 10 g de mel em um béquer com 75mL de água destilada e realizou-se a medida com o medidor de pH devidamente calibrado (pH= 4,0 e pH=7,0). A acidez livre foi determinada através da adição de 2 gotas de solução de fenolftaleína 1% e titulando-se com uma solução de hidróxido de sódio 0,05M (padronizada com biftalato de potássio) em bureta de 25 mL, até o ponto de viragem (solução levemente rósea que persiste por 10 segundos; pH 8,5) (AOAC, 2003).

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

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

M = molaridade exata da solução de NaOH após padronização.

V = volume de solução de NaOH utilizado na titulação.

4.3.5. Determinação de Açúcares Redutores e Sacarose Aparente

Para as análises de açúcares redutores em glicose e não redutores em sacarose foi utilizado o método recomendado pela legislação brasileira, através da Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000). Para a quantificação de açúcares redutores e açúcar não redutor foi utilizado o método titulométrico (AOAC, 1997). O método para a determinação dos açúcares redutores, como glicose e frutose, baseou-se na capacidade dos açúcares da solução de mel a 20% reduzirem o cobre presente na solução cuproalcalina (Solução de Fehling), sob ebulição. Em meio alcalino, os íons cúprico Cu^{+2} são reduzidos a íons cuprosos Cu^{+} , e os açúcares são oxidados a ácidos orgânicos. A solução passa da coloração azul a vermelho tijolo, e deve ficar constantemente em ebulição durante a titulação, porque o Cu_2O formado pode ser novamente oxidado pelo O_2 do ar, voltando a apresentar a cor azul. A segunda etapa consistiu em hidrolisar a solução de mel a 20%, sob aquecimento, e depois de neutralizada, é titulada com as soluções de Fehling conforme descrito anteriormente. O percentual de açúcar não redutor presente na solução foi feito pela diferença entre os dois percentuais calculados (açúcares redutores e açúcares totais) multiplicando-se pelo fator 0,95.

4.4. Determinações de fenólicos totais com reagente de Folin-Denis

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras de méis e extratos foi realizada por método espectrofotométrico utilizando o reagente de Folin-Denis com modificações (FOLIN e DENIS, 1912; SANT'ANA, 2010).

4.4.1. Preparo do reagente de Folin-Denis

Em um balão de fundo redondo de 250 mL acoplado a um condensador de refluxo, foram adicionados 20g de tungstato de sódio diidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 4g de ácido fosfomolibdico ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]_x \cdot \text{H}_2\text{O}$), 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 ultrapura. A solução apresentou coloração esverdeada e foi armazenada em frasco âmbar, sob refrigeração, até o momento do uso (LIANDA, 2009).

4.4.2. Procedimento Experimental

Para cada amostra de mel *in natura* foi preparado uma solução na concentração de 100 mg/mL em água ultrapura. Para a determinação em extratos de mel foram preparadas soluções na concentração de 2 mg/mL em metanol espectroscópico. A uma alíquota de 0,5 mL dessa solução foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos adicionaram-se 2,0 mL de uma solução aquosa 14% de carbonato de sódio, 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 da sua absorbância a 760 nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1cm de caminho óptico e água ultrapura como branco (PÉREZ *et al.*, 2007)(**Figura 14**). Uma solução de ácido gálico foi utilizada para construção da curva de calibração e o teor de fenólicos totais foi calculado e expresso como mg de equivalentes em ácido gálico por 100 g de mel (mg EAG/100 g). As análises foram realizadas com três repetições.

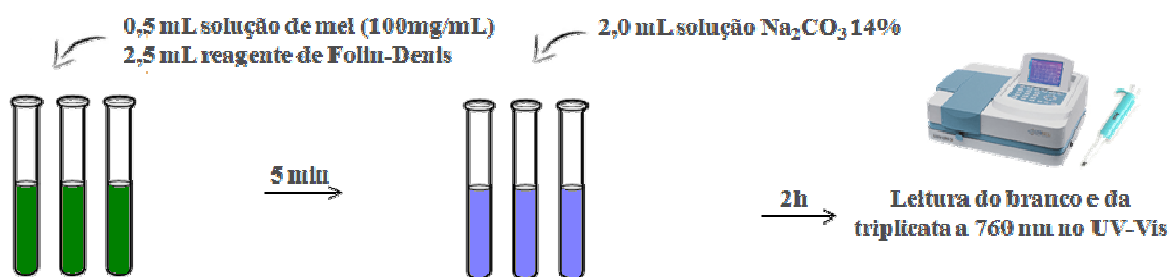


Figura 14 - Determinação de fenólicos totais com reagente de Folin-Denis.

4.4.3. Construção 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 14% de carbonato de sódio, recém-preparada. As leituras foram feitas a 760 nm, utilizando-se água ultrapura como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0, e sua equação foi definida como $Y = 0,083 + 81,759.X$, 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 (**Figura 15**). 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. Todas as análises foram realizadas com três repetições.

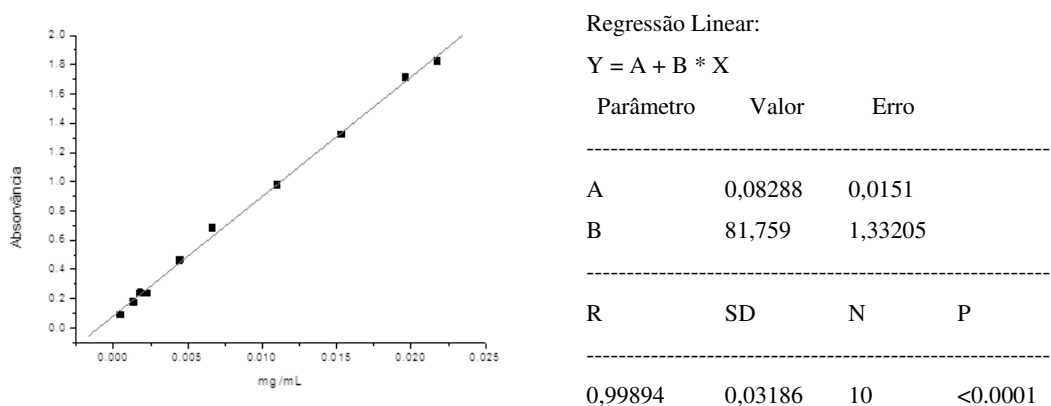


Figura 15 - Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico *versus* as absorbâncias (760 nm) para os ensaios de Folin-Denis.

4.5. Determinações de flavonoides totais com cloreto de alumínio

O teor de flavonoides totais foi determinado segundo adaptação da metodologia descrita na literatura utilizando como reagente o cloreto de alumínio (MEDA *et al.*, 2005; AHN *et al.*, 2007). Foram preparadas as soluções de mel a 100 mg/mL em metanol grau espectroscópico/água ultrapura (1:1). A 2,0 mL da solução de mel foram adicionados 2,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso as soluções foram lidas a 415 nm, utilizando metanol como branco (**Figura 16**).

Para a determinação em extratos de mel foram preparadas soluções na concentração de 2 mg/mL em metanol (UV-HPLC). Todas as análises foram feitas com três repetições.

A concentração dos flavonoides totais dos méis e dos extratos foram determinadas utilizando uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida para

quercetina padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes em quercetina por 100g de mel (mgE_Q/100g) e todas as análises foram feitas com três repetições.

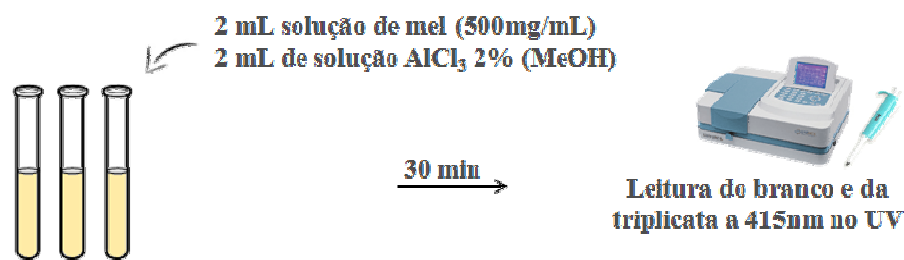


Figura 16- Determinação de flavonoides totais com cloreto de alumínio.

4.5.1. Construção da curva analítica da 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 μ L) 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 415nm, utilizando metanol como branco. A curva analítica foi feita a partir do programa Origin 6.0, sendo obtida a equação da reta $Y = 0,00482 + 47,44374.X$, onde Y é a absorbância a 415nm e X é a concentração de quercetina (**Figura 17**). O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,998. Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de flavonoides totais nas amostras, onde se substituiu Y pela média da absorbância de cada amostra de mel. Todas as análises foram realizadas com três repetições.

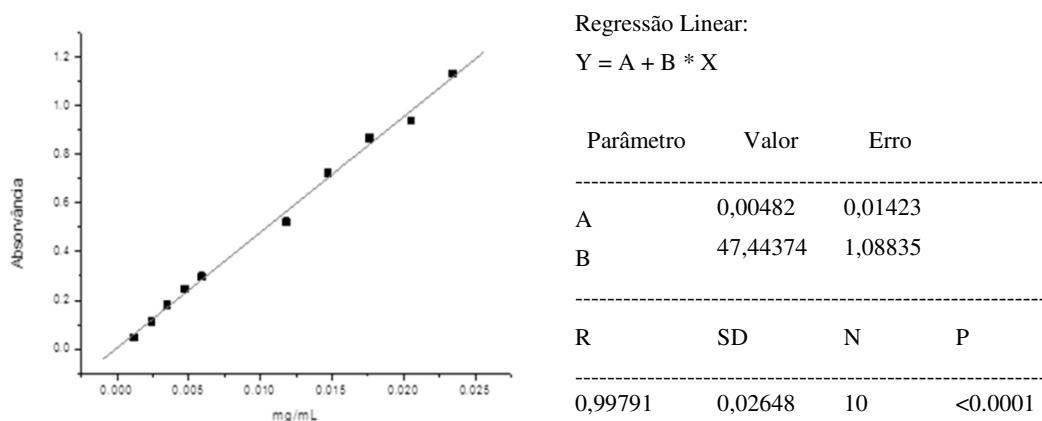
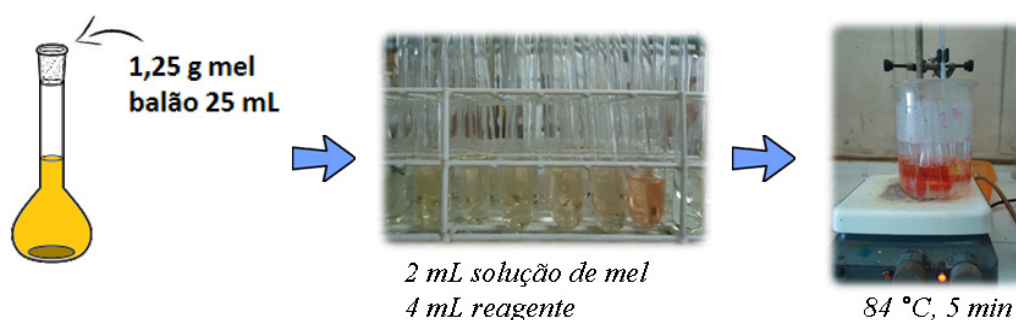


Figura 17 - Curva analítica das médias das concentrações da solução de quercetina *versus* as leituras de absorbâncias (415 nm), após o ensaio com cloreto de alumínio.

4.6. Determinação do teor de aminoácidos livres

Para a determinação dos aminoácidos livres foi utilizado o método cádmio-ninidrina descrito por Doi *et al.* (1981). Uma solução de 0,8 g de ninidrina foi misturada em 80 mL de etanol 99.5% e 10 mL de ácido acético, em seguida foi adicionado uma solução de 1,24 g de cloreto de cádmio dissolvido em 1mL de água destilada. Amostra de mel contendo 1,25 g foram diluídas em 25 mL de água destilada. A uma alíquota de 1mL dessa solução de mel adicionou-se 2,0 mL da solução reacional cádmio-ninidrina.

Manteve-se a mistura aquecida a 84°C por 5 minutos. Em seguida, fez-se a leitura da sua absorbância a 507nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1cm de caminho óptico e a solução reacional cádmio-ninidrina sem a amostra de mel foi usada como branco (**Figura 18**). Uma solução de *L*-leucina (2,5- 40 mg/L) foi utilizada como curva analítica e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de *L*-leucina por 100g de mel (mgE_{LE}/100g). Todas as análises foram realizadas com três repetições.



Após resfriamento, leitura a 507 nm
Branco: mistura sem a amostra

Figura 18 - Determinação de aminoácidos livres no mel.

4.6.1. Construção da curva analítica de *L*-leucina

A curva analítica foi construída a partir da solução aquosa do padrão de *L*-leucina (40 mg/mL). Alíquotas de 1 mL com concentrações variando de (2,5; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35 e 40 mg/mL), foram misturadas com 2,0 mL da solução reacional de cádmio-ninidrina. Manteve-se a mistura aquecida a 84°C por 5 minutos. As leituras foram feitas a 507 nm, utilizando solução reacional sem o padrão como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0 e sua equação foi definida como $Y = 0,005 + 0,1585 \cdot X$, onde Y é a absorbância a 507 nm e X é a concentração de *L*-leucina (**Figura 19**). O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,9996. Através dessa equação determinou-se o teor de

aminoácidos livres nas amostras (concentração X), substituindo Y pela média das absorvâncias obtidas para cada amostra de mel. Todas as análises foram realizadas com repetições.

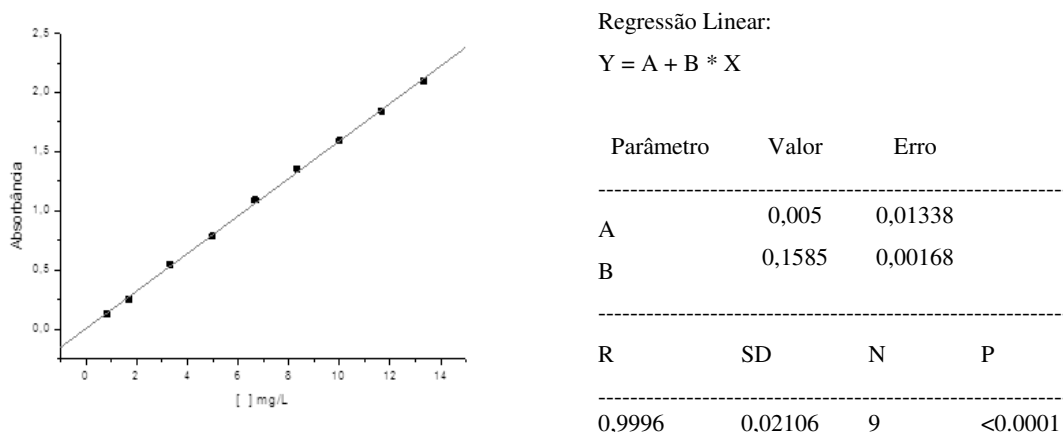


Figura19- Curva analítica das médias das concentrações da solução de L-leucina *versus* as leituras de absorvâncias (507 nm), após o ensaio com solução de cádmio- ninidrina.

4.7. Determinação do conteúdo de proteínas totais

Para a determinação do conteúdo de proteínas foi utilizado o método de Bradford, que se baseia na ligação do reagente azul brilhante de Coomassie G-250 com proteínas, onde há a formação de um complexo azul (BRANDFORD, 1976).

O reagente foi preparado através da dissolução de 0,1 g de azul brilhante de Coomassie G-250 em 50 mL de etanol 95%, seguido de adição de 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução obtida foi avolumada para 1000 mL com água ultrapura. Após filtração em papel de filtro quantitativo (Whatman nº1), a solução foi mantida em geladeira.

Em tubos de ensaio foram misturados 5,0 mL do reagente de Bradford a 100 µL da solução de mel (50% m/v). Após 2 min, as respectivas absorvâncias foram lidas a 595 nm em espectrofotômetro, utilizando-se a mistura reacional sem a amostra como branco (**Figura 20**). Todas as análises foram realizadas com três repetições. A média de cada repetição foi substituída na equação da curva analítica e os resultados foram expressos em mg de

equivalentes de albumina sérica bovina por 100g de mel ($\text{mg}_{\text{ASB}}/100\text{g}$).

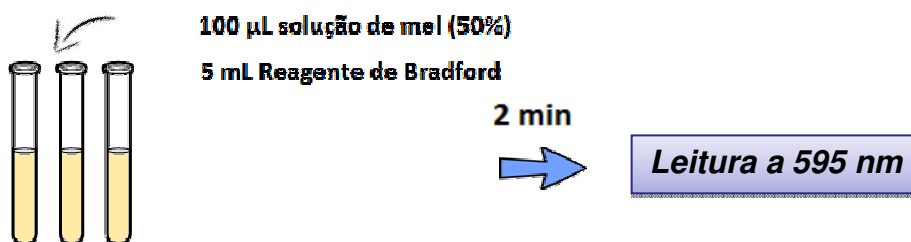


Figura 20- Determinação do conteúdo de proteínas totais no mel.

4.7.1. Construção da curva analítica de albumina sérica bovina (ASB)

A curva analítica foi construída utilizando-se albumina sérica bovina (ASB) em solução de cloreto de sódio a 0,15 M, na faixa de concentração de 0-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em tubos de ensaio foram misturados 5,0 mL do reagente de Bradford a 100 μL da solução de albumina sérica bovina. Após 2 min, as respectivas absorbâncias foram lidas a 595 nm em espectrofotômetro, utilizando-se a mistura reacional sem a amostra como branco. Todas as análises foram realizadas com três repetições. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0 e sua equação foi definida como $Y = 0,62695 + 0,000726 \cdot X$, onde Y é a absorbância a 595 nm e X é a concentração de albumina sérica bovina (ASB) (**Figura 21**). O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,9996 . Através dessa equação determinou-se o teor de proteína (concentração X), substituindo Y pela média das absorbâncias obtidas para cada amostra de mel.

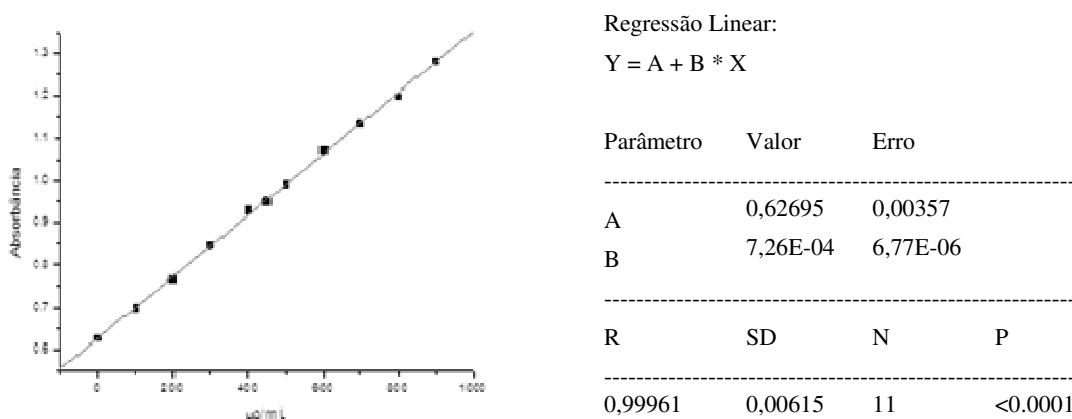


Figura 21 - Curva analítica das médias das concentrações da solução de albumina sérica bovina (ASB) versus as leituras de absorbâncias (595 nm), após o ensaio com reagente de Bradford.

4.8. Avaliação da capacidade antioxidante pelo método do DPPH

A avaliação da capacidade antioxidante foi realizada segundo metodologia descrita por PÉREZ *et al.*, (2007), com pequenas modificações. A porcentagem de atividade antiradicalar (%AA) é 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).

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

Abs amostra = absorvância da amostra com a solução de DPPH

Abs branco = absorvância da amostra com metanol

Abs controle = absorvância do metanol com a solução de DPPH

4.8.1. Determinação do CE₅₀ para amostra de mel e extratos

Para a determinação do CE₅₀ das amostras de mel, foram preparadas soluções de (2,5, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg/mL) em MeOH/H₂O (1:1), partindo de uma solução inicial de 100 mg/mL. Os ensaios foram realizados utilizando duas microplacas com 96 poços para cada amostra, com três concentrações em cada linha e em ordem crescente de diluição, onde foram pipetados 0,71µL das soluções de mel (fileiras B, C e D, da coluna 1 a 11). Como controle, nos seis primeiros poços (fileira A) foram pipetados 0,71µL de metanol, e para o branco foram pipetados 0,29µL de metanol e 0,71µL da solução de mel (colunas 10 e 11 da microplaca). Em seguida foram pipetados 0,29µL da solução de DPPH e adicionados em cada poço utilizado, exceto nos relativos aos brancos. Após 30 minutos de incubação no escuro, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro ELISA a 520nm (**Figura 22**). Todos os ensaios foram realizados com repetições.

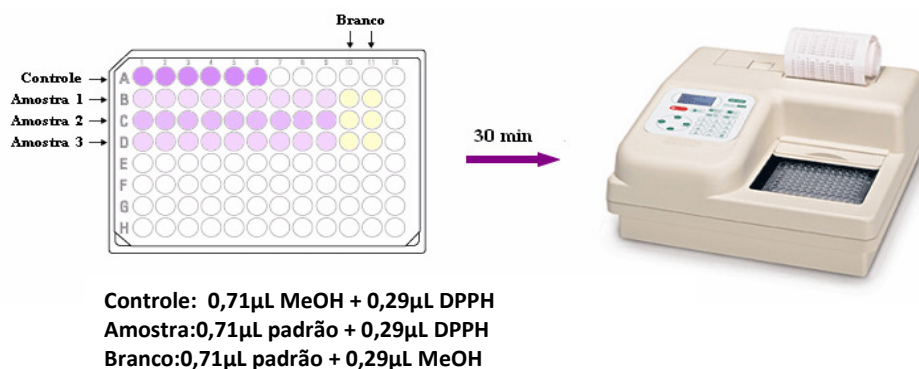


Figura 22 - Ensaio da atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA.

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

A concentração efetiva, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE₅₀), foi determinada para as amostras usando o programa Origin 6.0, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando na abscissa as concentrações da amostra (mg/mL) ou do controle positivo (µg/mL) e na ordenada, a porcentagem de atividade antioxidante (% AA).

Para a determinação do CE₅₀ dos extratos de mel, foram preparadas soluções de (500, 600, 700, 800, 900 e 1000 µg/mL) em metanol, partindo de uma solução inicial de 1000 µg/mL.

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 (355, 465, 497, 568, 639 e 710 µg/mL) foram obtidas para as amostras de mel diluídas de 500 a 1000 µg/mL.

A concentração efetiva, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE₅₀), foi determinada para as amostras usando o programa Origin 6.0, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando na abscissa as concentrações da amostra (µg/mL) e na ordenada, a porcentagem de atividade antioxidante (% AA).

4.9. Avaliação da Capacidade Antioxidante pelo Método de Redução do Ferro

A avaliação da capacidade antioxidante pelo método de redução do íon ferro (FRAP) foi realizado segundo a metodologia descrita por Bertonecelj *et al.* (2007). Este método testa a força antioxidante das substâncias, via avaliação da redução do complexo Fe³⁺-TPTZ (ferritripiridiltriazina) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] a ferroso-tripiridiltriazina (Fe²⁺-TPTZ), um complexo de cor mais intensa, na presença de antioxidantes. O reagente FRAP é obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M (pH 3.6), 2,5 mL de uma solução de 40 mM de HCl de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) à 10 mM e 2,5 mL

de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM, devendo ser usado imediatamente após sua preparação.

Soluções de méis em água na concentração de 100mg/mL foram preparadas. A uma alíquota de 0,5mL dessa solução adicionou-se 4,5mL de reagente de FRAP. Manteve-se a mistura aquecida a 37°C por 10 minutos, onde a coloração da solução passou de azul claro para azul escuro. Em seguida, fez-se a leitura da sua absorbância a 593nm, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e a solução de mel artificial como branco (Figura 23).

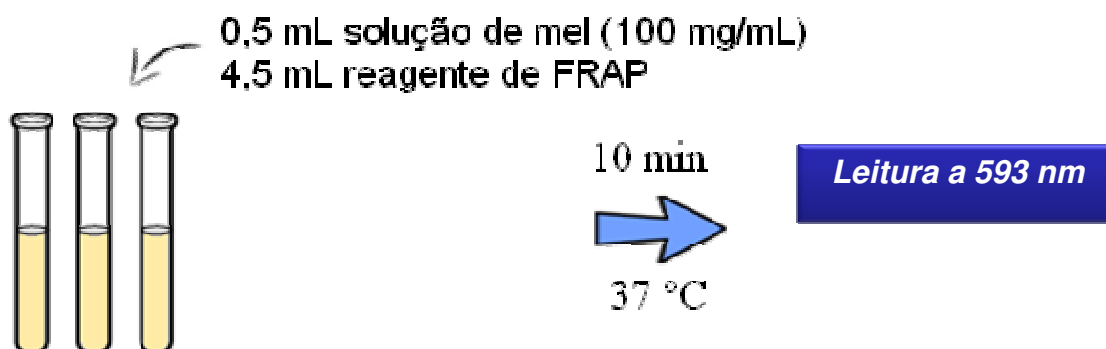


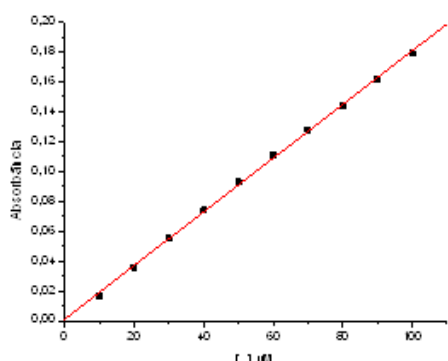
Figura 23 - Determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP).

Para a determinação da atividade antioxidante total em extratos de mel pelo método FRAP foram preparadas soluções na concentração de 2 mg/mL em metanol grau espectrosocópico. Todos os ensaios foram efetuados com repetições. Uma solução aquosa de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (100-1000 μM) foi utilizada como curva analítica e os resultados foram expressos em valores de FRAP ($\mu\text{mol Fe(II)}/100 \text{ g}$).

4.9.1. Construção da curva analítica com sulfato ferroso

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução aquosa do padrão de sulfato ferroso heptaidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Alíquotas de 0,5 mL de soluções de concentrações variando de (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 μM) foram transferidas para tubos de ensaio, na qual acrescentou-se 4,5 mL do reagente de FRAP. Os tubos de ensaio foram mantidos em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. As leituras foram feitas a 593nm, utilizando a solução reacional sem o padrão como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0, e sua equação foi definida como $Y = 0,00107 + 0,0018 \cdot X$, onde Y é a absorbância a 593 nm, X é a concentração de sulfato ferroso heptaidratado. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0.99961. Através dessa equação determinou-se a concentração equivalente de Fe(II) nas amostras (concentração X),

substituindo Y pela média das absorbâncias de cada amostra de mel. Todas as análises foram realizadas com três repetições. (**Figura 24**)



Linear Regression for Data1_B:

$$Y = A + B * X$$

Parameter	Value	Error	
A	0,00107	0,0011	
B	0,0018	1,78E-05	
R	SD	N	P
0,99961	0,00161	10	<0.0001

Figura 24 - Curva analítica das médias das concentrações da solução aquosa de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ versus as leituras de absorbâncias (593 nm), após o ensaio com reagente de FRAP.

4.10. Avaliação da Capacidade Antioxidante pela Captura do Radical-Cátion ($\text{ABTS}^{\cdot+}$)

A avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio com ABTS foi realizado segundo metodologia descrita por Rufino *et al.* (2007). O método consiste em medir a atividade antioxidante através da captura do radical-cátion $\text{ABTS}^{\cdot+}$. O radical-cátion $\text{ABTS}^{\cdot+}$ é preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque 7mM de ABTS com 88 μL da solução 140mM de persulfato de potássio. A mistura é mantida no escuro à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida, diluir 1 mL desta mistura com álcool etílico até obter uma absorbância de 0,700 nm \pm 0,05 nm a 734 nm. Preparar e usar apenas no dia da análise.

Soluções de méis em água na concentração de 100mg/mL foram preparadas. A uma alíquota de 50 μL dessa solução adicionou-se 5,0mL de reagente de ABTS. A leitura da sua absorbância a 734nm foi realizada após 6 minutos, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e álcool etílico como o branco.

Para a determinação da capacidade antioxidante total em extratos de mel pelo método ABTS foram preparadas soluções na concentração de 2 mg/mL em metanol espectroscópico. A curva analítica foi construída a partir de soluções de Trolox em concentração conhecida. Os resultados foram expressos em μg de equivalentes de Trolox por 100g de mel ($\mu\text{molTE}/100\text{g}$) e todas as análises foram feitas com repetições.

4.10.1 - Construção da curva analítica com Trolox

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução etanólica do padrão de Trolox. Em alíquotas de 50µL de concentrações variando de (0,0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1 e 2,4 mmol/L), adicionou-se 5,0 mL do reagente de ABTS. A leitura da sua absorvância a 734nm foi realizada após 6 minutos, utilizando a solução reacional sem o padrão como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0 e sua equação foi definida como $Y = -26.37778 \cdot X + 0.65164$, onde Y é a absorvância a 760 nm, X é a concentração de Trolox. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de -0.9997(Figura 25). Através dessa equação determinou-se a concentração equivalente em Trolox nas amostras (concentração X), substituindo Y pela média das absorvâncias de cada amostra de mel. Todas as análises foram realizadas com repetições.

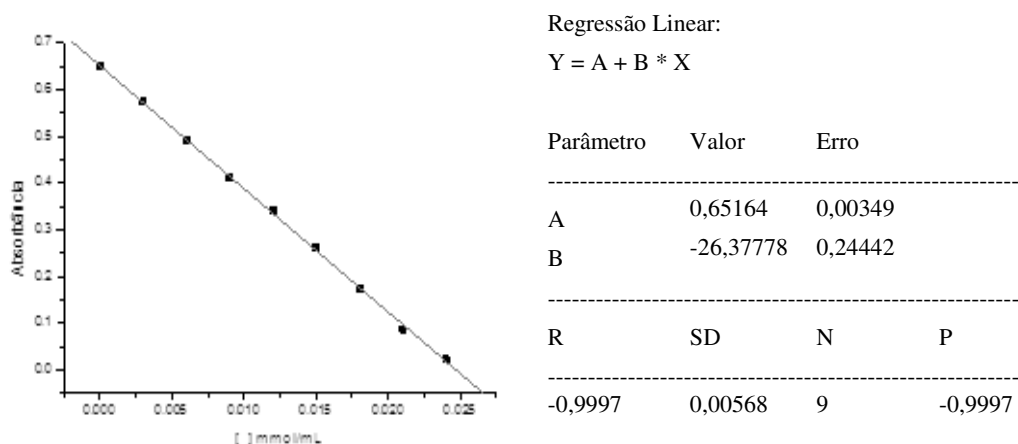
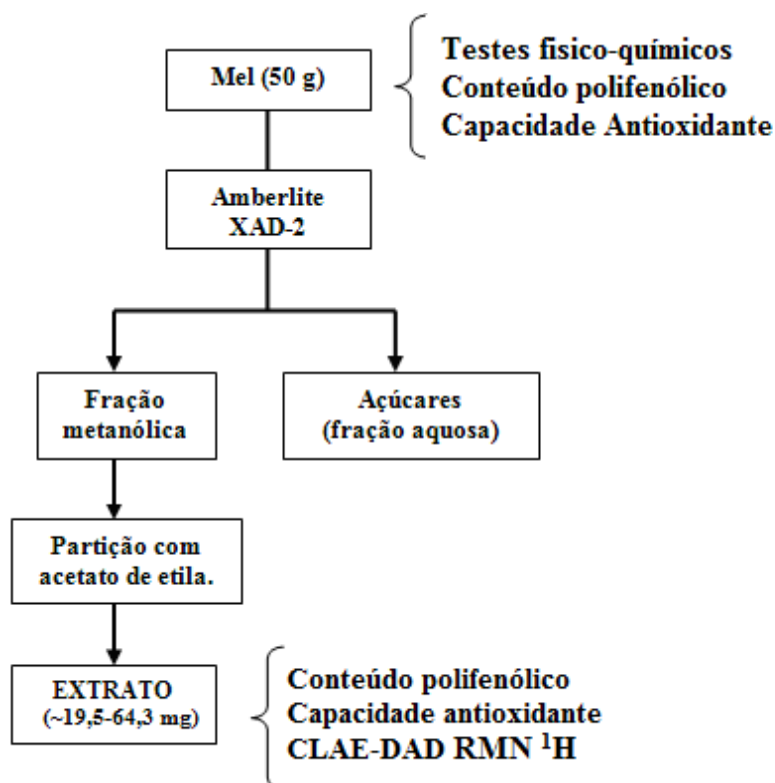


Figura 25 - Curva analítica das médias das concentrações da solução etanólica de Trolox *versus* as leituras de absorvâncias (760 nm), após o ensaio com reagente de ABTS.

4.11. Preparo dos Extratos de Mel

As substâncias fenólicas foram extraídas do mel segundo metodologia descrita previamente na literatura (FERRERES *et al*, 1994; MARTOS *et al*, 2000; TOMÁS-BARBERÁN, *et al*, 2001) com algumas modificações (LIANDA, 2004). Para o preparo dos extratos foram pesados cerca de 50 gramas de mel, os quais foram misturados com 250 mL de água destilada, ajustada a pH = 2 com ácido clorídrico concentrado e agitada com agitador magnético, a temperatura ambiente, até completa dissolução. Em seguida, a amostra fluida foi filtrada através de algodão para eliminar possíveis partículas sólidas. O filtrado foi então misturado com cerca de 75 gramas de resina Amberlite XAD-2 (poro 9 nm e

partícula 0,3-1,2 mm) , agitado por 10 minutos e empacotada em uma coluna de vidro (45 x 3,5 cm). O material contido na coluna foi lavado primeiramente com 100 mL de água acidificada (pH = 2 com HCl concentrado), e depois com 150 mL de água destilada para remover todos os açúcares e outros constituintes polares do mel, enquanto as substâncias fenólicas permaneceram na coluna. A fração fenólica adsorvida na coluna foi então eluída com 350 mL de metanol. Esta fração metanólica foi reunida, concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório a 40° C. O extrato metanólico bruto foi pesado e armazenado a 4 °C até ser utilizado no processo de extração líquido-líquido com acetato de etila. O resíduo metanólico foi solubilizado em água destilada, e em seguida fez-se a extração líquido-líquido com acetato de etila (5 x 10 mL). As fases orgânicas foram reunidas, secas com sulfato de sódio anidro, concentradas até secura em rotavapor a 40°C e pesadas para obteção dos extratos de acetato de etila. (LIANDA *et al*, 2012). O extato foi redissolvido em metanol grau espectroscópico para ser analisado por CLAE-DAD. (Esquema 1).



Esquema 1 - Modelo esquemático do preparo dos extratos do mel.

4.12. Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD)

As análises dos extratos de mel foram realizadas por CLAE-DAD e as separações feitas em coluna analítica de fase reversa C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm de partícula, Betasil, Thermo), mantida a 30 °C. A fase móvel foi constituída por uma mistura de água: ácido acético (99:1, solvente A) e metanol (solvente B), velocidade de fluxo constante (1,0 mL/min) e o volume injeção de 20µL. O seguinte gradiente de eluição foi usado: 35 a 80% de B em 20 minutos; 80 a 92% B em 25 minutos e 100% B em 30 minutos, após 3 minutos nessa concentração retornou a 35% de B. Os cromatogramas foram monitorados a 280 e 340 nm, visto que a maioria das substâncias fenólicas encontradas nos méis mostram seus máximos de absorção no ultravioleta, próximos a esses comprimentos de onda (SALGUEIRO *et al*, 2014). Todas as análises foram realizadas com três repetições. A identificação dos ácidos fenólicos e flavonoides nos cromatogramas dos méis foram feita por comparação direta dos tempos de retenção, coinjeção e análises das curvas de absorção no UV, com as curvas de absorção dos padrões, obtidas no detector de arranjo de diodos (DAD).

4.12.1 - Construção das Curvas Analíticas com os padrões

As soluções analíticas de referência foram preparadas por sucessivas diluições a partir de uma solução mãe em metanol na concentração de 100 g/mL de cada um dos padrões: ácido gálico, HMF, ácido protocatecuico, ácido *p*-hidroxi-benzoico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido benzóico, naringerina, ABA (ácido abscísico), ácido vanílico, luteolina e canferol (todos 99,0% de pureza). As curvas analíticas foram construídas utilizando a padronização externa, a partir de 8 pontos das soluções dos padrões em metanol nas concentrações de (2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 35,0 e 50,0 g/mL), preparadas no mesmo dia em que se realizaram as análises.

A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0 (UFRRJ), onde foi efetuada a regressão linear e obtida a equação da reta [$y = a + b.x$], relacionando a concentração de cada solução injetada com a respectiva área obtida no cromatograma. Através das equações (**Tabela 5**) determinou-se a concentração de cada padrão identificado nos extratos analisados.

Tabela 5 - Resultados obtidos a partir da curva analítica preparada com diferentes padrões.

Substâncias Padrão	R	Equação da reta: $Y = A + B * X$
Ácido gálico	0,99994	$Y = -148731 + 202759,1 * X$
HMF	0,99868	$Y = -348554 + 612541,7 * X$
Ácido protocatecuico	0,99004	$Y = 138543333 + 53282,2 * X$
Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzoico	0,99573	$Y = 82440 + 26298,3 * X$
Ácido ferúlico	0,99961	$Y = -986283333 + 1388253 * X$
Ácido <i>p</i> -cumarico	0,99448	$Y = 375770 + 258398,7 * X$
Ácido benzóico	0,99609	$Y = 2115 + 15989,95 * X$
Naringerina	0,99780	$Y = 10621533333 + 139121,3 * X$
ABA	0,99995	$Y = -787549 + 82394,53 * X$
Ácido vanílico	0,99990	$Y = 158973000000 + 156752000000 * X$
Canferol	0,99563	$Y = -24195 + 49516,85 * X$
Luteolina	0,99952	$Y = 8971633333 + 53149,6 * X$

4.13 - Tratamento Quimiométrico

Todas as análises foram realizadas com três repetições e os valores foram expressos como a média \pm desvio padrão. Os desvios padrão foram calculados usando o Microsoft Excel 2010.

Os dados obtidos de RMN e CLAE foram convertidos em uma matriz (m x n) em planilha usando o Microsoft Excel 2010 e importado para The Unscrambler® 10.1 para análise estatística multivariada. Todos os espectros de RMN de ^1H obtidos foram processados em grupo utilizando o software ACD / Spec Manager (ACD Laboratories, versão 12.0, Toronto, Canadá).

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

Para interpretação dos dados foi utilizando a análise dos componentes principais (PCA).

4.14. Tratamento estatístico dos dados

Para interpretação dos dados obtidos pelas variáveis FRAP, ABTS, DPPH, fenóis, flavonoides, proteínas, aminoácidos e cor (Pfund) foi gerada uma matriz de correlação (Pearson r). Neste tipo de análise valores de r acima de 0,7 indicam uma forte correlação, valores entre 0,3 – 0,69 uma correlação significativa e fraca abaixo de 0,3 entre os dados.

Todas as operações matemáticas e estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas BioEstat 5.0 e Excel 2010.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização físico-química do mel de abelha sem ferrão

Os procedimentos analíticos realizados nesse trabalho estão de acordo às diretrizes e metodologias recomendadas pela Legislação Brasileira e possibilitou avaliar a qualidade de vinte amostras de mel de meliponíneos de diferentes origens geográficas e botânicas. Os resultados obtidos para as análises físico-químicas (HMF, acidez total, pH, açúcares redutores, sacarose aparente, umidade) e cor dos 20 méis de meliponíneos estão apresentados na **Tabela 6**. Visando a comparação das características encontradas para as diferentes espécies de abelhas sem ferrão, os valores encontrados nesse trabalho serão comparados aos valores encontrados para méis de *Apis mellifera* relatados por Salgueiro (2012).

Tabela 6 – Valores médios e os desvios padrões dos parâmetros físico-químicos e cor para os diferentes méis de meliponíneos.

Amostras*	HMF (mg./kg)	Acidez (mEq/kg)	pH	Açúcares Redutores (%)	Sacarose (%)	Açúcares Totais (%)	Umidade (%)	Escala (mmPfund)	Cor
SC1	1,99±0,21	85,73±1,38	3,72±0,02	58,40±0,24	2,14±1,45	60,66±1,29	29,4±0,00	165,39±0,00	Âmbar escuro
SC2	0,75±0,32	99,34±0,99	3,58±0,06	52,41±0,12	0,35±0,33	52,78±0,39	29,0±0,00	126,03±0,00	Âmbar escuro
SC3	0,46±0,10	54,06±1,73	3,85±0,01	55,02±0,64	5,10±0,13	60,39±0,77	29,0±0,00	150,91±0,00	Âmbar escuro
SC4	0,87±0,22	54,21±1,68	3,93±0,02	55,56±0,75	3,39±0,86	59,13±0,25	27,4±0,50	175,79±0,00	Âmbar escuro
SC5	4,49±0,57	81,45±1,19	3,51±0,01	53,05±0,57	11,46±1,04	65,11±0,89	23,4±0,00	233,36±0,00	Âmbar escuro
SC6	7,49±0,38	103,72±2,48	3,36±0,04	50,95±0,12	17,39±0,56	69,26±0,58	27,2±0,50	185,45±0,01	Âmbar escuro
SC7	4,49±0,99	103,95±0,45	3,57±0,02	58,69 ±0,55	2,46±0,50	61,28±0,80	25,8±0,00	287, 95±0,01	Âmbar escuro
SC8	2,99±0,37	66,00±1,30	3,72±0,02	54,99±0,74	8,34±1,22	63,78±0,56	25,8±0,00	177,65±0,00	Âmbar escuro
MF1	92,83±1,26	54,90±1,01	3,23±0,02	59,78±2,11	3,62±1,16	63,22±0,90	27,8±0,00	141,25±0,01	Âmbar escuro
NI1	7,73±1,56	103,50±2,25	3,76±0,04	53,19±0,45	3,28±0,45	56,65±0,15	27,4±0,00	65,86±0,00	Âmbar-claro
TA1	1,98±0,00	68,15±0,00	4,28±0,02	68,2± 0,01	4,20±0,05	76,21±0,02	28,44±0,01	226,43±0,57	Âmbar escuro
TA2	1,89±0,00	68,15±0,00	4,27±0,07	70,0±0,50	4,00±0,14	77,89±0,01	29±0,01	181,24±0,43	Âmbar escuro
TA3	2,02±0,00	51,7±0,00	4,48±0,05	67,9±0,35	3,85±0,25	75,53±0,52	28,6±0,02	166,76±0,21	Âmbar escuro
TA4	1,97±0,00	88,83±0,00	3,62±0,04	68,5±0,00	3,46±0,30	75,75±0,11	35±0,01	165,15±1,07	Âmbar escuro
TA5	1,89±0,00	72,85±0,00	4,11±0,01	64,6±0,00	3,89±0,75	72,09±0,77	29±0,03	176,66±0,21	Âmbar escuro
TA6	1,96±0,01	70,50±0,00	4,14±0,09	62,3±0,10	4,02±0,99	69,81±0,65	29±0,02	190,30±0,86	Âmbar escuro
TA7	1,86±0,00	62,04±0,01	4,10±0,06	66,8±0,88	4,15±0,20	74,68±0,99	29±0,01	176,66±0,21	Âmbar escuro
TA8	1,83±0,00	45,59±0,00	4,32±0,01	64,9±0,01	4,16±0,31	72,69±1,01	29±0,04	179,14±1,34	Âmbar escuro
TA9	2,06±0,01	44,18±0,00	4,36±0,01	69,2±0,00	3,84±0,44	76,88±0,99	28,6±0,01	184,58±1,91	Âmbar escuro
TA10	2,10±0,01	52,64±0,00	4,36±0,02	62,8±0,10	3,65±0,60	69,95±1,5	28,6±0,05	178,89±1,30	Âmbar escuro

* SC = *Scaptotrigona* sp; MF = *Melipona fasciculata*; NI = não identificada; TA = *Tetragonista angustula*

5.1.1. Avaliação do teor de HMF

Através das análises dos resultados apresentados na **Tabela 6**, observou-se que os méis de meliponídeos das espécies *Scaptotrigona sp* (**SC1 a SC8**) apresentaram teores de HMF com valor médio 2,94 mg/Kg (faixa que variou de 0,46 a 7,49 mg/Kg), os méis de *Tetragonisca angustula* (**TA1 a TA10**) apresentaram teores de HMF com um valor médio 1,96 mg/Kg (variando de 1,83 a 2,1 mg/Kg), o mel de *Melipona fasciculata* (**MF1**) apresentou o valor de 92,83 mg/Kg e para o mel da espécie não identificada (**NI1**), o valor foi de 7,73 mg/Kg. Quando comparados aos resultados obtidos por Salgueiro (2012) (**Tabela 18**, em anexo pág. 138) para méis monoflorais de *A. mellifera* que apresentaram valor médio de HMF de 19,39 mg/Kg variando de 1,49 a 55,38 mg/Kg, observa-se que houve diferença significativa entre os méis, com o mel da abelha africanizada apresentando valor superior (19,39 mg/kg) aos méis produzidos pelas abelhas *Scaptotrigona sp* (**SC1 a SC8**) (2,94/kg mel), *Tetragonisca angustula* (**TA1 a TA10**) (1,96mg/kg) e não identificada (**NI1**) (7,73 mg/Kg). Logo, tanto o local de origem como a espécie produtora do mel podem causar diferenças, embora, dezenove das amostras de *Melipona* estão com valores dentro dos padrões exigidos pela Legislação Vigente, que estabelece um valor máximo de 60 mg/Kg de mel (BRASIL, 2000) para mel de *Apis*, exceto para amostra **MF1**(espécie *Melipona fasciculata*).

Concentrações elevadas de HMF como na amostra de mel **MF1** pode fornecer uma indicação de superaquecimento, armazenamento em condições inadequadas ou idade do mel, porque HMF é uma substância formada espontaneamente em alimentos que contém carboidratos através da reação de Maillard (o escurecimento não enzimático) ou a desidratação catalisada por ácido de hexoses (SPANNO *et al.*, 2006).

Alvarez-Suarez *et al.* (2010), Estevinhos *et al.* (2010) e Fallico *et al.* (2006) afirmaram que, em países de clima tropical, as amostras de méis costumam apresentar elevado teor de HMF em função do clima quente, sendo a quantificação deste parâmetro fundamental para a verificação da qualidade do produto. Uma série de fatores, tais como temperatura e tempo de aquecimento, condições de estocagem, pH, origem floral influenciam a quantidade de HMF no mel.

Diversos trabalhos têm mostrado valores variados de HMF para espécies de meliponíneos. Assim, para amostras de méis de *Cephalotrigona capitata* foi observado valor médio de 3,38 mg/kg (ALMEIDA, 2002); para méis de *Melipona asilvai*, variou

entre 0,52 a 7,93 mg/kg (SOUZA *et al.*, 2004a); amostras de mel de *M. compressipes*, o valor encontrado foi igual a 30,50 mg/kg (SOUZA & BAZLEN, 1998); em méis de *M. quadrifasciata*, 1,03 mg/kg (ALMEIDA, 2002); no mel de *M. scutellaris*, o valor foi de 0,38 mg/kg (MARCHINI *et al.*, 1998) e 18,92 mg/kg (SILVA *et al.*, 2002); em méis de *Plebeia droryana*, 7,64 mg/kg (ALMEIDA, 2002); e *T. angustula*, 4,99 mg/kg (RODRIGUES *et al.*, 1998) e 8,12 mg/kg (ALMEIDA, 2002).

5.1.2. Avaliação de pH

O pH variou de 3,36 a 3,93 para os méis de *Scaptotrigona* sp (**SC1 a SC8**), de 3,62 a 4,48, para méis de *T. angustula* (**TA1 a TA10**), enquanto o valor encontrado para o mel de *M. fasciculata* (**MF1**) foi 3,23 e 3,76 para o mel da espécie não identificada (**NI1**). Os dados (**Tabela 6**), mostram que houve diferença significativa entre as diferentes espécies, e principalmente, a região geográfica do mel, com o mel de abelha *Scaptotrigona* sp (Belterra-PA) apresentando valor médio de pH menor (3,65) do que a média (pH= 4,20) para os méis de abelha *T. angustula* do Rio de Janeiro (Ilha Grande). Neste caso, Crane (1983) cita que o valor de pH pode estar diretamente relacionado com a composição florística nas áreas de coleta, uma vez que o pH do mel poderá ser influenciado pelo pH do néctar, além das diferenças na composição do solo ou a associação de espécies vegetais para a composição final do mel, que também estariam contribuindo para a variação de pH.

Em trabalhos descritos na literatura Marchini e colaboradores (1998) obtiveram valor médio de 3,15 para o pH de amostras de méis de *M. scutellaris*. Para a mesma espécie, Silva *et al.*(2002) observaram o valor médio de 4,66. Para *M. compressipes*, o valor médio obtido por Souza & Bazlen (1998) foi de 4,06, enquanto Souza *et al.* (2004a) trabalhando com a espécie *M. asilvai* constataram valor médio de 3,27, com variação de 3,14 a 3,40. Em amostras de méis de diferentes espécies de meliponíneos, Azeredo *et al.* (2000) encontraram valor médio de 3,50. Já Almeida (2002), estudando amostras de méis do cerrado paulista de quatro espécies de meliponíneos (*Plebeia droryana*, *T. angustula*, *Cephalotrigona capitata* e *M. quadrifasciata*) constatou valores para o pH variando de 3,62 a 4,52. Denadai *et al.* (2002) trabalhando com amostras de méis de *T. angustula* obtiveram o valor médio de 3,80.

5.1.3. Acidez Total

Com relação aos resultados de acidez total (**Tabela 6**) observou-se uma variação de 54,06 a 103,9 (mEq/Kg) para os oito méis de *Scaptotrigona* sp (**SC1 a SC8**), variação de 44,18 a 88,83 (mEq/Kg) para os dez méis de *T. angustula* (**TA1 a TA10**), enquanto o valor encontrado para o mel de *M. fasciculata* (**MF1**) foi 54,90 (mEq/Kg) e 103,5 (mEq/Kg) para o mel da espécie não identificada (**NI1**). Quando comparados aos resultados obtidos por Salgueiro (2012) para méis monoflorais de *A. mellifera* (**Tabela 18**, em anexo pág.138), onde a acidez variou de 35,46 a 93,04 mEq/Kg, observou-se que houve diferença significativa entre os valores de acidez livre. Notadamente o mel de abelha africanizada oriundo da região sudeste (*A. mellifera*) apresentou valor mais baixo (41,66meq/kg) que o mel de abelha nativa (*Scaptotrigona* sp) oriundo da região de Belterra- PA (valor de 81,06 mEq/kg), enquanto o mel da abelha (*T. angustula*) oriundo da região de Ilha Grande- RJ apresentou valor de 62,46 mEq/Kg. Observou-se, também, que a quantidade de acidez está diretamente relacionada ao pH, demonstrando que maiores teores de acidez refletem em menores valores de pH e vice-versa. Para o mel de abelhas africanizadas foram encontrados valores de acidez de 35,46 a 93,04mEq/Kg (SALGUEIRO, 2012) e 3,42 a 4,21 para o pH (**Tabela 18**, em anexo pág.138). O mesmo aconteceu para amostras de mel de abelhas *T. angustula*, onde os valores de acidez de 88,43 mEq/Kg (amostra **TA4**) e 44,18meq/kg (amostra **TA9**) apresentaram para pH valores de 3,62 e 4,36, respectivamente, enquanto as amostras de mel de abelhas *Scaptotrigona* sp, os valores de acidez de 103,72 mEq/Kg (amostra **SC9**) e 54,21 mEq/Kg (amostra **SC4**), apresentaram para pH valores de 3,36 e 3,93, respectivamente.

A legislação permite um teor máximo de acidez igual a 60 mEq/Kg. Isso indica que apenas 35% das amostras analisadas (**SC3, SC4, MF1, TA3, TA8, TA9, TA10**) estão em conformidade, no entanto, a legislação ainda não regulamenta valores máximos ou mínimos para pH (BRASIL, 2000).

Os méis de abelhas sem ferrão geralmente possuem maiores valores de acidez comparados aos méis de *Apis*, uma vez que possuem, em geral, maior umidade, estando mais susceptíveis ao ataque por microorganismos, facilitando a fermentação.

Trabalhos da literatura tem demonstrado que tais parâmetros quando avaliados, mesmo dentro de um mesmo gênero de abelha nativa, são observadas grandes variações nos valores de acidez. Souza & Bazlen (1998) obtiveram o valor de acidez média de

40,75 meq/kg para *M. compressipes*, enquanto para *M. asilvai* os valores variaram de 21,50 a 80,50 meq/kg (SOUZA et al., 2004a). A mesma variação foi observada em uma mesma espécie, onde Marchini et al. (1998) obtiveram valor médio de 8,88 meq/kg para *M. scutellaris*, enquanto Silva et al. (2002) observaram valor médio de 28,33 meq/kg. Denadai et al. (2002), trabalhando com amostras de méis de *T. angustula* observaram acidez média de 112,80 meq/kg.

Amostras de méis das tribos *Meliponini* e *Trigonini* provenientes da Venezuela, apresentaram valores de acidez variando de 9,20 a 69,60 meq/kg e de 20,00 a 94,00 meq/kg, respectivamente (VIT et al., 1998). Azeredo et al. (2000) trabalhando com amostras de méis de meliponíneos obtiveram valor médio de 27,15 meq/kg. Almeida (2002), também trabalhando com amostras de méis de meliponíneos, obtiveram valores que variam de 16,50 a 52,00 meq/kg.

A acidez do mel das abelhas sem ferrão é geralmente superior, o que justifica o sabor mais ácido deste tipo de mel, responsável pela preferência dos consumidores mais exigentes (VIT et al, 2004;. ALMEIDA-MURADIAN, 2013).

5.1.4. Açúcares Totais

Os valores encontrados para açúcares totais, açúcares redutores e sacarose aparente neste trabalho variaram de acordo com o gênero da abelha sem ferrão. Para o mel de abelhas *Scaptotrigona* sp (**SC1 a SC8**) foi obtido um percentual de açúcares totais que variou de 52,78 a 69,26%, açúcares redutores de 50,95 a 58,69% e sacarose aparente de 0,35 a 17,39%; para os méis de abelhas *Tetragonisca angustula* (**TA1 a TA10**) os percentuais obtidos variaram de 69,81 a 77,89%, 62,3 a 70,0% e 3,46 a 4,2%, respectivamente. Já o mel de abelha *M. fasciculata* (**MF1**) o percentual foi de 63,22% para açúcares totais, 59,78% para açúcares redutores e 3,62% para sacarose, enquanto o mel da espécie não identificada (**NI1**) apresentou o valor de 56,65%, 53,19% e 3,28%, respectivamente. Segundo a legislação brasileira o mel deve conter no mínimo 65% de açúcares redutores, sendo assim apenas seis amostras de mel de *Tetragonisca angustula* (**TA1, TA2, TA3, TA4, TA9, TA10**) se enquadrariam nesse quesito.

O teor de sacarose aparente no mel serve como critério para diferenciar os monoflorais dos poliflorais. Segundo a legislação vigente o máximo permitido é de 6%,

estando dezessete amostras dentro do limite estabelecido, com exceção de três amostras de mel de abelha *Scaptotrigona* sp (**SC7, SC8 e SC10**).

Em amostras de mel *A. mellifera* avaliados por Alves *et al.* (2011), os valores variaram de 66,58% a 79,02%; Aroucha *et al.* (2008), encontraram valores na faixa de 66,97% a 75,0% e Araújo *et al.*, (2006) obtiveram valores com variações de 59,38% a 76,45%.

Outros autores também verificaram uma variação dos níveis de açúcares entre méis de diferentes espécies de abelhas *Meliponas*. Souza *et al.* (2009) por exemplo, analisando méis de meliponíneos da região Nordeste, encontraram valores médios de açúcares totais entre 57,9 a 95,6%, açúcares redutores entre 50,6 a 93,1% e sacarose entre 0,2 e 9,0%. Já para méis produzidos na região Amazônica, Souza *et al.* (2004) verificaram os valores de açúcares totais variando de 60,2 a 61,7%, açúcares redutores de 60,2 a 61,3% e sacarose de 0,1 a 0,2%.

Analisando amostras de méis de meliponíneos da Venezuela, Bogdanov e colaboradores (1996) constataram os seguintes valores médios de açúcares totais de 76,30% para *M. compressipes*, 76,30% para *M. trinitatis*, 74,70% para *M. favosa* e 76,00% para *Frieseomelitta* sp. Enquanto Vit *et al.* (1998), também na Venezuela, encontraram valores variando de 53,70 a 73,10 % para a tribo *Meliponini* e 51,20 a 70,40% para a tribo *Trigonini*. Com relação a sacarose, os valores variaram de 0,60 a 5,60% (*Meliponini*) e 0,30 a 6,10% (*Trigonini*).

Rodrigues *et al.* (1998) trabalhando com amostras de méis de *Tetragonisca angustula* constataram para açúcares redutores valor médio de 58,19% e para a sacarose valor médio de 1,17%. Denadai *et al.* (2002) analisando amostras de méis da mesma espécie obtiveram valores médios de 58,00% e 2,35% para açúcares redutores e sacarose, respectivamente.

Na Bahia, Souza *et al.* (2004a) trabalhando com a espécie *M. asilvai* encontraram para açúcares totais, açúcares redutores e sacarose os valores variando de 67,72 a 84,99%, 66,00 a 76,20% e 1,13 a 8,35%, respectivamente. Alves (2004), também no Estado da Bahia, analisando amostras de méis de *M. mandacaia* obtiveram valores médios de 74,82% para açúcares redutores e de 2,91% para sacarose. Mel de meliponíneos pode cristalizar no pote dentro da colônia, como foi observado em *M. mandacaia* na Bahia.

Para o mel de abelhas *Tetragonisca angustula*, segundo o parâmetro sugerido por Villas-Bôas e Malaspina (2005) e Vit, Medina e Enriquez (2004), este mel deve conter no mínimo 50% de açúcares redutores, desta maneira todas as amostras estudadas estariam de acordo com os padrões sugeridos pelos autores.

A tendência de cristalização do mel está diretamente relacionada com alguns parâmetros que são sensíveis tais como a razão frutose/glicose e glicose/umidade. Esta taxa de cristalização é também importante na identificação da origem botânica do mel (RUOFF *et al.*, 2006).

5.1.5. Umidade

Os valores de umidade encontrados nesse trabalho, para os méis de *Scaptotrigona* sp (**SC1 a SC8**) variaram de 23,4 a 29,4%, para os méis de *T. angustula* (**TA1 a TA10**) variaram de 28,44 a 35%, para o mel de *M. fasciculata* (**MF1**) apresentou o valor de 27,8% e já a espécie não identificada (**NI1**) o valor foi 27,4%. Segundo a legislação vigente o máximo estabelecido é de 20%, estando todas as amostras fora das especificações.

Em trabalho desenvolvido por Vit *et al.* (1998) com amostras de méis das tribos *Meliponini* e *Trigonini* produzidos na Venezuela, os valores de umidade variaram de 22,90 a 31,50% (*Meliponini*) e 17,90 a 29,50% (*Trigonini*).

Segundo Pamplona (1989) que trabalhou com amostras de méis brasileiros de *Apis* e meliponíneos, constatou valores mais altos de umidade para os méis de meliponíneos que para os de *Apis*. Em seu trabalho encontrou para umidade valores máximos de 24,00% (*A. mellifera*); 40,20% (*Tetragonisca angustula*); 45,00% (*Melipona quadrifasciata*); 20,00% (*Scaptotrigona postica*) e 27,00% (*Plebeia droryana*). Já o trabalho desenvolvido por Cortopassi-Laurino & Gelli (1991) com diferentes amostras de méis de meliponíneos a umidade determinada apresentou valores variando de 18,00 a 36,00%.

Marchini *et al.* (1998) estudando méis da espécie *M. scutellaris* encontraram valor médio de 28,40% para a umidade; Silva *et al.* (2002) trabalhando com a mesma espécie constataram valor médio de 25,26%. No entanto, Cortopassi-Laurino & Montenegro (2000) observaram que os méis desta espécie tinham um maior teor de umidade (27,00 a 29,70%) nos meses secos, quando comparado com os meses mais úmidos, onde esta umidade variava de 25,00 a 26,30%.

Souza & Bazlen (1998) quando avaliaram méis de *M. compressipes* obtiveram valor médio de 25,00%, enquanto que em amostras de méis de *T. angustula* os valores médios variaram de 23,70% (DENADAI *et al.*, 2002) maior que 26% (RODRIGUES *et al.*, 1998).

Almeida (2002) em amostras de méis do cerrado paulista constatou para *P. droryana*, *T. angustula*, *Cephalotrigona capitata* e *M. quadrifasciata* valores médios de umidade de 31,00%, 25,50%, 27,00% e 34,00%, respectivamente. Souza *et al.* (2004a) constataram porcentagem de umidade variando de 26,80 a 32,00% para méis de *M. asilvai*. Trabalhando com amostras de méis de diferentes espécies de *Melipona* (*M. compressipes manaosensis*, *M. rufiventris paraensis* e *M. seminigra merrillae*) da região amazônica, Souza e colaboradores (2004b) encontraram valores de 23,90 a 34,60%.

O conhecimento do teor de umidade no mel é útil para auxiliar na sua conservação e armazenamento, impedindo o crescimento de fungos em sua superfície (GOMES *et al.*, 2011; ESTEVINHO *et al.*, 2012). Altos níveis de umidade podem ser considerados importantes para o mel de abelhas sem ferrão porque afetam outras características como viscosidade, fluidez e conservação. De um modo geral, alguns dos parâmetros físico-químicos do mel produzidos por espécies de abelhas indígenas diferem em comparação com o mel de *A. mellifera*, especialmente a umidade, que é muito alta e faz com que o mel seja mais fluido, favorecendo a fermentação. Além disso, o mel requer maiores níveis de cuidados durante a colheita e precisa ser refrigerado para maior durabilidade.

5.1.6. Cor

A cor é a propriedade física mais facilmente percebida pelo consumidor, sendo na maioria das vezes um critério útil para a escolha e classificação comercial. Os méis claros são apontados como de maior preferência, embora em países como Alemanha, Áustria e Suíça, os de cor escura sejam os mais apreciados (BOGDANOV, 2004).

A cor dos méis estudados teve predominância da tonalidade âmbar escuro, apenas a amostra de espécie não identificada (**NI1**) apresentou a coloração âmbar claro. Estas cores enquadram-se as cores preconizadas pela legislação brasileira (BRASIL, 2000), variando do incolor ao âmbar escuro, para o mel de *A. mellifera*. A predominância de tons escuros nos méis de abelhas sem ferrão analisados no presente trabalho diferem dos resultados obtidos por Souza *et al.* (2006) e Anacleto *et al.* (2009)

que relataram predominância de méis claros quando analisaram os méis de *Melipona*. Segundo Lacerda *et al.* (2010) a variação da cor pode estar relacionada com a origem floral, variações climáticas durante o fluxo do néctar e o nível de maturação do mel. Quimicamente a intensificação da cor do mel se dá em função das reações de substâncias polifenólicas com sais de ferro, do conteúdo de minerais e da instabilidade da frutose em solução ácida (BATH & SINGH, 2005).

Marchini *et al.* (1998) trabalhando com amostras de *M. scutellaris* do Estado da Bahia constataram que 100,00% apresentaram cor branca. Semelhantemente, Souza *et al.* (2004a) trabalhando com méis de *M. asilvai* também produzidos na Bahia registraram 81,20% das amostras de coloração branca.

A cor âmbar claro foi considerada a predominante por Azeredo *et al.* (2000), em amostras de méis de *M. scutellaris*, *M. compressipes* e *T. angustula*. Para amostras de méis do cerrado paulista, Almeida (2002) determinou cores âmbar claro para as amostras produzidas por *P. droryana*, branco para *T. angustula* e *C. capitata*, e âmbar extra claro para *M. quadrifasciata*.

Análises de amostras de mel da abelha *Melipona mandacaia* provenientes do município de São Gabriel, região semiárida do Estado da Bahia, foram realizadas com o objetivo de contribuir para o conhecimento das características físico-químicas desse produto (ALVES *et al.*, 2005). A análise do mel dessa espécie demonstrou uma coloração variando entre o branco e o âmbar claro, predominando o âmbar claro na maior parte das amostras (50%).

Em méis de *M. compressipes* também, predominou a cor âmbar claro, enquanto para amostras de *M. quadrifasciata* houve predomínio da cor âmbar extra claro e nas de *M. asilvai* e *M. scutellaris* predominou o branco (SOUZA *et al.*, 2004).

5.2 – Determinação de aminoácido livre e proteína total no mel de abelha sem ferrão

Os resultados do conteúdo de aminoácidos livres (mg de equivalentes de *L*-leucina por 100 g de mel) e proteínas totais (mg de equivalentes albumina sérica bovina por 100 g de mel) estão apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Valores médios e os desvios padrões dos conteúdos de aminiácidos livres e proteínas totais das vinte amostras de méis estudadas.

Amostras	Proteínas (mgE _{ASB} /100g)	Aminoácidos (mgE _{LE} /100g)
SC1	202,90±4,59	38,64±0,22
SC2	172,79±1,11	21,88±0,13
SC3	190,97±1,59	14,15±0,04
SC4	202,26 ±2,77	16,63±0,32
SC5	102,74±0,00	22,02±0,53
SC6	80,99±4,33	19,41±0,79
SC7	110,09±1,59	29,02±1,59
SC8	100,91±1,36	19,55±1,03
MF1	38,11±1,36	3,23± 0,10
NI1	60,88±5,43	21,55±0,19
TA1	113,02±0,16	89,34±0,20
TA2	109,63±1,46	56,30±0,42
TA3	103,84±0,73	59,28±0,38
TA4	81,35±2,03	44,59±0,08
TA5	109,08±1,46	28,11±0,59
TA6	109,72±1,11	49,82±1,35
TA7	111,83±1,53	28,97±1,01
TA8	109,90±1,53	54,46±2,46
TA9	107,70±1,10	29,12±0,53
TA10	84,47±3,19	78,89±2,90

Através das análises dos resultados observou-se que o mel de *Scaptotrigona* sp (SC1 a SC8) apresentou os valores médios para aminoácidos e proteínas de 22,66 mgE_{LE}/100g e 145,45 mgE_{ASB}/100g, respectivamente, o mel de abelha *T. angustula* (TA1 a TA10) apresentou os valores médios de 51,89 mgE_{LE}/100g para aminoácidos e 104,05 mgE_{ASB}/100g para proteínas, o mel da abelha *M. fasciculata* (MF1) apresentou o valor de 3,23 mgE_{LE}/100g e 38,11 mgE_{ASB}/100g, respectivamente, enquanto o mel da espécie não identificada (NI1) apresentou os valores de 21,55 mgE_{LE}/100g e 60,88 mgE_{ASB}/100g.

Ao se comparar esses valores com os obtidos por Salgueiro (2012) para os méis monoflorais de *A. mellifera* (Tabela 20, em anexo pág.138), o valor para teor de aminoácido foi 19,16 mgE_{LE}/100g, enquanto para proteínas foi de 53,85 mgE_{ASB}/100g. Já no estudo realizado por Sant’Ana e colaboradores (2012) para méis de *A. mellifera* do sudeste brasileiro, os valores para aminoácido foi 19,35 mgE_{LE}/100g (morrão de candeia), 19,45 mgE_{LE}/100g (eucalipto) e 16,44 mgE_{LE}/100g (camabará), enquanto para o conteúdo de proteína, os valores encontrados foram 44,61 mgE_{ASB}/100g, 72,83

mgE_{ASB}/100g e 45,51 mgE_{ASB}/100g, respectivamente. A partir desses dados, foi possível observar que os teores de aminoácido e, principalmente, o de proteína foram superiores para o mel de abelha sem ferrão quando comparados ao mel de abelha africanizada, sugerindo que possa estar ocorrendo alguma influência do sistema digestório da abelha de acordo com a espécie estudada.

Infelizmente pouco se sabe sobre o teor de proteínas no mel. De acordo com Anklam (1998), as proteínas do mel podem originar-se a partir do néctar das plantas, das abelhas, ou de pólen. A origem vegetal advém do néctar e do pólen, enquanto a animal é proveniente da própria abelha, oriunda das secreções das suas glândulas salivares, conjuntamente com produtos recolhidos no decurso da colheita do néctar, ou da maturação do mel (CAMPOS, 1987). Assim, a sua redução ou ausência em méis adulterado, superaquecido ou armazenados inadequadamente serve como um indicador de frescor do mel.

A maior parte dos aminoácidos vem da fonte floral; contudo, uma parte significativa é adicionada pelas abelhas (BERGNER E HAHN, 1972, citado por Bogadanov, 2004), o que leva a uma grande variabilidade de aminoácidos dentro dos méis de uma mesma fonte botânica.

Wootton, Edwards e Faraji-Haremi (1976) constataram na composição de seis amostras de méis australianos, os seguintes aminoácidos livres em suas composições: leucina, isoleucina, histidina, metionina, alanina, fenilalanina, glicina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, valina, cisteína, tirosina, lisina e arginina. Dentre esses aminoácidos, a prolina proveniente das secreções salivares das abelhas, é o que apresenta os maiores valores, variando entre 0,2 % e 2,8 %, e juntamente com o conteúdo de água, é usado como um parâmetro de identificação da "maturação" do mel (COSTA *et al.*, 1999). Segundo Dustmann e Ohe (1991) é necessário pelo menos 200 mg de prolina/kg de mel. Não há qualquer regulamentação ou legislação que imponha limites para as proteínas no mel, mas é necessário para a rotulagem do produto.

5.3 – Teor de substâncias polifenólicas das amostras de mel de abelha sem ferrão

O mel não é apenas um alimento de alto valor nutritivo, apresenta também substâncias que lhe conferem propriedades antioxidantes, tais como os polifenóis e os flavonoides. Algumas destas substâncias já foram identificadas no mel de *A. mellifera*, sejam europeus ou brasileiros, tais como os ácidos gálico, caféico, ferúlico e cumárico, a quercetina, naringenina, e canferol (SERGIEL *et al.*, 2014; LIANDA *et al.*, 2012;

SALGUEIRO *et al.*, 2014); bem como em méis de abelha sem ferrão (SILVA *et al.*, 2013, 2013a).

As substâncias polifenólicas são importantes constituintes dietéticos, e apresentam elevada capacidade antioxidante, atribuída à sua habilidade em complexar íons metálicos, inativar reações radicalares, e prevenir conversão de hidroperóxido em oxi-radicais reativos (De OLIVEIRA *et al.*, 2009). Os polifenóis são grupos de substâncias que apresentam estruturas diversificadas, algumas relativamente simples, como os derivados de ácidos fenólicos e outros de moléculas de alto peso molecular, como os taninos e as ligninas. Muitas dessas substâncias fenólicas têm propriedades sequestradoras de radicais livres, conferindo-lhes atividade antioxidante. A ação antioxidante dos polifenóis pode ser devido a combinações de várias etapas químicas, como inibição enzimática, quelação metálica e doação de hidrogênio (SEHWAG & DAS, 2013). Na **Tabela 8** estão apresentados os valores médios e os desvios padrões para a determinação de fenólicos e flavonoides totais encontrados nas vinte amostras de méis estudadas nesse trabalho.

Tabela 8 – Valores médios e os desvios padrões dos teores totais de fenólicos e flavonoides das vinte amostras de méis estudadas.

Amostras	Teor de Fenólicos Totais (mgE _{AG} /100g) ^a	Teor de Flavonoides Totais (mgE _Q /100g) ^b
SC1	80,39 ±1,35	6,07 ±0,05
SC2	72,69 ±0,35	4,99 ±0,01
SC3	66,62 ±0,93	5,78 ±0,02
SC4	72,85 ±0,07	6,57 ±0,02
SC5	74,04 ±0,81	2,29 ±0,02
SC6	61,28 ±1,85	1,78 ±0,02
SC7	76,48 ±1,27	2,77 ±0,02
SC8	73,39 ±0,37	2,25 ±0,01
MF1	64,99 ±0,67	1,59 ±0,05
NI1	58,18 ±0,92	0,55 ±0,02
TA1	101,35 ±0,51	4,46 ±0,16
TA2	102,01 ±0,12	5,59 ±1,46
TA3	101,27 ±0,53	5,13 ±0,73
TA4	104,09 ±0,56	5,89 ±2,03
TA5	105,59 ±1,25	6,38 ±1,46
TA6	101,68 ±1,23	5,39 ±1,11
TA7	90,75 ±0,86	5,47 ±1,53
TA8	90,35 ±0,49	5,38 ±1,53
TA9	90,22 ±0,37	5,46 ±1,10
TA10	132,1 ±0,73	7,54 ±3,19

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

b- mg de equivalentes de quercetina por 100g de mel.

5.3.1. Teor de fenóis totais

Vários métodos espectrofotométricos para quantificação das substâncias fenólicas em alimentos têm sido desenvolvidos (DAÍ & MUMPER, 2010). O método de Folin-Denis é o mais utilizado para determinação de fenólicos totais em vegetais, e este foi usado para estimar o teor de fenólicos totais nos méis de abelha sem ferrão. Este método fundamenta-se numa reação de oxi-redução entre os polifenóis e o reagente de Folin (**Figura 26**). Ocorre a 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} da qual resulta um complexo de coloração azul que ao absorver radiação a 760 nm permite a quantificação das substâncias fenólicas (FOLIN e DENIS, 1912).

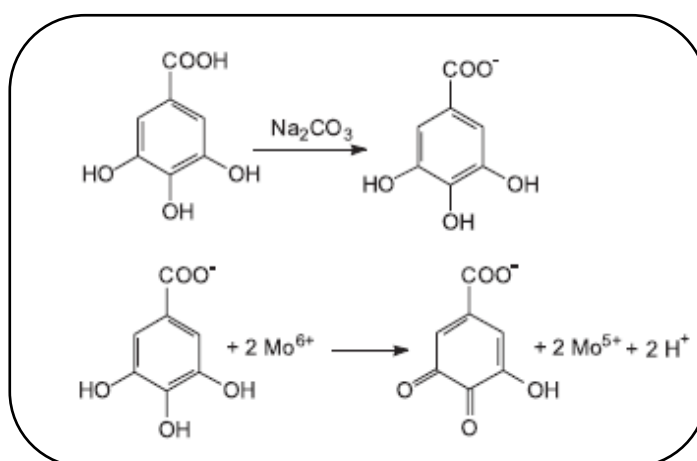


Figura 26. Reação de ácido gálico com molibdênio, no método de Folin-Ciocalteu (De OLIVEIRA *et al*, 2009).

O teor de fenóis totais foi realizado por espectrofotometria a 765nm usando o reagente de Folin-Dennis, e o conteúdo variou de acordo com o mel produzido por diferente espécie de abelha. Os valores variaram de 61,28 a 80,39 mg $\text{E}_{\text{AG}}/100 \text{ g}$ para os méis de abelha *Scaptotrigona* sp (**SC1 a SC8**), 90,22 a 105,59 mg $\text{E}_{\text{AG}}/100 \text{ g}$ para os méis de abelha *T. angustula* (**TA1 a TA10**) para o único mel estudado de *M. fasciculata* (**MF1**) o valor encontrado foi de 64,99 mg $\text{E}_{\text{AG}}/100\text{g}$ e para mel de espécie não identificada (**NI1**) o valor observado foi de 58,18 mg $\text{E}_{\text{AG}}/100\text{g}$. O mais alto conteúdo (105,59 mg $\text{E}_{\text{AG}}/100\text{g}$ de mel) foi observado para a amostra **TA5** (*T. angustula*), classificada como âmbar escuro, enquanto o menor teor foi obtido para amostra **NI1** de espécie não identificada (58,18 mg $\text{E}_{\text{AG}}/100\text{g}$), classificada como âmbar

claro. Este ensaio espectrocolorimétrico apresenta baixa especificidade, pois não só mede fenóis totais, mas também reage com qualquer substância redutora; assim, a reação de coloração pode ocorrer com qualquer grupo hidroxil fenólico oxidável e muitas substâncias não-fenólicas (açúcares) presentes no mel (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2009).

Na literatura existem muitos trabalhos relatando resultados sobre o conteúdo de fenólicos e flavonoides de méis de *Apis mellifera*, embora para os méis das diferentes espécies de abelhas nativas sem ferrão poucos dados são encontrados. Por exemplo, o trabalho descrito por Oliveira e colaboradores (2012) para vinte e quatro méis de *M. fasciculata* e *M. flavolineata* da Amazônia, os valores de totais de fenóis variaram de 25,53 a 88,81 mgE_{AG}/100g e 23,39 a 236,71 mgE_{AG}/100g, respectivamente. Já para nove amostras de *M. subnitida* (mel de jandaíra) do estado da Paraíba, Silva e colaboradores (2013) encontraram teores que variaram de 120-130 mgE_{AG}/100g no mel. Esses resultados estão próximos aos valores encontrados nesse trabalho. No entanto, trabalhos realizados por ODDO e colaboradores (2008) com mel de abelha sem ferrão (*Trigona carbonaria*) da Austrália o conteúdo de polifenóis foi inferior (44,53-63,43 mgE_{AG}/100 g de mel), e méis de *Tetragonisca fiebrigi* na Argentina (144,22 e 431,20 mgE_{AG}/100g) e do Paraguai (125,17 e 176,50 mgE_{AG}/100) os valores foram superiores aos encontrados para méis de abelha nativa brasileira (Vit *et al.*, 2009). Em outro estudo, méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão do Peru apresentaram conteúdo de polifenóis na faixa de 99,7 a 464,9 mgE_{AG}/100g (RODRÍGUEZ-MALAVÉ *et al.*, 2009).

Diferentes plantas têm grupos diversificados de substâncias fenólicas, que podem acarretar variação de conteúdo nos fenólicos totais de mel (BLUM, 1996). Por exemplo, para *A. mellifera*, o teor de fenólicos totais de mel do nordeste do Brasil variou 10,21-108,5 mg E_{AG}/100 g de mel (TAVARES *et al.*, 2011). No entanto, diferenças substanciais foram observadas em mel do Chile, com teor de fenólicos totais variando de 0,0-8,83 mg E_{AG}/100 g de mel (MUÑOZ E COPAJA, 2007), amostras de mel de diferentes origens florais da Polônia variando de 21,7-75,3 mg E_{AG}/100 g de mel (SOCHA *et al.*, 2009); enquanto que amostras de mel de Eslovênia variaram entre 44,8- 241 mg E_{AG}/100 g de mel (BERTONCELJ *et al.*, 2007).

Em comparação aos méis brasileiros de *A. mellifera* estudado por Salgueiro (2012), o teor de fenóis variou com o tipo de mel monofloral (**Tabela 19**, em anexo pág. 138), apresentando valores de 94,9 a 103,0 mg E_{AG}/100 g para os méis de assa peixe, de

73,7 a 81,4 mgE_{AG}/100 g para os méis de morrão de candeia e de 104,7 a 129,3 mgE_{AG}/100g para os méis de cambará. De acordo os resultados obtidos por Salgueiro (2012) a amostra de mel de cambará, classificada como âmbar claro foi a que apresentou a maior concentração em polifenólicos (129,3 mgE_{AG}/100g), enquanto a amostra de morrão de candeia, classificada como branco, apresentou o menor teor (73,7 mgE_{AG}/100g). Já o estudo realizado por Sant'Ana e colaboradores (2012) para méis monoflorais do sudeste, os valores encontrados variaram de 61,11 a 81,42 mgE_{AG}/100g (morrão de candeia), de 82,76-137,03 mgE_{AG}/100g (de eucalipto) e 104,66 a 129,32 mgE_{AG}/100g (cambará). Todos esses valores foram superiores aos valores encontrados nesse trabalho para abelha sem ferrão.

5.3.2. Teor de Flavonoides Totais

Diversas técnicas podem ser empregadas para a detecção e doseamento de flavonoides em amostras de vegetais, bebidas e mel, tais como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM), Cromatografia em Camada Delgada (CCD), entre outras. No entanto, o método de quantificação de flavonoides por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) alcança grande destaque devido a sua simplicidade, rapidez, baixo custo de execução e ampla disponibilidade nos laboratórios. Comumente emprega-se o método colorimétrico com cloreto de alumínio (AlCl₃) para tratamento das amostras a serem analisadas. Na reação, o cátion alumínio forma complexos estáveis com as hidroxilas livres dos flavonoides, de coloração amarela, ocasionado pela extensão do sistema conjugado e, conseqüentemente, levando a um desvio batocrômico, ou seja, um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda (MEDA *et al.*, 2005; AHN *et al.*, 2007). A intensidade de absorção é proporcional à concentração de flavonoide presente na amostra (MABRY *et al.*, 1970) podendo ser quantificado sem sofrer influência de outras substâncias fenólicas presentes na amostra (**Figura 27**).

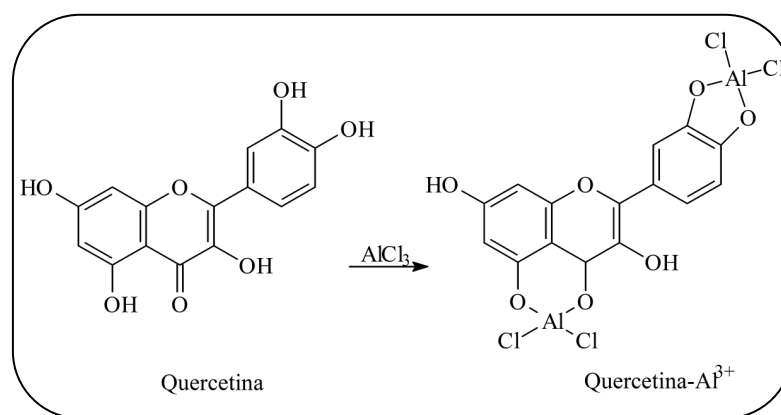


Figura 27:Complexação da quercetina com cloreto se alumínio (MABRY *et al.* 1970)

O teor de flavonoides totais dos méis analisados nesse trabalho foi determinado por espectrofotometria utilizando como reagente uma solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl₃).

Conforme pode ser observado na **Tabela 8**, o teor de flavonoides totais variou de 1,78 a 6,57 mg E_Q/100g para os méis de abelha *Scaptotrigona* sp (**SC1 a SC8**), para os méis de *T. angustula* (**TA1 a TA10**) variou de 4,46 a 7,54 mg E_Q/100g, para o mel de *M. fasciculata* (**MF1**) o valor foi de 1,59 mg E_Q/100g, enquanto para o mel de abelha cuja espécie não foi identifica (**NI1**) o valor foi 0,55 mgE_Q/100g de mel. Observou-se que a amostra **NI1**, classificada como âmbar claro, foi a que apresentou o menor teor em flavonoides, enquanto a amostra **TA10** (*T. angustula*), classificada como âmbar escuro, foi a que apresentou a maior concentração (7,54 mgE_Q/100g).

Trabalhos realizados por ODDO e colaboradores (2008) com mel de abelha sem ferrão (*Trigona carbonaria*) da Austrália o teor de flavonoides foi 10,02 ± 1,59 mgE_Q/100g de mel. Mel produzido por dez espécies de abelhas sem ferrão (*Melipona crinita*, *M. eburnea*, *M. grandis*, *M. illota*, *Nannotrigona melanocera*, *Partamona epiphytophila*, *Ptilotrigona lurida*, *Scaptotrigona polystica*, *Scaura latitarsis* e *T. angustula*), do Peru apresentaram o teor de flavonoides variando de 2,6-31,0 mgE_Q/100g de mel. Estes dados foram bem superiores aos relatados nesse trabalho.

Em contraste com méis monoflorais brasileiro de *A. mellifera*, Salgueiro (2012) encontrou o teor de flavonoides totais variandode 5,55 a 9,82 mg E_Q/100g para os méis de assa peixe, de 2,54 a 2,98 mg E_Q/100g para os méis de morrão de candeia e de 6,38 a 10,25 mgE_Q/100g para os méis de cambará (**Tabela 19**, em anexo pág. 138). Nesse trabalho o mel de cambará foi a que apresentou o maior conteúdo em flavonoides totais (10,25 mgE_Q/100g), enquanto o mel de morrão de candeia foi a que apresentou a menor

concentração (2,54 mgEQ/100g). Para trinta e sete méis monoflorais brasileiro, Sant'Ana e colaboradores (2014) encontraram o conteúdo de flavonoides variando de 1.99 a 11.8 mgEQ/100g, enquanto o teor de fenólicos variou de 58.26 a 152.52 mgEQ/100g.

Comparando os valores dos méis de abelha sem ferrão com os méis de abelha *A. mellifera* (SALGUEIRO, 2012; SANT'ANA *et al.*, 2014) observou-se maiores teores, tanto para totais de fenólicos quanto de flavonoides para os méis de *A. mellifera*. Verificou-se também que os méis de meliponíneos e os de *A. mellifera* apresentaram forte correlação entre o teor de fenólicos totais e a cor do mel. Atualmente têm sido publicados inúmeros estudos sobre a avaliação da atividade antioxidante do mel, a qual está correlacionada positivamente com o conteúdo em substâncias fenólicas, e consequentemente, com a sua origem botânica e/ou geográfica. Estevinho *et al* (2008) constataram que os méis de cor escura apresentavam um teor em substâncias fenólicas maior e, consequentemente uma atividade antioxidante mais elevada. A cor escura reflete, parcialmente, o conteúdo em pigmentos como os carotenóides e flavonoides, muitos dos quais possuem propriedades antioxidantes.

5.4 – Avaliação da Capacidade Antioxidante dos méis de abelha sem ferrão

Os estudos envolvendo substâncias antioxidantes naturalmente presentes em alimentos e a prevenção ou controle de algumas doenças crônico-degenerativas e câncer têm chamado a atenção da comunidade científica e da população em geral. Entre os alimentos que contém antioxidantes naturais, as frutas e os vegetais são os que mais contribuem para o suprimento dietético destes compostos, associados aos efeitos benéficos à saúde humana. (ANTOLOVICH *et al.*, 2002)

Uma gama de componentes fenólicos em mel é conhecida: o ácido cafeico, ácido gálico, ácido protocatecuico, acacetina, camferol, galangina, crisina, quercetina e apigenina, entre outros. Eles têm efeitos promissores no tratamento de algumas doenças crônicas devido à sua atividade antioxidante, conferindo assim, propriedades funcionais benéficas.

A grande diversidade química existente tornam as substâncias fenólicas difíceis de separarem, bem como quantificarem individualmente (PRIOR & CAO, 2000). Vários métodos *in vitro* vêm sendo desenvolvidos para determinar o potencial

antioxidante de extratos vegetais, bebidas e mel. Os diversos métodos propostos na literatura para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas variam quanto ao tipo de radicais gerados, estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC - Capacidade de Absorção de Oxigênio Radicalar e TRAP – Potencial Antioxidante Total), no poder de redução do metal (FRAP – Poder Antioxidante de Redução do Ferro e CUPRAC – Poder Antioxidante de Redução do Íon Cúprico), na captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), na captura do radical orgânico ABTS (ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), na quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS – Medida da lipoperoxidação), na oxidação da lipoproteína de baixa densidade [LDL] ou na co-oxidação do β -caroteno. Dentre estes métodos, DPPH, ABTS, FRAP e ORAC são alguns dos mais usados atualmente na análise de alimentos (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006).

Nesse trabalho, três métodos diferentes foram utilizados para determinar a capacidade antioxidante dos méis de abelha sem ferrão, o que permite obter informação sobre a atividade desses méis durante diferentes fases da reação de oxidação (PRIOR *et al.*, 2005). Os métodos utilizados incluíram a capacidade sequestrante dos radicais DPPH e ABTS⁺, e o poder de oxidação do íon ferro através do ensaio com FRAP. Baseados em ensaios antioxidantes semelhantes, diferentes tipos de mel de vários países e regiões geográficas têm apresentado elevadas propriedades antioxidantes (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010, 2012b; SILVA *et al.*, 2013; SALGUEIRO *et al.*, 2014).

Na **Tabela 9** estão apresentados os valores médios e desvios padrão dos resultados para a determinação da capacidade antioxidante realizada para as vinte amostras de mel.

Nos resultados apresentados, diferentes amostras revelaram vários graus de capacidade antioxidante, apresentando CE₅₀ que variou de 10,46 a 72,97 mg/mL para o DPPH (**Tabela 9**). O valor de CE₅₀ variou de 20,49 a 36,16 mg/mL para méis de abelha *Scaptotrigona* sp (**SC1 a SC8**), de 10,46 a 34,89 mg/mL para os méis de abelha *T. angustula* (**TA1 a TA10**), para o mel de *M. fasciculata* (MF1) o valor de CE₅₀ foi 29,62 mg/mL, enquanto para o mel de espécie não (**NI1**) foi de 72,97 mg/mL. Entre todas as amostras estudadas, o mel de *T. angustula* (**TA10**) foi o que apresentou a mais elevada capacidade de resgate do radical DPPH (CE₅₀= 10,46 mg/mL), enquanto o mel

de espécie não identificada (NI1) apresentou o resultado mais baixo ($CE_{50} = 72,97$ mg/mL).

Tabela 9 - Capacidade antioxidante das amostras de méis de abelha sem ferrão.

Amostras	DPPH (CE_{50}) (mg/mL)	FRAP ($\mu\text{mol Fe(II)}/100$ g)	ABTS ($\mu\text{molTE}/100$ g)
SC1	22,32±0,31	223,69±0,00	20,32±0,00
SC2	33,68±1,92	147,76±0,00	34,36±0,0
SC3	36,16±1,52	175,54±0,01	33,08±0,00
SC4	23,54±1,60	214,43±0,00	31,81±0,00
SC5	22,70±0,59	112,57±0,00	3,73±0,00
SC6	28,81±0,47	77,39±0,00	7,56±0,00
SC7	20,49±0,16	182,94±0,00	11,38±0,00
SC8	23,60±1,07	149,61±0,00	13,94±0,00
MF1	29,62±0,76	94,06±0,00	229,69±0,03
NI1	72,97± 1,70	84,80±0,00	217,56±0,00
TA1	18,11±0,22	357,02±6,42	289,62±0,01
TA2	21,62±1,29	468,13±2,10	224,53±0,00
TA3	34,89±2,17	368,13±3,21	192,62±0,00
TA4	20,94±1,24	460,72±9,62	128,81±0,00
TA5	24,94±2,20	449,61±0,00	85,41±0,00
TA6	24,76±0,31	445,91±8,49	93,07±0,00
TA7	26,05±0,48	436,65±3,21	123,70±0,00
TA8	20,52±0,66	431,09±3,21	139,02±0,01
TA9	19,55±1,15	436,65±6,42	179,86±0,01
TA10	10,46±0,17	640,35±8,49	364,93±0,00

Este ensaio se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina e foi desenvolvido por Marca-Williams *et al* (1995). A molécula de DPPH[•] é caracterizada por ser um radical livre estável, em virtude da deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização confere a esta molécula uma coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em cerca de 520 nm. Quando uma determinada substância, que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionado a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (**Figura 28**). A atividade antiradicalar, expressa pelo parâmetro EC_{50} , é definida como a quantidade do antioxidante necessário para diminuir 50% da concentração do radical DPPH[•] inicial. O ensaio com DPPH é um teste rápido e

simples, garante resultados confiáveis e precisa apenas de um espectrofotômetro UV-vis, o que provavelmente explica seu amplo uso na triagem antioxidante.

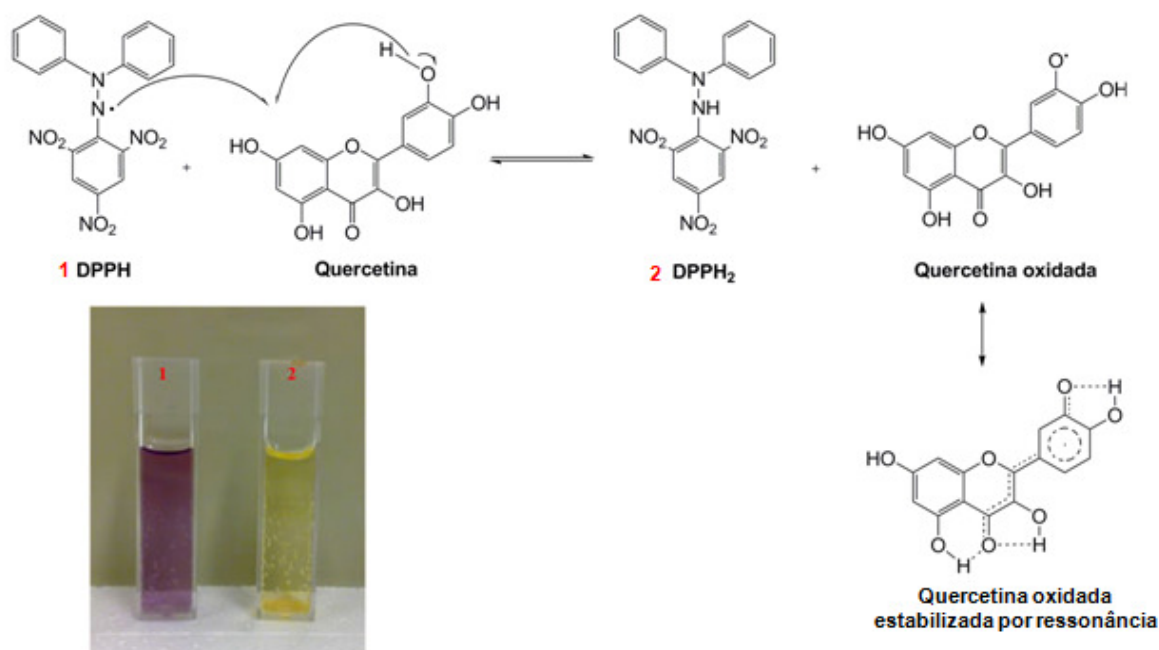


Figura 28: Redução do radical livre DPPH pelo flavonoide antioxidante quercetina (qnint.s bq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=UF)

Em trabalho realizado com nove amostras de *M. subnitida* (mel de abelha jandaíra) de duas regiões semi-áridas no interior do estado da Paraíba, Silva e colaboradores (2013) encontraram valores de CE₅₀ variando de 10,6-12,9 mg/ mL para o mel puro no ensaio DPPH, e CE₅₀ de 6,1- 9,7 mg/mL para ABTS.

Oliveira *et al* (2012) encontraram para méis das espécies *M. flavolineata* e *M. fasciculata* da Amazônia, CE₅₀ que variou de 6,85-49,92 e 15,58 a 54,43 mg/mL, respectivamente. Já para o mel de abelha sem ferrão (*Tetragonula carbonária*) da Austrália, o valor encontrado foi CE₅₀ 83,33 mg/ml (MARYLENLID *et al*, 2013). Resultados de CE₅₀ menos significativos do que os encontrados neste estudo.

Estevinho *et al* (2009) encontraram para CE₅₀ 27,24 mg /mL em méis escuros e 68,17 mg/ mL em méis claros. Estes valores foram semelhantes aos encontrados neste estudo, onde os méis mais escuros de *T. angustula* (por exemplo, TA1 e TA10) apresentaram melhores atividades antioxidantes. Lianda e colaboradores (2012) obtiveram para méis de *A. mellifera* de regiões do Rio de Janeiro valores de CE₅₀ variando de 10,81 a 52,44 mg/mL. Os valores de CE₅₀ para sessenta méis de *Apis*

mellifera obtidos por Sant'Anna e colaboradores (2014) variaram de 7,61 – 42,25 mg/mL.

Salgueiro (2012) analisou amostras de méis de assa-peixe, camará e morrão de candeia oriundas de Minas Gerais e Rio de Janeiro (**Tabela 21**, em anexo pág. 139), encontrando os melhores resultados para os méis de camará, variando de 190,35 - 297,76 $\mu\text{mol Fe(II)}/100\text{ g}$ para FRAP, de 474,69 - 689,11 $\mu\text{molTE}/100\text{g}$ para ABTS, e de 17,12 - 33,39 mg/mL para CE_{50} .

O FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) testa a força antioxidante via avaliação da redução do complexo Fe^{3+} -TPTZ (ferritripiridiltriazina) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] a ferroso-tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ) por redutores, em valor de pH baixo. Baseia-se no fato da habilidade de um composto em gerar Fe^{2+} a partir de Fe^{3+} , definindo sua força antioxidante. O complexo Fe^{2+} -TPTZ tem uma cor azul intensa e pode ser monitorado espectrofotometricamente a 593 nm (**Figura 29**). A vitamina C e o ácido úrico, por ex., reduzem Fe^{3+} a Fe^{2+} . Por outro lado, um antioxidante que reduz efetivamente um pró-oxidante, não reduz, necessariamente, Fe^{3+} a Fe^{2+} . (PRIOR *et al.*, 2005)

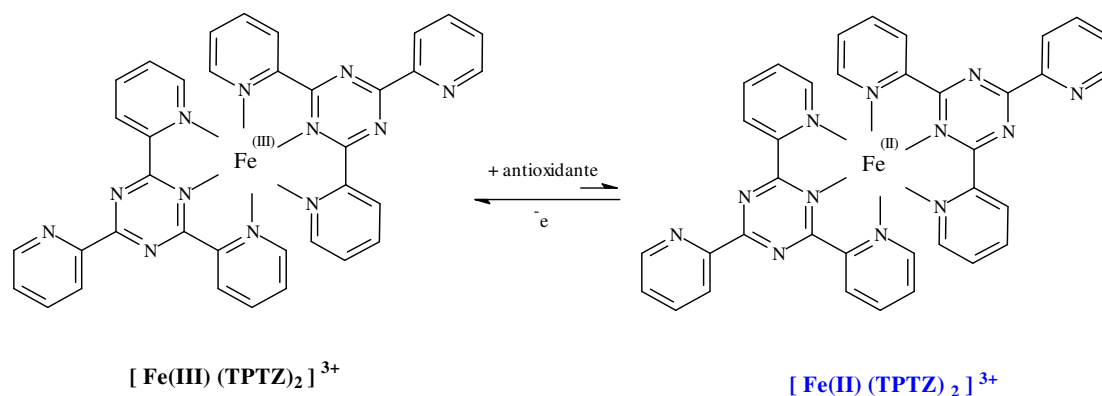


Figura 29 - Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} . (adaptado de RUFINO *et al.*, 2006).

As limitações do método são, portanto: nem todo redutor que é hábil para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} é antioxidante; nem todo antioxidante tem a habilidade específica para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} , como por ex., a glutatona. O resultado final pode ser convertido a mmol de equivalentes de trolox. A atividade relativa do trolox em FRAP é de 2,0 mmol/L, ou seja, a reação direta de Fe^{2+} proporciona uma mudança de absorvância que é a metade de 1 equivalente molar para o trolox.

Os valores de FRAP variaram de 77,39 a 640,35 ($\mu\text{mol Fe(II)/100 g}$) (**Tabela 9**). Para o mel de abelha *Scaptotrigona* sp (**SC1 a SC8**) o valor de FRAP variou de 77,39 a 223,69 ($\mu\text{mol Fe(II)/100 g}$), de 357,02 a 640,35 ($\mu\text{mol Fe(II)/100 g}$) para o mel de *T. angustula* (TA1 a TA10), 94,06 ($\mu\text{mol Fe(II)/100 g}$) para o mel de *M. fasciculata* **MF1**, e para o mel de espécie não identificada (**NI1**) o valor foi de 84,80 ($\mu\text{mol Fe(II)/100 g}$). Entre todas as amostras analisadas o mel de *Tetragonisca angustula* (**TA10**) foi o que apresentou a mais elevada capacidade antioxidante através do ensaio com FRAP (640,35 $\mu\text{mol Fe(II)/100 g}$), enquanto o mel de abelha *Scaptotrigona* sp (**SC6**) apresentou o menor resultado (77,39 $\mu\text{mol Fe(II)/100 g}$).

Para efeito de comparação na literatura só existe dados para méis de *A. mellifera* usando esse ensaio. Os valores de FRAP para onze amostras de méis monoflorais de *Apis mellifera* obtidos por Salgueiro (2012) variaram de 68,13 a 297,96 $\mu\text{mol Fe(II)/100 g}$ (**Tabela 21**, em anexo pág. 139). Comparativamente, os valores de FRAP obtidos neste estudo foram relativamente superiores aos obtidos por Salgueiro (2012) para os méis de *Apis mellifera*.

A capacidade antioxidante usando o teste do ABTS é determinada a partir da leitura (415nm) da inibição causado por antioxidantes do cátion radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato), sal de diamônio, $\text{ABTS}^{\bullet+}$, produzido nesta reação (VASCONCELOS *et al*, 2007), **Figura 30**.

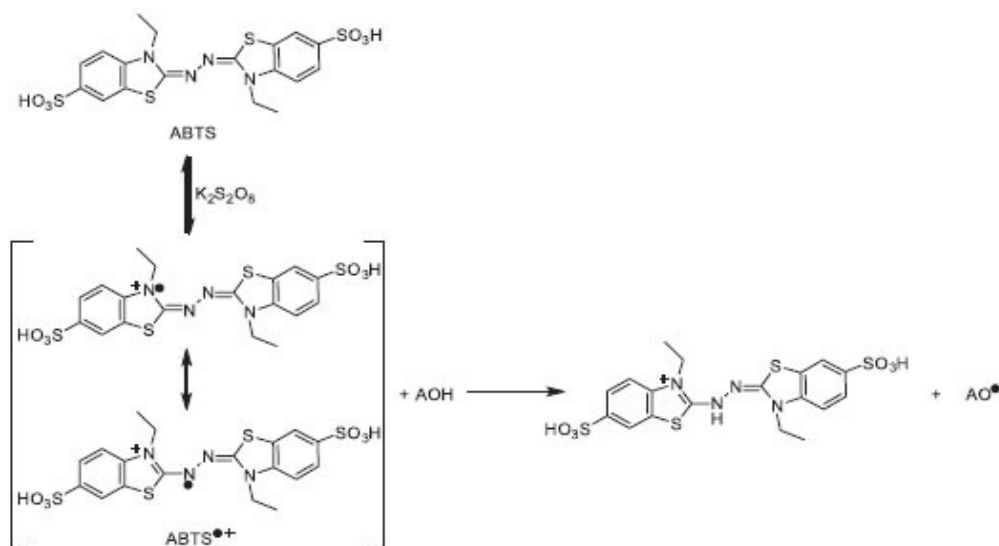


Figura 30. A oxidação de ABTS por persulfato de potássio para gerar cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ e a sua reação com um composto anti-radicalar. (AOH) (De OLIVEIRA *et al.*, 2014)

O método original baseia-se na ativação de metamioglobina como peroxidase, em presença de ABTS. O complexo perferril da hemeproteína produziria o cátion

radical (ABTS^{•+}) de cor azul esverdeada. A adição desse radical a um meio contendo antioxidantes permite avaliar, através do grau de descoloração, a capacidade antioxidante do mesmo. Alguns autores sugerem o uso de oxidação química de ABTS, com utilização de reagentes como dióxido de manganês ou persulfato de potássio, uma vez que outros antioxidantes podem contribuir para reduzir o radical ferrimioglobina formado durante a reação. O percentual de inibição de (ABTS^{•+}) é determinado em função da concentração e do tempo. Quando a medida é relativa à reatividade do trolox, como padrão, sob as mesmas condições, o teste é denominado TEAC, expresso como unidades equivalentes de trolox que correspondem a 1,0 mmol/L. Esse método é aplicável para o estudo de antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis (VASCONCELOS *et al*, 2007).

Neste estudo os valores de ABTS variaram de 3,73 a 364,93 (µmolTE/100g) (**Tabela 9**). Para os méis de abelha *Scaptotrigona* sp (**SC1 a SC8**) os valores variaram de 3,73 a 34,36 (µmolTE/100g), de 85,41 a 364,93(µmolTE/100g) para os méis de *Tetragonisca angustula* (**TA1 a TA10**), 229,69 (µmolTE/100g) para o mel de *Melipona fasciculata* (**MF1**), e para o mel de espécie não identificada (**NI1**) o valor determinado foi 217,56 (µmolTE/100g). Entre todas as amostras de méis avaliadas a amostra de *Tetragonisca angustula* (**TA10**) foi a que apresentou a mais elevada capacidade antioxidante através do ABTS (364,93 µmolTE/100g), enquanto a amostra de *Scaptotrigona* sp **SC5** apresentou o resultado mais baixo (3,73 µmolTE/100g).

Os valores de ABTS para onze amostras de méis monoflorais de *Apis mellifera* obtidos por Salgueiro (2012) variaram de 70,09 a 689,11µmolTE/100g (**Tabela 21**, em anexo pág.139). Comparativamente, os valores de ABTS obtidos neste estudo foram relativamente superiores aos obtidos por Salgueiro (2012) para os méis de *Apis mellifera*.

5.5 - Preparo dos extratos das amostras de mel de abelha sem ferrão

Nesse trabalho para isolar e recuperar as substâncias fenólicas do mel foi utilizada uma combinação de extração em resina XAD-2 e partição líquido-líquido, com acetato de etila (LIANDA, 2004).

O primeiro passo para a extração dos ácidos fenólicos e flavonoides do mel foi a adsorção dessas substâncias fenólicas sobre uma resina polimérica não-iônica Amberlite XAD-2. Esta etapa foi realizada por filtração de uma solução de mel em água

acidificada (pH 2,0) através de uma coluna contendo a resina, e os açúcares e outras substâncias polares foram lavados com a água. As substâncias fenólicas retidas foram então eluídas com metanol e por último foi feita uma partição de acetato de etila.

Nesse estudo foram preparados apenas os extratos dos oito méis de abelha *Scaptotrigona sp*, um do mel de *Melipona fasciculata* e um do mel de espécie não identificada. As dez amostras do mel de *Tetragonisca angustula* por não terem quantidades suficientes, não tiveram seus extratos preparados.

Para cada tipo de mel avaliado, os extratos da partição com acetato de etila foram obtidos a partir de 50g de amostra cujos rendimentos em resíduo seco estão apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10 – Valores médios e desvios padrão dos rendimentos dos extratos da partição com acetato de etila dos méis de *Scaptotrigona sp*, *Melipona fasciculata* e uma amostra de espécie não identificada .

Código dos extratos de Mel	Resíduo seco (mg)
ESC1- <i>Scaptotrigona sp</i>	20,5 ± 3,4
ESC2- <i>Scaptotrigona sp</i>	24,8 ± 1,8
ESC3- <i>Scaptotrigona sp</i>	35,7 ± 2,1
ESC4- <i>Scaptotrigona sp</i>	31,2 ± 7,6
ESC5- <i>Scaptotrigona sp</i>	32,4 ± 1,8
ESC6- <i>Scaptotrigona sp</i>	40,9 ± 3,0
ESC7- <i>Scaptotrigona sp</i>	39,7 ± 3,2
ESC8- <i>Scaptotrigona sp</i>	64,3± 11,3
EMF1- <i>Melipona Fasciculata</i>	19,5 ± 1,7
ENI1- <i>Não Identificada</i>	29,4± 2,5

Os extratos dos méis de *Scaptotrigona sp* (**ESC1 a ESC8**), *Melipona fasciculata* (**EMF1**) e da amostra de mel não identificada (**ENI1**) foram preparados com o objetivo de avaliar o potencial antioxidante, bem como determinar a sua composição química por RMN ¹H e CLAE-DAD. Posteriormente, os resultados aqui obtidos através das substâncias identificadas foram correlacionados aos resultados encontrados por Salgueiro (2012) para diferentes tipos de méis monoflorais de *Apis mellifera*, através de análise multivariada. Antes porém, os resultados de teor de fenólicos e flavonoides, bem como a avaliação da capacidade antioxidante utilizando os três métodos (DPPH, ABTS e FRAP) para os extratos estão sendo discutidos.

5.6 – Determinação do teor de polifenóis totais dos extratos de mel

O conteúdo em fenólicos e flavonoides totais foi realizado para dez dos extratos de mel de abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona sp*, *M. fasciculata* e uma não identificada) a fim de buscar uma comparação com seus méis *in natura*, bem como comparar com resultados obtidos pelo nosso grupo para extratos de mel de *Apis mellifera*.

As médias e os desvios padrão para os teores em fenólicos e flavonoides totais dos extratos de mel de abelha sem ferrão estão apresentados na **Tabela 11**.

Tabela 11 – Teor em polifenóis totais dos extratos de mel de abelha sem ferrão

Extratos de mel	Fenólicos totais (mgE _{AG} /100g) ^a	Flavonoides totais (mgE _Q /100g) ^b
ESC1	18,19 ± 0,02	6,98 ± 0,00
ESC2	7,71 ± 0,01	5,48 ± 0,00
ESC3	16,15 ± 0,02	11,56 ± 0,01
ESC4	11,00 ± 0,01	8,10 ± 0,00
ESC5	12,80 ± 0,02	10,08 ± 0,01
ESC6	10,01 ± 0,01	9,40 ± 0,00
ESC7	8,35 ± 0,01	8,79 ± 0,02
ESC8	9,98 ± 0,01	20,75 ± 0,00
EMF1	4,44 ± 0,01	3,46 ± 0,02
ENI1	7,60 ± 0,01	5,75 ± 0,01

a - mg de equivalentes em ácido gálico por 100mg de extrato, b – mg de equivalentes em quercetina por 100mg de extrato. **ESC** – extrato de *Scaptotrigona sp*; **EMF** – extrato de *M. fasciculata* e **ENI**-extrato de mel de espécie não identificada.

O conteúdo em fenólicos e flavonoides totais variou entre os extratos dos méis da mesma espécie de abelhas, bem como entre as diferentes espécies. O teor variou de 7,71 a 18,19 mgE_{AG}/100mg para os extratos de méis de abelha *Scaptotrigona sp* (**ESC1 a ESC8**); 4,44 mgE_{AG}/100mg para o extrato de mel de *M. fasciculata* (**EMF1**) e 7,60 mgE_{AG}/100mg extrato de mel de abelha sem ferrão de espécie não identificada (**ENI1**).

O teor em flavonoides totais encontrado para os extratos variou de 5,48 a 20,75 mgE_Q/100mg para os extratos de méis de *Scaptotrigona sp* (**ESC1 a ESC8**); 3,46 mgE_Q/100mg para o extrato de mel de *M. fasciculata* (**EMF1**) e 5,75mgE_Q/100mg para o extrato de mel da espécie não identificada (**ENI1**).

De acordo com esses resultados, o extrato *Scaptotrigona sp* (**ESC1**) apresentou o maior valor para o conteúdo de fenólicos totais (18,19 mgE_{AG}/100mg) e o extrato de *Scaptotrigona sp* (**ESC8**) apresentou o maior valor para flavonoides totais (20,75

mgE_Q/100mg), enquanto o único extrato de *M. fasciculata* (**EMF1**) apresentou o mais baixo valor, tanto de fenólicos (4,44 mgE_{AG}/100mg) quanto de flavonoides totais (3,46 mgE_Q/100mg). Parte desse resultado foi compatível com aqueles obtidos para o mel *in natura*, onde para o mel de abelha *Scaptotrigona sp.*, a amostra **SC1** foi também o que apresentou o maior teor em fenólicos totais (80,39 mgE_{AG}/100g de mel, **Tabela 8** pag. 67), e embora a amostra de mel de *M. fasciculata* (**MF1**) tenha apresentado um valor relativamente alto (64,59 mgE_{AG}/100g) para fenólicos totais, o seu extrato (**EMF1**) apresentou o menor resultado. Uma possível explicação para essa variação, é que este ensaio colorimétrico apresenta baixa especificidade, pois não só mede fenóis totais, mas também reage com qualquer substância redutora; por conseguinte, a reação de coloração pode ocorrer com qualquer grupo hidroxifenólico oxidável e muitas substâncias não fenólicas (açúcares) presentes no mel (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2009).

Em trabalho realizado por Silva e colaboradores (2013) o teor de fenólicos totais dos extratos metanólicos do mel de *Melipona s. merrillae* da região Amazônica variou de 17 a 66 mgE_{AG}/100mg de extrato. Em outro trabalho realizado por Silva e colaboradores (2013a) para nove amostras de *M. subnitida* (mel de jandaíra) de duas regiões semi-áridas no interior do estado da Paraíba, o teor variou 80,2-166,1 mgE_{AG}/100mg de extrato no extrato MeOH e de 125,9-391,9 mgE_{AG}/100mg de extrato na fração AcOEt. Esses valores foram superiores ao encontrado nesse estudo.

Ao comparar os resultados do conteúdo de fenólicos totais (4,44 a 18,19 mgE_{AG}/100mg) e flavonoides totais (3,46 a 20,75 mgE_Q/100mg) realizados aqui com os valores obtidos por Salgueiro (2012) para extratos méis monoflorais de *Apis mellifera* do estado do Rio de Janeiro (4,88 a 12,14 mgE_{AG}/100mg e 0,36 a 1,79 mgE_Q/100mg fenólicos e flavonoides totais, respectivamente) (**Tabela 22**, em anexo pág.139); pode-se observar que os extratos dos méis de abelhas sem ferrão apresentaram valores superiores, principalmente para o conteúdo de flavonoides totais. No entanto, quando se comparou com os valores de fenólicos e flavonoides dos extratos de méis silvestre (24,22-71,76 mgE_{AG}/100mg e 0,50-0,95 mgE_Q/100mg, respectivamente) e dos extratos de méis laranjeira (12,72-76,75 mgE_{AG}/100mg e 0,16-5,34 mgE_Q/100mg, respectivamente) obtidos por Lianda e colaboradores (2012) para méis do sudeste brasileiro, os valores para fenólicos totais foram bem superiores ao relatados neste estudo, enquanto flavonoides foram significativamente menores.

A variação no conteúdo de fenólicos e flavonoides entre as amostras analisadas pode ser causada pela variação nas espécies de abelhas, bem como nas fontes florais,

porque as plantas diferentes contêm substâncias fenólicas diferentes e esta variação é mostrada no seu conteúdo fenólico. (EREJUWA *et al*, 2012).

5.7 – Avaliação da Capacidade Antioxidante dos extratos de mel de abelhas sem ferrão

Três métodos diferentes (DPPH, ABTS e FRAP) foram utilizados para determinar a capacidade antioxidante de dez extratos de mel de abelha sem ferrão. As médias e os desvios padrão para a determinação dessas atividades para os extratos estão apresentados na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Capacidade antioxidante dos extratos de mel de abelha sem ferrão.

Códigos dos extratos	FRAP (mmol Fe(II)/100 mg)	ABTS (mmolTE/100mg)	DPPH (CE ₅₀) (µg/mL)
ESC1	223,13 ± 0,01	165,27 ± 0,01	136,63 ± 3,10
ESC2	110,54 ± 0,01	43,13 ± 0,00	225,92 ± 4,36
ESC3	89,05 ± 0,01	75,68 ± 0,00	128,18 ± 3,69
ESC4	143,13 ± 0,01	23,98 ± 0,01	130,57 ± 2,42
ESC5	111,18 ± 0,00	53,85 ± 0,03	48,99 ± 1,03
ESC6	137,76 ± 0,00	51,55 ± 0,00	97,99 ± 4,32
ESC7	81,09 ± 0,00	43,51 ± 0,00	10,30 ± 0,14
ESC8	177,67 ± 0,00	54,11 ± 0,00	6,89 ± 0,77
EMF1	148,59 ± 0,00	20,03 ± 0,01	375,92 ± 17,62
ENI1	128,31 ± 0,01	37,64 ± 0,01	22,19 ± 0,41

Todos os extratos ensaiados apresentaram uma relativa propriedade antioxidante. No entanto, diferentes extratos revelaram vários graus de capacidade antioxidante. Entre os extratos dos méis avaliados, o extrato de *Scaptotrigona sp* (**ESC8**) foi o que apresentou os melhores resultados de capacidade antioxidante (177,67 mmolFe(II)/100mg; 54,11 mmolTE/100mg e CE₅₀ = 6,89 µg/mL), enquanto resultados bem inferiores foram observados para o extrato de *M. fasciculata* (**EMF1**), com valores de 148,59 mmol Fe(II)/100mg; 20,03 mmolTE/100mg e CE₅₀ = 375,92 µg/mL. Estes valores foram compatíveis com resultados obtidos para os conteúdos em fenólicos e flavonoides totais.

Em trabalho realizado por Silva e colaboradores (2013a) para nove amostras de *M. subnitida* (mel de jandaíra) de duas regiões semi-áridas no interior do estado da Paraíba, o valor de CE₅₀ para ensaio com DPPH variou de 108,5-208,6 µg/mL para o

extrato metanólico e 43,5-87,8 $\mu\text{g/mL}$ para a fração de acetato de etila, estando superiores ao encontrado para a maioria dos extratos aqui estudados (exceto os extratos **ESC8, ESC7 e ENI1**).

Os valores da capacidade antioxidante observados para os extratos dos méis de abelhas sem ferrão foram mais elevados quando comparados aos extratos de méis monoflorais de *Apis mellifera* do estado do Rio de Janeiro estudados por Salgueiro (2012) que variou de 23,88 a 116,47 mmolFe(II)/100mg , 30,88 a 137,79 mmolTE/100mg e 278,61 a 1601,89 $\mu\text{g/mL}$, para as análises de FRAP, ABTS e DPPH, respectivamente (**Tabela 22**, em anexo pág.139). No entanto, quando se comparou com os valores obtidos por Lianda e colaboradores (2012) para extratos de méis silvestre os resultados de FRAP, ABTS e DPPH foram 78,51 a 408,14 mmolFe(II)/100mg , 58,66 a 316,48 mmolTE/100mg e 8,17 a 51,45 $\mu\text{g/mL}$; enquanto para os extratos de méis laranjeira os valores foram 34,99 a 438,96 mmolFe(II)/100mg , 46,53 a 383,49 mmolTE/100mg e 5,48 a 52,87 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os valores obtidos nestes trabalhos foram relativamente inferiores aos obtidos para os extratos de méis de *A. mellifera* citados anteriormente.

Segundo Salgueiro e colaboradores (2014) a avaliação da atividade antioxidante (expressa como CE_{50}) dos padrões utilizados na identificação das substâncias presentes no mel pode ser utilizada, a fim de correlacionar a sua contribuição para o potencial antioxidante dos extratos.

De acordo com os resultados obtidos por Salgueiro e colaboradores (2014) na **Tabela 13** os compostos mais hidroxilados, especialmente em posições *orto*, como o ácido gálico, mostrou a atividade antioxidante mais elevada ($\text{CE}_{50} = 1,16\mu\text{g/mL}$) em comparação aos compostos menos hidroxilados, como o ácido benzóico ($\text{CE}_{50} > 1500\mu\text{g/mL}$).

Tabela 13 – Avaliação da atividade antioxidante (CE_{50}) dos compostos fenólicos utilizados como padrão pelo método DPPH (SALGUEIRO *et al*, 2014)

Substâncias fenólicas	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido gálico	1,16 \pm 0,04
Ácido vanílico	338,82 \pm 0,52
Canferol	6,10 \pm 0,56
Ácido protocatecuico	2,30 \pm 0,84
Ácido <i>p</i> -hidroxi- benzóico	207,29 \pm 25,81
Ácido <i>p</i> -cumárico	39,31 \pm 2,78
Vanilina	486,01 \pm 10,05
<i>c,t</i> ABA	>1000
HMF	>1000
Ácido Ferúlico	24,71 \pm 1,87
Luteolina	2,04 \pm 0,07
Naringenina	>1000

Entre os extratos dos méis avaliados, o extrato de *Scaptotrigona sp* (**ESC8**) foi o que apresentou os melhores resultados de capacidade antioxidante ($CE_{50} = 6,89 \mu\text{g/mL}$, **Tabela 12**). Para o extrato de *Scaptotrigona sp* (**ESC8**) foram identificados os ácidos protocatecuico e *p*-hidroxi-benzóico nas concentrações: 0,212 e 0,223 mg/100 mg de extrato respectivamente. Este resultado pode ser explicado pela alta capacidade antioxidante apresentada pelo ácido protcatecuico ($CE_{50} = 2,30 \mu\text{g/mL}$; **Tabela 13**). Enquanto que o pior resultado foi observado para o extrato *Melipona fasciculata* (**EMF1**) ($CE_{50} = 375,92 \mu\text{g/mL}$, **Tabela 12**). Para o extrato **EMF1** foram identificados os ácidos gálicos, *p*-hidroxi-benzóico e HMF nas concentrações: 0,35, 0,53 e 4,16 mg/100 mg de extrato respectivamente. Este resultado pode, em parte, ser explicado pela baixa capacidade antioxidante apresentada, principalmente, pelo HMF ($CE_{50} = >1000 \mu\text{g/mL}$) que representa 82,36% das substâncias identificadas nessa amostra.

5.8 – Composição química dos extratos do mel por CLAE-DAD

As substâncias fenólicas, destacando-se os ácidos fenólicos e flavonoides, representam o grupo mais importante de constituintes presentes no mel. Sua concentração reflete a qualidade inerente ao mel, sendo responsável por sua cor, características sensoriais e, principalmente, sua capacidade antioxidante.

Os constituintes fenólicos do mel e, conseqüentemente, a sua capacidade antioxidante depende das fontes florais que o originam. A predominância de uma fonte

botânica no mel é influenciada, principalmente, por fatores geográficos, sazonais e ambientais. Portanto, variadas propriedades dos méis são esperadas porque a composição das substâncias polifenólicas nos méis de diferentes localidades é provavelmente diferente. Por isso os ácidos fenólicos e flavonoides podem ser considerados como biomarcadores para a origem botânica e/ou geográfica de alguns méis.

Os dados sobre o perfil fenólico é uma ferramenta valiosa para uma melhor caracterização do mel de acordo com a sua origem botânica e / ou geográfica, por isso o desenvolvimento de métodos analíticos para obter essas informações de forma confiável é necessário e de grande importância.

Para caracterização de substâncias fenólicas e dos flavonoides dos méis de diferentes tipos e origens é comum o uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada a detector de arranjo de diodo (DAD) ou a espectrometria de massas (EM).

Para a determinação da composição dos extratos de mel foi utilizado a CLAE-DAD de acordo com o experimental descrito no item 4.12 (pág.50). As condições cromatográficas (fase móvel, velocidade de fluxo e tempo de análise) foram ajustadas de forma a permitir a análise dos ácidos fenólicos (derivados benzóicos e cinâmicos) e flavonoides, HMF e ácido abscísico (ABA). A identificação e quantificação das substâncias fenólicas foram realizadas por comparação dos seus tempos de retenção e espectros no UV com os dos padrões puros de referência, e utilizando padrões para a construção da curva de calibração.

Para auxiliar o monitoramento das diferentes substâncias presentes nos dez extratos foram utilizados doze padrões comerciais de diferentes substâncias, a saber: os ácidos gálico, protocatecuico, *p*-hidroxi-benzóico, ferúlico, *p*-cumárico, benzóico, vanílico, ácido *cis,trans*-abscísico (*c,t*-ABA), HMF, e os flavonoides naringerina, canferol e luteolina (**Figura 31**). Esses padrões foram escolhidos em função dos resultados anteriores descritos na literatura (LIANDA *et al*, 2012; SALGUEIRO *et al*, 2014; LIRA,2014).

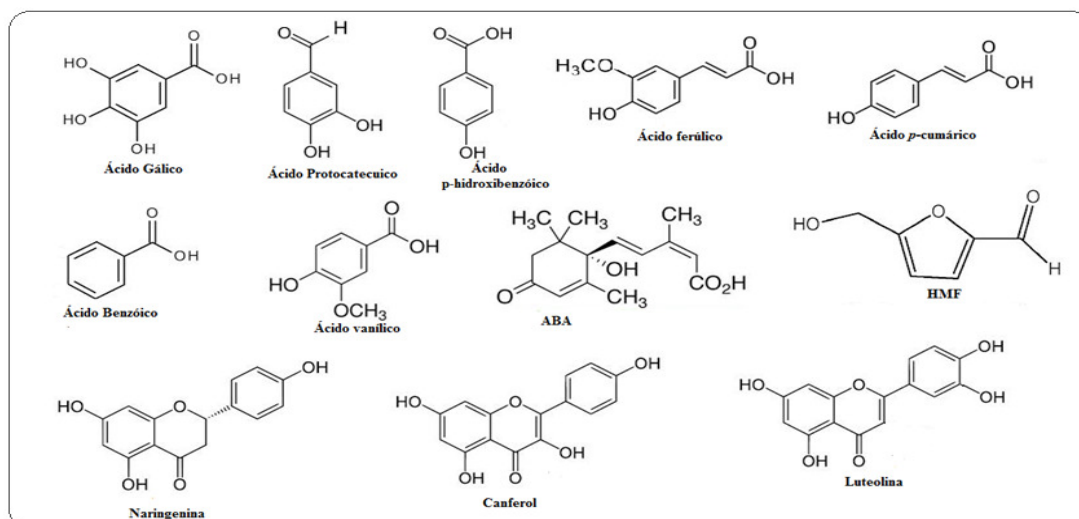


Figura 31 - Estruturas das substâncias usadas como padrões.

Cada padrão foi analisado, individualmente, por CLAE-DAD para ter seus tempos de retenção e as suas curvas de UV determinadas, sendo posteriormente utilizadas para identificar as substâncias desconhecidas presentes nos diferentes extratos de mel. O ácido *t,t*-abscísico foi quantificado a partir do uso da curva de calibração do *c,t*-ABA e comparação com dados da literatura (SILVA *et al*, 2013).

Na **Tabela 14** foram reunidos os tempos de retenção (minutos) e os máximos dos comprimentos de onda (nm) de cada padrão utilizado para facilitar a comparação com os dados obtidos nos extratos dos méis.

Tabela 14– Tempos de retenção e máximos de absorção no UV das substâncias utilizadas como padrão na CLAE-DAD.

Padrões comerciais	t_R (min)	λ_{max} (nm)
Ácido gálico	2,94	271
HMF	3,42	282
Ácido protocatecuico	4,25	259; 294
Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzoico	5,82	254
Ácido ferúlico	9,43	239; 323
Ácido <i>p</i> -cumárico	8,69	310
Ácido benzoico	13,58	240; 273
Naringerina	14,5	289
<i>c,t</i> -ABA	13,01	232; 262
Ácido vanílico	6,26	260; 291
Canferol	16,52	265; 365
Luteolina	14,78	254; 342

A partir das análises dos perfis cromatográficos foi possível determinar a presença de picos nos cromatogramas referentes às diferentes substâncias identificadas. A análise de cada extrato foi feita com três repetições, e cada corrida cromatográfica levou cerca de 45 minutos, onde foi possível identificar a presença de diferentes substâncias: ácido fenólicos, flavonoides, ABA e HMF. A composição química dos extratos metanólicos do mel produzido pela abelha sem ferrão indicou a presença de oito ácidos, três flavonoides e HMF (**Tabela 15**). Posteriormente, serão apresentadas as concentrações (mg/ 100g extrato) para cada substância identificada individualmente nos méis analisados.

Tabela 15: Substâncias identificadas por CLAE-DAD para os três tipos de extratos de méis de abelha sem ferrão estudados nesse trabalho.

Extratos de méis	Substâncias identificadas por CLAE-DAD
<i>Scaptotrigona sp</i>	<p>Ácidos: gálico, protocatecuico, ferúlico, <i>p</i>-cumárico, benzóico, <i>p</i>-hidoxi-benzóico e ABA. Flavonoide: naringerina. Outros: HMF</p>
<i>Melipona fasciculata</i>	<p>Ácidos: gálico e <i>p</i>-hidoxi-benzóico. Flavonoides: luteolina e canferol. Outros: HMF.</p>
Mel de espécie não identificada	<p>Ácidos: protocatecuico, <i>p</i>-hidroxi-benzóico, ferúlico, ABA e vanílico. Outros: HMF.</p>

Os extratos de mel produzidos pela abelha *Scaptotrigona sp* (**ESC1 a ESC8**) apresentaram os ácidos fenólicos derivados de benzóico, como os ácidos gálico, protocatecuico, *p*-hidroxi-benzóico e benzóico; e o derivado hidroxicinâmico, o ácido ferúlico; além da flavanona naringenina, HMF e ABA. Já o extrato do mel produzido pela abelha *M. fasciculata* (**MF1**) só apresentou derivados do ácido benzóico (ácidos gálico e *p*-hidroxi-benzóico), além da flavona luteolina, do flavonol canferol e HMF. O mel de abelha sem ferrão não identificado (NI1) apresentou tanto derivados de ácido benzóico (ácidos protocatecuico, *p*-hidroxi-benzóico e vanílico), como de cinâmico (ácido ferúlico), além de ABA e HMF, porém não apresentou flavonoides. Estas substâncias foram identificadas com base nos seus tempos de retenção e as características espectrais no UV, os quais foram comparados com os dos padrões. Os

cromatogramas registrados a 320 nm, confirmaram a presença de naringenina, luteolina e canferol nas amostras de *Scaptotrigona* sp e *M. fasciculata*.

Para facilitar a discussão e interpretação dos resultados, os cromatogramas dos extratos de cada mel serão apresentados segundo a espécie de abelha sem ferrão. Os valores em porcentagem representam a quantidade relativa da substância presente no extrato em relação ao somatório das substâncias fenólicas totais encontradas (exceto HMF e ácido abscísico).

A avaliação do perfil químico das substâncias encontradas nas amostras de mel produzidos pela abelha *Scaptotrigona* sp foi realizada através da análise cromatográfica dos oito extratos codificados **ESC1, ESC2, ESC3, ESC4, ESC5, ESC6, ESC7 e ESC8**. Para facilitar a apresentação os extratos foram agrupados em duas figuras: extratos de **ESC1 a ESC4 (Figura 32)** e extratos de **ESC5 a ESC8 (Figura 33)**.

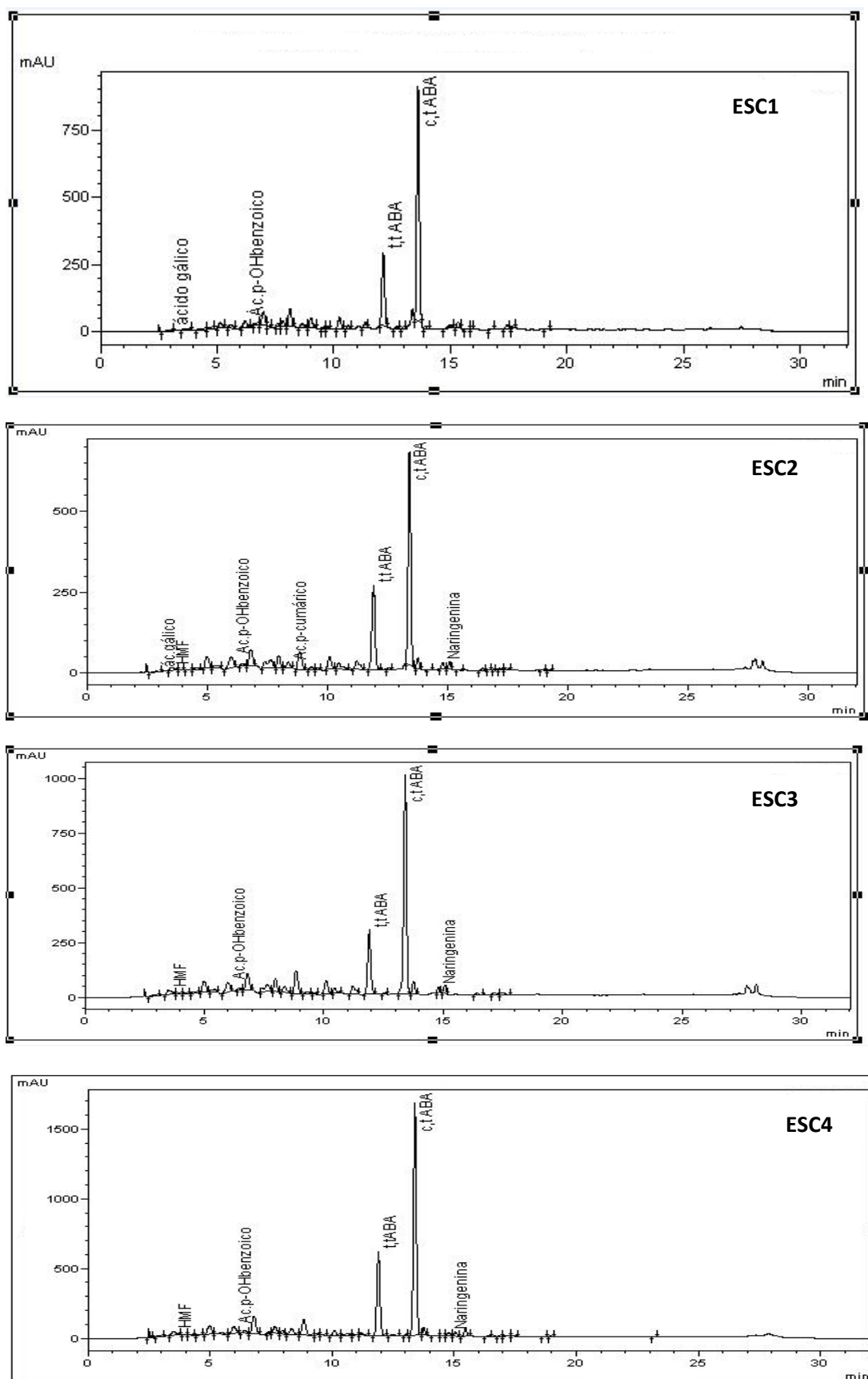


Figura 32: Substâncias identificadas nos extratos **ESC1, ESC2, ESC3 e ESC4** de *Scaptotrigona sp.* por CLAE_DAD (condições parte experimental item 4.12)

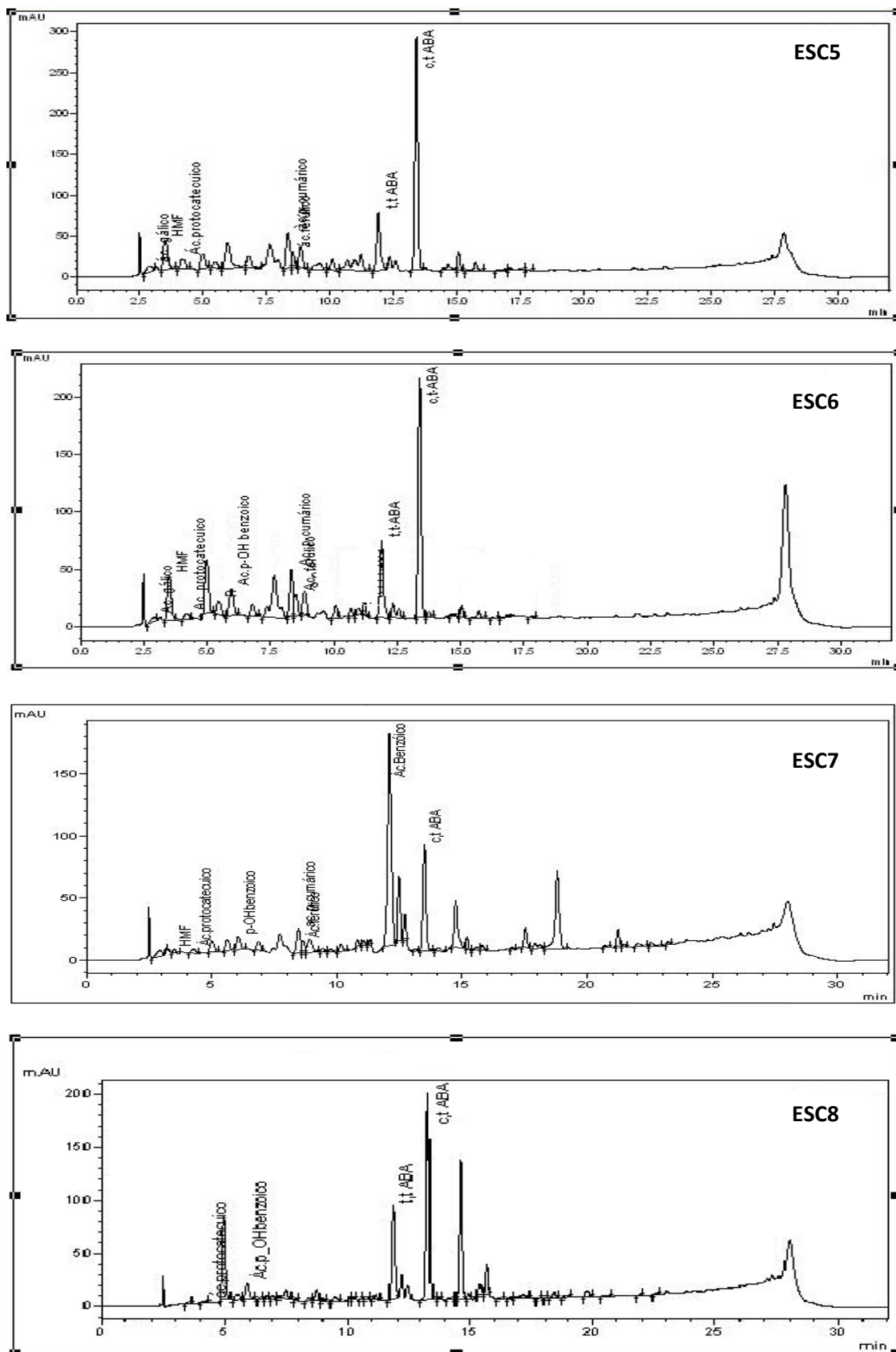


Figura 33 – Substâncias identificadas nos extratos ESC5, ESC6, ESC7 e ESC8 de *Scaptotrigona sp.* por CLAE_DAD (condições na parte experimental item 4.12)

A partir da análise de cada um dos cromatogramas apresentados anteriormente, foi possível identificar a presença de ácido abscísico (ABA) em todas as oito amostras de *Scaptotrigona sp* (**SC1 a SC8**). O ácido *p*-hidroxi-benzóico foi identificado em sete amostras com exceção da amostra **ESC5**. Já o ácido protocatecuico foi identificado em quatro amostras **ESC5** (24,38%), **ESC6** (4,20%), **ESC7** (0,10%) e **ESC8** (48,23%), bem como o ácido gálico esteve presente nas amostras **ESC1** (14,31%), **ESC2** (6,0%), **ESC5** (15,10%) e **ESC6** (7,89%). Os valores entre parênteses representam o percentual da substância presente no extrato em relação ao conteúdo somente dos ácidos fenólicos totais encontrados, exceto flavonoides, HMF e ABA. Além desses ácidos, também foram identificados o ácido ferúlico nas amostras **ESC5** (20,25%), **ESC6** (12,95%) e **ESC7** (1,11%); o ácido *p*-cumárico nas amostras **ESC2** (7,88%), **ESC5** (40,28%), **ESC6** (22,78%) e **ESC7** (1,25%) e o ácido benzóico apenas na amostra **ESC7** (96,49%).

O HMF foi identificado em seis dos extratos, com exceção das amostras **ESC1** e **ESC8**.

O flavonoide naringerina foi identificado apenas em três amostras **ESC2** (14,59%), **ESC3** (97,15%) e **ESC4** (9,21%). Os percentuais de naringenina foram calculados basendo-se no total de substâncias identificadas nos extratos.

A partir desses resultados foi possível observar que nas amostras de extrato de mel de abelha *Scaptotrigona sp* ocorreu uma maior predominância de substâncias ácidas, destacando-se o ácido *cis-trans*-abscísico (ABA).

A avaliação do perfil cromatográfico das substâncias presentes na única amostra de extrato de mel de *Melipona fasciculata*, codificada como extrato **EMF1**, permitiu identificar os percentuais das seguintes substâncias, calculados basendo-se no total de substâncias identificadas no extrato: ácido gálico (6,57%), ácido *p*-hidroxi-benzóico (9,85%), HMF (75,91%), luteolina (2,19%) e canferol (5,47%). Observou-se que esta amostra apresentou um perfil químico com menor variação quando comparado as amostras de *Scaptotrigona sp*. Um fator que deve ser levado em conta foi que apenas uma amostra de extrato de mel de *Melipona fasciculata* foi analisado, não podendo assegurar, para fins estatísticos, a predominância dos fitoquímicos encontradas, embora a análise tenha sido feita com três repetições.

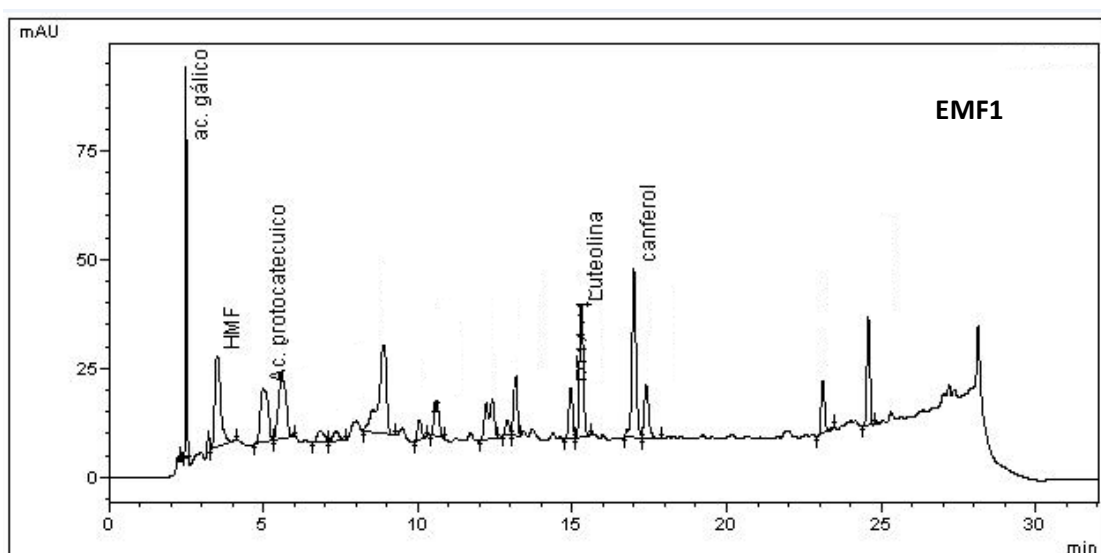


Figura 34 – Substâncias identificadas no extrato **EMF1** de *M. fasciculata* por CLAE-DAD.

A avaliação do perfil cromatográfico das substâncias presentes na única amostra de extrato de mel não identificado e codificado como extrato **ENI1** permitiu identificar os percentuais das seguintes substâncias, calculados basendo-se no total de substâncias identificadas no extrato: ácido protocatecuico (0,63%), ácido *p*-hidroxi-benzóico (6,85%), ácido ferúlico (3,91%), ácido vanílico (22,96%), *c,t*-ABA (45,81%) e o *t,t*-ABA(18,65%) e HMF (1,19%). Nesta amostra não foi identificado nenhum flavoinoide.

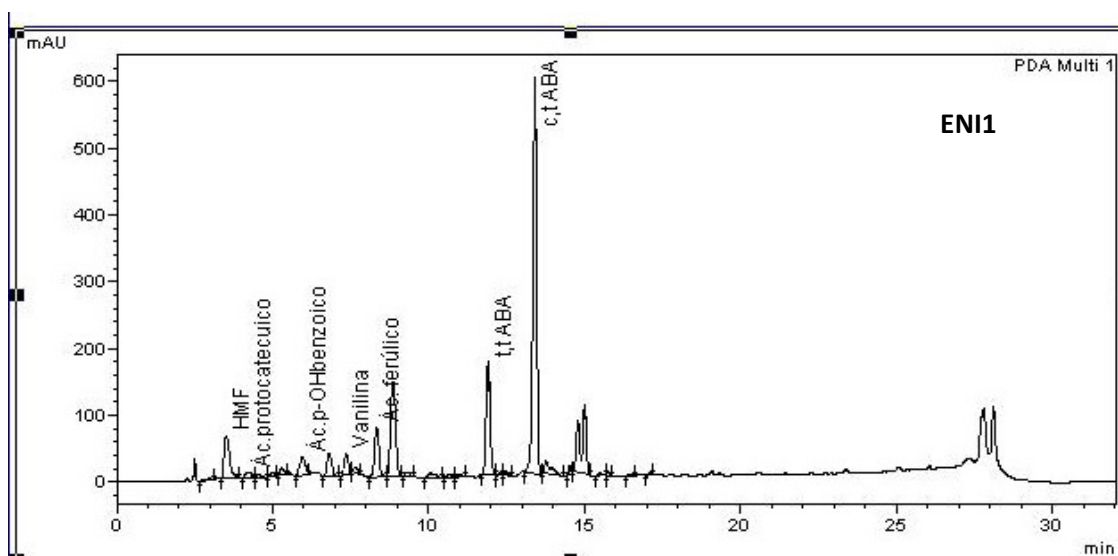


Figura 35– Substâncias identificadas no extrato **ENI1**(mel de espécie não identificada) por CLAE-DAD.

A comparação dos perfis cromatográficos dos extratos dos méis de abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona sp*, *Melipona fasciculata* e espécie não identificada) mostrou que as substâncias fenólicas encontradas não foram às mesmas na sua totalidade.

Em trabalho realizado por Borsato e colaboradores (2014) para o extrato de mel *Melipona marginata* de Curitiba, a composição química apresentou os ácidos fenólicos e os seus derivados como o ácido benzóico, o ácido caféico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, siringato de metila, ácido sinápico, e cafeato de 1,1-dimetilalila. Como flavonoides, o extrato forneceu miricetina, apigenina, quercetina-O-rhamnosideo, e canferol.

Além de flavonoides (MARTOS *et al.*, 2000; ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2012), os ácidos fenólicos mais comuns encontrados geralmente em méis são ácidos benzóico e cinâmico e seus ésteres (SABATIER *et al.*, 1992). Para avaliar a presença destas substâncias nos méis de abelha sem ferrão, foram selecionadas doze substâncias que são comumente encontradas em amostras de mel, que compreendem cinco derivados de benzoico (ácidos gálico, *p*-hidroxi-benzóico, protocatecuico, benzóico e vanílico), dois derivados do ácido cinâmico (ácidos *p*-cumárico e ferúlico), três flavonoides (naringenina, canferol e luteolina), HMF e ácido *c,t*-abscísico.

Os resultados da determinação quantitativa individual das substâncias identificadas nos extratos de mel, expressos em mg por 100 mg de extrato, assim como a quantidade total de ácidos fenólicos e flavonoides encontrados (excluindo HMF e ABA) estão apresentados na **Tabela 16**.

A análise conjunta das substâncias presentes em todos os extratos por CLAE-DAD revelou uma percentual maior em ácidos fenólicos (63,34%) do que em flavonoides (36,66 %). Esses dados estão de acordo com alguns trabalhos descritos na literatura para estudo do perfil químico de méis de abelha sem ferrão (SILVA *et al.*, 2013, 2013a).

Através da quantificação das substâncias foi possível observar também, que entre os extratos avaliados, o mel da espécie não identificada (**ENI1**) foi o que apresentou a maior a concentração de ácidos (30,53mg/100mg de extrato), sendo o ácido vanílico o seu principal constituinte (20,42 mg/100 mg de extrato), enquanto o extrato do mel de abelha *Scaptotrigona sp* (**ESC3**) foi o que apresentou maior concentração de flavonoide (20,89 mg/100mg de extrato), sendo a flavanona naringenina responsável por essa concentração.

Tabela 16 – Conteúdo das substâncias identificadas nos extratos de mel de abelhas sem ferrão (mg/100 mg de extrato)

Substâncias identificadas	ESC1	ESC2	ESC3	ESC4	ESC5	ESC6	ESC7	ESC8	EMF1	ENI1
Ácido gálico	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00			0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00			0,36 ± 0,01	
HMF		0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00		4,16 ± 0,04	1,06 ± 0,01
Ác.protocatecuico					0,08 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,21 ± 0,01		0,56 ± 0,01
Ác. <i>p</i> -HO-benzoico	0,22 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,78 ± 0,00		0,24 ± 0,05	0,04 ± 0,00	0,23 ± 0,03	0,54 ± 0,07	6,09 ± 0,00
Ác. Ferúlico					0,06 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00			3,48 ± 0,01
Ác. <i>p</i> -cumarico		0,03 ± 0,00			0,13 ± 0,00	0,10 ± 0,00	0,05 ± 0,00			
Ác. Benzóico							4,06 ± 0,02			
Naringerina		0,33 ± 0,01	20,89 ± 0,87	0,72 ± 0,44						
<i>c,t</i> -ABA	3,50 ± 0,04	1,54 ± 0,06	0,24 ± 0,00	6,28 ± 0,00	1,39 ± 0,00	1,07 ± 0,01	0,68 ± 0,00	1,60 ± 0,01		40,74 ± 0,02
<i>t,t</i> ABA	1,46 ± 0,11	0,77 ± 0,00	0,82 ± 0,00	2,62 ± 0,12	0,66 ± 0,00	0,60 ± 0,02		1,09 ± 0,00		16,58 ± 0,33
Ác. Vanílico										20,42 ± 0,02
Canferol									0,30 ± 0,00	
Luteolina									0,12 ± 0,00	
Total A.fenolicos	0,26 ± 0,13	0,35 ± 0,16	0,36 ± 0,01	0,78 ± 0,00	0,32 ± 0,03	0,46 ± 0,09	4,21 ± 1,71	0,44 ± 0,01	0,90 ± 0,13	30,55 ± 8,81
Total flavonoides	0	0,33 ± 0,01	20,89 ± 0,87	0,72 ± 0,44	0	0	0	0	0,42 ± 0,00	0

Os padrões de flavonoides de méis de duas espécies de *Melipona* foram analisadas por Vit *et al.* (1997), e verificou-se que os tipos de flavonoides presentes em amostras individuais variaram significativamente. Um estudo posterior realizado por Vit e Tomás-Barberán (1998) sobre flavonoides presentes em mel de abelhas sem ferrão mostrou que méis de mesma origem geográfica tinham perfis flavonoídicos muito similares.

Recentemente foi determinada a presença de naringenina em oito de nove amostras de mel de jandaíra (*Melipona subnitida*) e os autores relacionaram a presença dessa flavanona com a origem botânica do mel (SILVA *et al.*, 2013).

Esses dados sugere que a diversidade de flavonoides nos méis tropicais é menor do que aquela previamente determinada em méis de clima temperado.

O ácido benzóico foi encontrado apenas no extrato **ESC7** (*Scaptotrigona* sp) e apresentou a maior concentração (4,06 mg/ 100mg de extrato).

O isoprenóide, ácido abscísico (ABA), esteve presente na maioria das amostras de extrato de mel de abelhas sem ferrão, como um componente principal, exceto para o extrato **EMF1** (*M. fasciculata*) onde não foi encontrado.

A quantificação do ácido abscísico para as amostras em estudo variou de 0,24 a 40,74 mg/100 mg de extrato , sendo a amostra de extrato de mel não identificado (**ENI1**) a que apresentou a maior quantidade (40,74 mg/100mg de extrato). Desta forma, não poderia ser considerada como um importante biomarcador para autenticação da origem do mel.

Em trabalho descrito por Silva e colaboradores (2013) para nove méis de mel de jandaíra (*M. subnitida*), o ácido abscísico apareceu em todas as amostras analisadas como um componente principal.

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

A presença deste hormônio vegetal pode ser devido ao estresse hídrico que algumas espécies de plantas são submetidas durante as estações do ano. O papel do

ácido abscísico como hormônio do estresse está bem estabelecido. Sob condições de estresse quando o solo começa a secar e o potencial da água das folhas é levemente afetado, ácido abscísico acumulado nas raízes é liberado para os vasos e transportado para folhas para ajudar a planta lidar com a situação de estresse (JIANG E HARTUNG, 2008). Este hormônio de planta foi anteriormente reconhecido como um constituinte fitoquímico para a autenticação de mel e como um marcador fonte floral (FERRERES *et al*, 1996;. BERTONCELJ *et al*, 2011).

Diferenças e similiaridades foram observadas na composição química dos méis de abelhas sem ferrão o que afeta suas propriedades bioativas, particularmente o conteúdo de flavonoides e ácidos fenólicos, que estão diretamente relacionados com a capacidade antioxidante. Para os méis de meliponíneos analisados as amostras apresentaram, em média, maior teor em ácidos fenólicos do que em flavonoides, sendo esse fato responsável por sua boa capacidade antioxidante.

5.9 – Análise Multivariada dos dados

A aplicação de ferramentas quimiométricas para a caracterização, determinação da origem geográfica e controle de qualidade dos produtos alimentares tornou-se uma área de pesquisa bastante ativa. A análise de componentes principais (PCA) é uma ferramenta matemática que realiza uma redução na dimensionalidade de dados e permite a visualização da estrutura subjacente, em dados experimentais e as relações entre os dados e amostras. Abordagens matemáticas multivariadas são ferramentas poderosas que muitas vezes permitem uma representação relativamente simples de semelhanças entre amostras com base em dados analíticos mais ou menos complexos.

Alguns autores têm utilizado a análise multivariada de dados laboratoriais para especificar parâmetros característicos de méis de diferentes origens florais e geográficas. Estes métodos facilitam a classificação de diferentes tipos de méis considerando a conformidade com o modelo estatístico e as variáveis que descrevem os méis analisados. A análise estatística multivariada é muito utilizada na química dos alimentos.

Sant'Anna *et al.*, (2012) utilizando a análise de PCA aliado a testes físico-químicos conseguiram classificar amostras de méis monoflorais brasileiros de cambará, eucalipto e morrão de candeia. Pelo gráfico de *loadings* foi possível determinar que os

ensaios da atividade antioxidante (FRAP, ABTS, e DPPH), cor, pH e conteúdo de flavonoides totais foram as variáveis responsáveis pela discriminação das amostras no gráfico de *scores*.

Técnicas de análises multivariadas têm sido usadas também para detectar a origem geográfica de mel com base no conteúdo de aminoácidos livres, e classificar méis do mesma origem botânica, de acordo com os descritores químicos e físicos.

No presente trabalho, foi utilizada uma abordagem comparativa utilizando-se métodos de análise multivariada para predizer a origem de méis de abelhas sem ferrão e africanizada com base em fatores de composição geralmente aceitos para avaliar a qualidade do mel: pH, acidez, HMF, Pfund (escala de cor), aminoácidos, proteínas; além do teor de ácidos fenólicos e flavonoides, e as avaliações de capacidade antioxidante (FRAP, DPPH, ABTS).

Devido à existência de diferentes fatores que influenciam na caracterização do mel, as análises de correlação (Pearson r) e componentes principais (PCA) foram aplicadas aos resultados das amostras dos méis de abelhão sem ferrão aqui estudados e dos méis de *A. mellifera* estudados por Salgueiro (2012) (em anexo pág.138), visando desenvolver um estudo de caracterização das variáveis indicativas da classificação desses diferentes méis.

5.9.1 - Correlação entre os parâmetros avaliados

No sentido de procurar possíveis relações entre os diferentes parâmetros avaliados nesse trabalho para méis de abelha sem ferrão e uma amostra de espécie não identificada foi desenvolvida a matriz de correlação apresentada na **Tabela 17**.

A análise de correlação (Pearson r) foi realizada entre as variáveis HMF, pH, acidez, Pfund (escala de cor), teor de aminoácidos e proteínas, fenólicos e flavonoides totais e capacidade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP) para 19 amostras de méis provenientes de abelha sem ferrão e uma amostras de espécie não identificada.

Tabela17- Matriz de correlação entre as variáveis analisadas para as amostras de méis de abelhas sem ferrão e não identificada.

	HMF	Acidez	pH	Aç. Redut.	Sacarose	Aç.Totais	Umidade	DPPH	ABTS	FRAP	Proteínas	Aminoác.	Flavon.	Ác. Fen.	Cor
HMF	1.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Acidez	-0.13	1.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
pH	-0.47	-0.62	1.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Aç.	-0.08	-0.50	0.71	1.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Sacarose	-0.02	0.20	-0.34	-0.40	1.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Aç.Totais	-0.15	-0.43	0.62	0.86	0.12	1.00	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Umidade	-0.10	-0.08	0.22	0.54	-0.42	0.37	1.00	---	---	---	---	---	---	---	---
DPPH	0.10	0.37	-0.23	-0.41	-0.05	-0.46	-0.09	1.00	---	---	---	---	---	---	---
ABTS	0.23	-0.40	0.53	0.59	-0.32	0.47	0.27	-0.01	1.00	---	---	---	---	---	---
FRAP	-0.33	-0.49	0.79	0.82	-0.35	0.74	0.53	-0.51	0.56	1.00	---	---	---	---	---
Proteínas	-0.46	-0.07	0.09	-0.22	-0.27	-0.38	0.05	-0.14	-0.49	-0.10	1.00	---	---	---	---
Aminoác.	-0.37	-0.23	0.70	0.63	-0.22	0.60	0.30	-0.38	0.64	0.71	-0.09	1.00	---	---	---
Flavon.	-0.43	-0.48	0.63	0.52	-0.46	0.34	0.55	-0.53	0.18	0.76	0.52	0.46	1.00	---	---
Ác. Fen.	-0.30	-0.39	0.72	0.76	-0.31	0.68	0.44	-0.56	0.58	0.94	-0.13	0.81	0.71	1.00	---
Cor	-0.20	-0.01	0.07	0.20	0.22	0.32	-0.32	-0.71	-0.21	0.16	0.04	0.27	0.08	0.25	1

*Significativo ao nível de $\rho \leq 0.05$

Foram observados que os parâmetros que apresentaram uma correlação mais significativa, foi o conteúdo de fenólicos com os resultados de FRAP, ABTS e DPPH ($r = 0,94$, $r = 0,58$ e $r = -0,56$, respectivamente) e flavonoides totais com os resultados de FRAP e DPPH ($r = 0,76$ e $r = -0,53$, respectivamente), bem como entre os resultados de fenólicos totais e flavonoides ($r = 0,71$), uma vez que estes também podem ser reduzidos pelo molibdênio na análise com Folin-Denis. O coeficiente de correlação forte indica que compostos fenólicos são um dos principais responsáveis pela atividade anti-radicalar do mel.

Pode ser observada uma correlação significativa entre o conteúdo total de aminoácidos e açúcares redutores e totais ($r = 0,63$ e $r = 0,60$ respectivamente). Este resultado pode, em parte, ser explicado pelos produtos formados através da reação entre os aminoácidos ou proteínas com o grupo carbonila dos açúcares redutores (reação de Maillard). Após várias etapas nessa reação, são produzidos polímeros de alto peso molecular, chamados melanoidinas, que possuem forte coloração e que podem interferir na cor do mel (BRUDZYNSKI e MIOTTO, 2011).

A cor do mel mostrou forte correlação com DPPH ($r = -0,71$). Isto se deve a contribuição da estrutura dos polifenólicos, composta por cromóforos resultantes de sistemas de duplas ligações conjugadas, que intensificam a coloração do mel. (BRUDZYNSKI e MIOTTO, 2011).

O pH do mel costuma estar relacionado com os metais presentes, que, por terem caráter básico, aumentam o pH do meio. Os flavonoides apresentam maior atividade antioxidante quando quelados a metais de transição, especialmente Fe(II). Esses íons metálicos complexados podem reduzir os radicais através de mecanismo de oxirredução. Além disso, a capacidade antioxidante pode ser favorecida pelo aumento da conjugação do radical flavonoil formado pela complexação do flavonoide com o metal. Dessa forma, pode ser justificada a correlação entre pH e FRAP ($r = 0,79$), uma vez que esta análise antioxidante ocorre via mecanismo de oxirredução (BUKHARI *et al*, 2008; KOSTYUK *et al* 2007; MASELEV e KUNTIC, 2007).

5.9.2. Análise quimiométrica aplicada aos resultados das análises dos méis de abelhas sem ferrão

Para fins de comparação e tentativa de discriminação entre os méis de abelha sem ferrão e africanizada, método multivariado de análise (PCA) foi aplicado aos resultados obtidos neste estudo para vinte méis de abelha sem ferrão, e aos resultados obtidos anteriormente, e cedidos gentilmente, por Salgueiro (2012) para onze méis monoflorais (cambára, morão de candeia e assa-peixe) de *Apis mellifera* (em anexo pág.138). A análise quimiométrica foi aplicada, visando desenvolver um método que pudesse distinguir e classificar os méis oriundos de diferentes espécies de abelhas, e para isso foram utilizados os resultados das análises físico-químicas, teor de

aminoácidos e proteínas, fenólicos e flavonoides totais, e capacidade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP) de méis de meliponíneos e *mellifera*.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada considerando trinta e uma amostras de méis, sendo vinte provenientes de três tipos de abelha sem ferrão (oito *Scaptotrigona sp* - **SC1 a SC8**; uma *Melipona fasciculata* - **MF1**; dez *Tetragonisca angustula* - **TA1 a TA10** e uma espécie não identificada **NI1**) e onze oriundos de méis monoflorais (dois de assa-peixe, seis de cambará e três de morrão de candeia) de *Apis mellifera* (codificados aqui **AM1 a AM11**).

A análise em componentes principais (PCA) foi utilizada para obter uma transformação mais representativa e compacta das observações. Os componentes são individualmente responsáveis pela variância dos dados. Geralmente a maior parte da variância pode ser explicada por um número reduzido de componentes, sendo possível o descarte do restante sem perda significativa de informação. A partir da PCA puderam ser extraídos os autovalores e os autovetores da matriz de covariância do grupo de variáveis originais. Os componentes principais (PCs) são as variáveis descorrelacionadas, obtidas multiplicando-se as variáveis correlacionadas originalmente com os autovetores (*loadings*). Os autovalores dos PCs são as medidas das discrepâncias associadas à participação das variáveis originais nos PCs. Os elementos de transformação das novas variáveis são chamados de *scores* (DOS SANTOS *et al*, 2010).

A fim de se tentar estabelecer uma outra alternativa de classificação e discriminação das amostras de méis de abelha sem ferrão, o método de PCA foi aplicado considerando-se apenas as amostras de méis: **SC1 a SC8, TA1 a TA10, NI1 e NI11**. A **Figura 36** representa o gráfico de *scores* obtidos através dos dados de pH, acidez, HMF, Pfund (cor), aminoácidos, proteínas, ácidos fenólicos, flavonoides, FRAP, DPPH, ABTS para as amostras de *Tetragonisca angustula* (**TA**), *Scaptotrigona sp* (**SC**), espécie não identificada (**NI1**) e *M. fasciculata* (**MF1**). Nessa análise foram escolhidos os dois primeiros PCs. PC-1 descreveu 75% de variância do conjunto de dados, enquanto a PC-2 descreveu 17%, e as duas PCs juntas descreveram 92% dos dados da variância total.

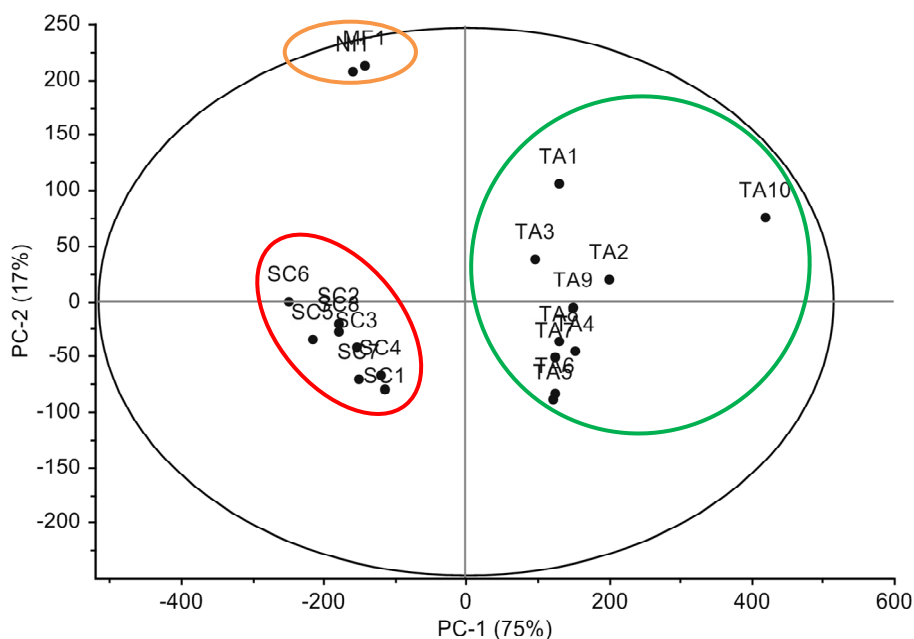


Figura 36-Gráfico de *scores* de PC-1 x PC-2 aplicados aos dados de pH, acidez, HMF, Pfund, aminoácidos, proteínas, ácidos fenólicos, flavonoides, FRAP, DPPH, ABTS das amostras de *Tetragonisca angustula* (TA), *Scaptotrigona sp* (SC), espécie não identificada (NI1) e *M. fasciculata* (MF1).

Na análise do gráfico de *scores* **Figura 36** observou-se a formação de três grupos distintos: um grupo com as amostras de méis de *Tetragonisca angustula* (TA), um grupo com as amostras de méis de *Scaptotrigona sp* (SC) e um com as amostras de espécie não identificada (NI1) e *M. fasciculata* (MF1). Este resultado demonstrou que mesmo todas as amostras sendo de méis de meliponíneos, foi possível através da aplicação de análise multivariada (PCA), discriminar os méis das diferentes espécies de abelhas sem ferrão usando os resultados físico-químicos, teor de fenólicos e flavonoides e capacidade antioxidante. Além disso, mesmo o mel da amostra não identificada (NI1) foi classificada como mel proveniente de abelhas sem ferrão.

O gráfico de *loadings* (**Figura 37**) permite a caracterização de tendências entre as variáveis, ou seja, indica quais variáveis foram as responsáveis pela construção do gráfico de *scores*. Quanto mais distante estiver do centro de origem, mais importante foi esta variável para a formação das PCs. O gráfico abaixo (**Figura 37**) sugere que as várias que mais influenciaram na separação dos dois principais grupos *Tetragonisca angustula* (TA) e *Scaptotrigona sp* (SC) foram o ABTS, aminoácidos, pH, ácidos fenólicos, FRAP e flavonoides.

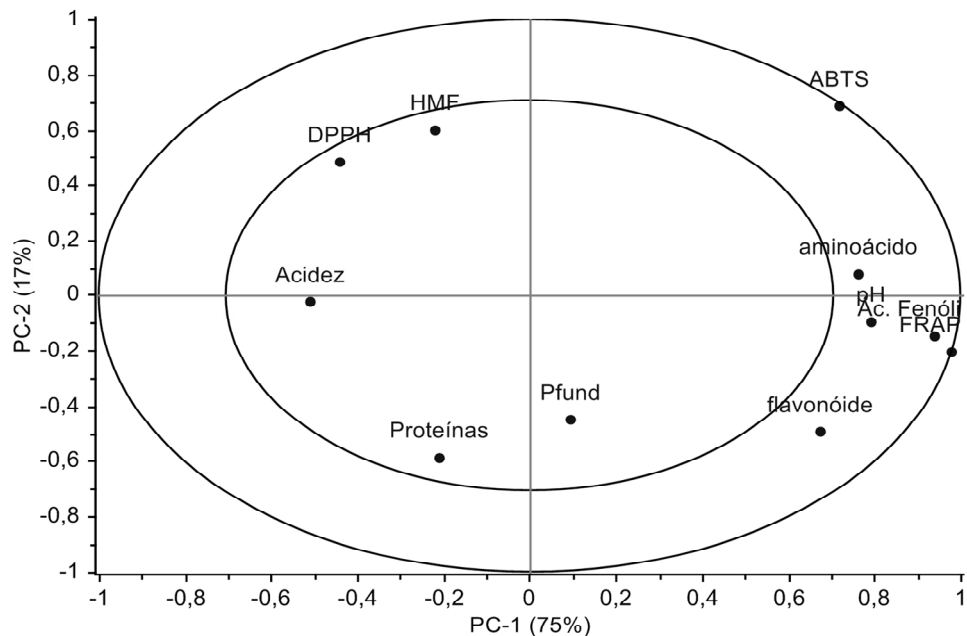


Figura 37- Gráfico de loadings das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de pH, acidez, HMF, Pfund, aminoácidos, proteínas, ácidos fenólicos, flavonoides, FRAP, DPPH, ABTS das amostras de *Tetragonisca angustula* (TA), *Scaptotrigona sp* (SC), espécie não identificada (NI1) e *M. fasciculata* (MF1).

A partir dos dados de variância das amostras de abelhas sem ferrão e *Apis mellifera* determinou-se o número de componentes principais (PCs). Nessa análise foram escolhidos os dois primeiros PCs, onde o primeiro componente (PC-1) concentrou 60% da variância do conjunto de dados, o segundo (PC-2) 34%, e as duas juntas descreveram 94% dos dados de variância total. A **Figura 38** mostra o gráfico de scores obtido por análise de PCA selecionando-se as duas primeiras PCs. Segundo a análise do gráfico, foi possível observar claramente a formação de quatro grupos bem definidos: o primeiro, formado unicamente por méis de abelha *Tetragonisca angustula* (TA), o segundo, formado por méis de *Apis mellifera* (AM), o terceiro, formado por méis de *Scaptotrigona sp* (SC), e o quarto contendo uma mistura de méis de diferentes espécies (não identificado NI1, *M. fasciculata* MF1 e *A. mellifera* AM). Embora não tenha sido possível definir um grupo para o mel não identificado de Inhangapi- Pará, ele se aproximou mais dos méis de abelha *Scaptotrigona sp* (SC) também oriundos do estado do Pará (Belterra). Assim, ficou evidente que as variações das características físico-químicas, do conteúdo de aminoácidos e proteínas, fenólicos e flavonoides e atividade antioxidante influenciam na separação dos agrupamentos ao longo das componentes 1 e 2, conforme a **Figura 38**.

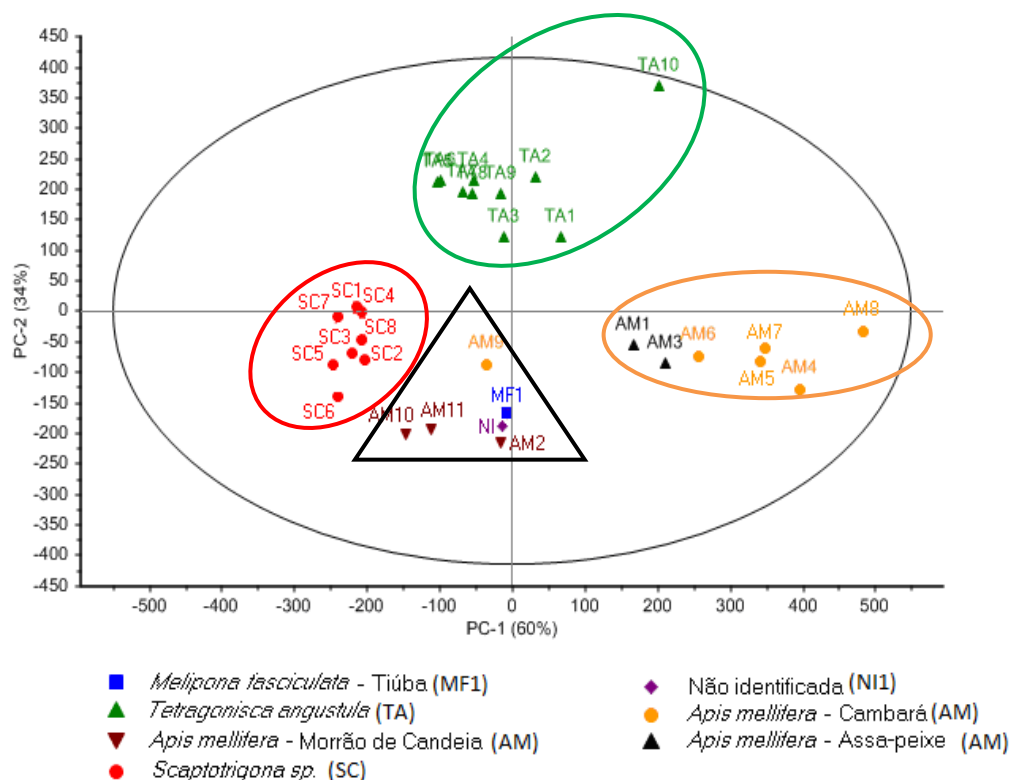


Figura 38-Gráfico de scores de PC-1 x PC-2 aplicados aos dados de pH, acidez, HMF, Pfund, aminoácidos, proteínas, ácidos fenólicos, flavonoides, FRAP, DPPH, ABTS.

O gráfico de *loadings* (**Figura 39**) permite a caracterização de tendências entre as variáveis, ou seja, indica quais variáveis foram as responsáveis pela construção do gráfico de *scores*.

De acordo com o gráfico de *loadings*, as variáveis que mais influenciaram no agrupamento das amostras de mel de *Tetragonisca angustula* foram os aminoácidos e FRAP (**Figura 39**). Dados este que corroboram com os resultados observados nas Tabelas 7 e 9 (páginas 62 e 72), onde os valores de FRAP e aminoácidos ($449,43 \pm 76,56$ mmol Fe(II)/100 mg e $51,89 \pm 20,76$ mgE_{LE}/100g, respectivamente) obtidos para os méis provenientes desta abelha foram superiores, quando comparados os valores médio ($297,8$ mmol Fe(II)/100 mg e $36,25$ mgE_{LE}/100g) para os méis das demais espécies. Já as variáveis que foram importantes para o agrupamento dos méis provenientes da espécie de *Scaptotrigona sp* foram conteúdo de proteínas e Pfund (escala de cor), os quais apresentaram valores superiores ($145,45 \pm 51,49$ mgBSA/100g e $187,52 \pm 50,76$ mm Pfund, respectivamente), confirmando os resultados apresentados

nas **Tabelas 6 e 7** (pag. 54 e 62) quando comparado aos demais méis analisados. Para os méis provenientes de *Apis mellifera* (cambará e assa-peixe) as variáveis que mais influenciaram foram ácidos fenólicos e flavonoides. Esse dado pode ser justificado pelo maior teor de substâncias fenólicas encontradas nos méis monoflorais de assa-peixe e cambará (valores de 94,9 a 103,0 mg E_{AG}/100 g para os méis de assa peixe, 104,7 a 129,3 mgE_{AG}/100g para os méis de cambará, e de 73,7 a 81,4 mgE_{AG}/100 g para os méis de morrão de candeia, SALGUEIRO, 2012). A origem botânica e geográfica pode afetar os padrões de fenólicos e flavonoides, a distribuição de pólen e a atividade antioxidante dos méis (LACHMAN *et al*, 2010). A quantidade de ácidos fenólicos e flavonoides presentes nesses tipos méis, é maior do que em méis de abelhas sem ferrão, isso justificaria o agrupamento de acordo com a origem floral, uma vez que essas substâncias são originadas do néctar e do pólen das plantas.

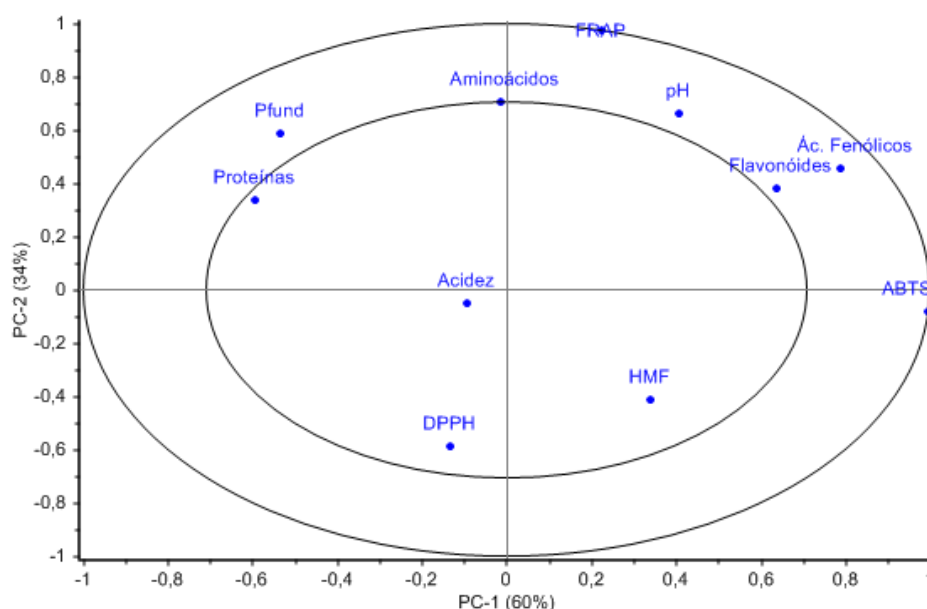


Figura 39- Gráfico de loadings das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de pH, acidez, HMF, Pfund, aminoácidos, proteínas, ácidos fenólicos, flavonoides, FRAP, DPPH, ABTS.

5.9.3 – Análise quimiométrica aplicada aos dados de CLAE-DAD dos extratos de méis abelhas sem ferrão

A fim de se tentar estabelecer outra maneira de se discriminar os diferentes tipos de méis produzidos por abelhas indígenas e africanizadas, o método de PCA foi aplicado também para as substâncias identificadas por CLAE-DAD para os extratos de

méis de abelha sem ferrão deste estudo, e os dados cedidos por Salgueiro (2012) para os extratos de méis de *A. mellifera*.

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada aos resultados obtidos pelas análises cromatográficas considerando vinte um extratos de méis, sendo dez provenientes de dois tipos de abelha sem ferrão (oito de *Scaptotrigona sp* - **SC1 a SC8**, um de *Melipona fasciculata*- **MF1**; e um de espécie não identificada **NI1**), e onze extratos oriundos de méis monoflorais (dois de assa-peixe, seis de cambará e três de morrão de candeia) de *Apis mellifera* (codificados aqui **AM1 a AM11**). Para isto foi construída uma tabela de dados onde constou a presença/ausência dos compostos identificados por CLAE-DAD.

A **Figura 40** mostra o gráfico de *scores* obtido por análise de PCA selecionando-se as duas primeiras PCs. Nessa análise foram escolhidos os dois primeiros PCs, onde o primeiro componente (PC-1) concentrou 34% da variância do conjunto de dados, o segundo (PC-2) 20%, e as duas juntas descreveram 54% dos dados de variância total.

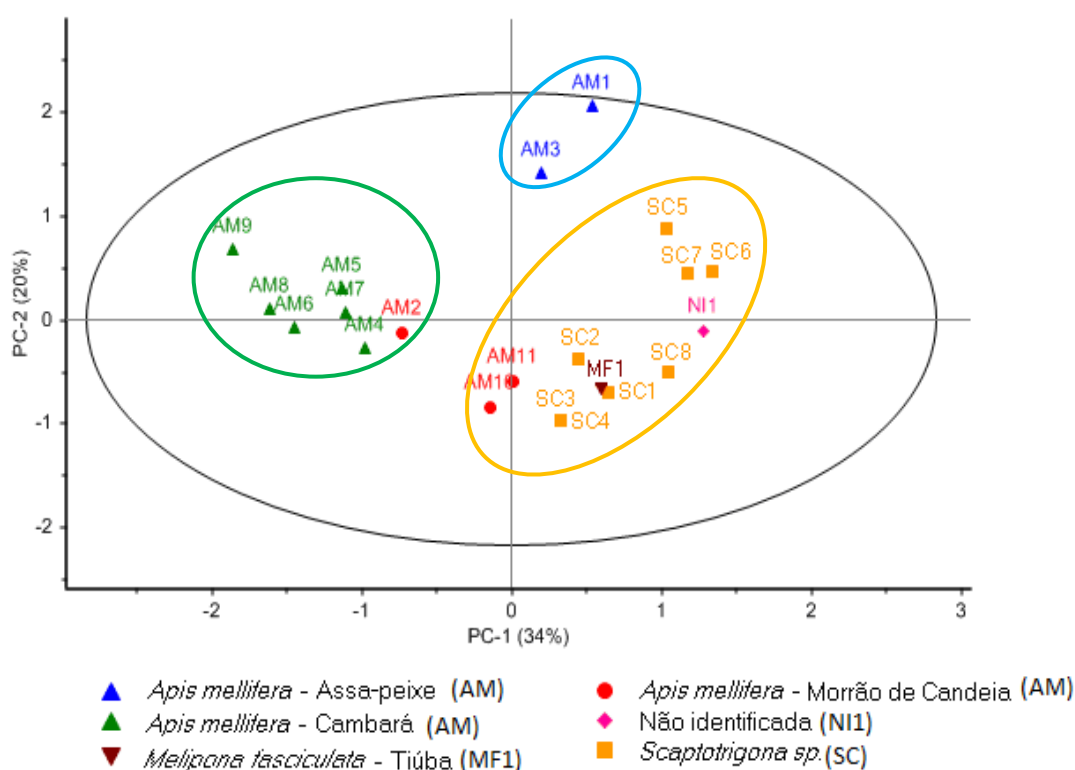


Figura 40- Gráfico de *scores* de PC-1 x PC-2 a partir da matriz de substâncias identificadas por CLAE-DAD dos extratos .

Segundo a análise do gráfico, foi possível observar claramente a formação de três grupos bem definidos: o primeiro, formado unicamente por méis de abelha *Apis mellifera* (AM), o segundo, formado por méis de diferentes espécies de abelha sem ferrão (SC, MF1 e NI1) e *A. mellifera*, e o terceiro, formado por dois méis de assa-peixe de *A. mellifera* (AM). Assim ficou evidente que as substâncias identificadas nos diferentes tipos de méis influenciaram na separação dos agrupamentos ao longo das componentes 1 e 2, conforme a **Figura 40**. A análise revelou uma boa discriminação entre os diferentes grupos de extratos, podendo distinguir principalmente o mel de *Apis mellifera* (AM) daquele de *Scaptotrigona sp* (SC). Para as amostras de méis de *A. mellifera* também foi possível observar uma discriminação de acordo com a origem floral, ou seja, ocorreu, principalmente, uma separação dos méis de cambará dos de assa-peixe, ficando morrão de candeia um pouco menos agrupado.

De acordo com o gráfico de *loadings* (**Figura 41**) as variáveis que mais influenciaram no agrupamento dos extratos de méis de abelha sem ferrão (*Scaptotrigona sp*, *M. fasciculata* e não identificada) foram os ácidos protocatecuico, ferúlico e *p*-hidroxi-benzóico. Já para os méis de cambará de *A. mellifera* foram os ácidos cinâmico, *m*-metoxi-cinâmico, *m*-cumárico e os flavonoides crisina, naringenina e galangina, enquanto para os méis de assa-peixe foram os ácidos cinâmico e *p*-metoxi-cinâmico.

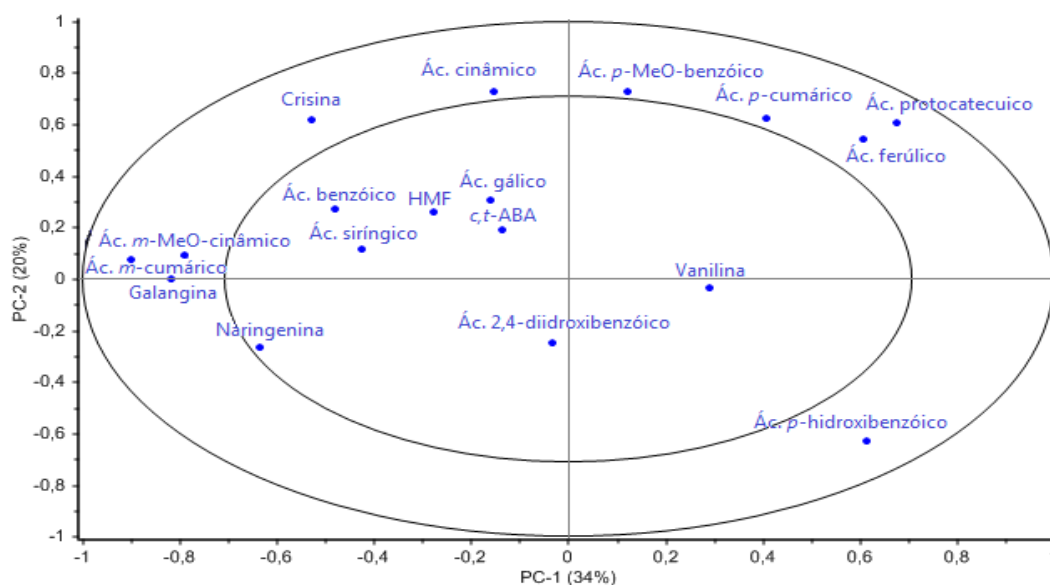


Figura 41 - Gráfico de *loadings* das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de CLAE-DAD dos extratos de méis de abelhas sem ferrão e *A. mellifera*.

5.9.4 – Análise quimiométrica aplicada aos dados de RMN ^1H dos extratos de méis de abelhas sem ferrão

A combinação da quimiometria com a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear tem se revelado um método bastante útil para a classificação de alimentos e bebidas (ANASTASIADI *et al* , 2009; LOLLI *et al*, 2008). Dado ao grande número de informações contidas no espectro de RMN de ^1H de uma amostra, a quimiometria tem se mostrado uma ferramenta valiosa que pode ser usada para determinar e caracterizar méis, permitindo reconhecer as similaridades e diferenças na composição das amostras.

Neste trabalho, buscou-se desenvolver uma forma de classificação dos diferentes tipos de méis através do uso de RMN ^1H aliado a análise de componentes principais (PCA). Para isto, os dez extratos de méis provenientes de abelha sem ferrão (oito de *Scaptotrigona sp*, um de *Melipona fasciculata* e um de espécie de abelha não identificada) foram submetidos a análise por RMN de ^1H . Além desses extratos, onze extratos de méis de *Apis mellifera* (dois de assa-peixe, seis de cambará e três de morrão de candeia), preparados anteriormente e cedidos por Salgueiro (2012) foram utilizados a fim de obter um número maior de amostras de espécies de abelhas distintas, para poder avaliar a aplicação da técnica. Para se obter os melhores resultados para aplicação dos métodos quimiométricos aos espectros de RMN ^1H , a aquisição dos espectros foi feito com repetições.

Todos os extratos de mel (*Scaptotrigona sp*, *Melipona fasciculata*, de espécie de abelha não identificada e de *Apis mellifera*) foram solubilizados em 500 μL de metanol deuterado para a realização dos espectros de RMN ^1H . Os espectros foram adquiridos sem fazer a supressão do sinal do metanol ($\sim 3,80$ ppm), porque poderia causar a exclusão de importantes sinais das amostras.

O estudo da classificação dos méis de abelhas sem ferrão e *Apis mellifera* foi iniciado pela análise visual dos espectros de RMN ^1H dos extratos, com objetivo de verificar as diferenças entre eles, que poderiam auxiliar na discriminação dos tipos de méis estudados. Os espectros foram então integrados em regiões (*buckets*) de igual intervalo (0,04 ppm) na região espectral de 0,01 a 10,1 ppm, na qual foram atribuídas regiões de exclusão nos intervalos: -5 a 0,01; 3,27 a 3,37; 4,81 a 5,19; 8,40 a 9,35 e 10,1 a 20 ppm.

A análise quimiométrica dos dados de RMN ^1H dos extratos foi iniciada pela análise por componentes principais (PCA), que é geralmente uma ferramenta eficiente para reduzir a dimensionalidade dos dados, além de fornecer uma melhor visualização dos agrupamentos dos dados. Com esse tipo de análise foi possível fazer a seleção das variáveis (regiões espectrais) mais importantes para a discriminação entre os grupos de amostras.

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

A **Figura 42** mostra a sobreposição de todos os espectros: oito de *Scaptotrigona sp* (**SC1 a SC8**), um de *Melipona fasciculata* (**MF1**) e um de espécie de abelha não identificada (**NI1**) integrados com as regiões de exclusão.

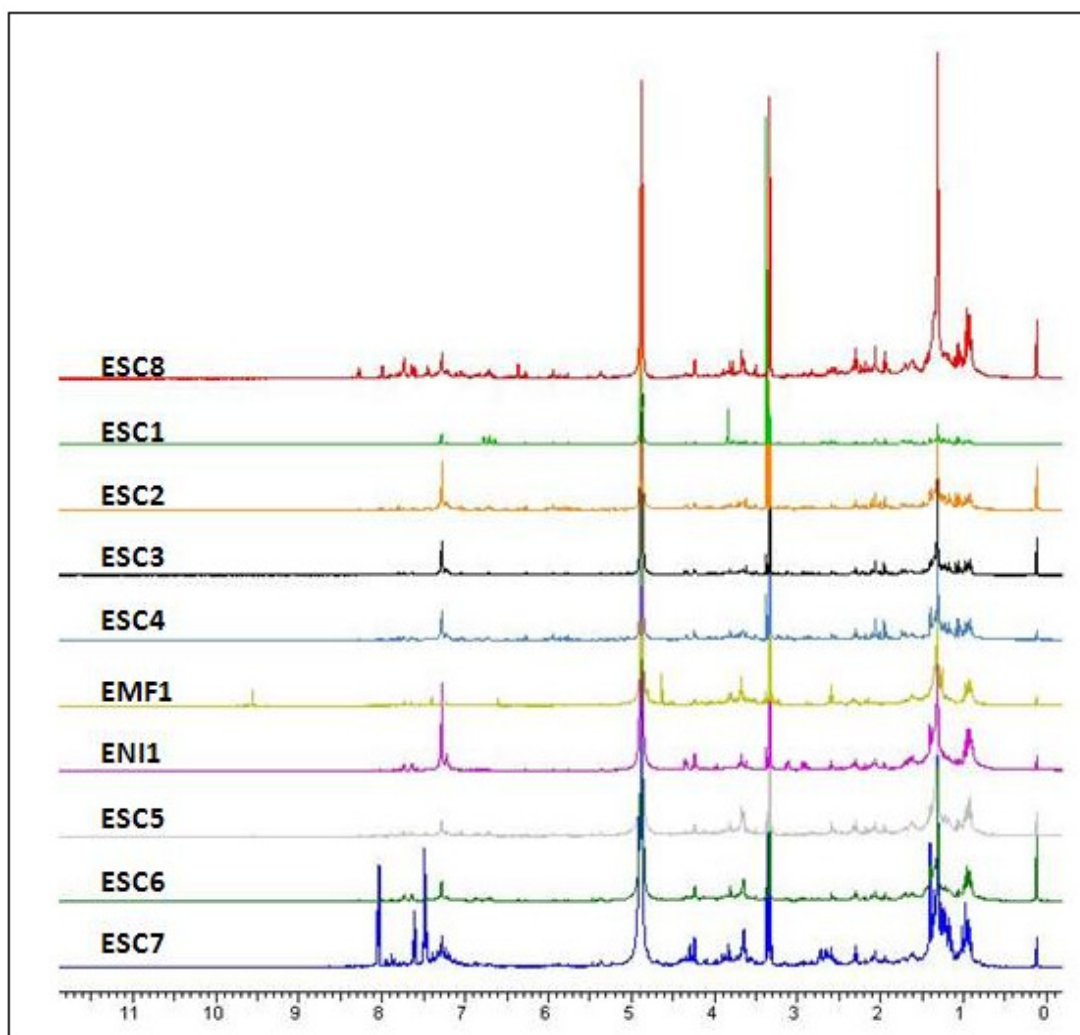


Figura 42 - Sobreposição de todos os espectros de RMN ^1H : oito de *Scaptotrigona* sp(SC), um *M. fasciculata* (MF1) e um de espécie não identificada (NI1) .

A análise de PCA foi realizada considerando os onze extratos de méis de *Apis mellifera* em acetato de etila (AM1 a AM11) e os dez extratos em acetato de etila de méis de abelha sem ferrão (SC1 a SC8, MF1, NI1). A partir dos dados de variância determinou-se o número de PCs. Nessa análise foram escolhidos os dois primeiros PCs, onde PC-1 descreveu 51% de variância do conjunto de dados, enquanto PC-2 descreveu 21%, e as duas PCs juntas descreveram 72% dos dados da variância total. A **Figura 43** mostra o gráfico de *scores* obtido por análise de PCA selecionando-se as duas primeiras PCs.

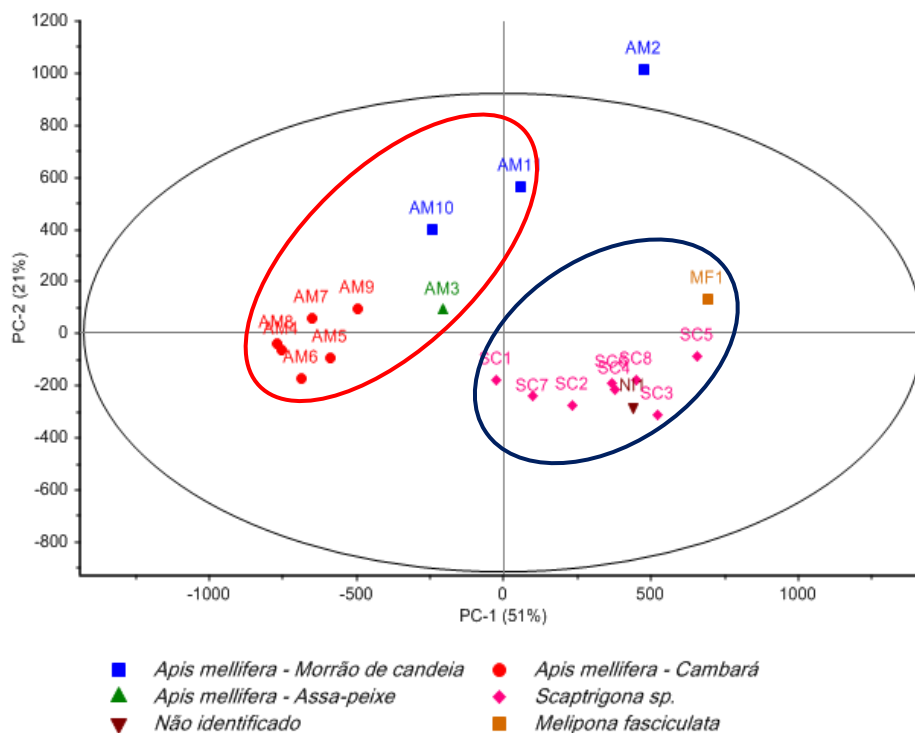


Figura 43 - Gráfico de *scores* de PC-1 x PC-2 dos dados de RMN ¹H dos dez extratos de méis de abelhas sem ferrão e onze extratos de méis de *Apis mellifera*.

Segundo a análise do gráfico, foi possível observar claramente a formação de dois grupos bem definidos: o primeiro, formado unicamente por méis monoflorais (assa-peixe, cambará e morrão de candeia) de *Apis mellifera* (AM), e o segundo, formado somente pelos méis de abelhas sem ferrão (*Scaptotrigona sp.* (SC), *M. fasciculata* (MF1) e mel não identificado (NI1)). Além dessa classificação, para as amostras de méis de *A. mellifera* também foi possível observar uma discriminação de acordo com a origem floral, ou seja, ocorreu uma separação dos méis de cambará, de morrão de candeia e de assa-peixe.

Comparando os gráficos de *scores* obtidos com os dados de RMN ¹H (**Figura 43**), tanto quanto por CLAE-DAD (**Figura 40**), foi possível perceber que em ambos ocorreu a discriminação entre os grupos de méis de acordo com diferentes espécies de abelha. Porém o RMN ¹H mostrou-se mais específico quanto ao agrupamento através da formação de dois grupos distintos: um grupo apenas com méis de *Apis mellifera* e outro grupo com méis de abelhas sem ferrão. O que mais uma vez contribuiu para

sinalizar que a amostra não identificada (**NI1**) seja realmente da espécie de abelha sem ferrão.

6- Conclusões

Os méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão produzidos em diferentes regiões possuem características físico-químicas distintas entre si, com destaque para os parâmetros de umidade e acidez.

Para análise de HMF dezenove das amostras de abelha sem ferrão apresentaram valores dentro dos padrões exigidos pela Legislação Vigente para *Apis*, exceto a amostra MF1 (*Melipona fasciculata*).

Com relação aos valores de pH houve uma grande diferença entre os méis estudados, principalmente, para os méis de abelha *Scaptotrigona sp* (Belterra-Pará) que apresentou valor médio de pH menor (3,65) do que o valor (pH= 4,20) encontrado para os méis de abelha *Tetragonisca angustula* (Ilha Grande -RJ). Quanto a acidez apenas 35% das amostras analisadas (**SC3, SC4, MF1, TA3, TA8, TA9, TA10**) estão em conformidade com os limites exigidos pela legislação vigente. No entanto, a legislação ainda não regulamenta valores máximos ou mínimos para pH (BRASIL, 2000).

Os méis das abelhas sem ferrão apresentam em média teores de umidade maiores quando comparadas com o mel das abelhas *Apis mellifera*.

Segundo a legislação brasileira o mel deve conter no mínimo 65% de açúcares redutores, sendo assim apenas seis amostras de mel de *Tetragonisca angustula* (**TA1, TA2, TA3, TA4, TA9, TA10**) se enquadrariam nesse quesito. Já para sacarose a legislação vigente permite o máximo de 6%, estando dezessete amostras dentro do limite estabelecido, com exceção de três amostras de mel de abelha *Scaptotrigona sp* (**SC7, SC8 e SC10**).

É necessário que a legislação brasileira que regulamenta os requisitos de qualidade do mel (que é baseada no mel de *Apis mellifera*) leve em consideração as características peculiares do mel de abelhas sem ferrão, pois a maioria das amostras de mel de meliponíneos analisadas não se enquadram nesta legislação, especialmente devido aos parâmetros de umidade e acidez.

Os teores de aminoácido e de proteína dos méis de abelha sem ferrão foram superiores quando comparados ao mel de abelha *Apis mellifera*, sugerindo que possa

estar ocorrendo alguma influência do sistema digestivo da abelha de acordo com a espécie estudada.

Verificou-se que os teores de fenólicos totais e flavonoides para os méis de meliponíneos são expressivos e que estes méis apresentam importante atividade antioxidante, o que poderia fundamentar seu uso como fitoterápico e/ou alimento funcional.

Os méis de meliponíneos analisados apresentaram, em média, maior teor em ácidos fenólicos do que em flavonoides, podendo esse fato estar relacionado a sua uma boa capacidade antioxidante.

As principais substâncias identificadas por CLAE-DAD para méis estudados: foram: ácidos protocatecuico, ferúlico, *p*-cumárico, benzóico, *p*-hidroxi-benzóico, ABA, HMF e o flavonoide naringerina para *Scaptotrigona* sp; para *Melipona fasciculata* os ácidos gálico e *p*-hidroxi-benzóico, HMF e flavonoides luteolina e canferol, e para mel de espécie não identificada os ácidos protocatecuico, *p*-hidroxi-benzóico, ferúlico e vanílico, além de HMF e ABA.

A análise por PCA permitiu discriminar os méis das diferentes espécies de abelhas sem ferrão usando os resultados das análises físico-químicas, teor de fenólicos e flavonoides e capacidade antioxidante. Além disso, a análise por PCA aplicada aos espectros de RMN ^1H e dos dados de CLAE-DAD para os extratos foi capaz de distinguir os diferentes tipos de méis de abelha africanizada daqueles de abelha sem ferrão.

A análise de componentes principais (PCA) permitiu a discriminação dos méis de abelhas sem ferrão e *Apis mellifera* levando em consideração os parâmetros analisados mostrando ser uma técnica eficiente e versátil na classificação de méis de diferentes espécies de abelha

7- Referências Bibliográficas

AHMED, A.Y.B.H.; OBBED, M.S.; WABAIDUR, S.M.; ALOTHMAN, Z.A.; AL-SHAALAN, N.H. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Phenolic Acid, Flavonoid, and Phenol Contents in Various Natural Yemeni Honeys Using Multi-walled Carbon Nanotubes as a Solid-Phase Extraction Adsorbent. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014.

AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.MATSUKA,M.; ZHU, F.;NAKAYAMA, T. Antioxidant properties and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101: 1383-1392, 2007.

AIDAR, D.S. Proteic feeding to *Melipona quadrifasciata* Lep. on without flowers seasons (HYMENOPTERA, APIDAE, MELIPONINAE). In: *Anais do 15º Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias* (in press). (1996a)

AIDAR, D.S. Multiplicação e Alimentação Artificial de Colônias de Meliponíneos. In: *Anais do XI Congresso Brasileiro de Apicultura*, Terezina, PI. 12 pp. (in press). (1996b).

ALJADI A M, KAMARUDDIN M Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. *Food Chemistry*. 5:513–518. 2004

ALMEIDA. D. Espécies de abelhas (Hymenoptera, Apoidea) e tipificação dos méis por elas produzidos em área de cerrado do município de Pirassununga, estado de São Paulo.103p. Dissertação de Mestrado em Ciências – Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de são Paulo, piracicaba. 2002.

ALMEIDA-ANACLETO, D. Recursos alimentares, desenvolvimento das colônias e características físico-químicas, microbiológicas e polínicas de mel e cargas de pólen de meliponíneos, do município de Piracicaba, Estado de São Paulo. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 133 f. 2007.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; STRAMM, K.M.; HORITA, A.; BARTH, M.O.; DE FREITAS, A. D. & ESTEVINHO, L. M. Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. *International Journal of Food Science & Technology*, 48 (8), 1698-1706, 2013

ALMEIDA-MURADIAN,L.B.;MATSUDA,A.H.;BASTOS,D.H.M. Physicochemical parameters of amazon melipona honey. *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 3, 707-708, 2007.

ALONSO, W. J. Abelhas sem ferrão: centenas de espécies para polinização, produção de mel, lazer e educação. Sociedade Nacional de Agricultura - *Artigos técnicos*, n. 626, 1998.

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

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

ALVES, R.M.O.; CARVALHO, C.A.L; SOUZA, B. S.; SODRÉ, G. S., MARCHINI, L.C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith (Hymenoptera: Apidae). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 25(4): 644-650., 2005.

ALVES, D.F.S.; CABRAL JÚNIOR, F. das C.; CABRAL, P.P. de A.C.; OLIVEIRA JÚNIOR, R.M. de; REGO, A.C.M. do; MEDEIROS, A.C. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 35, p. 188-193, 2008.

ALVES, E.M.; FONSECA, A. A. O.; SANTOS, P.C. DOS; BITENCOURT, R. M.; SODRÉ, G. DA S.; CARVALHO, C. A. L. DE. Estabilidade físico-química e sensorial de méis desumidificado de *Tetragonisca angustula*. *Magistra*, Cruz das Almas-BA, v. 24, número especial, p. 185-193, dez. 2012.

ALVES, R. M. O, SOUZA B. A, SODRE G. S, FONSECA A. A. O Desumidificação: uma alternativa para a conservação do mel de abelhas sem ferrão. *Mensagem Doce* 91: 2-8. (2007).

ALVES, R.M.O. *Melipona mandacaia* Smith, (Hymenoptera, Apidae): aspectos de interesse agrônômico. Cruz das Almas,. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Mestrado em Ciências Agrárias. 67f. 2004.

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

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183–198. 2002.
AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC Internacional. 17. ed. Gaithersburg - EUA, 2003.

AQUINO, I. S. Abelhas Nativas da Paraíba. João Pessoa: Universitária /UFPB. 91p. 2006.

ARAÚJO, D. R.; SILVA, R. H. D.; SOUSA, J. S. Avaliação da qualidade físico-química do mel comercializado na cidade de Crato, CE. *Rev. Biol. Ciênc. Terra*, v. 6, n. 1, p. 51-55, 2006.

AROCHA, E. M.M. produzidos pelos incubados da Iagram e comercializado no município de Mossoró/RN. *Rev. Caatinga*, v. 21, n. 1, p. 211-217, 2008.

AUBERT, S.; GONNET, M. Measure de la couleur dês miels. *Apidologie*, v.14, p.105-118. 1983.

AYOUB, S. M. H; MAKAWI, S. Z. A; GADKARIEM, E. A. Determination of antioxidant flavonoids in Sudanese honey samples by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *E. J. Chem.*, 6: S429–S437. 2009.

AZEREDO, M. A. A.; AZEREDO, L. da C.; DAMASCENO, J. G. Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis - RJ. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.*, 19, 1, 3-7. 1999

AZEREDO. L. C.; AZEREDO. M. A. A.; BESER. L.B. DE O. Características físico-químicas de amostras de méis de melíponas coletas no estado de Tocantins. In: Congresso brasileiro de Apicultura.. Florianópolis, Anais... Florianópolis: Confederação Brasileira de apicultura, Florianópolis. 13.2000.

BARONI, M. V; NORES, M. L; DÍAZ, M. D. P; CHIABRANDO, G. A; FASSANO, J. P; COSTA, C., WUNDERLIN, D. A. Determination of volatile organic compound patterns characteristics of five unifloral honeys by solid-phase microextraction-Gas chromatography-mass spectrometry coupled to chemometrics. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 7235–7241. 2006.

BARTH, F.G. Insects and flowers - the biology of a partnership. Princeton. University Press, Princeton. 1991.

BATH, P. K.; SINGH, N. A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey. *Food Chemistry*, v.67, 389-397.1999.

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

BERETTA, G.; VISTOLI, G.; CANEVA, E.; ANSELMI, C.; FACINO, R. M. Structure elucidation and NMR assignments of two new pyrrolidinyl quinoline alkaloids from chestnut honey. *Magn. Reson. Chem.* 47, 456–459. 2009.

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.

BERTONCELJ, J., POLAK, T., KROPF, U., KOROSËC, M., GOLOB, T. LC-DAD-ESI/MS analysis of flavonoids and abscisic acid with chemometric approach for the classification of Slovenian honey. *Food Chemistry* 127, 296–302, 2011.

BIESMEIJER, K. Abejas sin aguijón - su biología y la organización de la colmena. Utrecht. 1997.

BLAU, L.; MENEGON, R. F.; FERREIRA, E. I.; FERREIRA, A. G.; BOFFO, E. F.; TAVARES, L. A. Synthesis and total ¹H- and ¹³C-NMR assignment of cephem derivatives for use in ADEPT approaches. *Molecules*, 13, 841e854. 2008.

BLUM, M. Designing foods for better health. *International Food Ingredients* 3: 25–29. 1996.

BOFFO, E. F., TAVARES, L. A., FERREIRA, M. M. C., & FERREIRA, A. G. Classification of Brazilian vinegars according to their ^1H NMR spectra by pattern recognition analysis. *LWT e Food Science and Technology*, 42, 1455e1460. 2009.

BOFFO, E.F.; FERREIRA, M.M.C.; FERREIRA, A.G. SNIF-NMR and chemometric methods applied to ^1H NMR in the study of Brazilian brandy authenticity. In: GUOJONSDOTTIR, M.; BELTON, P.; WEBB, G. Magnetic resonance in food science: challenges in a changing world. Cambridge: Royal Society of Chemistry, p. 143-150. 2009a.

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

BOGDANOV, S.; VIT, P.; KILCHENMANN, V. Sugar profiles and conductivity of stingless bee honey from Venezuela. *Apidologie*, v.27,p.445-450. 1996.

BOORN, K.L.; KHOR, Y.Y.; SWEETMAN, E.; TAN, F.; HEARD, T.A.; HAMMER, K.A. Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonária* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, p. 1534-1543, 2010.

BORG-KARLSON, A. K.; UNELIUS, C. R.; VALTEROVA, I.; NILSSON, L. A. The flora fragrance chemistry in the early flowering shrub *Daphne mezereum*. *Phytochemistry*, v. 41, n. 6, p. 1483-1487, 1996.

BORSATO, D. M; PRUDENTE, A.S.; DÖLL-BOSCARDIN, P.M.; BORSATO, A.V.; LUZ,C.F.P.; . MAIA, B. H. L. N. S.; CABRINI, D.A.; OTUKI, M.F.; MIGUEL, M.D.; FARAGO, P.V. e MIGUEL, O.G. Topical Anti-Inflammatory Activity of a Monofloral Honey of *Mimosa scabrella* provided by *Melipona marginata* During Winter in Southern Brazil. *Journal of Medicinal Food*, 2014.

BORSATO, D.M.; ESMERINO, L.A.; FARAGO, P.V.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O. G. Atividade antimicrobiana de méis produzidos por meliponíneos Nativos do Paraná (Brasil). *B.CEPPA*, Curitiba, v. 31, n. 1, 57-66, 2013.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of μg quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254. 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 28: 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução normativa número 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. <http://www.agricultura.gov.br/>. D.O.U., Seção I,p.16-17.

BUARQUE DE HOLANDA, S. A Cera e o Mel. Rio de Janeiro - RJ.1957.

CALIGIANI, A.; ACQUOTTI, D.; PALLA, G., & BOCCHI, V. Identification and quantification of the main organic components of vinegars by high resolution ¹H NMR spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 585, 110e119. 2007.

CAMARA J.Q., SOUSA A.H., VASCONCELOS W.E., FREITAS R.S., MAIA P.H., da S., de ALMEIDA J.C. & MARACAJÁ P.B. Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. *Rev. Biol. Cienc. Terra*, 4(1), 2004.

CAMARGO, J. M. F; POSEY, D. A. O conhecimento dos Kayapósobre as abelhas sociais sem ferrão (Meliponidae, Apidae, Hymenoptera): notas adicionais. Boletim do Museu Paraense EmilioGoeldi, sér. Zool., v.6, n.1. 1990.

CAMARGO, J.M.F.; PEDRO, S.R.M. . Notas sobre a bionomia de *Trichotrigona extranea* Camargo & Moure (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). *Rev. Bras. Ent.* 51(1): 72-81. 2007

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

CARVALHO, C. A. L. de; SOUZA, B.A.; SODRÈ, G.S.; MARCHINI, L.C.; ALVES, R.M.O. Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. Cruz das Almas: UFBA; SEAGRI-BA, (Série Meliponicultura, 4).32 p. 2005 .

CARVALHO, C.A.L.; SODRÉ, G.S.; FONSECA, A.A.O.; ALVES, R.M.O. & SOUZA, A.C.L. Physicochemical characteristics and sensory profile of honey samples from stingless bees (Apidae: Meliponinae) submitted to a dehumidification process. *Anais Acad. Bras. Cienc.*, 81:143-149, 2009.

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

CLARTON, L. Caracterização do mel de *Melipona scutellaris* da região do recôncavo da Bahia. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; Bahia, Brasil. 73 p. 2012.

CODEX ALIMENTARIUS. Revised codex standard for honey codex stan 12- 1981, Rev.2 [2001]. 24th session of the *Codex Alimentarius* in 2001. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/310/CX12.pdf>. Acesso em 18 de janeiro de 2014.

COLETTO-SILVA, A. Captura de Enxames de Abelhas Sem Ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) sem Destruição de Arvores. *Acta Amazonica* 35(3): 385 – 390, 2005.

CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R.; BENEVELLI, F.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; STOCCHERO, M. NMR and chemometric methods: A powerful combination for characterization of balsamic and traditional balsamic vinegar of Modena. *Anal. Chim. Acta*, 611, 31–40. 2008.

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

CORNEJO, L. G. Tecnologia de miel. In: SEEMANN, P.; NEIRA, M.(Ed). Tecnologia de la produccion apicola. Valdivia: Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, p.145-171. 1988.

CORTOPASSI -LAURINO, M. & GELLI, D.S. Propriedades antibacterianas de méis brasileiros. *Ciência e Cultura*, v.36, n.7, p.616, 1984.

CORTOPASSI-LAURINO, M. & GELLI, D.S. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action des miéis d'abellies africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. *Apidologie*, v.22, p.61-73, 1991.

CORTOPASSI-LAURINO, M. Abelhas em agronegócios. VI Seminário Nordeste de Pecuária - Apicultura, Fortaleza, CE, p. 5-11. 2002.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; MONTENEGRO, A. H. de. Forrageamento na abelha uruçú (*Melipona scutellaris*) In: XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, Florianópolis-SC. 2000.

CRANE, E. Livro do mel. Trad. de Astrid Kleinert Giovannini. São Paulo: Nobel. 1983

CRANE, E. A short history of knowledge about honey bees (*Apis*) up to 1800. *Bee World*, v. 85, n.1.p.6-11, 2004.

CRANE, E. Honey: a comprehensive survey. London: Heinemann. 608 p. 1975.

CRANE, E. O Livro do mel. 2. ed. São Paulo. Livraria Nobel, 1987.

CRUZI, C.B.N.; PIERI, F. A.; CARVALHO-ZILSE, G.A.; ORLANDI, P.P.; NUNES-SILVA, C. G.; LEOMIL, L. Antimicrobial activity of honeys from two stingless honeybee species and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) against pathogenic microorganisms. *Acta Amazonica*. 44(2), 287 – 290, 2014.

DAÍ, J. & MUMPER, R.J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* 15, 7313-7352, 2010.

DANTAS, F. M.; MARQUES, D. D.; OLIVEIRA, M. L.; MORATO, E. F. Sobre os méis de abelhas indígenas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) de Rio Branco, Acre. In: Congresso Brasileiro de Zoologia, 22. Recife. Anais. Recife. p.194. 1998.

DANTAS, H.K.M. Análises físico-químicas e sensorial de mel de abelhas *A. mellifera* L. *Monografia (Graduação em Zootecnia)* –Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB. 50 f. 2003.

DARDÓN, M.J; ENRÍQUEZ, E. Caracterización físico-química y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala. *Interciencia*, v. 33, p. 916-922, 2008.

DE OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S.; Fontes vegetais naturais de antioxidantes . *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 3, 689-702, 2009.

DE OLIVEIRA, S.; DE SOUZA, G.A.; ECKERT, C.R.; THUANY ALVES SILVA, T.A.; SOBRAL, E.S.; FÁVERO, O.A.; FERRERA, M.J.P. ROMOFF, P. WILHELM JOSEF BAADER, W.J. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Quim. Nova*, Vol. 37, No. 3, 497-503, 2014.

DeFLORIART, G.R. Insects as food: why the western attitude is important. *Annual Review of Entomology*, Stanford, v.44, p.21-50, 1999.

DENADAI, J. M.; RAMOS-FILHO, M.M.; COSTA, D.C. Caracterização físico-química de mel de abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) do município de Campo Grande-MS. Obtenção de parâmetros para análises de rotina. In: CONGRESSO DE APICULTURA. Campo Grande. Anais... Campo Grande: Confederação Brasileira de Apicultura. p.80.2002.

DI, W., SHUIJUAN, F., XIAOJING, C., HAIQING, Y., & YONG, H. Three-way principal component analysis applied to food analysis: an example. *Analytica Chimica Acta*, 462, 133–148. 2002.

DOI et al., "Modified Colorimetric Ninhydrin Methods for Peptidase Assay," *Anal Biochem* 118:173-184. 1981.

DORNELES, L.L. *et al.* Polinização de euterpe edulis (*arecaceae*) por abelhas em sistema agroflorestal na ilha de Santa Catarina. 2009. Disponível em: <<http://www.set.embrapa.br/cdagro/tema02/02tema08.pdf>>. Acesso em 30 abril de 2014.

DOS SANTOS, M. L. P.; DOS SANTOS, J. S.; DOS SANTOS, J. R.; DE OLIVEIRA, L. B.; Efeitos dos Escoamentos urbanos e rurais na qualidade das águas do córrego Verruga em Vitória da Conquista - Bahia, Brasil. *Quim. Nova*, 31, 1997-2003, 2008.

DRUMOND, P. Abelhas indígenas sem ferrão. 2007. Disponível em: <http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php>, acesso em: 03 jan. de 2014.

EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; WAHAB, M. S. A.; Honey: A Novel Antioxidant *Molecules*. 17, 4400-4423, 2012.

ESCOBAR, A.L.S. & XAVIER, F.B. Propriedades fitoterápicas do mel de abelhas. *Revista UNINGÁ*, Maringá – PR, n.37, p. 159-172. 2013.

ESTEVINHO, L. M., PEREIRA, A. P., MOREIRA, L., DIAS, L. G., & PEREIRA, L. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3774–3779, 2008.

ESTEVINHO, L.M.; FEÁS, X.; EIJAS, J.A.; VÁZQUEZ-TATO, M.P. Organic honey from Trás-Os-Montes region (Portugal):chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 258-264, 2012.

EUI-CHEOL, S., BRIAN, D. C., PEGG, R. B., DIXON, P. R., & EITENMILLER, R. R. Chemometric approach to fatty acid profiles in Runner-type peanut cultivars by principal component analysis (PCA). *Food Chemistry*, 119, 1262–1270. (2010).

EVANGELISTA-RODRIGUES, A; SILVA, E. M; BESERRA, E. M. F; RODRIGUES, M. L. Análise Físico-Química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões distintas no Estado da Paraíba. *Ciência Rural* 35: 1166-1171. 2005.

FALLICO, B.; ARENA, E.; VERZERA, A.; ZAPPALA, M. The European Food Legislation and its impact on honey sector. *Accreditation and Quality Assurance*. 11, 49-54, 2006.

FALLICO, B.; ARENA, E.; ZAPPALA, M. Degradation of 5 Hydroxymethylfurfural in Honey. *Journal of Food Science* . 73, 625-631, 2008.

FERREIRA, E. L; LENCIONI, C; BENASSI M. T; BARTH, M. O; BASTOS, D. H. M. Avaliação Sensorial de Mel de Abelhas Indígenas de Diferentes Localidades do Brasil. 2007.

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 Chem.*, 114, 1438, 2009.

FERRERES, F., ANDRADE, P., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 2053–2056, 1996.

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; SOLER, C.; GARCIA-VIGUERA, C.; ORTIZ, A.; TOMÁS-LORENTE, F. A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. *Apidologie*. 25, 21-30, 1994a.

FERRERES, F.; GINER, J.M.; TOMAS-BARBERAN, F.A. A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65, 371-372, 1994b

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *The Journal of Biological Chemistry*. 12, 239-243, 1992

FRÍAS, I.; HARDISSON, A. Estudio de los parámetros analíticos de interés en la miel. II: Azúcares, cenizas y contenido mineral y color. *Alimentaria*, v.28, n.235, p.41-43. 1992.

GOMES, S.; DIAS, L.; MOREIRA, L.; RODRIGUES, P. & ESTEVINHO, M.L. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 544–548. (2009).

GOMES, T.; FEÁS, X.; IGLESIAS, A.; ESTEVINHO, L.M. Study of organic honey from the Northeast Portugal. *Molecules*. 16, 5374-5386, 2011.

GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Atividade Antimicrobiana do Mel da Abelha Nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Arquivos Inst. Biol.* São Paulo, v.72, n.4, p.455-459, 2005.

GONZÁLES, A. P.; BURIN, L.; BUERA, M. P. Color changes during storage of honeys in relation to their composition and initial color. *Food Research International*, v.32, p.185-191. 1999.

GUERRINI, A.; BRUNI, R.; MAIETTI, S.; POLI, C.; ROSSI, D.; PAGANETTO, G.; MUZZOLI, M.; SCALVENZI, L.; SACCHETTI, G. Ecuadorian stingless bee (Meliponinae) honey: a chemical and functional profile of an ancient health product. *Food Chemistry*, v. 114, 1413-1420, 2009.

HERNÁNDEZ, O.M.; FRAGA, J.M.G.; JIMENEZ, A.I.; JIMENEZ, F.; ARIAS, J.J. Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. *Food Chemistry*. 93, 449-458, 2005.

HOLANDA, C.A.; OLIVEIRA, A.R.; COSTA, M.C.P.; MARIA NILCE DE SOUSA RIBEIRO; JANILSON LIMA SOUZA; ARAÚJO, M.J.A.M. Qualidade dos méis produzidos por *Melipona fasciculata* Smith da região do Cerrado Maranhense. *Quim. Nova*, Vol. 35, No. 1, 55-58, 2012.

HOOPER, 1981 HOOPER, Ted. Guia do apicultor. 3° ed. São Paulo: Europa América, 269 p. 1981. Disponível em: <http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3>, acesso em: 29 jan. de 2014.

HORN, H.; alunos da disciplina análise de mel da Universidade de Hoheinheim, Alemanha. Méis brasileiros: resultados de análises físico-químicas e palinológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA. Anais. Teresina: Confederação Brasileira de Apicultura, p.403-429. 1996.

ISLA M, CORDERO A, DÍAZ L, PÉREZ-PÉREZ EM, VIT P. Cosmetic properties of honey. 1. Antioxidant activity. pp. 1-8. In Vit P & Roubik DW, eds. Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes; Mérida, Venezuela. 2013. Disponível em: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/35292>. Acesso em: 29 jan. de 2014.

JAMRÓZ, M.K.; PARADOWSKA, K.; ZAWADA, Z.; MAKAROVA, K.; KÁZMIERSKIA, S.; WAWERA, I. ¹H and ¹³C NMR-based sugar profiling with

chemometric analysis and antioxidant activity of herbhoneys and honeys. *J Sci Food Agric*, 243-252, 2013.

JIANG, F. & HARTUNG, W. Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany* 59, 37–43, 2008.

KUMAR, A.; SHARMA, V.K.; SINGH, H.P.; PRAKASH, P.; SINGH, S.P. Efficacy of some indigenous drugs in tissue repair in buffaloes. *Indian Veterinary Journal*, v.70, p.42-44, 1993.

KAŠKONIENE, V.; VENSKUTONIS, R.P. Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 9, 620-634, 2010.

KERR, W. E.; CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V.A. Abelha urucu biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte: Fundação Acangaú. (Coleção Manejo da vida Silvestre. v.2) .144p.1996.

KERR, W. E., FILHO A. B. Meliponíneos. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* 8: 22-23. 1999.

KERR, W. E. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção do mel, pólen, geoprópolis e cera. Informe Agropecuário. Belo Horizonte, v. 13, n. 149, p. 15-22, 1987.

KEVAN, P. G. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, Amsterdam, v.74, p. 373–393, 1999.

KLEINERT-GIOVANNINI, A. A vida das abelhas “sem ferrão”. *Apicultura no Brasil* 32: 38-40. 1989.

KÜÇÜK, M., KOLAYLI, S., KARAOĞLU, S., ULUSOY, E., BALTACI, C., CANDAN, F.. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100, 526–534. 2007.

KÚS, P.M.; CONGIU, F.; TEPER, D.; SROKA, Z.; JERKOVIC, I.; IGNAZIO, C.; TUBEROSO, G. Antioxidant activity, color characteristics, total phenol content and general HPLC fingerprints of six Polish unifloral honey types. *Food Science and Technology*. 55, 124-130, 2014.

LACERDA, J. J. J.; SANTOS, J. S.; SANTOS, S. A.; RODRIGUES, G. B.; SANTOS, M. L. P. Influência das características físico-químicas e composição elementar nas cores de méis produzidos por *Apis mellifera* no sudoeste da Bahia utilizando análise multivariada. *Química Nova*, v. 33, n. 5, p. 1022-1026, 2010.

LAGE, L. G. A; COELHO, L. L; RESENDE, H. C; TAVARES, M. G; CAMPOS, L. O; FERNANDES-SALOMÃO, T. F. Honey physicochemical properties of three

species of the Brazilian *Melipona*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 84: 605-608. 2012.

LIANDA, R.L.P. *Dissertação de Mestrado*. Caracterização de mel de *Apis mellifera* pelo seu perfil em substâncias fenólicas por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação da atividade biológica. PPGQO-UFRRJ. 2004.

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

LIANDA, R.L.P.; SANT'ANA, L.D'O.; ECHEVARRIA, A.; CASTRO, R.N.; Antioxidant activity and phenolic composition of Brazilian honeys and their extracts. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 23, 618-627, 2012.

LMPERATRIZ-FONSECA, V.L.; KLEINERT-GIOVANNINI, A. Abelhas sociais e flores: Análise polínica como método de estudo. In: Pirani, R.L., Cortopassi-Laurino, M. Flores e abelhas em São Paulo. EDUSP/FAPESP, São Paulo. 192p. 1993.

LOLLI, M.; BERTELLI, D.; PLESSI, M.; SABATINI, A. G.; RESTANI, C. Classification of Italian honeys by 2D HR-NMR. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1298–1304. 2008.

LYNN, E. G.; ENGLIS, D. T.; MILUM, V. G. Effect of processing and storage on composition and color of honey. *Food Research*, v.1, p.23-27. 1936.

MABRY, T.J. *et. al. The systematic identification of flavonoids*. Springer: Berlin, p.51-2. 1970.

MAGALHÃES, T. L. de. Aspectos econômicos da criação de abelhas indígenas sem ferrão (Apidae: Meliponini) no Nordeste Paraense / Tatiana Lobato de Magalhães, Giorgio Cristino Venturieri . – Belém, PA : Embrapa Amazônia Oriental, 2010.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79: 727-747. 2004.

MANYI-LOH, C. E; NDIP, R. N; CLARKE A. M . Volatile Compounds in Honey: A Review on Their Involvement In Aroma, Botanical Origin Determination and Potential Biomedical Activities. *Int. J. Mol. Sci.*, 12: 9514-9532. 2011.

MANYI-LOH, C. E; CLARKE, A. M; NDIP, R. N. An overview of honey: Therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *Afric. J. Microbiol. Res.*, 5: 844–852. 2011.

MARCHINI, L.C.; SODRÉ, G. da S; MORETI, A.C. de C.C. Mel brasileiro: composição e normas. Ribeirão Preto, 111p. 2004c.

MARCHINI, L.C.; CARVALHO, C. A.L. DE; ALVES, R. M. O. Características físico-químicas de amostras de méis de abelha urucu (*Melipona scutellaris*). In: Congresso Brasileiro de Apicultura. Salvador. Anais... Salvador: confederação Brasileira dos apicultores.p.201. 1998.

MARTINS, A, C. L.; RÊGO, M.M.C.; CARREIRA, L.M.M.; ALBUQUERQUE, P.M.C. Espectro polínico de mel de tiúba (*Melipona fasciculata* Smith, 1854, Hymenoptera, Apidae). *Acta Amazonica*. vol. 41(2), 183 – 190, 2011.

MARTOS, I.; FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F.A. Identification of flavonoid markers for the botanical origin of Eucalyptus honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48, 1498-1502, 2000.

MARYLENLID, I.; ATILIO, C.; LORENA, D.; MARIANA, P.P. E.; VIT, P. Cosmetic properties of honey. 1. Antioxidant activity. pp. 1-8. In Vit P & Roubik DW, eds. Stingless bees process honey and pollen in cerumen pots. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes; Mérida, Venezuela. 2013.

MEDA, A. et al. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, v. 91, p. 571-577, 2005.

MEDINA, C. M.; GONZALEZ, A. J. B. Memórias del IX Seminario Americano de Apicultura, México, p. 46-50. 1995.

MENSOR, L. L.; MENEZER, F. S. LEITÃO, G. G.; REIS. A. S. SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. *Phytotherapy Research*, v. 15, p. 127-130, 2001.

MERCOSUL. Resolução MERCOSUL nº 56, de 29 de setembro de 1999. Regulamento técnico MERCOSUL “Identidade e Qualidade do Mel,” em suas versões em espanhol e português, que consta no anexo e faz parte da presente Resolução. XXXV Grupo Mercado Comum, Montevideú, 1999.

MICHENER, C. D. The Bees of the World. Baltimore, The Johns Hopkins. 2007.

MICHENER, C. D. The social behavior of the bees: A comparative study. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA. 404 pp. 1974.

MICHENER, C. D. The bees of the world. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 913 p. 2000.

MILUM, V.G. Some factores affecting the color of honey. *Journal of Economic Entomology*, v.41, p.495-505. 1948.

MOLAN, P.C. The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World*, 73:5–28. 1992.

MONTE, A. M. M.; AZEVEDO, M.L.X. ; FILHO, F.C.C.; RODRIGUES, A.M.D.; MOURA, S.G.M.; e MURATORI, M.C.S. Qualidade de méis de abelhas nativas sem ferrão do estado do Piauí, Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 35(1):48-54, 2013.

MOURA, L. N. Caracterização botânica e físico-química do mel de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae) produzido em comunidades rurais do semi-árido baiano. Relatório de Bolsa de Iniciação Científica.

Graduando em Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; Cruz das Almas, Brasil. 12 pp. 2011.

MUÑOZ , O. & COPAJA, S. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Química Nova* 30: 848–851, 2007.

NAAB, O.A.; TAMAMEM, M.A.; CACCAVARI, A. Palynological and physicochemical characteristics of three unifloral honey types from central Argentina. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 6, 566-576, 2008.

NOGUEIRA-NETO, P. Uma conversa sobre fragmentos florestais, pequenas populações de abelhas indígenas. *Anais do IV Encontro sobre abelhas*, 4: 27-34.2000.

NOGUEIRA-NETO, P. *Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão* – São Paulo:Nougeirapis, 445p. 1997.

ODDO, L. P., HEARD, T. A., RODRIGUES-MALAYER, A., PEREZ, R. A., FERNANDEZ-MUINO, M., SANCHO, M. T. Composition and antioxidant activity of Trigona carbonaria honey from Australia. *Journal of Medicinal Food*, 11, 789–794, 2008.

OLIVEIRA, D. J. Qualidade microbiológica de méis de *Tetragonisca angustula* Latreille, 1811 (Apidae, Meliponinae) provenientes da Ilha de Itaparica, Estado da Bahia. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; Cruz das Almas, Brasil. 20 pp. 2011.

OLIVEIRA, P. S., MULLER, R. C. S., DANTAS, K. G. F., ALVES, N. C., VASCONCELOS, M. A. M., & VENTURIERI, G. C. Phenolic acids, flavonoid and antioxidant activity of honeys of *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) from Amazon. *Química Nova*, 15, 200–205, 2012.

PAMPLONA, B. C. Exame dos elementos químicos inorgânicos encontrados em méis brasileiros de *Apis mellifera* e suas relações físico-biológicas. São Paulo, Dissertação (Mestrado) -Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 131p. 1989.

PÉREZ, A.R.; IGLESIAS, M.T.; PUEYO E.; GONZALEZ, M.; DE LORENZO, C. Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 360-365, 2007.

PESSON, P. Transport du pollen par des lês animaux: zoogamie. In: Pesson, P.; Louveaux, L. (eds.). *Pollination et Productions végétales*. Institute National de la Recherche Agronomique, Paris. p.97-139. 1984.

PIMENTEL,R.B.Q.; COSTA,C.A.; ALBUQUERQUE, P.M. & JUNIOR,S.D. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manaosensis* and commercial honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13:151- 2013.

PONTE, F.L.R. Toxicidade pré-clínica de fitoterápicos à base de mel de abelha, própolis e extratos de mikania glomerata, eucalyptus globulus ou da associação zingiber officinale e allium sativum em roedores. 78f. Dissertação de Mestrado (Fisiologia). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2003.

POSEY, D. A. Ethnomethodology as an emic guide to cultural systems: the case of the insects and the Kayapó Indians of Amazonia. *Revista Brasileira de Zoologia* 1: 135-144. 1983.

POSEY, D. A. Temas de inquirições em entomologia: algumas sugestões quanto à geração e teste de hipóteses. Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi, v.3, n.2, p.99-134, 1987.(Série Antropológica)

PRESTES, R.A.; COLNAGO, L.A.; FORATO, L.A.; VIZZOTTO, L.; NOVOTNY, E.H.; CARRILHO, E. A rapid and automated low resolution NMR method to analyze oil quality in intact oilseeds. *Analytica Chimica Acta*. 596, 325-329, 2007.

PRIOR, R.L., WU, X., SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4290–4302, 2005.

PRONI, E.A. Biodiversidade de abelhas indígenas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae na Bacia do Rio Tibagi, Estado do Paraná, Brasil. *Arq. Ciên.Vet. Zool. UNIPAR*, 3(2):p.145-150, 2000.

PUSCAS, A., HOSU, A., CIMPOIU, C. Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. *Journal of Chromatography A*. 1272, 132-135, 2013.

RESOLUÇÃO CONAMA nº 346, de 16 de agosto de 2004. Publicada no DOU no 158, de 17 de agosto de 2004, Seção 1, página 70.

RIBEIRO, R.O.R.; MÁRSICO, E.T.; CARNEIRO, C.S.; MONTEIRO, M.L.G.; JÚNIOR, C.A.C.; MANO, S.; JESUS, E.F.O. Classification of Brazilian honeys by physical and chemical analytical methods and low field nuclear magnetic resonance (LF ¹H NMR). *LWT - Food Science and Technology*. 55, 90- 95, 2014.

RODRIGUES, A. S. Etnoconhecimento sobre abelhas sem ferrão: saberes e práticas dos índios Guarani M'Byá na Mata-Atlântica. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Ecologia de Agroecossistemas. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESLQ). 2005.

RODRIGUES. A.C.L.; MARCHINI. L.C.; CARVALHO. C.A.L. Análises de mel de *Apis mellífera* L.1758 e *Tetragonisca angustula* (Latreille.1811) coletado em Piracicaba-SP. *Revista da Agricultura*. Piracicaba.v.73.p.255-262.1998.

RODRÍGUEZ-MALAVER, A.J.; RASMUSSEN, C.; GUTIÉRREZ, M.G.; GIL, F. NIEVES, B. VIT, P. Properties of honey from ten species of Peruvian stingless bees. *Natural Product Communications*. 4: 1221-1226, 2009.

- ROUBIK, D. W. Stingless bee nesting biology. *Apidologie* 37: 124-143. 2006.
- RUFINO, M, S, M.; ALVES, R, E.; BRITO, E, S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS⁺ *Comunicado técnico online* 128. ISSN 1679-6535, 2007.
- RUOFF, K. Tese de doutorado Authentication of the Botanical Origin Honey. University of Helsinki, 2006.
- SAKAGAMI, S.F. Stingless bees: 361-423, In H.R. Hermann (ed.), *Social Insects*, III, Academic Press, New York. 1982.
- SALGUEIRO, B.F. *Dissertação de Mestrado*. Caracterização de méis brasileiros: físico-química, perfil de substâncias polares, atividade antioxidante e quimiometria. PPGQO-UFRRJ. 2012.
- SALGUEIRO, F. B.; LIRA, A. F.; RUMJANEK, V. M. & Castro, R. N. Phenolic composition and antioxidant properties of brazilian honeys. *Quim. Nova*, Vol. 00, No. 00, 1-6, 2014.
- SALINAS, F.; ESOINOSA-MANSILLA, A.; BERZAS-VEVADO, J. J. Flow-injection determination of HMF in honey by Winkler method. *Journal of Analytical Chemistry*, v.340, p.250-252. 1991.
- SANT'ANA, L.D'O.; SOUSA, J.P.L.M.; SALGUEIRO, F.B.; LORENZON, M.C.A.; CASTRO, R.N. Characterization of monofloral honeys with multivariate analysis of their chemical profile and antioxidant activity. *Journal of Food Science*. 77, 135-40, 2012.
- SANTOS, W. S. Estudo das populações de *Melipona scutellaris* Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae) e qualificação do mel produzido em comunidades rurais da região do recôncavo da Bahia. Relatório de Estágio de Pós-Doutorado. Universidade Federal da Bahia/PNPD/CAPES; Cruz das Almas, Brasil. 51 pp. 2010.
- SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81: 215S-217S. 2005.
- SCHADE, J. W.; MARSH, G.; LECKERT, J. E. Diastase activity and hydroxymethylfurfural in honey and their influence in detecting heat alteration. *Food Research*, v.23, p.446-463. 1958.
- SCHIEVANO, E., PEGGION, E., & MAMMI, S. ¹H nuclear magnetic resonance spectra of chloroform extracts of honey for chemometric determination of its botanical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 57 e 65. 2010.
- SEEMANN, P.; NEIRA, M. Tecnología de la producción apícola. Valdivia: Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 202p. 1988.
- SEHWAG, S. & DAS, M. Antioxidant Activity: An Overview. *Research & Reviews: Journal of Food Science & Technology*, 1-11, 2013.

- SERGIEL, I.; POHL, P.; BIESAGA, M. Characterisation of honeys according to their content of phenolic compounds using high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 145, 15, 404-408, 2014.
- SILVA, C.L.; QUEIROZ, A.J.M.; FIGUEIREDO, R.M.F. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.8, n.2/3, p260-265, 2004.
- SILVA, E. M. S. da; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; FREITAS, B. M. Análises físico-química dos méis das abelhas melíferas (*Apis mellifera*) e urucu (*Melipona scutellaris*) In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, Campo Grande-MS. Anais.Campo Grande. p.61. 2002.
- SILVA, I.A.A.; SILVA, T.M.S.; CAMARA, C.A.; QUEIROZ, N.Q.; MAGNAN, M.; NOVAIS, J.N. SOLEDADE, L.E.B.S.; LIMA, E.O.; SOUZA, A.L.S. ANTONIO GOUVEIA DE SOUZA, A.G. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chemistry*. 141 3552–3558, 2013a.
- SILVA, M. M. DA & CUNHA, W.L. Levantamento de abelhas indígenas sem ferrão (*Hymenoptera*) na unidade de conservação do Instituto Monte Sinai. *Biofar*. v.08, n.2, p.1-7, 2012.
- SILVA, T.M.S.; SANTOS, F.P.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E. M. S.; SILVA, G.S.; NOVAIS, J.S.; SANTOS, F.A.R.; CAMARA, C.A. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaí'ra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis* 29,10–18, 2013.
- SILVEIRA, F.A.; MELO, G.A.R & ALMEIDA, E.A.B. Abelhas Brasileiras: Sistemática e Identificação. Belo Horizonte, Fernando A. Silveira. 253 p. 2002.
- SIMAL, J.; HUIDOBRO, J. Parámetros de calidad de la miel.III. Acidez (pH libre, láctica & total) e índice de formol. *Offarm*, v.3,p.532. 1984.
- SMITH, F. G. Deterioration of the colour of honey. *Journal of Apicultural Research*, v.6, p.95-98. 1967.
- SNOW M.J, MANLEY-HARRIS, M. On the nature non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey. *Food Chem* 84:145–147, 2004.
- SOCHA, R.; JUSZCZAK, L.; PIETRZYK, S.; FORTUNA, T. Antioxidant activity and phenolic composition of herb honeys. *Food Chem.*, v. 113, n. 2, p. 568-574, 2009.
- SODRÉ, G. S. Características físico-químicas, microbiológicas, polínicas e técnicas de conservação e armazenamento de amostras de méis de *Melipona* spp. (Hymenoptera: Meliponini) da Bahia. Relatório de Estágio de Pós-Doutorado. Universidade Federal da Bahia/PRODOC/FAPESB; Cruz das Almas, Brasil. 43 pp. 2005.

SOUZA, B de A.; CARVALHO, A.L. de; SODRÉ, G. da S.; MARCHINI, L.C. Características físico-químicas de amostras de méis de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). *Ciência Rural*, v.34, n.5, p.1623-1624. 2004a.

SOUZA, B. A. et al. Composición de la miel de abejas sin aguijón: Estableciendo – requisitos de calidad. *Interciencia*, v. 31, n. 12, p. 867-875, 2006.

SOUZA, B. A.; MARCHINI, L. C.; DIAS, C. T. S.; ODA-SOUZA, M.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas. v. 29, n.4 Dez. 2009.

SOUZA, B. de A.; CARVALHO, C. A. L. de; SODRÉ, G. da S.; MARCHINI, L. C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). *Ciência Rural*, v. 34, n. 5, p. 1623-1624, 2004.

SOUZA, B. de A.; CARVALHO, C. F. L. de. *Melipona asilvai* (HYMENOPTERA: APIDAE) Aspectos Bioecológicos de Interesse Agrônômico. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, 67 f. 2003.

SOUZA, D. L.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; PINTO, M. S. C. As Abelhas Como Agentes Polinizadores. *Revista Eletrônica de Veterinária VIII(3):1695-7504*. 2007.

SOUZA, D.C.; BAZLEN, K. Análises preliminares de características físico-químicas de méis de tiuba (*Melipona compressipes*) do Piauí. In: XII CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 1998, Salvador-Ba. Anais. Salvador. 1998.

SOUZA, R. C. S.; YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; OLIVEIRA, F.P. M. Valor nutricional do mel e polén de abelhas sem ferrão da região amazônica. *Acta Amazônica*. Manaus, v.34, p. 333-336, 2004b.

SOUZA, B.; ROUBIK, D.; BRATH, O. Composition of stingless bee honey: setting quality standards. *Interciencia*. Caracas. v.31. n.12. p.867-882. 2006.

SPANO, N. An RP-HPLC determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey. The case of strawberry tree honey. *Talanta*, v. 68, n. 4, p. 1390-1395, 2006.

TAVARES, M.C.; MORAIS, S.M.; COSTA-SIQUEIRA, S.M.; ALENCAR DE MENEZES, J.; NOGUEIRA, D.; ANDRADE, L.K.; LIMA, I. Phenolic content and antioxidant and antiacetylcholinesterase properties of honeys from different floral origins. *Journal of Medicinal Food*, 14: 658-663, 2011.

TERRAB A, DIEZ MJ AND HEREDIA FJ. Characterisation of Moroccan unifloral honeys by their physico-chemical characteristics. *Food Chemistry*, 79: 373-379. 2002.

TOMAS-BARBERAN, F.A., MARTOS, I., FERRERER, F., RADOVIC, B. S., & ANKLAM, E. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81, 485-496, 2001.

TORRES, A.; GARADEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I. Calorimetric investigation of the antimicrobial action and insight into the chemical properties of “angelita” honey - a product of the stingless bee *Tetragonisca angustula* from Colombia. *Thermochimica Acta*, v. 415, p. 107-113, 2004.

TOSI, E.; MARTINET, R.; ORTEGA, M.; LUCERO, H.; Re, E. Honey diastase activity modified by heating, *Food Chemistry*, 106, 883–887, 2008.

TRIPOLI, E. C. B. & LIMA, C. P. Correlação das análises de méis da cidade de Curitiba com a atividade antibacteriana. *Cadernos da Escola de Saúde*, Curitiba, 11: 116-127, 2014.

VALENTE, A. M. M. P., BOFFO, E. F., COSTA, F. G., MELO, F. M. P., MELO, I. S., & FERREIRA, A. G. Complete NMR assignments of a new prodigiosin isolated from *Streptomyces violaceusniger*. *Annals of Magnetic Resonance*, 7, 1e11. 2008.

VENTURIERI, G. C.; OLIVEIRA, P. S.; VASCONCELOS, M. A. M.; MATTIETTO, R. A. Caracterização, Colheita, Conservação e Embalagem de Méis de Abelhas Indígena Sem Ferrão. Belém: EMBRAPA/PA, 51p. 2007.

VENTURIERI, G. C.; RAIOL, V. F. O.; PEREIRA, C. A. B. Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona fasciculata* (APIDAE: MELIPONINA), entre os agricultores familiares de Bragança – PA, Brasil. *Biota Neotropica*, v. 03, n. 02, p. 01-07, 2003.

VÉRAS, S. O. Parâmetros de diferenciação dos méis dos principais grupos de abelhas criadas para a produção de mel na Bahia. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; Bahia, Brasil. 58 pp. 2012.

VERÍSSIMO, M. T. L. Saiba o que é o HMF. *Apicultura no Brasil*, v.4,n.24, p.31. 1988.

VIDAL, R.; FREGOSI, E. V. de. Mel: características, análises físico-químicas, adulteração e transformação. Barretos: Instituto Tecnológico Científico “Roberto Rios”. 95p. 1984.

VIEIRA, J. F. Aplicação da técnica de desumidificação em méis de *Melipona quadrifasciata anthidioides* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae) e estudo da sua estabilidade microbiológica durante armazenamento. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; Cruz das Almas, Brasil. 38 pp. 2011.

VILLAS-BÔAS JK, MALASPINA O. Parâmetros físico-químicos propostos para o controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil. 2005. Mensagem Doce 82. Disponível em:

<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/82/artigo2.htm>. Acessado em: 20 de março de 2014.

VILLAS-BÔAS, J. Mel de abelhas sem ferrão. Brasília: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), Série Manual Tecnológico, 3. 96 pp. 2012.

VILLAS-BÔAS, J. Manual Tecnológico Mel de Abelhas sem Ferrão. 1ª edição. Brasília, DF – 2012- ISPN.

VIT, P., & TOMAS-BARBERAN, F. A. Flavonoids in meliponinae honeys from Venezuela related to their botanical, geographical and entomological origin to assess their putative anticataract activity. *Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und -Forschung*, 206, 288–293, 1998.

VIT, P.; GUTIÉRREZ, M.G.; RODRÍGUEZ-MALAVAR, A.J.; AGUILERA, G.; FERNÁNDEZ-DÍAZ, C. & TRICIO, A.E. Comparación de mieles producidas por la abeja yateí (*Tetragonisca fiebrigi*) en Argentina y Paraguay. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* 43: 219-226, 2009.

VIT, P.; MEDINA, M.; ENRÍQUEZ, E. Quality standards for medicinal use of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *Bee World*, v. 85, p. 2-5, 2004.

VIT. P.; PERSONA-ODDO.L; MARANO. M.L. Venezuelan stingless bee honey characterized by multivariate analysis of physicochemical properties. *Apidologie. Celle*.v.29.p.377-389.1998

WESTON, R.J., BROCKLEBANK, L.K.,; LU, Y. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. *Food Chem*, 70:427–435, 2000.

WHITE Jr. J.W. La miel. In: DADANT, H. La colmena y la abeja mellifera. Montevideo : Hemisfério Sul, Cap.1, p.21-35. 1989.

WHITE JÚNIOR, J. W. Em *The hive and honeybee*; Graham, J., ed.; Dadant & Sons: Hamilton, 1976.

WHITE JÚNIOR, J. W. Methods for determining carbohydrates, hydroxymethylfurfural and proline in honey; Collaborative study. *Journal of the Association of the Official Analytical Chemistry*, v.62,n.3, p.515-526. 1979.

WHITE JÚNIOR, J. W. Quality evaluation of honey: role of HMF and diastase assays. Part II. *American Bee Journal*, v.132, n.12, p.792-794. 1992.

WHITE, J.W. COMPOSITION OF HONEY. IN: CRANE, E. (ED.), *Honey, a Comprehensive Survey*. Russak & Company, New York, NY, USA, pp. 157–206. 1975.
WHITE, J.W. The protein content of honey. *Journal of Apicultural Research* 17, 234–238. 1978.

WOOTTON, M.; EDWARDS, R. A.; FARAJI-HAREMI, R. Effect of accelerated storage conditions on the chemical composition and properties of Australian honey. 2. Changes in sugar and free amino acid contents. *Journal of Apicultural Research*, v.15, p.29-34. 1976.

YAO, L.; JIANG, Y.; SINGANUSONG, R.; D'ARCY, B.; DATTA, N., CAFFIN, N., RAIMONT, K. Flavonoid in Australian Malaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication. *Food Research International*, 37(2), 166–174. 2004.

ZHOU, J.; QI, Y.; RITHO, J.; DUAN, L.; WU, L.; DIAO, Q. ; LI, Y.; ZHAO, J. Analysis of maltooligosaccharides in honey samples by ultra-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. *Food Research International*. 56, 260-265, 2014.

8. Anexos

Tabela 18 – Valores médios e os desvios padrões dos parâmetros físico-químicos para os méis estudados e para o mel artificial. (SALGUEIRO, 2012)

Amostras	Escala Pfund	Cor	pH	Acidez total	HMF
A1	124,5 ±0,008	Âmbar escuro	3,96 ±0,015	45,26 ±0,005	1,49 ±0,001
M2	33,2 ±0,005	Branco	3,56 ±0,006	38,66 ±0,009	8,98 ±0,006
A3	61,7 ±0,008	Âmbar claro	4,19 ±0,015	35,56 ±0,025	17,96 ±0,011
C4	53,1 ±0,002	Âmbar claro	4,21 ±0,006	62,27 ±0,004	22,45 ±0,003
C5	43,0 ±0,005	Âmbar extra claro	3,74 ±0,020	80,31 ±0,020	55,38 ±0,008
C6	95,6 ±0,004	Âmbar	3,74 ±0,006	87,89 ±0,010	34,43 ±0,005
C7	40,2 ±0,009	Âmbar extra claro	4,06 ±0,021	70,62 ±0,002	16,46 ±0,003
C8	56,5 ±0,001	Âmbar claro	4,07 ±0,006	67,32 ±0,012	8,98 ±0,002
C9	16,14 ±0,006	Âmbar claro	4,13 ±0,006	55,15 ±0,000	18,71 ±0,013
M10	50,89 ±0,007	Branco	3,50 ±0,058	35,46 ±0,005	7,48 ±0,004
M11	45,92 ±0,006	Branco	3,42 ±0,012	37,94 ±0,009	20,95 ±0,001
MA	-21,17 ± 0,14	Indeterminada	3,84 ± 0,020	1,6 ±0,001	--

Cor (mm Pfund), Acidez total (mEq/kg) e HMF (mg/kg) foram determinados em triplicada. MA – Mel artificial

Tabela 19 – Valores médios e os desvios padrões dos teores de fenólicos e flavonóides totais, das amostras de méis estudadas e para o mel artificial. (SALGUEIRO, 2012)

Amostras de mel	Teor em Fenólicos Total (mgE _{AG} /100g) ^a	Teor em Flavonóides Total (mgE _Q /100g) ^b
A1	103,0 ±0,004	9,82 ±0,001
M2	73,7 ±0,005	2,98 ±0,005
A3	94,9 ±0,006	6,43 ±0,004
C4	126,6 ±0,007	7,43 ±0,009
C5	110,5 ±0,001	6,38 ±0,001
C6	104,7 ±0,003	6,46 ±0,003
C7	121,7 ±0,002	7,56 ±0,011
C8	129,3 ±0,003	10,25 ±0,004
C9	102,8 ±0,002	5,55 ±0,007
M10	81,4 ± 0,004	2,54 ±0,002
M11	78,1 ±0,003	2,95 ±0,006
MA	- 2,32 ± 0,12	0,25 ± 0,02

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

Tabela 20 – Valores médios e os desvios padrões dos conteúdos de aminiácidos livres e proteínas totais, das amostras de méis estudadas e para o mel artificial. (SALGUEIRO, 2012).

Amostras de mel	Aminoácidos livres (mgE _{LE} /100g) ^a	Proteínas totais (mgE _{ASB} /100g) ^a
A1	24,82 ±0,002	98,06 ±0,983
M2	10,68 ±0,005	43,44 ±0,785
A3	17,10 ±0,004	53,26 ±0,820
C4	39,42 ±0,009	46,65 ±0,796
C5	6,51 ±0,001	44,63 ±0,789
C6	7,75 ±0,006	43,07 ±0,783
C7	21,36 ±0,007	41,51 ±0,778
C8	7,14 ±0,006	51,70 ±0,815
C9	30,1 ±0,005	67,40 ±0,872
M10	24,0 ±0,005	49,50 ±0,807
M11	21,9 ±0,005	53,17 ±0,820
MA	- 0,08 ± 0,04	-0,63 ± 0,69

a- mg de equivalentes de L-leucina por 100g de mel. b – mg de equivalentes albumina sérica bovina (ASB) por 100 g de mel. MA – Mel artificial

Tabela 21 - Capacidade antioxidante das onze amostras de mel e do mel artificial. (SALGUEIRO, 2012).

Amostra	FRAP (μ mol Fe(II)/100 g)	ABTS (μ molTE/100g)	DPPH (CE ₅₀) (mg/mL)
A1	218,13 ±0,001	395,56 ±0,002	24,38 ±0,004
M2	68,13 ±0,001	207,94 ± 0,002	67,69 ±0,013
A3	214,43 ±0,001	423,64 ±0,005	41,76 ±0,026
C4	190,35 ±0,001	616,36 ±0,005	33,39 ±0,023
C5	240,35 ±0,001	548,72 ± 0,002	22,30 ±0,013
C6	225,54 ±0,001	474,69 ±0,005	24,34 ±0,016
C7	253,31 ±0,001	548,72 ±0,006	21,39 ±0,011
C8	297,76 ±0,002	689,11 ±0,002	17,12 ±0,016
C9	179,24 ±0,005	174,75 ±0,003	16,14 ±0,009
M10	68,13 ± 0,005	70,09 ±0,005	50,89 ±0,008
M11	79,24 ±0,002	106,33 ±0,007	45,92 ±0,010
MA	ND	34,36 ±5,85	404,64 ±1,44

FRAP – Valores expressos em μ mol de FeII (solução aquosa de FeSO₄) por 100g de mel. ABTS – Valores expressos em μ mol de Trolox por 100g de mel. ND – Não determinado, pois já é usado como branco na análise.

Tabela 22 – Teor em polifenólicos total dos extratos de mel. (SALGUEIRO, 2012).

Amostras	Fenólicos Total (mgE _{AG} /100g) ^a	Flavonóides Total (mgE _Q /100g) ^b
A11	12,14 ±0,010	1,79 ±0,002
M21	10,72 ±0,002	1,54 ±0,001
A31	7,15 ±0,007	0,79 ±0,001
C41	6,40 ±0,006	0,48 ±0,003
C51	6,50 ±0,012	0,44 ±0,001
C61	7,38 ±0,024	0,53 ±0,001
C71	7,12 ±0,002	0,36 ±0,004
C81	5,13 ±0,003	0,37 ±0,004
C91	4,88 ± 0,010	1,64 ±0,002
M101	11,05 ± 0,002	1,64 ±0,001
M111	11,00 ±0,010	0,56 ±0,002

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

Tabela 23 - Capacidade antioxidante dos extratos de mel. (SALGUEIRO, 2012).

Amostra	FRAP	(mmol	ABTS	DPPH (CE ₅₀)
	Fe(II)/100 g)	(mmolTE/100g)	(µg/ML)	
A11	116,47 ±0,002	92,07 ±0,001	521,79 ±0,016	
M21	113,69 ±0,001	67,70 ±0,003	278,61 ±0,007	
A31	34,06 ±0,001	33,55 ±0,002	448,96 ±0,007	
C41	23,88 ±0,003	35,05 ±0,002	890,07 ±0,004	
C51	59,06 ±0,001	109,07 ±0,003	302,79 ±0,009	
C61	67,39 ±0,001	137,79 ±0,003	455,74 ±0,005	
C71	44,25 ±0,004	30,88 ±0,002	1601,89 ±0,007	
C81	48,48 ±0,004	94,70 ±0,002	624,88 ±0,016	
C91	44,25 ±0,002	98,23 ±0,001	440,47 ±0,006	
M101	92,86 ±0,001	69,85 ±0,006	638,02 ±0,006	
M111	73,42 ±0,003	131,41 ±0,001	348,53 ±0,007	

FRAP – Valores de FRAP expressos em mmol de FeII em solução aquosa de FeSO₄ por 100g de mel, ABTS – Valores de ABTS expressos em mmol de Trolox por 100g de mel.

Tabela 24 - Atividade antioxidante dos méis, e seus respectivos extratos, com suas médias e desvios padrões. (SALGUEIRO, 2012).

	Mel	Extrato	Mel	Extrato	Mel	Extrato
	FRAP	FRAP	ABTS	ABTS	CE ₅₀	CE ₅₀
	µmolFe(II)/100g	mmolFe(II)/100g	µmolTE/100g	mmolTE/100g	mg/mL	µg/mL
A1	218,13 ±0,001	116,47 ±0,002	395,56 ±0,002	92,07 ±0,001	24,38 ±0,004	521,79 ±0,016
M2	68,13 ±0,001	113,69 ±0,001	207,94 ± 0,002	67,70 ±0,003	67,69 ±0,013	278,61 ±0,007
A3	214,43 ±0,001	34,06 ±0,001	423,64 ±0,005	33,55 ±0,002	41,76 ±0,026	448,96 ±0,007
C4	190,35 ±0,001	23,88 ±0,003	616,36 ±0,005	35,05 ±0,002	33,39 ±0,023	890,07 ±0,004
C5	240,35 ±0,001	59,06 ±0,001	548,72 ± 0,002	109,07 ±0,003	22,30 ±0,013	302,79 ±0,009
C6	225,54 ±0,001	67,39 ±0,001	474,69 ±0,005	137,79 ±0,003	24,34 ±0,016	455,74 ±0,005
C7	253,31 ±0,001	44,25 ±0,004	548,72 ±0,006	30,88 ±0,002	21,39 ±0,011	1601,89 ±0,007
C8	297,76 ±0,002	48,48 ±0,004	689,11 ±0,002	94,70 ±0,002	17,12 ±0,016	624,88 ±0,016
C9	179,24 ±0,005	44,25 ±0,002	174,75 ±0,003	98,23 ±0,001	16,14 ±0,009	440,47 ±0,006
M10	68,13 ± 0,005	92,86 ±0,001	70,09 ±0,005	69,85 ±0,006	50,89 ±0,008	638,02 ±0,006
M11	79,24 ±0,002	73,42 ±0,003	106,33 ±0,007	131,41 ±0,001	45,92 ±0,010	348,53 ±0,007

Tabela 25 - Substâncias fenólicas identificadas nos méis assa peixe, camará e morrão de candeia. (SALGUEIRO, 2012).

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