

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

DISSERTAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DE MÉIS BRASILEIROS:
FÍSICO-QUÍMICA, PERFIL DE SUBSTÂNCIAS POLARES,
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUIMIOMETRIA.**

FERNANDA BARBOSA SALGUEIRO

**Seropédica, Rio de Janeiro
2012**



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

FERNANDA BARBOSA SALGUEIRO

Sob a Orientação da Professora

Dra. Rosane Nora Castro

e Co-Orientação do Professor

Dr. Victor Marcos Rumjanek

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

Seropédica, Rio de Janeiro
Março 2012

547.632

S164c

T

Salgueiro, Fernanda Barbosa, 1983-
Caracterização de méis
brasileiros: físico-química, perfil
de substâncias polares, atividade
antioxidante e quimiometria /
Fernanda Barbosa Salgueiro - 2012.
124 f.: il.

Orientador: Rosane Nora Castro.

Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro, Curso de Pós-Graduação
em Química.

Bibliografia: f. 111-124.

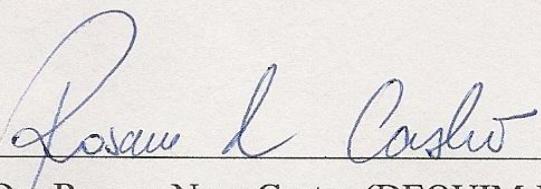
1. Fenóis - Teses. 2. Mel -
Análise - Teses. 3. Mel - Efeito
dos fenóis - Teses. I. Castro,
Rosane Nora, 1965-. II.
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Curso de Pós-Graduação
em Química. III. Título.

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

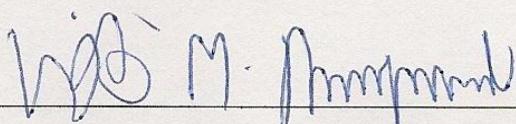
FERNANDA BARBOSA SALGUEIRO

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.

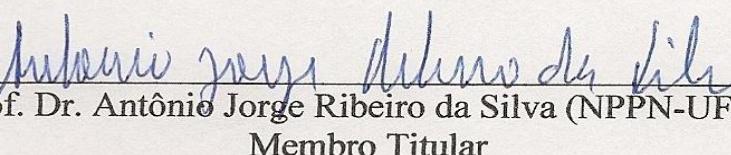
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 09/02/2012



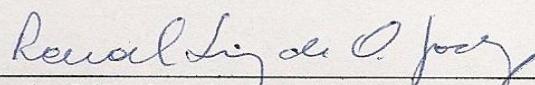
Profa. Dra Rosane Nora Castro (DEQUIM-UFRJ)
Orientadora e Presidente



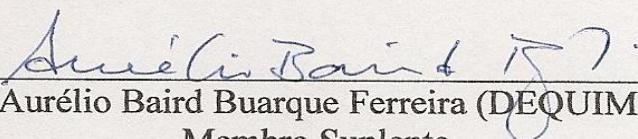
Prof. Dr. Victor Marcos Rumjanek (DEQUIM-UFRJ)
Co-Orientador



Prof. Dr. Antônio Jorge Ribeiro da Silva (NPPN-UFRJ)
Membro Titular



Dr. Ronoel Luiz de Oliveira Godoy (EMBRAPA - Agroindústria de Alimentos)
Membro Titular



Prof. Dr. Aurélio Baird Buarque Ferreira (DEQUIM-UFRJ)
Membro Suplente

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

Nicholas Flamel

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Arthur e Denise, que sempre me apoiaram em tudo e procuraram buscar para mim o melhor.

À Prof^a Rosane Nora Castro, pela orientação, dedicação, amizade e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Prof^o Aurélio Baird Buarque Ferreira, pela amizade, ensinamentos e estímulo na continuação do meu trabalho.

Aos professores Mário Geraldo, Carlos Maurício, Arthur, Marcia e Martha pelas aulas que contribuiram para meu crescimento profissional e especialmente ao Victor M. Rumjanek, pela co-orientação.

À amiga Luiza Sant'Ana (Manuella), que me ensinou pacientemente cada procedimento, pela amizade e alegria durante toda a execução deste trabalho.

À Juliana Paes Leme pelos ensinamentos das análises fisico-químicas, e a Prof. Maria Cristina Affonso Lorenzon, pelo fornecimento das amostras.

Aos demais amigos de laboratório, Arthur, Fred, Paulo, Wellison, Fábio e Tatiany, pelo convívio no Laboratório 48B.

Ao André Canuto, pelo trabalho técnico na extração do mel e Aline Lira, amigos aos quais sou muito grata e sempre guardarei ótimas lembranças.

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

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

À CAPES, pelo apoio financeiro

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

SUMÁRIO

Índice de Tabelas	i
Índice de Figuras	ii
Índice de Esquemas	iv
Índice de Abreviatura e Siglas	v
Resumo	vi
Abstract	vii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 - Composição química do mel	3
2.2 - Características físico-químicas do mel.	6
2.2.1 - Ácdez Livre	7
2.2.2 - 5-Hidroximetilfurfural (HMF).	7
2.2.3 - pH.	8
2.2.4 - Açúcares Redutores.	8
2.2.5 - Umidade.	9
2.2.6 - Sacarose Aparente.	9
2.2.7 - Sólidos Insolúveis.	9
2.2.8 - Cinzas.	10
2.2.9 - Atividade Diastásica.	10
2.3 - Propriedades terapêuticas	10
2.4 - Atividade Antioxidante	11
2.4.1 - Radicais Livres e Antioxidantes	11
2.4.2 - Oxidação Lipídica ou Autoxidação	13
2.4.3 - Mecanismos de ação antioxidant	15
2.4.4 - Métodos para Avaliar a Atividade Antioxidante (AA)	16
2.4.3.1 - Ensaio com DPPH radicalar (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	17
2.4.3.2 - Ensaio com ABTS ou TEAC	17
2.4.3.3 - Ensaio FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Íon Férrico)	19
2.4.3.4 - Ensaio ORAC (Capacidade de Absorção de Oxigênio Radicalar)	20
2.5 - Atividade Antioxidante das Substâncias Fenólicas	21
2.5.1 - Atividade Antioxidante de Ácidos Fenólicos	22
2.5.2 - Atividade Antioxidante de Flavonóides	24
2.6 - Determinação da Origem botânica do mel	27
2.7 - Métodos Alternativos para a determinação da origem botânica do mel: RMN de ¹ H e Quimiometria	32
3 – OBJETIVOS GERAIS	35
3.1 – Objetivos Específicos	35
4 – PARTE EXPERIMENTAL	36
4.1 - Material e Métodos	36
4.2 - Amostras de Mel	37
4.3 - Preparo do mel artificial.	37
4.4 - Determinação espectrofotométrica da cor do mel.	37
4.5 - Determinação do teor 5-hidroximetilfurfural (HMF) no mel	39
4.5.1 - Preparo dos Reagentes	39
4.5.2 - Procedimento Experimental	39
4.6 - Determinação do pH e acdez livre	19
4.7 - Determinação de fenólicos totais nos méis com reagente de Folin-Denis	40

4.7.1 - Preparo do reagente de Folin-Denis.	40
4.7.2 - Procedimento experimental	40
4.7.3 - Construção da curva analítica do ácido gálico	41
4.8 - Determinação de flavonóides totais nos méis com cloreto de alumínio	41
4.8.1 - Construção da curva analítica com quercetina	42
4.9 - Determinação do teor de aminoácidos livres.	43
4.9.1 - Construção da curva analítica com L-leucina	43
4.10 - Determinação do conteúdo de proteínas totais	44
4.10.1 - Construção da curva analítica de albumina sérica bovina (ASB)	45
4.11 - Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH	45
4.11.1 - Determinação do CE ₅₀ para amostra de mel	46
4.11.2 - Determinação do CE ₅₀ dos extratos de mel	47
4.12 - Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Íon Férrico (FRAP)	47
4.12.1 - Construção da curva analítica com sulfato ferroso	48
4.13 - Determinação da Atividade Antioxidante pela Captura do Radical-Cátion (ABTS ⁺)	49
4.13.1 - Construção da curva analítica com Trolox	50
4.14 - Preparo dos Extratos de Mel.	50
4.15 - Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD).	52
4.15.1 - Construção das Curvas Analíticas com os padrões	52
4.16 - Dados de RMN de ¹ H e Tratamento Quimiométrico.	53
4.17 - Tratamento estatístico dos dados.	54
 5 - RESULTADO E DISCUSSÃO	55
5.1 - Caracterização físico-química das amostras de mel	55
5.1.1 - Teor em substâncias fenólicas presentes nas amostras de mel	58
5.1.2 - Conteúdo de aminoácidos e proteínas presentes nas amostras de mel	65
5.1.3 - Avaliação da Atividade Antioxidante dos méis	67
5.1.4 - Correlação entre os parâmetros avaliados	70
5.2 - Preparo dos extratos das amostras de mel	73
5.2.1 - Teor em substâncias fenólicas dos extratos de mel	74
5.2.2 - Avaliação da Atividade Antioxidante dos extratos de mel	76
5.2.3 - Identificação das Substâncias Fenólicas por CLAE-DAD	78
5.2.3.1 - Análises dos extratos dos méis de assa peixe	87
5.2.3.2 - Análises dos extratos dos méis de cambará	89
5.2.3.3 - Análises dos extratos dos méis de morrão de candeia	93
5.2.4 - Quantificação dos extratos por CLAE-DAD	95
5.3 - Análise quimiométrica dos dados de RMN dos extratos dos méis	99
 6 – CONCLUSÕES	109
 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição média dos constituintes do mel (dados em g/100 g)	3
Tabela 2 - Teor dos principais minerais encontrados no mel	5
Tabela 3 - Espécies reativas de oxigênio – EROs	14
Tabela 4 - Substâncias características em alguns méis monoflorais	29
Tabela 5 - Substâncias fenólicas identificadas nos méis de eucalipto e silvestre	30
Tabela 6 - Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestre, assa-peixe e macieira	30
Tabela 7 - Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres e laranjeira	31
Tabela 8 - Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, laranjeira e eucalipto	31
Tabela 9 - Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, laranjeira e eucalipto	31
Tabela 10 - Amostras de méis (em favos e centrifugadas) estudadas neste trabalho.	37
Tabela 11 - Relação da cor do mel com escala de Pfund	38
Tabela 12 - Resultados obtidos a partir da curva analítica preparada com diferentes padrões	53
Tabela 13 - Valores médios e os desvios padrões dos parâmetros físico-químicos para os méis estudados e para o mel artificial.	55
Tabela 14 - Valores médios e os desvios padrões dos teores de fenólicos e flavonóides totais, das amostras de méis estudadas e para o mel artificial.	61
Tabela 15 - Valores médios e os desvios padrões dos conteúdos de aminoácidos livres e proteínas totais, das amostras de méis estudadas e para o mel artificial.	65
Tabela 16 - Atividade antioxidante das onze amostras de mel e do mel artificial	69
Tabela 17 - Matriz de correlação entre as variáveis analisadas para as amostras de méis.	71
Tabela 18 - Valores médios e desvios padrão dos extratos em acetato de etila.	74
Tabela 19 - Teor em substâncias fenólicas totais dos extratos de mel	75
Tabela 20 - Atividade antioxidante dos extratos de mel.	76
Tabela 21 - Atividade antioxidante dos méis, e seus respectivos extratos, com suas médias e desvios padrões.	77
Tabela 22 - Tempo de retenção e máximo de absorção das substâncias fenólicas utilizados como padrão	81
Tabela 23 - Substâncias fenólicas identificadas nos méis assa-peixe, cambará e morrão de candeia.	87
Tabela 24 - Conteúdo das substâncias fenólicas das amostras de extratos de mel. (mg/100g de mel)	96
Tabela 25 - Avaliação da atividade antioxidante (CE_{50}) das substâncias fenólicas utilizados como padrão.	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de formação do HMF (5-hidroximetilfurfural)	7
Figura 2 - Exemplos de antioxidantes sintéticos comumente utilizados.	12
Figura 3 - Estabilização do radical livre DPPH	17
Figura 4 - Estabilização do radical ABTS ⁺ por um antioxidante.	18
Figura 5 - Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe ³⁺ .	19
Figura 6 - Reação do radical AAPH no teste ORAC.	20
Figura 7 - Processo esquemático do mecanismo de queilação de metais.	21
Figura 8 - Estruturas dos derivados de ácido benzóico.	22
Figura 9 - Estruturas dos derivados de ácido cinâmico.	23
Figura 10 - Estrutura básica de um flavonóide	24
Figura 11 - Estrutura das principais classes de flavonóides.	25
Figura 12 - Critérios estruturais que definem a eficiência da capacidade antioxidant de um flavonóide.	25
Figura 13 - Flavonóides atuando sobre EROs com a formação de estrutura estável	26
Figura 14 - 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.	41
Figura 15 - 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.	42
Figura 16 - 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.	44
Figura 17 - 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	45
Figura 18 - Esquema do ensaio de atividade antioxidant utilizando o espectrofotômetro ELISA.	46
Figura 19 - 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.	49
Figura 20 - 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.	50
Figura 21 - Modelo esquemático do preparo dos extratos do mel	51
Figura 22 - Sítios de complexação de metais de transição em flavonóides.	63
Figura 23 - Complexo bimolecular da morina com cloreto de alumínio.	63
Figura 24 - Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD: 1 - ácido gálico, 2 – HMF, 3 – ácido protocatecuico e 4 – ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico.	82
Figura 25 - Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD: 5- ácido siríngico, 6 - ácido 2,4 dihidroxi-benzóico, 7 – ácido sinápico e 8 – ácido ferúlico.	83
Figura 26 - Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD: 9 – ácido <i>p</i> -cumárico, 10 – ácido <i>m</i> -cumárico, 11- ácido benzóico e 12 – ácido <i>p</i> -metoxi-benzóico.	84
Figura 27 - Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD: 13- ácido cinâmico, 14 - naringenina, 15 – <i>c,t</i> -ABA e 16 – ácido <i>m</i> -metoxi-cinâmico.	85
Figura 28 - Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD: 17- crisina e 18 – galangina	86
Figura 29 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato A11 de assa-peixe por CLAE.	88
Figura 30 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato M21 de morrão de candeia por CLAE.	88
Figura 31 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato A31 de assa-peixe por CLAE.	90
Figura 32 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato C41 de cambará por CLAE.	90
Figura 33 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato C51 de cambará por CLAE.	91
Figura 34 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato C61 de cambará por CLAE.	91
Figura 35 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato C71 de cambará por CLAE.	92
Figura 36 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato C81 de cambará por CLAE.	92
Figura 37 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato C91 de cambará por CLAE.	93
Figura 38 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato M101 de morrão de candeia por CLAE.	94
Figura 39 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato M111 de morrão de candeia por CLAE.	94
Figura 40 - Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz) dos extratos: A- assa peixe, C- cambará, M- morrão de candeia, L- laranjeira e E- eucalipto, sem supressão do metanol	101

Figura 41 - Espectro de RMN de ^1H integrados com regiões de exclusão.	102
Figura 42 - Gráfico de <i>scores</i> de PC-1 x PC-2 dos dados de RMN de ^1H dos onze extratos divididos em 3 diferentes origens florais: assa peixe (A); cambará (C) e morrão de cadeia (M).	103
Figura 43 - Gráfico do desvio padrão residual do PCA.	104
Figura 44 - Dendrograma dos dados de RMN de ^1H : A-assa peixe; C-cambará, M-morrão de candeia.	104
Figura 45 - Gráfico de <i>scores</i> de PC-1 x PC-2 dos dados de RMN de ^1H dos vinte extratos divididos em 3 diferentes origens florais: E- eucalipto, C-cambará e L-laranjeira.	105
Figura 46 - Dendrograma dos dados de RMN de ^1H dos extratos de E- eucalipto, C-cambará e L-laranjeira	106
Figura 47 - Gráfico de <i>scores</i> de PC-1 x PC-2 a partir da matriz de dados obtida por CLAE-DAD dos extratos de A-assa peixe; C-cambará e M- morrão de candeia.	23
Figura 35 - Gráfico de <i>loadings</i> das PC-1 x PC-2 aplicados a PCA para os dados de CLAE-DAD.	23

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Esquema geral da autoxidação lipídica.

14

Esquema 2 - Mecanismos de ação de um antioxidante.

15

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%AA	percentual de atividade antioxidante
ABTS	ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
CE ₅₀	concentração efetiva para redução de 50% dos radicais
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-ESI/MS	cromatografia líquida de alta eficiência por ionização com eletrón spray acoplada a spectrometria de massas
DAD	detector de arranjo de fotodiodo
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunoabsorvent Assay</i>
EROs	espécies reativas de oxigênio
FRAP	poder antioxidant de redução do íon férrico
HCA	análise hierárquica de agrupamentos
HMF	5-hidroximetilfurfural
MeOH	metanol
meq/kg	mili-equivalentes por quilograma
mgE _{ASB}	miligramas em equivalente de albumina sérica bovina
mgE _{AG}	miligramas em equivalente de ácido gálico
mgE _{LE}	miligramas em equivalente de L-leucina
mgE _{QC}	miligramas em equivalente de queracetina
nm	nanômetros
ORAC	capacidade de absorção de oxigênio radicalar
PCA	análise de componentes principais
PCs	componentes principais
pág.	página
RMN de ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TEAC	capacidade antioxidant de equivalente em trolox
TPTZ	(2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina)
t _R	tempo de retenção
UV	ultravioleta
UV-Vis	ultravioleta ao visível
µM	micromolar
µm	micrômetros

RESUMO

SALGUEIRO, Fernanda Barbosa. CARACTERIZAÇÃO DE MÉIS BRASILEIROS: FÍSICO-QUÍMICA, PERFIL DE SUBSTÂNCIAS POLARES, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUIMIOMETRIA. Seropédica, UFRRJ, 2012. 124 p. Dissertação de Mestrado em Química, Química de Produtos Naturais.

No mercado, méis são conhecidos pelo seu poder terapêutico e a designação de sua principal fonte floral permite atestar ao consumidor as propriedades de sua origem. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade e caracterizar onze méis de *Apis mellifera* provenientes do Estado do Rio de Janeiro, por meio de parâmetros físico-químicos, do perfil de substâncias fenólicas, de seus potenciais antioxidantes, além de usar métodos quimiométricos aplicados aos dados de RMN de ^1H e CLAE-DAD. Para tanto, utilizou-se duas amostras de mel de assa peixe, seis de cambará e três de morrão de candeia de diferentes municípios do Rio de Janeiro. Os parâmetros físico-químicos avaliados foram: teor de HMF e a cor utilizando método espectrofotométrico, acidez livre e pH. Além dessas determinações, o conteúdo de aminoácidos livre foi avaliado pelo método de cádmio-ninidrina, e proteínas totais pelo método de Bradford. A capacidade antioxidante dos méis e de seus extratos foi avaliada qualitativamente através do conteúdo de fenólicos total pelo método de Folin-Denis, e de flavonóides total pelo método de complexação com cloreto de alumínio. A quantificação do potencial antioxidante foi realizada pela captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), captura do radical livre ABTS $^{+}$, além do método de redução do íon férrico (FRAP). A identificação e quantificação das substâncias polifenólicas dos extratos foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). A aplicação da análise multivariada aos dados de RMN de ^1H e de CLAE-DAD distinguiu os méis de assa peixe, cambará e morrão de candeia produzidos no Estado do Rio de Janeiro. Assim, o uso de RMN de ^1H e CLAE-DAD combinado com a quimiometria pode ser uma nova estratégia para tipificação de méis brasileiros de forma rápida e não destrutiva.

Palavras chaves: Mel monofloral, análise multivariada, RMN, CLAE-DAD.

ABSTRACT

SALGUEIRO, Fernanda Barbosa, CHARACTERIZATION OF BRAZILIAN HONEYS: PHYSICO-CHEMICAL, POLAR SUBSTANCES PROFILE, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND CHEMOMETRICS. Seropédica, UFRRJ, 2012. 124 p. Dissertação de Mestrado em Química, Química de Produtos Naturais.

Honey is generally known for its therapeutic value and the determination of its main floral source allows the certification to the consumer the properties related to its origin. Thus, the aim of this work was to evaluate the quality and characterize eleven honeys from *Apis mellifera* from the state of Rio de Janeiro according to physico-chemical parameters, to phenolics profile, to the antioxidant activity and also through the use of chemometric analysis applied to ^1H NMR data and HPLC-DAD. Two samples of assa peixe, six samples of cambara and three samples of morrão-de-candeia honeys from different regions of Rio de Janeiro were analyzed. The physico-chemical parameters determined were: HMF content and color through a spectrophotometric method, free acidity and pH. The content of free aminoacids was also determined through the cádmium-ninhydrine together with total proteins via the Bradford method. The antioxidant ability of honeys and their extracts was qualitatively determined through the total phenolics content using the Folin-Denis method. Total flavonoids were determined by the complexation method with aluminium chloride. The quantitative antioxidant activity of honeys was determined by the trapping of the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical, by trapping of the ABTS $^{+}$ radical and also by the iron reduction method (FRAP). The identification and quantitation of polyphenols in the extracts were done by HPLC-PDA. The use of multivariate analysis for the ^1H NMR data and HPLC enabled the distinction of the honeys analyzed in this work. Thus, the use of ^1H NMR and HPLC data combined with multivariate analysis may be employed as a new strategy for the fast and non-destructive typification of Brazilian honeys.

Keywords: Floral honey, multivariate analysis, NMR, HPLC-PDA.

1 - INTRODUÇÃO

Muitas das terapias milenares de civilizações antigas utilizaram os produtos das abelhas como valiosos recursos terapêuticos e/ou conservativos. As histórias das medicinas das civilizações tibetana, egípcia e também a greco-romana são muito ricas, todas contendo em seus escritos antigos, centenas de receitas onde entram principalmente mel, própolis, larvas de abelhas e às vezes as próprias abelhas, para curar ou prevenir enfermidades. No Egito antigo, o mel era o medicamento mais popular, participando de 500 dos 900 remédios da época, com registros decifrados. Também foi a primeira fonte de açúcar utilizada pelo homem e representava fartura (MENDES *et al.*, 2009; BOGDANOV, 2009a).

A maioria das abelhas (cerca de 95%) não tem hábito social. No entanto, as abelhas sociais são as mais conhecidas, por serem exploradas para obtenção especialmente do mel estocado em suas colméias e da polinização. As abelhas sociais mais utilizadas comercialmente pertencem ao gênero *Apis*. As abelhas africanizadas no Brasil referem-se à espécie *Apis mellifera* (COUTO e COUTO, 2002).

De acordo com a Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000, que regulamenta a identidade e qualidade do mel, entende-se por mel, produto alimentício produzida por abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou de secreções de árvores e plantas para a produção de mel de néctar ou mel de melato (“honeydew”), respectivamente (BRASIL, 2000).

O mel pode ser classificado de acordo com as plantas utilizadas na sua elaboração em mel floral ou mel de melato. O mel floral é obtido dos néctares das flores, e ainda pode ser classificado em: mel unifloral ou monofloral (quando o produto procede principalmente da origem de flores de uma mesma família, gênero ou espécie e possua características sensoriais, físico-químicas e microscópicas próprias) ou mel multifloral ou polifloral (obtido a partir de diferentes origens florais). O mel de melato é formado, principalmente, a partir de secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que se encontram sobre elas (BRASIL, 2000).

As características do mel podem ser alteradas de acordo com o tipo de flor utilizada, clima, solo, umidade, altitude, entre outros, afetando o sabor, a cor e o seu aroma. O mel é um alimento nutritivo além de ser terapêutico. Na composição do mel encontra-se a glicose, a frutose, minerais, ácidos orgânicos, enzimas, água e partículas sólidas provenientes da colheita (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010b).

As substâncias fenólicas são um importante grupo que podem ser relacionados com a aparência e as propriedades funcionais do mel. Eles são membros de uma classe de substâncias naturais que recentemente tem despertado o interesse científico e terapêutico. Ao longo da tradição humana, o mel tem sido usado não apenas como um nutriente, mas também como um medicamento. Além disso, várias pesquisas já comprovaram a contribuição das substâncias fenólicas na atividade antioxidante do mel. Apesar da importância das substâncias fenólicas e sua associação a benefícios terapêuticos, só recentemente surgiu um interesse real e efetivo de identificar e quantificar o conteúdo fenólico do mel (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010a).

O conhecimento das importantes funções que os antioxidantes desempenham na inibição dos radicais livres resultantes do metabolismo celular, tem motivado o interesse pela análise destas substâncias em diversos produtos alimentícios. Os estudos realizados têm mostrado que os antioxidantes contribuem para a prevenção de doenças associadas ao envelhecimento, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares e o aparecimento de câncer (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 2001).

Neste trabalho foram estudadas onze amostras de méis monoflorais (assa-peixe, cambará e morrão de candeia) provenientes do Estado do Rio de Janeiro. Foram determinadas propriedades físico-químicas tais como: cor, pH, acidez livre e teor de 5-hidroximetilfurfural (HMF).

A caracterização da atividade antioxidante das amostras *in natura* e de seus respectivos extratos foi efetuada através da determinação dos teores de ácidos fenólicos, flavonóides, aminoácidos e proteínas. A quantificação da atividade antioxidante foi realizada por três métodos: captura do radical orgânico 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), captura do radical livre ABTS⁺ e método de redução do ferro (FRAP).

A identificação e quantificação do conteúdo de substâncias polares dos extratos de mel foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). A maioria dos dados que serão apresentados estão em conformidade com trabalhos descritos anteriormente na literatura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Composição química do mel

A composição do mel é bastante variável e depende de sua origem botânica e da espécie da abelha, no entanto, certos fatores externos tais como os sazonais e ambientais também desempenham um papel importante no processo. O mel contém pelo menos 181 substâncias; é uma solução supersaturada de açúcares, composta principalmente de frutose (38%) e glicose (31%), contendo também minerais, proteínas, aminoácidos livres, ácidos, enzimas e vitaminas. Uma grande variedade de constituintes em menores quantidades também está presente no mel, muitos dos quais são conhecidos por terem propriedades antioxidantes. Estes incluem os ácidos fenólicos, flavonóides, certas enzimas (glicose-oxidase e catalase) e aminoácidos. Na **Tabela 1** estão resumidos a composição média dos constituintes do mel (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010b).

Tabela 1 - Composição média dos constituintes do mel (dados em g/100 g) (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010b).

Componente	Média (%)
Água	17,2
Frutose	38,19
Glicose	31,28
Sacarose	1,31
Dissacarídeos (calculado como maltose)	7,31
Açúcares superiores	1,5
Ácido livre como glucônico	0,43
Lactona como gluconolactona	0,14
Ácido total como glucônico	0,57
Cinzas	0,169
Nitrogênio	0,041
Minerais	0,2
Aminoácidos, proteínas	0,3
pH	3,9

O mel é composto principalmente de carboidratos que constituem cerca de 95% do seu peso seco. Em concentrações bem menores, aproximadamente 0,5% estão as proteínas, principalmente enzimas e aminoácidos livres (BOGDANOV, 2009b). A proteína do mel tem duas origens, a vegetal que advém do néctar e do pólen, e a animal proveniente da própria abelha (WHITE, 1975). As três principais enzimas presentes no mel são: a diastase (amilase) que decompõe amido ou glicogênio em menores unidades de açúcar; a invertase (sacarase, α -glicosidase) que decompõe sacarose em frutose e glicose; e a glucose oxidase que produz peróxido de hidrogênio e ácido glucônico a partir da glicose (BOGDANOV, 2009b).

A quantidade total de aminoácidos livres no mel está entre 10 e 200 mg/100g, sendo a prolina responsável por cerca de 50% desse valor. Além da prolina, podem ser encontrados ácido glutâmico, ácido aspártico, asparagina, serina, glutamina, histidina, glicina, treonina, arginina, alanina, ácido *gama*-aminobutírico, prolina, tirosina, valina, íon amônio, metionina, cisteína, isoleucina, leucina, triptofano, fenilalanina, ornitina e lisina. Uma vez que o pólen é a principal fonte de origem dos aminoácidos no mel, o perfil e a proporções desses poderia ser utilizado para identificação da origem botânica e geográfica do mel (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010b).

Os minerais estão presentes numa concentração que varia de 0,02% a valores próximos de 1%. Sabe-se que as concentrações de diferentes elementos minerais dependem da origem botânica e geológica do mel. Os oligoelementos desempenham um papel fundamental nas atividades terapêuticas relacionadas a este alimento, uma vez que estão envolvidos em inúmeras funções biológicos. Os principais elementos encontrados no mel são potássio, magnésio, cálcio, alumínio, ferro, mangânes, zinco, boro, cobre, cobalto, crômio, níquel, cádmio e fósforo que já são utilizados na diferenciação entre méis monoflorais. Além desses elementos, outros em concentrações menores (**Tabela 2**) representam a ampla variedade encontrada no mel (BOGDANOV *et al.*, 2007 BOGDANOV, 2009b).

Tabela 2 - Teor dos principais minerais encontrados no mel (BOGDANOV, 2009b).

Elemento	Média em mg/100 de mel	Elemento	Média em mg/100 de mel
Cálcio	4,4 – 9,20	Manganês	0,02 – 0,4
Cobre	0,0003 – 0,10	Fósforo	1,9 – 6,38
Ferro	0,6 – 1,5	Potássio	13,2 – 16,8
Magnésio	1,2 – 3,5	Sódio	0,0 – 7,60
Alumínio	0,01 – 2,4	Cádmio	0 – 0,001
Chumbo	0,01 – 0,03	Silício	0,05 – 24
Arsênio	0,014 – 0,026	Cloro	0,4 – 56
Lítio	0,225 – 1,56	Estrôncio	0,04 – 0,35
Bário	0,01 – 0,08	Cobalto	0,1 – 0,35
Molibdênio	0 – 0,004	Enxofre	0,7 – 26
Boro	0,05 – 0,3	Flúor	0,4 – 1,34
Níquel	0 – 0,051	Vanádio	0 – 0,013
Bromo	0,4 – 1,3	Iodo	10 – 100
Rubídio	0,040 – 3,5	Zircônio	0,05 – 0,08

Embora em concentrações ínfimas, vitaminas, tais como: B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, C, K e D também são encontradas no mel (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010b; CIULU *et al.*, 2011).

O perfil de aroma é uma das características mais típicas de um produto alimentar, tanto por sua qualidade organoléptica quanto por sua autenticidade. As substâncias responsáveis pelo aroma estão presentes no mel em concentrações muito baixas como misturas complexas de componentes voláteis de funções diferentes e relativo peso molecular baixo (PLUTOWSKA *et al.*, 2011).

Mais de 500 diferentes substâncias voláteis já foram identificados, devido ao número elevado de componentes, o perfil de aroma representa uma “impressão digital” do produto. Este fato poderia ser usado para determinar a origem floral do mel, já que a maioria dessas substâncias variam em função da sua origem botânica. (KASKONIENE e VENSKUTONIS, 2010).

2.2 - Características físico-químicas do mel.

As análises físico-químicas de méis contribuem para um controle de qualidade e para a fiscalização do mesmo. Os resultados dessas análises são comparados com os padrões definidos por órgãos oficiais internacionais, ou com os estabelecidos pelo próprio país, protegendo contra fraude.

Quando se trabalha com mel, é comum encontrar variações na sua composição física e química, tendo em vista que variados fatores interferem na sua qualidade, como condições climáticas, estágio de maturação, espécie de abelha, processamento e armazenamento, além do tipo de florada.

O crescente consumo do mel nas últimas décadas, estimulado pelas propriedades reconhecidamente benéficas à saúde humana, vem exigindo um controle de qualidade cada vez mais eficiente e rigoroso deste produto. Os mais importantes parâmetros para avaliar a qualidade do mel são teores de contaminantes (antibióticos, pesticidas e metais pesados), origem floral, área de produção e tempo de prateleira. O parâmetro mais utilizado para conferir se ocorreu um aquecimento indesejável, ou avaliar o tempo de estocagem do mel, são os teores de 5-hidroximetilfurfural (HMF) e o índice de diastase (LEMOS *et al.*, 2010).

O mel a ser exportado deve estar de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel que se encontra na íntegra na Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000 (BRASIL, 2000). Os principais parâmetros avaliados dizem respeito ao produto final destinado ao mercado, que deve estar dentro de padrões determinados pelo referido regulamento.

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).

O mel destinado ao mercado consumidor pode se apresentar em diferentes colorações e diferentes formas de estágio físico (líquido, pastoso ou cristalizado), de acordo com sua origem. Não é permitido qualquer tipo de adição de produtos estranhos ao mel, que possam alterar sua composição, excetuando-se a incorporação natural de grãos de pólen e cera provenientes do processo de colheita e extração. Os méis também precisam se encontrar dentro de especificidades de normalidade dentro de determinados

valores referenciais em diferentes tipos de análises. Alguns desses valores serão apresentados a seguir.

2.2.1 - Ácidez Livre

O valor máximo aceito pela legislação brasileira para acidez livre no mel é de 50 mEq/Kg (BRASIL, 2000). Essa acidez se deve à variação dos ácidos orgânicos, provenientes das diferentes fontes de néctar e pela ação da enzima glicose-oxidase na glicose que origina o ácido glicônico.

Além disso, a ação das bactérias durante a maturação do mel e a quantidade de minerais presentes no mel pode contribuir para sua acidez. Os ácidos orgânicos representam menos que 0,5% dos sólidos no mel e, em parte são responsáveis pela excelente estabilidade frente aos microorganismos (MENDES *et al.*, 2009).

2.2.2 - 5-Hidroximetilfurfural (HMF)

O HMF (**Figura 1**), geralmente, não está presente em méis frescos e seu conteúdo tende a aumentar durante o processo de aquecimento e o longo tempo de estocagem, pela reação de Maillard em carboidratos ou pela desidratação catalítica ácida das hexoses (FALLICO *et al.*, 2006). O HMF é um dos principais produtos de degradação no mel sendo o aumento de sua concentração influenciada pelo baixo pH, acidez total, minerais, origem botânica, umidade, temperatura e estresse fotoquímico.

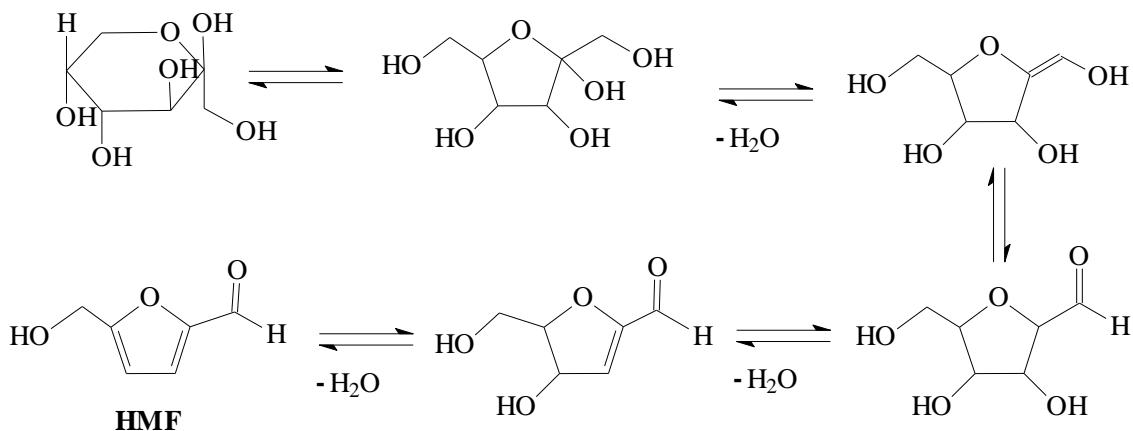


Figura 1 - Mecanismo de formação do HMF (5-hidroximetilfurfural) (BOGDANOV, 2009b)

O *Codex Alimentarius* e a União Europeia estabeleceram um nível máximo de HMF em mel de 40 mg/kg, exceto para os méis oriundos de países tropicais e para os méis com baixos níveis enzimáticos, cujos valores máximos de HMF estabelecidos são de 80 e 15 mg/kg, respectivamente (*Codex Alimentarius*, 2000). A legislação brasileira aceita no máximo 60 mg/kg de HMF no mel (BRASIL, 2000).

A presença de componentes potencialmente tóxicos, tais como aldeídos reativos (formaldeído), em alimentos vêm aumentando a atenção de agências protetoras do consumidor e de controle de qualidade. Em particular, alguns estudos mostram que o HMF está entre as substâncias consideradas de risco por sua citotoxicidade, genotoxicidade e atividade mutagênica (LEMOS *et al.*, 2010).

2.2.3 – pH

O valor de pH pode ser influenciado pelo pH do néctar, tipo de solo ou associado aos vegetais que contribuem para a composição do mel (CRANE, 1985). Além das substâncias mandibulares da abelha que são acrescentadas ao néctar durante o transporte até a colméia (MENDES *et al.*, 2009). Embora o pH não seja indicado como análise obrigatória no controle de qualidade dos méis brasileiros, pode ser um parâmetro útil para auxiliar na avaliação da sua qualidade.

2.2.4 - Açúcares Redutores

Os açúcares são um dos principais componentes do mel, onde os monossacarídeos frutose e glicose representam 80% e os dissacarídeos sacarose e maltose apenas 10% da quantidade total. Os teores desses diferentes tipos de açúcares podem provocar alterações físicas como viscosidade, densidade, higroscopичidade e cristalização no mel (WHITE, 1975).

A frutose é normalmente o açúcar predominante, sendo um dos fatores responsáveis pela docura do mel e sua alta higroscopicidade (CRANE, 1985). Além disso, méis com altas taxas de frutose podem permanecer líquidos por longos períodos ou nunca cristalizar (MENDES *et al.*, 2009).

Segundo a Instrução Normativa nº 11 de 2000 a quantidade mínimo de açúcares redutores para mel floral e mel de melato é de 65 g/100g e 60g/100g, respectivamente. (BRASIL, 2000).

2.2.5 – Umidade

Na composição do mel a água constitui o segundo componente em quantidade, variando de 15 a 21%, dependendo do clima, origem floral e colheita antes da completa desidratação. O conteúdo de água no mel pode influenciar na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade. Quando o teor de água for muito elevado, os microrganismos osmofílicos (tolerantes ao açúcar), presentes nos corpos das abelhas, no néctar, no solo, nas áreas de extração e armazenamento podem provocar fermentação no mel (MENDES *et al.*, 2009).

O mel é um alimento muito higroscópico, e pode facilmente absorver água, conforme as condições de armazenamento, manejo e região. O mel deve apresentar no máximo 20 g de umidade/100g (BRASIL, 2000).

2.2.6- Sacarose Aparente

A concentração de sacarose constitui um bom critério para diferenciar os méis monoflorais dos poliflorais. O teor elevado deste açúcar significa na maioria das vezes uma colheita prematura do mel, isto é, a enzima invertase ainda não transformou a sacarose ainda totalmente em glicose e frutose (AZEREDO *et al.*, 1999). A sacarose aparente máxima para o mel floral deve ser no máximo de 6 g/100g e para o mel de melato de 15 g/100g (BRASIL, 2000).

2.2.7 - Sólidos Insolúveis

Esta análise permite detectar as impurezas presentes no mel, tornando-o uma importante medida de controle higiênico. Os sólidos insolúveis correspondem aos resíduos de cera, patas e asas das abelhas, além de outros elementos inerentes do mel ou do processamento que este sofreu (MENDES *et al.*, 2009).

O máximo permitido é de 0,1 g/100g, exceto para o mel prensado que se tolera até 0,5 g/100g, unicamente em produtos acondicionados para sua venda direta ao público (BRASIL, 2000).

2.2.8– Cinzas

A falta de higiene e a não decantação e/ou filtração no final do processo de retirada do mel pelo apicultor são algumas irregularidades que podem ser identificadas através do método de determinação de cinzas (MENDES *et al.*, 2009). O máximo de cinzas permitido é de 0,6 g/100g, porém no mel de melato e suas misturas com mel floral tolera-se até 1,2 g/100g.(BRASIL, 2000).

2.2.9 - Atividade Diastásica

A diastase é uma das enzimas do mel que atua sobre a molécula de amido, sendo muito sensível ao calor, podendo assim indicar o grau de conservação e superaquecimento do produto. A sua ausência pode ser relacionada a procedimentos e/ou adulterações realizadas no mel, tal como uso de temperatura acima de 60°C durante o beneficiamento, condições de armazenamento inadequadas (tempo acima de seis meses e temperaturas elevadas) ou adição de açúcar invertido (MENDES *et al.*, 2009).

A atividade diastásica diminui devido à desnaturação parcial ou total das amilases. A legislação permite atividade diastásica como mínimo oito na escala Göthe. Os méis com baixo conteúdo enzimático devem ter como mínimo três na escala Göthe, sempre que o conteúdo de HMF não exceda a 15 mg/Kg (BRASIL, 2000).

Além desses critérios tratados pela Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, há outros requisitos não menos importantes para estabelecer os critérios para a identidade e qualidade do mel, entre eles podem ser salientados: o acondicionamento, aditivos, contaminantes, higiene, rotulagem e métodos de análises microbiológicas (LORENZON *et al.*, 2011).

2.3- Propriedades terapêuticas

O mel tem sido usado como um medicamento ao longo dos tempos. Um grande número de tratados tem sido publicados confirmado sua atividade antibacteriana, antitumoral, antimutagênica, anti-inflamatória e sua ação fungicida (TSIAPARA *et al.*, 2009; KOC *et al.*, 2011; ESTEVINHO *et al.*, 2011; AL-WAILI *et al.*, 2011 VOIDAROU *et al.*, 2011; KWAKMAN *et al.*, 2011)

Alguns trabalhos também já demonstraram que o mel reduz a inflamação da pele, edema e exsudação, promove a cicatrização de feridas, diminui o tamanho da cicatriz e estimula a regeneração de tecidos (BOGDANOV *et al.*, 2008; HASHEMI *et al.*, 2011)

A atividade antimicrobiana do mel está relacionada à sua alta osmolaridade, acidez e a presença de peróxido de hidrogênio, formado a partir da oxidação da glicose pela enzima glicose-oxidase. Quando o peróxido de hidrogênio é removido pela adição de catalase, alguns méis ainda apresentam atividade antibacteriana significativa. Isto se deve aos chamados fatores “não-peróxidicos”, na qual se incluem as lisozimas, os ácidos fenólicos e flavonóides, e sua acidez relativa (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010b)

Existem diferenças na atividade antibacteriana entre méis monoflorais de diferentes floras. A maior atividade foi relatada no mel de Manuka (*Leptospermum scoparium*), originário da Nova Zelândia. A alta atividade antibacteriana desse mel está, em muitos casos, relacionada aos fatores “não-peróxidico”. O mel de Manuka contém diversas substâncias fenólicas, incluindo ácido siríngico e siringato de metila, possui também atividade antibacteriana significativa contra *Staphylococcus aureus* (ALJADI e YUSOFF, 2002; JAYAVANTH *et al.*, 2011; JENKINS *et al.*, 2011).

2.4 - Atividade Antioxidante

2.4.1 - Radicais Livres e Antioxidantes

Atualmente existe um grande interesse no estudo das substâncias com propriedades antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Radicais livres são átomos ou moléculas produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes ao metabolismo (ALVES *et al.*, 2010). Esses radicais livres, que possuem pelo menos um elétron desemparelhado, quando em excesso apresentam efeitos deletérios ao organismo vivo, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, e promovem a peroxidação dos lipídios de membrana. Dessa forma, encontram-se

envolvidos em diversas patologias, tais como artrite, envelhecimento precoce, choque hemorrágico, doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cognitivas, etc podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (BARREIROS *et al.*, 2006). Para combater os radicais livres os organismos produzem substâncias que são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos, exercendo seu papel como antioxidante.

De acordo com Halliwell *et al.* (1995): “*Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo*”.

Na industria de alimentos, os antioxidantes são utilizados com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos. A oxidação de substâncias orgânicas é uma das principais causas da redução da vida de prateleira de diversos produtos alimentícios. As principais reações de oxidação que ocorrem nestes produtos são o escurecimento enzimático e a oxidação de lipídeos

Muitos antioxidantes são de origem natural ou produzidos sinteticamente, como o BHT- butil-hidroxitolueno, BHA- butil-hidroxianisol, TBHQ- *terc*-butil-hidroquinona (**Figura 2**), que são amplamente utilizados na indústria alimentícia.

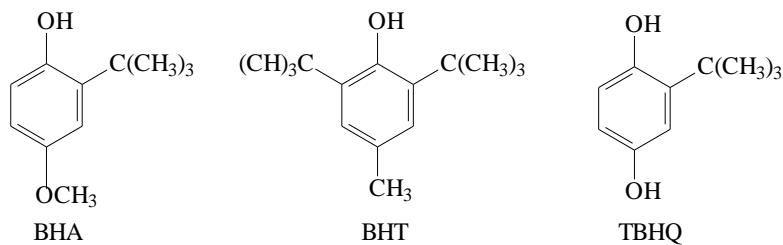


Figura 2 - Exemplos de antioxidantes sintéticos comumente utilizados.

Alguns antioxidantes atuam por mecanismos que retardam a etapa de iniciação da autoxidação. Entre esses mecanismos incluem-se: a complexação com metais; o sequestro de oxigênio; a decomposição de hidroperóxidos para a formação de espécie não radical e a absorção da radiação ultravioleta ou desativação do oxigênio singlete (RAMALHO e JORGE, 2006).

Desta maneira, os antioxidantes podem interromper as reações de propagação e inibir a oxidação de moléculas evitando a alteração do funcionamento normal da célula (AL-MAMARY *et al.*, 2002; SERAVALLI e RIBEIRO, 2007). Sendo assim, os antioxidantes contribuem para a prevenção de doenças associadas ao envelhecimento,

diminuindo o risco de doenças cardiovasculares e o aparecimento de câncer (GHELDOF e ENGESETH, 2001).

O conhecimento das importantes funções que os antioxidantes desempenham na inibição dos radicais livres resultantes do metabolismo celular, tem motivado o interesse pela análise destas substâncias em diversos produtos alimentares.

Um crescente número de estudos tem sido realizado com o objetivo de quantificar as substâncias fenólicas e estimar sua relação com a capacidade antioxidant do mel. Muitos pesquisadores encontraram boas correlações entre os conteúdos fenólicos e a atividade antioxidant do mel (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010a; ALJADI e KAMARUDDIN, 2004; AL-MAMARY *et al.*, 2002; BERETTA *et al.*, 2005, BLASA *et al.*, 2006; BRUDZYNSKI *et al.*, 2011; KHALIL *et al.*, 2011; GHELDOF e ENGESETH, 2002; MEDA *et al.*, 2005).

Uma substância com característica antioxidant protege o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva. Evidências epidemiológicas crescentes do papel de alimentos antioxidantes na prevenção de certas doenças têm conduzido ao desenvolvimento de grande número de métodos para determinar a capacidade antioxidant (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006; ZULUETA *et al.*, 2009).

2.4.2 - Oxidação Lipídica ou Autoxidação

O processo de autoxidacão dos lipídios foi proposto inicialmente por Farmer *et al.* (1942). O mecanismo de oxidação lipídica é classicamente dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Este processo é iniciado com a formação de radicais livres, espécies reativas do oxigênio (EROs).

Na etapa de iniciação, um grupo (RH) reage com um iniciador (X^\bullet) formando radical livre (R^\bullet) e uma substância neutra (XH). Durante a etapa de propagação, estes radicais são prontamente susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico, e assim convertidos em outros radicais, levando à formação dos produtos primários da oxidação (peróxidos e hidroperóxidos). Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico.

Por ultimo, na etapa de terminação, os radicais livres formados se ligam formando substâncias estáveis. Esses produtos estáveis (produtos secundários da

oxidação) são derivados da decomposição dos hidroperóxidos, como álcoois, aldeído, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos, além de produtos resultantes de dimerização e polimerização (**Esquema 1**, adaptado de RAMALHO e JORGE, 2006)

Iniciação:	$X^\bullet + RH \rightarrow R^\bullet + XH$
Propagação:	$R^\bullet + O_2 \rightarrow ROO^\bullet$ $ROO^\bullet + RH \rightarrow R^\bullet + ROOH$
Terminação:	$R^\bullet + R^\bullet \rightarrow R-R$ $R^\bullet + ROO^\bullet \rightarrow ROOR$ $ROO^\bullet + ROO^\bullet \rightarrow ROOR + O_2$

Esquema 1 - Esquema geral da autoxidação lipídica (adaptado de RAMALHO e JORGE, 2006).

As principais espécies reativas do oxigênio (EROs) distribuem-se em dois grupos: os radicalares e os não-radicalares, e estão representados na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Espécies reativas de oxigênio - EROs (adaptado de BARBOSA *et al.*, 2008).

Radicais livres	Não radicais
Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)	Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)
Hidroxila ($OH^{\bullet-}$)	Ácido Hipobromoso (HOBr)
Hidroperoxila ($HO_2^{\bullet-}$)	Ácido hipocloroso (HOCl)
Peroxila ($RO_2^{\bullet-}$)	Ozônio (O_3)
Alcoxila ($RO^{\bullet-}$)	Oxigênio Singlet (1O_2)
Carbonato ($CO_3^{\bullet-}$)	Peróxidos Orgânicos (ROOH)
Dióxido de Carbono ($CO_2^{\bullet-}$)	Peroxinitrito (ONOO) Ácido Peroxinitroso (ONOOH)

Enquanto algumas dessas espécies podem ser altamente reativas no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, outras são reativas apenas com os lipídios. Além disso, existem ainda alguns que são pouco reativos, entretanto podem gerar espécies danosas (BARREIROS *et al.*, 2006).

2.4.3 - Mecanismos de ação antioxidante

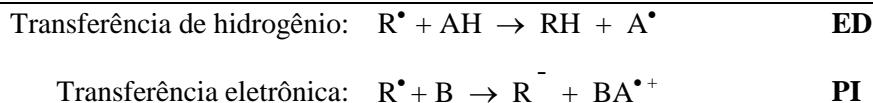
Os métodos de avaliação da atividade antioxidante são classificados em função do mecanismo de atuação em duas classes: os que atuam pela transferência de hidrogênio e os que atuam pela transferência de elétrons. Ambos os mecanismos podem atuar simultaneamente ou um dominará o outro em função da estrutura do antioxidante ou radical (PRIOR *et al.*, 2005).

Os métodos com transferência de hidrogênio são os mais comuns e medem a habilidade de um antioxidante em doar um átomo de hidrogênio para um padrão. Estas reações não dependem do pH e do solvente, além de serem reações rápidas (PRIOR *et al.*, 2005).

Neste caso, a eficiência da capacidade antioxidante de uma substância está relacionada à rapidez com a qual este doa um átomo de hidrogênio. A facilidade de formação e estabilidade do radical gerado deve ser maior do que a do radical inicial, e assim retardar ou até mesmo interromper a reação de propagação do processo oxidativo. Todos esses fatores estão relacionados à energia de dissociação, isto é, quanto mais fraca for a ligação covalente (R-H) da substância, mais fácil será a transferência do hidrogênio (QUIDEAU *et al.*, 2011).

Os métodos com transferência eletrônica medem a eficácia de um antioxidante em transferir um elétron para reduzir a substância, incluindo radicais, carbonilas e metais. O potencial de ionização (PI) neste caso é um parâmetro físico-químico de extrema importância, já que quanto mais baixo, mais fácil será a transferência eletrônica o que assegura a atividade antioxidante (PRIOR *et al.*, 2005; QUIDEAU *et al.*, 2011)

No **Esquema 2** estão representados os mecanismos de ação de um antioxidante, na qual a energia de dissociação (ED) e potencial de ionização (PI) são os dois parâmetros físico-químicos que podem ser usados para determinar a eficiência do processo em cada mecanismo, respectivamente.



Esquema 2 - Mecanismos de ação de um antioxidante.

2.4.4. - Métodos para Avaliar a Atividade Antioxidante (AA)

Os diversos métodos propostos na literatura para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas variam quanto ao tipo de radicais gerados, ao indicador de oxidação escolhido e ao método usado para sua detecção e quantificação. São chamados ensaios de captura (“*trap assays*”). Em todos esses ensaios, um radical é gerado e reage com moléculas-alvo, para produzir cor, fluorescência, quimioluminescência, perda ou ganho de sinais de ESR (“*Electron Spin Resonance*” ou Ressonância do Spin Eletrônico) ou outra mudança mensurável. A presença de antioxidantes altera esses sinais, o que permite sua análise quantitativa (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC – “*Oxygen-Radical Absorbance Capacity*” - Capacidade de Absorção de Oxigênio Radicalar e TRAP – “*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*” - Potencial Antioxidante Total, no poder de redução do metal (FRAP – “*Ferric Reducing Antioxidant Power*” - Poder Antioxidante de Redução do Íon Ferrico e CUPRAC – “*Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity*” - 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 – “*Thio Barbituric Acid Reactive Substances*” - 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).

2.4.4.1 - Ensaio com DPPH radicalar (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).

A molécula de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical livre estável devido à deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula. Esta deslocalização é responsável por sua coloração violeta.

O método DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995) é baseado na captura do radical DPPH[·] por antioxidantes que agem como doadores de hidrogênio, reduzindo-o a hidrazina (**Figura 3**). Este processo leva a um decréscimo da absorbância a 520nm causado pela mudança na coloração de violeta a amarelo claro.

A atividade do antiradical expressa pelo parâmetro EC₅₀ é definida como a quantidade do antioxidante necessário para diminuir 50% da concentração do DPPH[·] inicial.

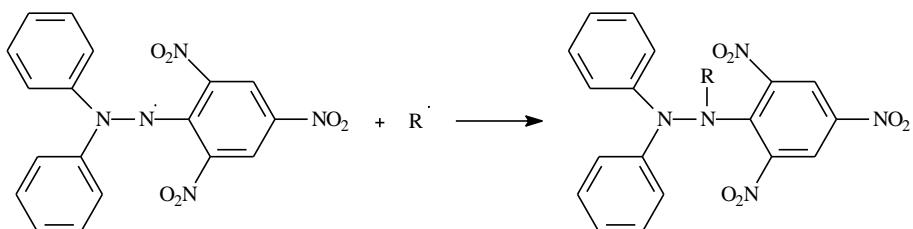


Figura 3 - Estabilização do radical livre DPPH (MOLYNEUX, 2004).

Embora seja um teste amplamente utilizado na avaliação da atividade antioxidante de alimentos, extratos vegetais e substâncias puras, tanto pela simplicidade e rapidez quanto pela reproduzibilidade, os resultados devem ser interpretados com cuidado. A presença de substâncias, tais como os carotenóides, que absorvem por volta de 515 nm podem interferir nos resultados devido à sobreposição dos seus espectros ao do DPPH (ALVES, *et al.*, 2010).

2.4.4.2 - Ensaio com ABTS ou TEAC (Capacidade Antioxidante de Equivalente em Trolox)

O método foi apresentado por Miller *et al.*, (1993) para ser utilizado em amostras biológicas. Desde então tem sido aplicado a alimentos e substâncias fenólicas solúveis em água. O método ABTS [ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)] baseia-se na capacidade de antioxidantes descolorirem o radical-cátion

(ABTS^{•+}) 2,2-azinobis(3-etylbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio), que é azul-esverdeado em solução, e tem um máximo de absorção em 734 nm (RE *et al.*, 1999).

Nesse ensaio, o ABTS é convertido ao seu radical-cáton (ABTS^{•+}) pela adição de persulfato de potássio, na qual o ânion S₂O₈⁻² atua como uma espécie oxidante. O ABTS^{•+}, radical cromóforico mono catiônico, reage com diversos antioxidantes (tais como, fenólicos, tióis, vitamina C, etc) através da doação de um átomo de hidrogênio, promovendo a supressão da cor da solução devido a sua conversão de volta à forma neutra (ABTS), que é sem cor. Essa medida da absorbância é realizada a 734 nm, na qual a ocorre mínima interferência de outros componentes que existem na amostra (**Figura 4**; ZULUETA *et al.*, 2009).

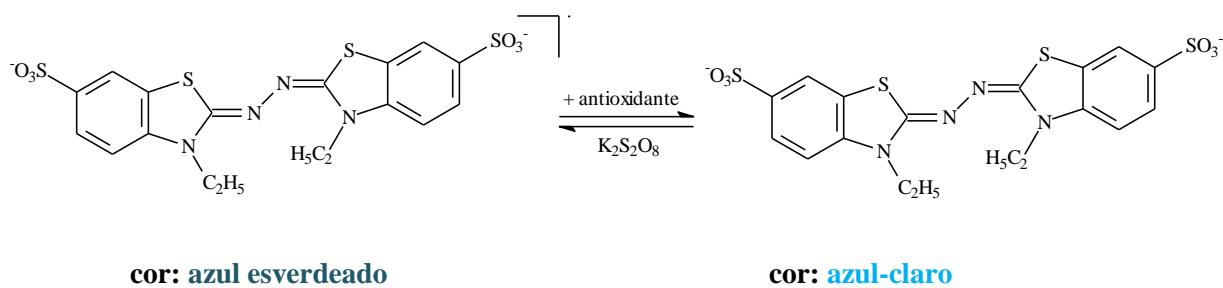


Figura 4 - Estabilização do radical ABTS⁺ por um antioxidante (ZULUETA *et al.*, 2009).

Uma das vantagens deste ensaio é a sua metodologia simples e sua aplicabilidade para o estudo de antioxidantes lipossolúveis e hidrossolúveis. O percentual de inibição de ABTS⁺ é determinado em função da concentração e do tempo (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006). Quando a medida é relativa à reatividade do Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), como padrão, sob as mesmas condições, o teste é denominado TEAC (“*Trolox Equivalent Antioxidant Activity*” ou Capacidade Antioxidante de Equivalente em Trolox), expresso como unidades equivalentes de Trolox que correspondem a 1,0 mmol/L. Entretanto possui certas limitações tais como: o valor de TEAC expressa a capacidade da amostra que está sendo avaliada em reagir como ABTS⁺ e não a sua capacidade em inibir o processo oxidativo. Além do que o ABTS⁺ apresenta baixa seletividade em relação à molécula doadora do átomo de hidrogênio, já que este reage com qualquer substância aromático hidroxilado independente de seu potencial antioxidante.

2.4.4.3 - Ensaio FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Íon Férrico)

O método FRAP (“*Ferric Reducing Antioxidant Power*” ou Poder Antioxidante de Redução do Íon Férrico) foi inicialmente desenvolvido para medir o poder redutor do plasma (BENZIE e STRAIN, 1996).

Pulido *et al.* (2000) demonstraram que o método com modificações pode ser aplicado não somente para estudos da atividade antioxidante de alimentos e bebidas, mas, também, para o estudo da eficiência antioxidante de substâncias puras, com resultados comparáveis àqueles obtidos com outras metodologias. Dentre os métodos em avaliação, o FRAP é o único que não é baseado na capacidade de captura do radical livre e sim na capacidade de redução (BENZIE e STRAIN, 1996). O método testa a força antioxidante das substâncias, via avaliação da redução do complexo Fe^{3+} -TPTZ (ferritripiridiltriazina) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] a ferro-tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ) por redutores, no caso, os antioxidantes, em valor de pH baixo. O complexo Fe^{2+} -TPTZ tem uma cor azul intensa e pode ser monitorado, a 593 nm, em espectrofotômetro (**Figura 5**).

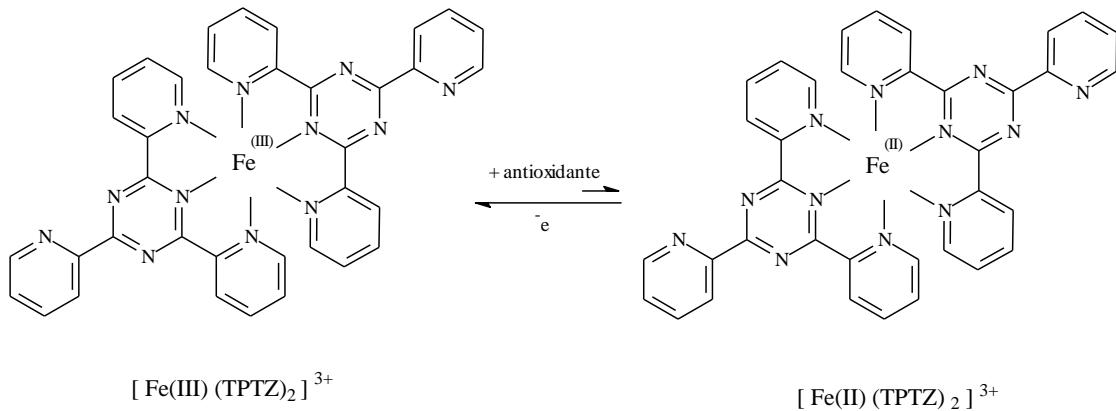


Figura 5 - Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina) com Fe^{3+} . (adaptado de RUFINO *et al.*, 2006).

O ensaio FRAP possui algumas limitações tais como: sendo um teste baseado na capacidade de redução do íon férrico, substâncias antioxidantes que atuam via mecanismos de transferência eletrônica, por exemplo, os carotenóides, não serão detectados. Além disso, qualquer substância (até mesmo os que não apresentam atividade antioxidante) com potencial de redução inferior a 0,7 V (o potencial redox do Fe^{3+} -TPTZ) pode teoricamente reduzir o $\text{Fe}(\text{III})$ -férrico a $\text{Fe}(\text{II})$ -ferroso, contribuindo para uma superestimação dos resultados. Apesar dessas limitações, o método FRAP, em

comparação a outras técnicas, é simples, rápido e não requer equipamentos especializados (PULIDO *et al.*, 2000).

2.4.4.4 - Ensaio ORAC (Capacidade de Absorção de Oxigênio Radicalar)

O método ORAC (“*Oxygen-Radical Absorbance Capacity*” ou Capacidade de Absorção de Oxigênio Radicalar) se baseia na propriedade fluorescente das proteínas B-ficoeritrina (B-PE) e R-ficoeritrina (R-PE). Neste ensaio o radical (I) derivado de AAPH [dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)], por perda de N₂, reage com oxigênio atmosférico, gerando radical (II) peroxila. Em ausência de antioxidante, II reage com B-PE e/ou R-PE, suprimindo a fluorescência destas proteínas. Em presença de antioxidantes, estas interceptam II, formando produtos estáveis e B-PE e/ou R-PE podem persistir fluorescendo (**Figura 6**). Este ensaio avalia a atividade antioxidante através da inibição da oxidação, induzida pelo radical peroxila, por transferência de átomos de hidrogênio (ALVES, *et al.*, 2010).

A habilidade antioxidante da substância é calculada a partir da medida da área sob a curva de decaimento da fluorescência comparada ao padrão que, na maioria das vezes, é o Trolox.

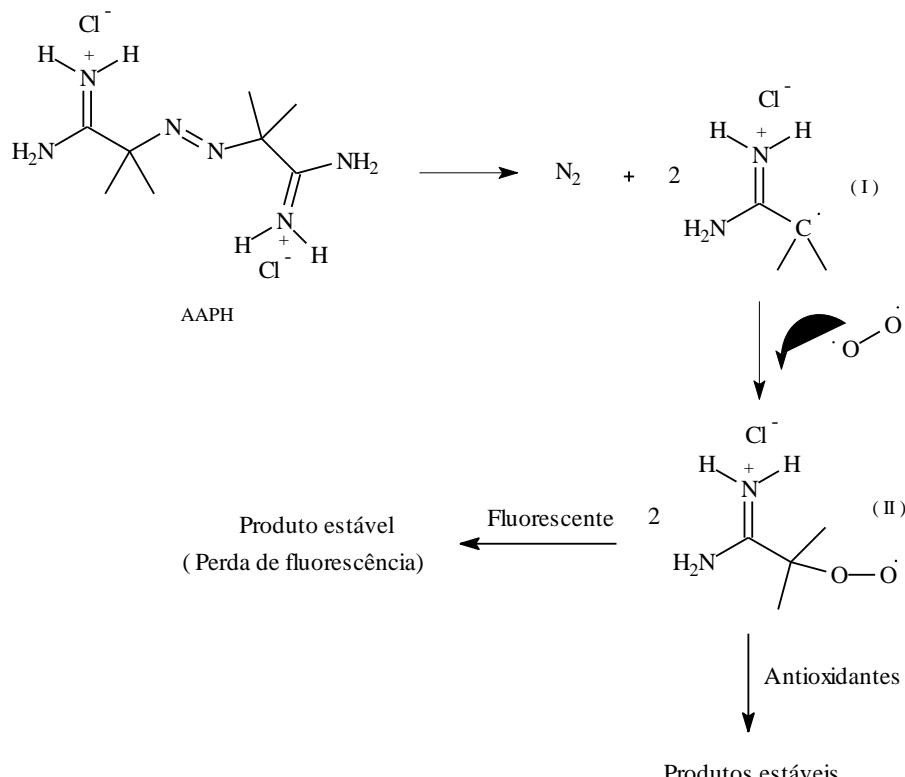


Figura 6 - Reação do radical AAPH no teste ORAC (ZULUETA *et al.*, 2009).

É preciso destacar que todos esses métodos apresentados se baseiam exclusivamente em reações químicas *in vitro* e não têm qualquer similaridade com sistemas biológicos. A validade de seus dados limita-se a um contexto de interpretação estritamente químico.

2.5 - Atividade Antioxidante das Substâncias Polares

Segundo Quideau *et al.* (2011), o termo substâncias fenólicas ou polares deve ser usado para definir metabólitos secundários das plantas derivados exclusivamente da via do chiquimato-fenilpropanóide e/ou derivados policetídeos, com mais de um anel aromático e desprovido de qualquer grupo funcional nitrogenado na sua estrutura mais básica.

As substâncias fenólicas são capazes de atuar como antioxidantes por distintas formas. Os grupos hidroxila dessas substâncias são bons doadores de hidrogênio, que podem reagir com espécies reativas tanto de oxigênio quanto de nitrogênio, em uma reação de terminação, que interrompe o ciclo de geração de novos radicais (PERREIRA *et al.*, 2009).

Após a interação com as espécies reativas iniciais, uma forma radicalar da substância antioxidante é produzida, e possui estabilidade química maior que o radical inicial. A interação dos grupos hidroxila das substâncias fenólicas com os eletrons π (pi) do anel benzênico proporciona a capacidade de gerar radicais livres mais estáveis devido a possibilidade de deslocalização do elétron em sua estrutura por meio das possíveis formas de ressonância (PERREIRA *et al.*, 2009).

A capacidade antioxidantas das substâncias polifenólicas também é atribuída à sua capacidade de quelação de metais (**Figura 7**) envolvidos na produção de radicais livres, como o Fe(II)/Cu(I) e Fe(III)/Cu(II), que estão envolvidos na geração de radicais livres pela reação de Haber-Weiss/Fenton (BARREIROS *et al.*, 2006).

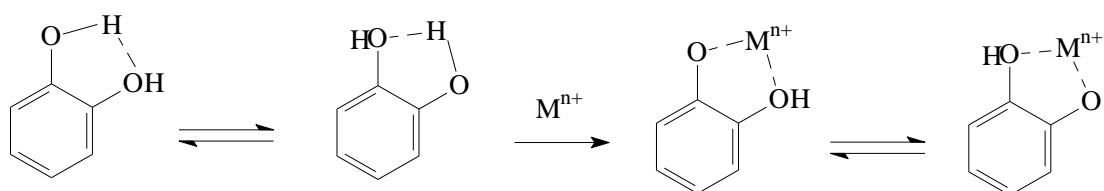


Figura 7 - Processo esquemático do mecanismo de quelação de metais . (adaptado de ERIN, 2009)

2.5.1 - Atividade Antioxidante de Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel aromático, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila na molécula. Essa classe de substâncias está dividida em dois grupos: os derivados do ácido benzóico e derivados do ácido cinâmico (DEWICK, 2002).

Na **Figura 8** destacam-se os ácidos gálico (2), 2,4-diidroxi-benzóico (3), protocatecuíco (4), *para*-hidroxi-benzóico (5), *para*-metoxi-benzóico (6), vanílico (7), e siríngico (8), todos derivados do ácido benzóico (1), que possuem como estrutura básica um grupo carboxílico ligado ao anel aromático.

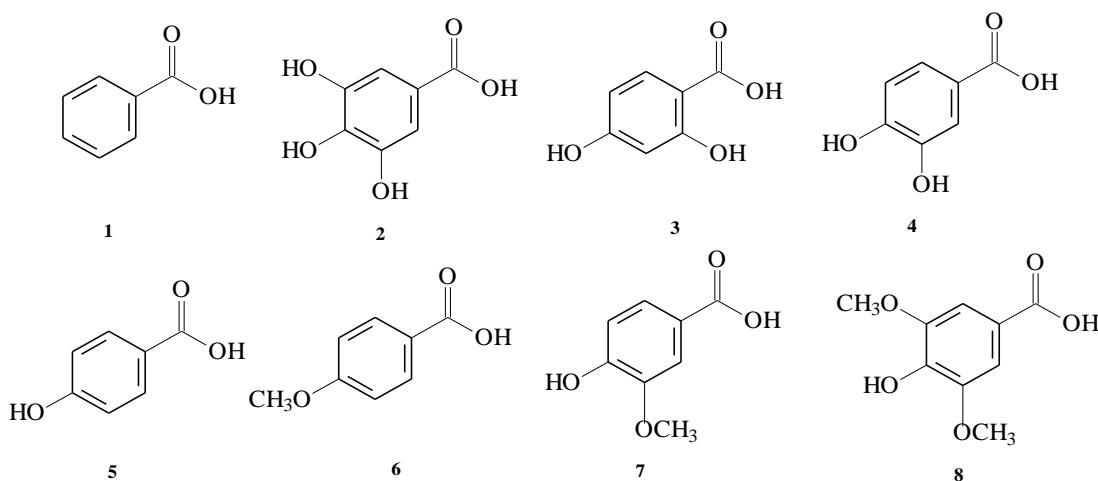


Figura 8 - Estruturas dos derivados de ácido benzóico

Os derivados do ácido cinâmico (9) possuem um anel aromático ligado a uma cadeia carbônica constituída por três carbonos. Na **Figura 9** estão alguns exemplos, onde os ácidos *p*-cumárico (10), caféico (11), ferúlico (12), *m*-cumárico (13) e sinápico (14) são os derivados mais comuns na natureza.

Estes ácidos existem nas plantas, usualmente na forma de ésteres, também são encontrados na forma de glicosídeos ou ligados a proteínas e a outros polímeros da parede celular e, raramente, como ácidos livres (DEWICK, 2002).

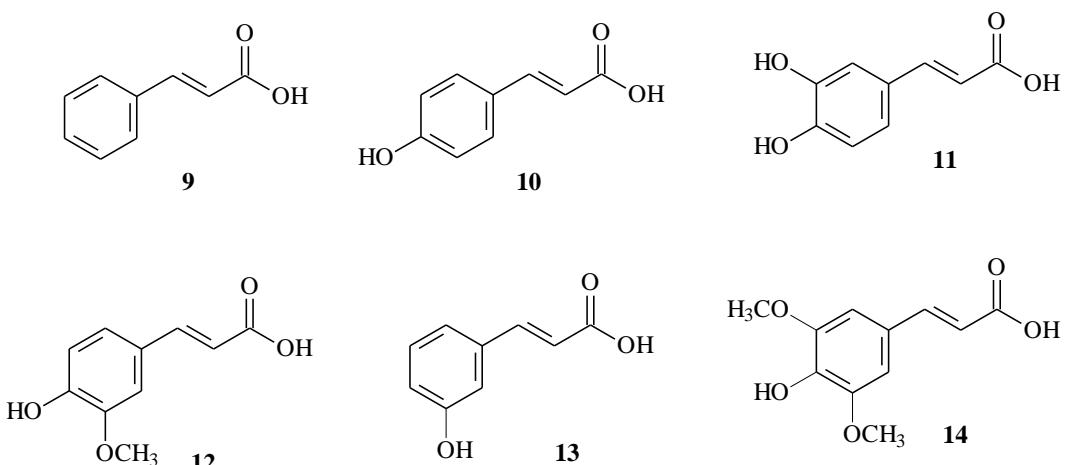


Figura 9 - Estruturas dos derivados de ácido cinâmico

Embora outras características também estejam envolvidas, a eficiência das substâncias fenólicas como antioxidantes depende, em grande parte, da sua estrutura química, orientação relativa e do número de grupos hidroxilas ligados ao anel aromático.

No caso do ácido ferúlico a existência de uma hidroxila na posição *ortho* ao grupo metoxila (doador de elétrons) explica o aumento da estabilidade do radical fenoxila e consequentemente aumenta a sua eficiência como antioxidante. O ácido caféico possui uma segunda hidroxila na posição *ortho* ou *para*, e devido a este fato apresenta uma atividade antioxidante maior do que o ácido ferúlico. Os ácidos sinápico, ferúlico e *p*-cumárico são antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzóico, tais como ácido procatecuíco, siríngico e vanílico. Este fato esta relacionado a questão estrutural, já que os derivados do ácido cinâmico possuem uma dupla ligação presente na molécula que participa da estabilização do radical pelo deslocamento do elétron desemparelhado por ressonância, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam tal característica (SOARES, 2002).

Vários autores vêm destacando a correlação entre o conteúdo de ácidos fenólicos encontrados no mel com a sua capacidade antioxidante. Khalil *et al.*, (2011b) identificaram ácidos gálico, siríngico, benzóico, cinâmico, *p*-cumárico e caféico e encontraram por CLAE uma alta correlação ($r= 0,976$) entre a atividade antioxidante nos méis malasianos. Enquanto Alvarez-Suarez *et al.*, (2010c) identificaram por CLAE-DAD-ESI/MS em méis cubanos ácidos vanílico, siríngico, ferúlico, *p*-cumárico e caféico e também encontraram alta correlação ($r= 0,9565$).

2.5.2 - Atividade Antioxidante de Flavonóides

Os flavonóides são substâncias fenólicas provenientes do metabolismo secundário de plantas e são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, que de modo simplificado derivam da condensação de uma unidade de *p*-cumaroil-CoA e três unidades de malonil-CoA (DEWICK, 2002).

Estruturalmente, os flavonóides são caracterizados por um esqueleto de 15 átomos de carbono arranjado em três anéis ($C_6-C_3-C_6$), que são chamados A, B e C (Figura 10). Aproximadamente mais de 4000 estruturas já foram descritas na literatura. Essa grande variedade estrutural se deve ao nível de hidrogenação, hidroxilação, metilação e sulfonação das moléculas. Além disso, os flavonóides podem formar complexos com açúcar, lipídios, aminas e ácidos carboxílicos (DEWICK, 2002)

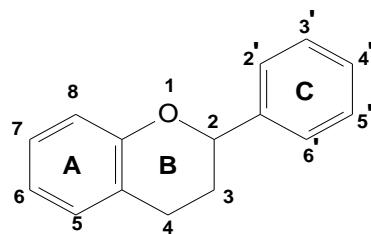


Figura 10 - Estrutura básica de um flavonóide.

As variações encontradas no anel C permitem uma subdivisão dos flavonóides (Figura 11) em seis principais classes: flavanol, antocianidina, flavona, isoflavona, flavonol e flavanona.

Os principais flavonóides encontrados no mel são queracetina, luteolina, canferol, apigenina, crisina, galangina, pinobanksina e pinocembrina (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010b).

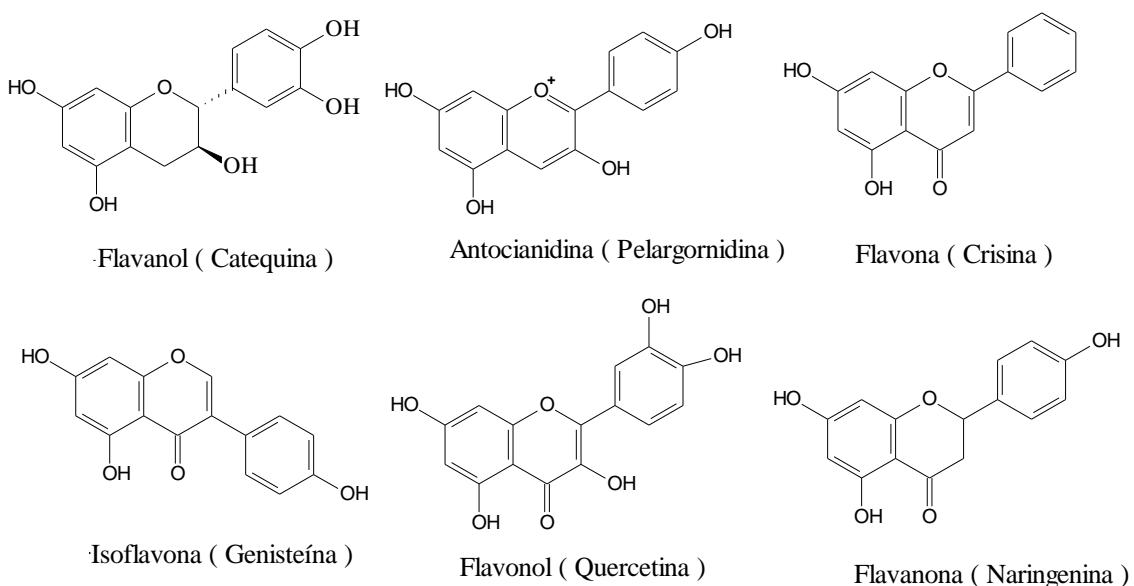


Figura 11 - Estrutura das principais classes de flavonóides.

Bors *et al.* (1990) propuseram critérios estruturais que definem a eficiência da capacidade antioxidante de um flavonóide (**Figura 12**).

1 – A presença de um grupo *o*-diidroxi (catecol) no anel B. Esse fator se destaca devido a possibilidade de uma maior estabilidade do radical formado através da deslocalização eletrônica pela estrutura.

2 – Uma dupla ligação em C2-C3 que conjugada com a função 4-oxo do anel C que é responsável pela deslocalização eletrônica no anel B.

3 – A presença de grupos hidroxilas em posição meta a C5 e C7.

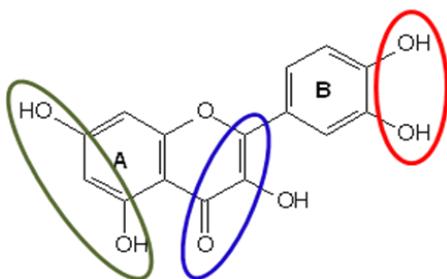


Figura 12 - Critérios estruturais que definem a eficiência da capacidade antioxidante de um flavonóide (adaptado de ERIN, 2009)

Frankel *et al.* (1999) aprofundaram a explicação destes critérios estruturais destacando a capacidade de doação de elétrons e interrupção de reações em cadeia dos flavonóides. Esta atividade é atribuída às hidroxilas fenólicas, em especial nas posições 3' e 4' do anel B e a presença da dupla ligação no C2-C3 no anel C. A atividade

aumenta com o número de grupos -OH nos anéis A e B. Estas substâncias atuam em diversos espécies de radicais, tais como radical hidroxila (HO^\cdot), radical ânion superóxido (O_2^\cdot), oxigênio singuleto ($^1\text{O}_2$), radical alcoxila (RO^\cdot), radical peroxila (ROO^\cdot), peroxinitrito (ONOO^\cdot), também atuam em mecanismo de complexação de proteínas (enzimas e seus sítios metálicos ativo) e induzindo efeitos sinérgicos pela redução de antioxidantes oxidados (mistura de vitaminas E e C).

Gao *et al.* (1999) sugeriram que as propriedades antioxidantes das substâncias são frequentemente associadas à sua capacidade de formar radicais estáveis após reação com radicais livres. Os flavonóides que possuem capacidade antioxidantem em muitos casos dão origem a radicais semiquinonas em soluções alcalinas. Este recurso especial pode também dar origem a seus sítios ativos. O radical semiquinona ou aroxil pode reagir com um segundo radical, aquirindo assim a estrutura de uma quinona estável (**Figura 13**).

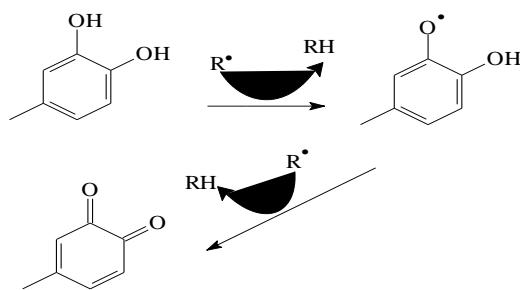


Figura 13 - Flavonóides atuando sobre EROS com a formação de estrutura estável.
(adaptado de TIWARI, 2001)

Portanto, a formação e estabilidade do radical gerado está fortemente ligado a atividade antioxidantem dos flavonoides. O fator mais determinante é a presença, número e posição dos grupos hidroxila na estrutura, já que essa localização implica na possível formação de ligação de hidrogênio intramolecular e a formação de conformações que possibilitem uma maior deslocalização eletrônica pela molécula. Os flavonóides com *o*-tri ou *o*-diidroxilas no anel B e /ou A formam radicais livres mais estáveis. São devido a essas características que muitos flavonóides são melhores antioxidantes do que as vitaminas C e E e o β -caroteno, por exemplo, que não formam radicais estáveis.

2.6 – Determinação da Origem botânica do mel

Um elevado número de amostras de méis está no mercado sendo comercializado como monoflorais, esse fato ressalta a importância de se verificar a sua qualidade e autenticidade evitando possíveis fraudes.

Tradicionalmente, a determinação da origem floral do mel é feita através da análise do pólen (melissopalinologia). Este método é baseado na identificação do pólen por exame microscópico, onde os diferentes tipos de pólen estão descritos na literatura (KASKONIENE e VENSKUTONIS, 2010).

No entanto, existem alguns problemas relacionados a este método: diferentes espécies de plantas produzem pólen em proporções distintas e esta quantidade ainda pode variar entre as estações, as abelhas pode levar o pólen sem recolher néctar, a maioria dos pólens podem ser coletadas de plantas que não podem ser a fonte de mel. Além disso, pólen pode ser adicionado de forma fraudulenta na amostra a ser analisada (KASKONIENE e VENSKUTONIS, 2010).

Outro elemento de incerteza para a interpretação dos resultados da melissopalinologia é consequência da aplicação das normas padrões da União Europeia e *Codex Alimentarius*. Ambos indiretamente permitem a remoção de pólen por filtração quando se faz a remoção de matérias orgânicas ou inorgânicas estranhas presentes no mel. Embora não seja mais permitida a classificação botânica do mel depois do pólen ter sido removido, esta filtração facilita a adulteração do mel em relação origem geográfica (RUOFF, 2006)

Dificilmente o mel é proveniente de uma única fonte botânica. O termo monofloral é usado para descrever mel produzido principalmente a partir de uma espécie de planta. Geralmente, para ser considerado monofloral o conteúdo de pólen de um mel deve ser de pelo menos 45% do conteúdo total. Esse percentual não é válido em determinados casos quando a origem botânica vem de espécies vegetais com alta ou baixa concentração de grãos de polen (SCHIEVANO *et al.*, 2010).

Por exemplo, para ser considerado monofloral o mel de castanheiro (*Castanea sativa*) e eucalipto (*Eucalyptus spp.*) requerem pelo menos 90% dos pólens, enquanto os méis de morango (*Arbutus unedo*), laranja (*Citrus spp.*), dente de leão (*Taraxacum sl*) e tília (*Tilia spp.*) precisam de apenas 10% de pólen (RUOFF, 2006; CONSONNI e CAGLIANI, 2008).

A análise do pólen não é usada apenas para a identificação da origem floral, mas também em alguns casos para determinar a origem geográfica do mel, isto é possível pois determinadas espécies botânicas se desenvolvem apenas em regiões específicas (CONSONNI e CAGLIANI, 2008).

Nas últimas décadas várias propostas de análises têm sido feitas como formas alternativas à melissopalinologia. Muitas dessas técnicas se baseiam, por exemplo, na determinação de substâncias fenólicas, no perfil de substâncias voláteis, de aminoácidos, de carboidratos na composição do mel e também pela análise sensorial. A diversidade dos constituintes do mel é ampla e depende da origem botânica, entretanto fatores sazonais e ambientais também podem interferir neste processo, e consequentemente na composição química do mel (SCHIEVANO *et al.*, 2011; KASKONIENE e VENSKUTONIS, 2010).

As propriedades sensoriais são extremamente importantes para a caracterização do mel, a fim de distinguir e avaliar sua origem botânica. Em geral, a análise sensorial é o processo pelo qual certas propriedades sensoriais ou atributos são identificados e medidos, e os dados resultantes são analisados estatisticamente. Neste processo, os diferentes atributos são percebidos através dos cinco sentidos, que desempenham um papel importante na identificação e mensuração: visão (aparência, cor e forma), cheiro (aroma) gosto, (sensações gustativas), toque (consistência, viscosidade, fluidez e grau de cristalização) e até mesmo ausência (ou seja, os atributos negativos, como fermentação). A análise descritiva sensorial é uma das ferramentas mais completas e informativas utilizada em análise sensorial. Estes testes podem fornecer dados completos da descrição sensorial do produto e identificar atributos sensoriais relacionados, ou mesmo responsável, por sua aceitação ou rejeição (BERTONCELJ *et al.*, 2011; GONZALEZ *et al.*, 2010).

Alguns metabólitos secundários derivados de plantas têm sido usados como marcadores quimiotaxonómicos em sistemática vegetal. Alguns autores já sugeriram as possíveis correlações entre a origem floral e o perfil de flavonóides contido no mel (ANKLAM, 1998; BALTRUŠAITYTĖ *et al.*, 2007; YAO *et al.*, 2004; KASKONIENE e VENSKUTONIS, 2010). Alguns deles também têm sido propostos como possíveis marcadores para a determinação da origem botânica do mel (SCHRÄMM *et al.*, 2003; IURLINA, *et al.*, 2009; LACHMAN *et al.*, 2010; ESCRICHE *et al.*, 2011; ALISSANDRAKIS *et al.*, 2011).

Diferenças consideráveis na composição e conteúdo de substâncias fenólicas foram encontradas em diferentes méis monoflorais. Os méis de colorações mais escuras têm sido relacionados a um maior conteúdo de derivados de ácidos fenólicos, do que flavonoides em comparação a méis mais claros. A predominância de algum componente individual ou de alguns grupos de substâncias tem sido apontadas como possíveis biomarcadores que podem ser utilizados na tipificação do mel. Em trabalho descrito por Kaskoniene e Venskutonis (2010), por exemplo, para o mel de eucalipto os flavonóides miricetina, tricetina, luteolina, queracetina e canferol foram sugeridos como marcadores, enquanto para o mel de laranjeira a hesperetina foi o mais relevante (**Tabela 4**).

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) é atualmente um dos métodos mais utilizados para determinação de ácidos fenólicos e flavonóides presentes em mel. O mel é uma matriz complexa, onde os ácidos fenólicos e flavonoides estão em baixas concentrações, por isso para facilitar a análise é realizada uma extração eficiente das substâncias fenólicas. Um dos métodos descritos na literatura é a extração utilizando a resina não-iónica XAD (PYRZYNSKA e BIESAGA, 2009; GOMEZ-CARAVACA *et al.*, 2006).

Tabela 4 – Substâncias características em alguns méis monoflorais. (adaptado de KASKONIENE e VENSKUTONIS, 2010).

Tipo de mel	Substâncias
Morango	Ácido homogentísico, ácido glucônico, ácido 2,5-dihidroxifenilacético, α -isoforona, ácidos (\pm) -2-cis, 4-trans e (\pm) -2-trans,4-trans-abscísico
Rosamary	Siringato de metila, canferol e 8-metoxicanferol
Acácia	Canferol, ácido ferúlico, alguns derivados do ácido cinâmico, ácidos (\pm) -2-cis, 4-trans e (\pm) -2-trans,4-trans-abscísico e ácido elágico
Eucalipto	Miricetina, tricetina, luteolina, queracetina, canferol, ácido galico e alguns derivados do ácido benzóico
Manuka	Queracetina, luteolina, queracetina 3-éter metil, ácido gálico, ácido abscísico, ácido 2-metoxibenzóico, ácido trimetoxibenzóico e metilgioxal
Kanuka	Queracetina, canferol, 8-metoxicanferol, ácido metoxifenil-lático, ácidos (\pm) -2-cis, 4-trans e (\pm) -2-trans,4-trans-abscísico
Laranjeira	Queracetina, hesperetina, crisina, antranilato de metila, ácido caféico, ácido <i>p</i> -cumárico e ácido ferúlico
Girassol	Queracetina, queracetina 3, 3-dimetil éter, miricetina, luteolina, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido ferúlico e ácido caféico.
Urze	Miricetina, miricetina 3-metil éter, miricetina 3'-metil éter, tricetina, ácidos (\pm) -2-cis, 4-trans e (\pm) -2-trans,4-trans-abscísico, ácido elágico, ácido fenilacético, ácido benzóico, ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico, ácido siríngico e ácido <i>o</i> -cumárico.
Lavander	Naringenina, luteolina, ácido gálico e ácido caféico.

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

Tabela 5 - Substâncias fenólicas identificadas nos méis de eucalipto e silvestre (DA SILVA, 2004).

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

Tabela 6 - Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestre, assa-peixe e macieira (MONTAGNI, 2005).

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

Tabela 7 - Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres e laranjeira (LIANDA, 2004).

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

Tabela 8 - Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, laranjeira e eucalipto (LIANDA, 2009).

Amostras de méis	Substâncias Fenólicas identificadas por CLAE-DAD
Silvestre	Ácidos: protocatecuico, <i>p</i> -hidroxi-benzóico, <i>p</i> -cumárico, <i>p</i> -metoxi-benzóico, vanílico e cinâmico. Flavonóides: quercetina, morina, isoqueracetina e canferol.
Laranjeira	Ácidos: <i>p</i> -hidroxi-benzóico, protocatecuico, vanílico, <i>p</i> -cumárico e cinâmico. Flavonóides: isoqueracetina e quercetina.
Eucalipto	Ácidos: protocatecuico, <i>p</i> -hidroxibenzóico, siringico, vanílico e cinâmico. Flavonóide: tricetina.

Tabela 9 - Substâncias fenólicas identificadas nos méis silvestres, laranjeira e eucalipto (VIANNA, 2010).

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

2.7 - Métodos Alternativos para a determinação da origem botânica do mel: RMN de ^1H e Quimiometria

Vários estudos têm sido desenvolvidos em busca de alternativas ao uso da análise sensorial e de pólen na tipificação do mel. Entre elas se destaca o uso da ressonância magnética nuclear de ^1H aliado a técnicas quimiométricas.

A caracterização e o controle de qualidade é uma exigência crescente e urgente para todos os alimentos. O mel é um dos alimentos mais estudados devido suas propriedades nutricionais e terapêuticas em uma dieta correta (SCHRAMM *et al.*, 2003).

Atualmente a origem botânica e geográfica do mel é avaliada através de análise de pólen, pois este reflete a vegetação a partir da qual o néctar foi recolhido. No entanto, a análise polínica apresenta algumas limitações, tais como, a dificuldade de encontrar profissionais qualificados, além de problemas nas interpretações dos dados devido a escassez de pólen em certas espécies de plantas. Apesar de todos esses problemas na contagem dos polens, a palinologia continua sendo o método de referência neste tipo de análise (CONSONNI e CAGLIANI, 2008).

Vários métodos analíticos têm sido aplicados na caracterização do mel, principalmente na identificação dos seus constituintes químicos, tais como: condutimetria, espectroscopia na região do infravermelho, espectrometria de massas, cromatografia líquida de alta eficiência, entre outras. (IGLESIAS *et al.*, 2004; RUOFF *et al.*, 2006a ; RUOFF *et al.*, 2006b; KAROUI e BAERDEMAEKER, 2007)

A análise por RMN de alta resolução tem conseguido nos últimos anos uma boa aceitação como método poderoso para o controle de qualidade em alimentos, devido à suas características, tais como: dispensa processos de extração e purificação das amostras, é um processo rápido, fácil, de alta reproduzibilidade e sensibilidade e não degradativo. Além disso, o uso de RMN tem sido aplicado na elucidação estrutural de substâncias orgânicas, podendo ser útil na investigação de misturas complexas, como o mel. Recentemente, métodos de classificação baseado em experimentos de RMN de ^1H estão sendo propostos como técnicas alternativas para a classificação de amostras de méis de diferentes origens botânicas (CONSONNI e CAGLIANI, 2008; LOLLI *et al.*, 2008; BOFFO, 2009; SCHIEVANO *et al.*, 2010; SCHIEVANO *et al.*, 2011).

A espectroscopia de RMN, que é uma técnica muito empregada na análise de alimentos, tem como vantagem o fato de apresentar em um único espectro todas as

informações sobre as possíveis classes de substâncias presentes e em quantidades detectáveis. Entretanto, a grande quantidade de informações contidas neste espectro de RMN pode dificultar a interpretação dos dados dependendo da matriz analisada e do número elevado de amostras utilizadas. Nesse caso, os métodos estatísticos multivariados têm sido aplicados com sucesso aos dados espectrais para reduzir a sua complexidade e destacar as informações mais relevantes (CONSONNI e CAGLIANI, 2008; LOLLI *et al.*, 2008; BOFFO, 2009; SCHIEVANO *et al.*, 2010; SCHIEVANO *et al.*, 2011).

Consonni e Cagliani (2008) mostraram que com o uso de RMN de ^1H e métodos de análise multivariada foi possível distinguir 41 amostras de mel (polifloral e acácia) de diferentes origens geográficas.

Schievano *et al.* (2010) demonstraram através do uso de RMN de ^1H aliado a quimiometria que o método foi válido para determinar a origem floral de 118 amostras de méis de acácia, tília, castanheiro e polifloral, e sugeriram ser uma alternativa ao uso da melissopalinologia. Esses pesquisadores mostraram que a partir de sinais selecionados nos espectros de RMN de ^1H foi possível a discriminação dos diferentes tipos botânicos e a identificação de metabólitos característicos de cada origem

Muitos estudos tem sido realizados para estabelecer novas metodologias, principalmente combinados com análises quimiométricas, para avaliar a origem geográfica de mel, com diferentes ou iguais origem botânica (BERRETA *et al.*, 2008; DONARSKI et al., 2008; CONSONNI e CAGLIANI, 2008; LOLLI *et al.*, 2008; BOFFO, 2009; SCHIEVANO *et al.*, 2010; SCHIEVANO *et al.*, 2011).

A quimiometria é um campo da análise multivariada que utiliza tratamentos estatísticos para gerar modelos que possibilitam extrair informações de natureza química a partir de conjuntos de dados multivariados bidimensionais (WINNING *et al.*, 2008).

Um dos principais objetivos consiste em classificar e agrupar amostras. Os métodos de reconhecimento de padrões permitem agrupar objetos de uma mesma categoria de acordo com a similaridade entre eles, buscando regularidade e padrões entre os dados analisados.

No caso do uso de RMN de ^1H , a partir dos espectros é construída uma matriz de dados, na qual são aplicados os métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados. Para tal são utilizados métodos fundamentados em projeção (PCA –

Análise de Componentes Principais) e métodos baseados na distância entre as amostras (HCA – Análise Hierárquica de Agrupamentos), também conhecida como Análise de *cluster*.

A análise por PCA é um método de análise multivariada que projeta os dados num espaço de dimensão menor por meio do agrupamento de variáveis altamente correlacionadas numa nova variável direcionada ao longo do eixo de maior variabilidade dos dados. Os dados originais são tratados e havendo correlação significativa entre as variáveis do conjunto de dados é possível encontrar novas variáveis, que são chamadas de componentes principais (PCs). Estas estão em número menor que a inicial e descrevem aproximadamente toda a informação contida nos dados originais (PIROUETTE, 2008).

As novas variáveis são combinações lineares das variáveis originais e ortogonais entre si. Elas são construídas em ordem decrescente de quantidade de variância que descrevem, de forma que as informações mais relevantes fiquem contidas nas primeiras PCs, e as de menor importância, nas últimas. A redução da dimensionalidade do conjunto de dados leva a uma diminuição na complexidade das informações analisadas, tornando-as de mais fácil compreensão (WINNING *et al.*, 2008).

A análise por agrupamento hierárquico (HCA) representa graficamente os dados multidimensionais em um esquema bidimensional. Os resultados são apresentados na forma de um diagrama chamado dendograma, na qual o comprimento dos ramos representa o grau de similaridade entre os objetos.

O parâmetro usado neste processo é a medida das distâncias entre as amostras. Este método calcula e compara as distâncias entre pares de amostras (ou variáveis) em um conjunto de dados. As amostras são agrupadas de acordo com a similaridade de seus atributos (PIROUETTE, 2008).

Uma das medidas mais utilizada para estabelecer a distância entre as amostras é a Euclidiana que consiste na distância geométrica entre duas amostras a e b (d_{ab}) em um espaço multidimensional e o Método de Ward, que consiste na análise da variância para avaliar a distância entre os grupos, com o objetivo de tentar minimizar a soma dos quadrados de quaisquer grupos que possam ser formados em cada passo da análise.

3 – OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar diferentes propriedades físico-químicas, o perfil de substâncias fenólicas e a atividade antioxidante de onze méis monoflorais (assa-peixe, cambará e morrão de candeia) de *Apis mellifera*.

3.1 - Objetivos específicos

- Determinar os seguintes parâmetros físico-químicos: teor de HMF e a cor utilizando método espectrofotométrico, acidez livre e o pH para avaliar qualidade do mel.
- Determinar o conteúdo de aminoácidos livres pelo método de cádmio-ninidrina, e proteínas totais pelo método de Bradford das amostras de méis.
- Determinar o conteúdo de fenólicos totais pelo método colorimétrico de Folin-Denis e o conteúdo de flavonóides totais, através do método de complexação com cloreto de alumínio das amostras de méis e de seus extratos.
- Avaliar as propriedades antioxidantes das amostras de méis e dos seus extratos através do método de captura de radicais livres (DPPH e ABTS) e pelo poder de redução do metal (FRAP).
- Identificar e quantificar a composição química dos extratos de mel, com base no perfil cromatográfico das substâncias fenólicas, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).
- Correlacionar à atividade antioxidante com a concentração de substâncias polares (ácidos fenólicos e flavonóides, aminoácidos e proteínas) encontrados nos méis.
- Classificar os méis quanto à origem floral e/ou geográfica a partir das análises dos perfis de suas composições químicas, nos extratos, por ressonância magnética nuclear de hidrogênio em conjunto com técnicas de análise multivariada.

4 - PARTE EXPERIMENTAL

4.1 - Material e Métodos

O solvente utilizado para os ensaios espectrofotométricos foi metanol grau espectroscópico (VETEC, RJ, Brasil) e todas as soluções foram preparadas usando água ultrapura, obtida em sistema de purificação Milli-Q (Millipore, SP, Brasil).

Os reagentes: carbonato de sódio anidro, cloreto de alumínio hexaidratado, tungstato de sódio diidratado, ácido fosfomolíbdico, ácido fosfórico, cloreto de cádmio, ninidrina, ferrocianeto de potássio, acetato de zinco, azul de Coomassie Brilhante G-250 leucina, bissulfito de sódio foram comprados da VETEC (RJ, Brasil). Enquanto os reagentes 2,2-difenil-1-picril-hidrazil, albumina sérica bovina, 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina, 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) e Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich (USA).

Os padrões de ácido gálico, quercetina, HMF, ácido protocatecuico, ácido *p*-hidroxi-benzóico, ácido siríngico, ácido 2,4 diidroxi-benzico, ácido sinápico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido *m*-cumárico, ácido benzóico, ácido *p*-metoxi-benzóico, ácido cinâmico, naringerina, ácido abscísico, ácido *m*-metoxi-cinâmico, crisina e galangina utilizados para a comparação dos dados por 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).

O espectrofômetro UV-Vis utilizado para as leituras de absorbâncias foi da marca NOVA 2000UV e o medidor de pH utilizado da marca Analyser pH 300. Os ensaios de atividade antioxidante foram realizados no espectrofômetro ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorvent Assay*), modelo 680 Microplate Reader (Bio Rad), utilizando microplacas de acrílico com noventa poços.

A fase móvel utilizada na análise por CLAE foi composta de água ultrapura, metanol, acetonitrila e ácido acético com grau espectroscópico (VETEC, RJ, Brasil). A fase móvel foi filtrada através de uma membrana de nylon 0,45 µm (Sartorius) para remover todas as impurezas.

4.2 - Amostras de Mel

Foram avaliadas onze amostras de méis de abelhas *Apis mellifera* oriundas do comércio e/ou diretamente de apicultores de diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro, incluindo diferentes origens botânicas de acordo com a **Tabela 10**. Os méis foram obtidos na forma centrifugada e/ou em favos (sem passar pela centrifugação) e foram mantidos em frascos de vidro ou polipropileno bem fechados sob refrigeração antes das análises.

Tabela 10 - Amostras de méis (em favos e centrifugadas) estudadas neste trabalho.

Código da Amostra	Origem Floral	Origem Geográfica	Data de Coleta
A1	Assa-peixe (favos)	Paracambi - RJ	Setembro-2010
M2	Morrão de Candeia	Vassouras - RJ	Junho /Julho – 2010
A3	Assa-peixe	Vassouras - RJ	Agosto-2010
C4	Cambará (favos)	Seropédica - RJ	Abril-2010
C5	Cambará (favos)	Seropédica - RJ	Janeiro-2010
C6	Cambará (favos)	Seropédica - RJ	Abril-2010
C7	Cambará	Seropédica - RJ	Janeiro-2010
C8	Cambará	Seropédica - RJ	Janeiro-2010
C9	Cambará (favos)	Seropédica - RJ	Agosto -2010
M10	Morrão de Candeia	Teresópolis - RJ	Abril – 2010
M11	Morrão de Candeia	Teresópolis - RJ	Julho – 2009

4.3 - Preparo do mel artificial

Um mel artificial foi preparado dissolvendo 2,25g de sacarose, 11,25g de maltose, 60,75g de frutose e 50,25g de glicose em 25,5mL de água ultrapura. (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010a).

4.4 - Determinação espectrofotométrica da cor do mel

Para determinação da cor do mel utilizando a escala Pfund foi utilizado o método descrito por NAAB *et al.*, (2008). Este método consiste na medida de absorbância a 635nm de uma solução 50% (m/v) de mel em água. Após diluição da

amostra, esta foi homogeneizada em banho de ultrassom e os testes realizados em triplicada. A média das absorbâncias é convertida para a escala Pfund pela fórmula **mm Pfund = -38,7 + 371,39 x Abs**, na qual mm Pfund é a intensidade da cor do mel e Abs é a absorbância lida para a solução de mel. Os resultados foram classificados conforme a **Tabela 11**.

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

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

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

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

4.5.1 - 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. Para a solução de Carrez II, foram dissolvidos 30 g 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 0,2 g de bissulfito de sódio em água destilada, e o volume diluído para 100 mL, em balão volumétrico.

4.5 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). Após a mistura, a absorbância foi determinada a 284 e 336 nm em cubeta de quartzo de 1 cm. Para cada amostra, o mesmo procedimento foi repetido no mínimo três vezes. Se a absorbância 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:

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

onde:

A_{284} = leitura da absorbância a 284 nm

A_{336} = leitura da absorbância a 336 nm

P = massa da amostra de mel em g

4.6 - 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. A acidez livre foi determinada através da neutralização da solução de mel, mediante uso de uma solução de hidróxido de sódio 0,05M padronizada com biftalato de potássio, até o ponto de equivalência (pH 8,5) (AOAC, 2003).

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

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

onde:

M = molaridade exata da solução de NaOH após padronização.

V = volume de solução de NaOH utilizado na titulação.

4.7 - Determinação de fenólicos totais com reagente de Folin-Denis

As determinações do teor de fenóis totais presentes nas amostras méis e extratos foram feitas por determinação espectrofotométrica utilizando o método de Folin-Denis com modificações (FOLIN e DENIS, 1912; MEDA *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2006; LIANDA, 2009; SANT'ANA, 2010).

4.7.1 – Preparo do reagente de Folin-Denis

Em um balão de fundo redondo de 250 mL acoplado a um condensador de refluxo, foram inseridos 20g de tungstato de sódio diidratado ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 4g de ácido fosfomolíbdico ($\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]_x \cdot \text{H}_2\text{O}$), 10 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 152 mL de água ultrapura. 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, foi armazenada em frasco âmbar, sob refrigeração até o momento do uso (LIANDA, 2009).

4.7.2 - Procedimento Experimental

Para cada amostra de mel foram preparadas soluções na concentração de 100 mg/mL em água ultrapura. A uma alíquota de 0,5 mL dessa solução adicionou-se 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de uma solução aquosa 14% de carbonato de sódio, recém-preparada. A mistura reacional ficou em repouso por 2h, e 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 1 cm de caminho óptico e água ultrapura como branco (PÉREZ *et al.*, 2007).

Para a determinação em extratos de mel foram preparadas soluções na concentração de 2 mg/mL em metanol espectroscópico. O teor de fenóis totais dos méis e dos extratos foram determinados por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva analítica construída com o padrão de ácido gálico em diferentes concentrações. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100g de mel ($\text{mgE}_{\text{AG}}/100\text{g}$) e todas as análises foram feitas em triplicatas.

4.7.3 - Construção da curva analítica do ácido gálico

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução metanólica do padrão de ácido gálico ($1 \text{ mg/mL} = 0,0059 \text{ mM}$). Alíquotas de 2, 6, 8, 10, 20, 30, 50, 75 e 100 μL desta solução mãe foram misturadas com 2,5 mL do reagente de Folin-Denis, e após 5 minutos adicionou-se 2,0 mL de solução aquosa 14% de carbonato de sódio, recém-preparada. As leituras foram feitas a 760 nm, utilizando-se água ultrapura como branco.

A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0, e sua equação foi definida como $Y = 0,083 + 81,759 \cdot X$, onde Y é a absorbância a 760 nm, X é a concentração de ácido gálico. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,999 (Figura 14). 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 em triplicata.

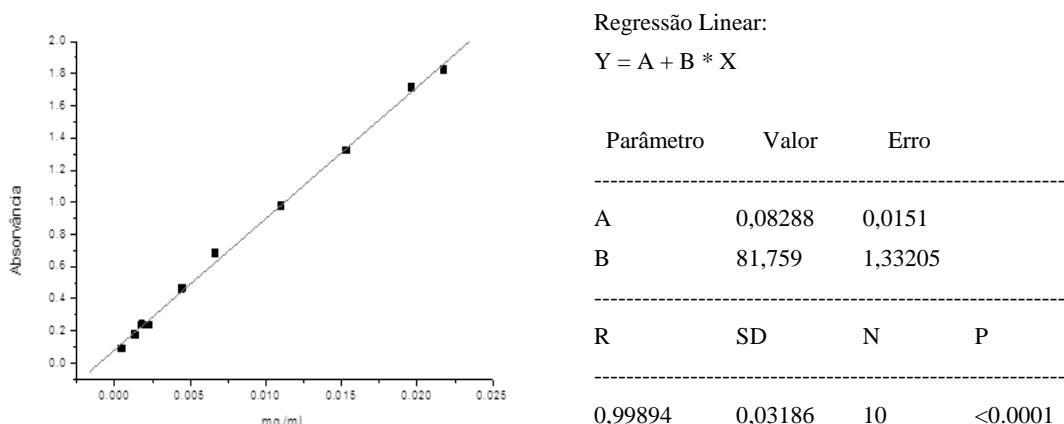


Figura 14 - Curva analítica da relação entre as médias das concentrações da solução do ácido gálico *versus* as absorbâncias (760 nm) para os ensaios de Folin-Denis.

4.8 - Determinação de flavonóides totais com cloreto de alumínio

O teor de flavonóides 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 UV-HPLC/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.

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 em triplicatas.

A concentração dos flavonóides totais dos méis e dos extratos foi determinada utilizando uma curva analítica estabelecida com soluções de concentração conhecida para queracetina padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de queracetina por 100g de mel ($\text{mgE}_Q/100\text{g}$) e todas as análises foram feitas em triplicatas.

4.8.1 – Construção da curva analítica da queracetina

Para a construção da curva analítica foi preparada uma solução padrão de queracetina em metanol ($1,78 \text{ mg/mL} \equiv 0,0059 \text{ mM}$). Em seguida, alíquotas de 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 μL desta solução padrão foram misturadas a 2,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2%. Após 30 minutos em repouso, foi realizada a leitura espectrofotométrica em 415nm, utilizando metanol como branco. A curva analítica foi feita a partir do programa Origin 6.0, sendo obtida a equação da reta $Y = 0,00482 + 47,44374 \cdot X$, onde Y é a absorbância a 415nm e X é a concentração de queracetina. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,998 (**Figura 15**). Através dessa equação determinou-se indiretamente o teor de flavonóides totais nas amostras, onde se substituiu Y pela média da absorbância de cada amostra de mel. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

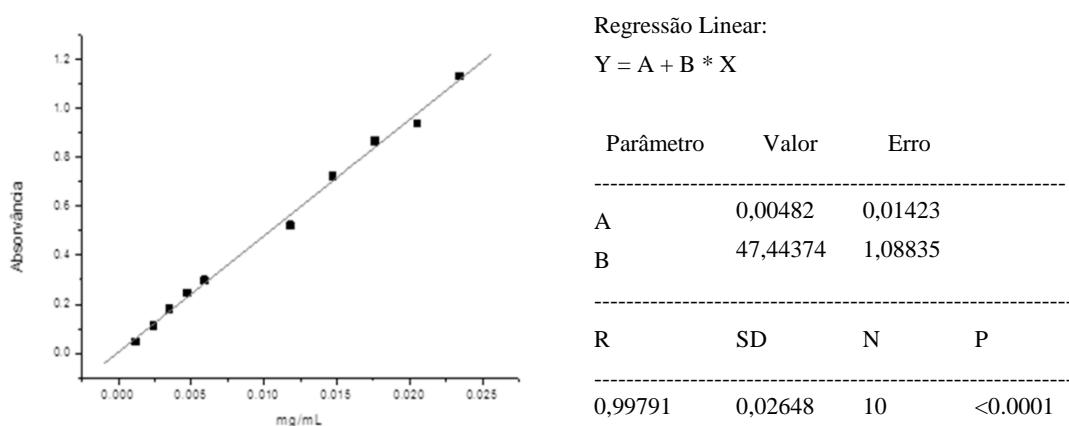


Figura 15 - Curva analítica das médias das concentrações da solução de queracetina *versus* as leituras de absorbâncias (415 nm), após o ensaio com cloreto de alumínio

4.9 - Determinação do teor de aminoácidos livres

Para a determinação dos aminoácidos livres foi utilizado o método cádmio-ninidrina descrito por DOI *et al.* (1981). O reagente foi preparado através da dissolução de 0,8 g de ninidrina 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. Amostras 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. 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 em triplicata.

4.9.1 – 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. X**, onde Y é a absorbância a 507 nm e X é a concentração de L-leucina. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,9996 (**Figura 16**). Através dessa equação determinou-se o teor de aminoácidos livres nas amostras (concentração X), substituindo Y pela média das absorbâncias obtidas para cada amostra de mel. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

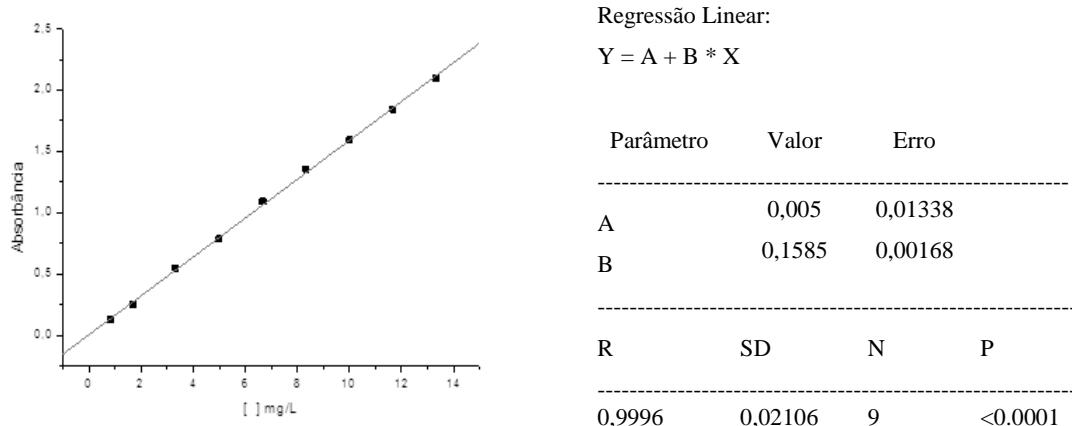


Figura 16 - Curva analítica das médias das concentrações da solução de L-leucina *versus* as leituras de absorbâncias (507 nm), após o ensaio com solução de cádmio-ninidrina.

4.10 - 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 μ L da solução de mel (50% m/v). 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 em triplicatas. A média de cada triplicata foi substituída na equação da curva analítica e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de albumina sérica bovina por 100g de mel ($mgE_{ASB}/100g$).

4.10.1 - 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 µg/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 em triplicatas. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0 e sua equação foi definida como **Y = 0,62695 + 0,000726 · X**, onde Y é a absorbância a 595 nm e X é a concentração de albumina sérica bovina (ASB). O coeficiente de correlação (R) obtido foi de 0,9996 (**Figura 17**). Através dessa equação determinou-se o teor de proteína (concentração X), substituindo Y pela média das absorbâncias obtidas para cada amostra de mel.

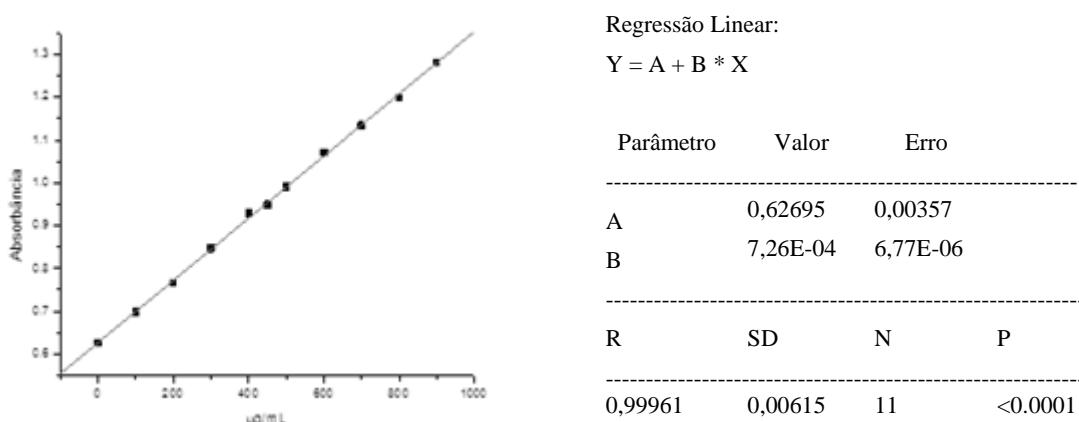


Figura 17 - Curva analítica das médias das concentrações da solução de albumina sérica bovina (ASB) versus as leituras de absorbâncias (595 nm), após o ensaio com reagente de Bradford.

4.11 - Avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH

A avaliação da atividade 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 ($\text{Abs}_{\text{controle}}$), e para o branco foi feita a média das leituras dos dois poços (10 e 11).

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

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

4.11.1 -Determinação do CE_{50} para amostra de mel

Para a determinação do CE_{50} das amostras de mel, foram preparadas soluções de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 mg/mL em MeOH/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 0,71 μL das soluções de mel (fileiras B, C e D, da coluna 1 a 11). Como controle, nos seis primeiros poços (fileira A) foram pipetados 0,71 μL de metanol, e para o branco foram pipetados 0,29 μL de metanol e 0,71 μL da solução de mel (colunas 10 e 11 da microplaca). Em seguida foram pipetados 0,29 μL 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 18**). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

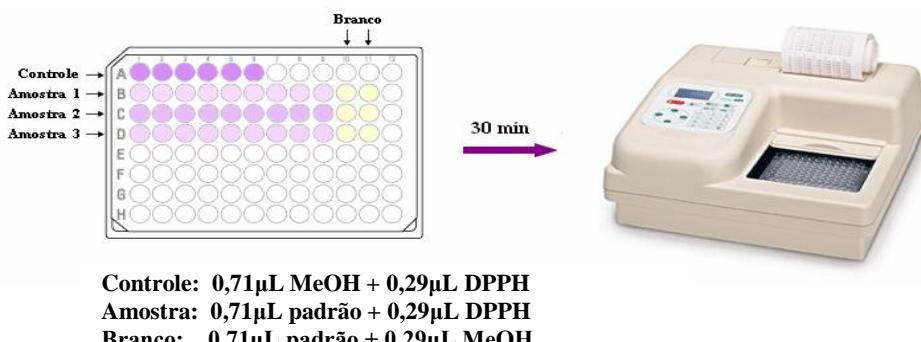


Figura 18 - Esquema do ensaio de atividade antioxidante utilizando o espectrofotômetro ELISA.

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 $[]_{\text{poço}} = 0,71 \cdot []_{\text{sol}}$, 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% (CE_{50}), foi determinada para as amostras usando o programa Origin 6.0, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando na abscissa as concentrações da amostra (mg/mL) ou do controle positivo (µg/mL) e na ordenada, a porcentagem de atividade antioxidante (% AA).

4.11.2 - Determinação do CE_{50} dos extratos de mel

Para a determinação do CE_{50} 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 $[]_{\text{poço}} = 0,71 \cdot []_{\text{sol}}$, 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% (CE_{50}), foi determinada para as amostras usando o programa Origin 6.0, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando na abscissa as concentrações da amostra (µg/mL) e na ordenada, a porcentagem de atividade antioxidante (% AA).

4.12 – Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Método de Redução do Íon Férrico (FRAP)

O teste de FRAP foi realizado segundo a metodologia descrita por Bertoncelj *et al.* (2007). Este método testa a força antioxidante das substâncias, via avaliação da redução do complexo $\text{Fe}^{3+}\text{-TPTZ}$ (ferritripiridiltriazina) [2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina] a ferroso-tripiridiltriazina ($\text{Fe}^{2+}\text{-TPTZ}$), 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.

Para a determinação da atividade antioxidante em extratos de mel pelo método FRAP foram preparadas soluções na concentração de 2 mg/mL em metanol UV-HPLC. Todos os ensaios foram efetuados em triplicada. Uma solução aquosa de FeSO₄.7H₂O (100-1000μM) foi utilizada como curva analítica e os resultados foram expressos em valores de FRAP (μmol Fe(II)/100 g).

4.12.1 - Construção da curva analítica com sulfato ferroso

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução aquosa do padrão de sulfato ferroso heptaidratado (FeSO₄ .7H₂O). 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 . 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 (**Figura 19**). Através dessa equação determinou-se a concentração equivalente de Fe(II) nas amostras (concentração X), substituindo Y pela média das absorbâncias de cada amostra de mel. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

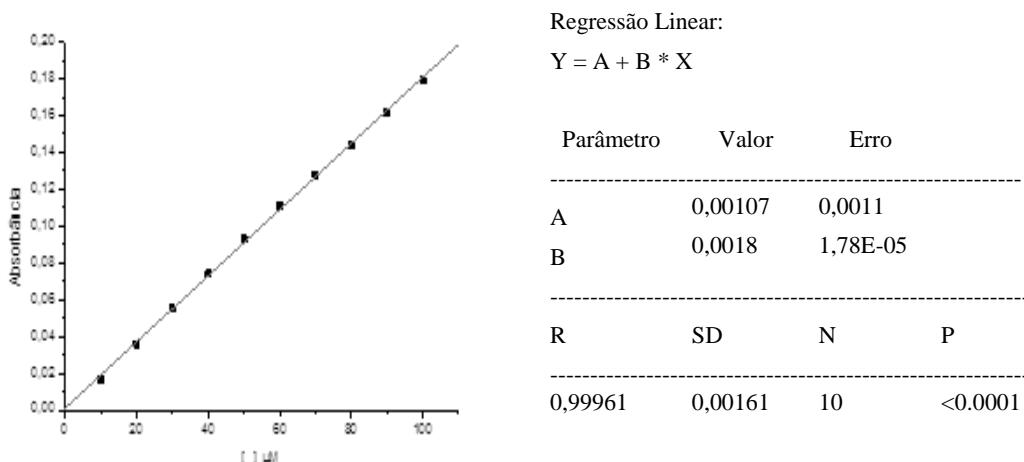


Figura 19 - Curva analítica das médias das concentrações da solução aquosa de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ versus as leituras de absorbâncias (593 nm), após o ensaio com reagente de FRAP.

4.13 - Determinação da Atividade Antioxidante pela Captura do Radical-Cáton (ABTS⁺)

A avaliação da atividade 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-cáton ABTS⁺. O radical-cáton ABTS⁺ é preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque 7mM de ABTS com 88μL 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 $0,700 \pm 0,05$ 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 50μL 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 atividade antioxidante 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 (μmolTE/100g) e todas as análises foram feitas em triplicatas

4.13.1 - Construção da curva analítica com Trolox

Foi preparada uma curva analítica a partir da solução etanólica do padrão de Trolox. Em alíquotas de 50 μ L de concentrações variando de 0,0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8; 2,1 e 2,4 mmol/L, adicionou-se 5,0 mL do reagente de ABTS. A leitura da sua absorbância a 734nm foi realizada após 6 minutos, utilizando a solução reacional sem o padrão como branco. A curva analítica foi construída a partir do programa Origin 6.0 e sua equação foi definida como $Y = -26.37778 \cdot X + 0.65164$, onde Y é a absorbância a 760 nm, X é a concentração de Trolox. O coeficiente de correlação (R) obtido foi de -0,9997(**Figura 20**). Através dessa equação determinou-se a concentração equivalente em Trolox nas amostras (concentração X), substituindo Y pela média das absorbâncias de cada amostra de mel. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

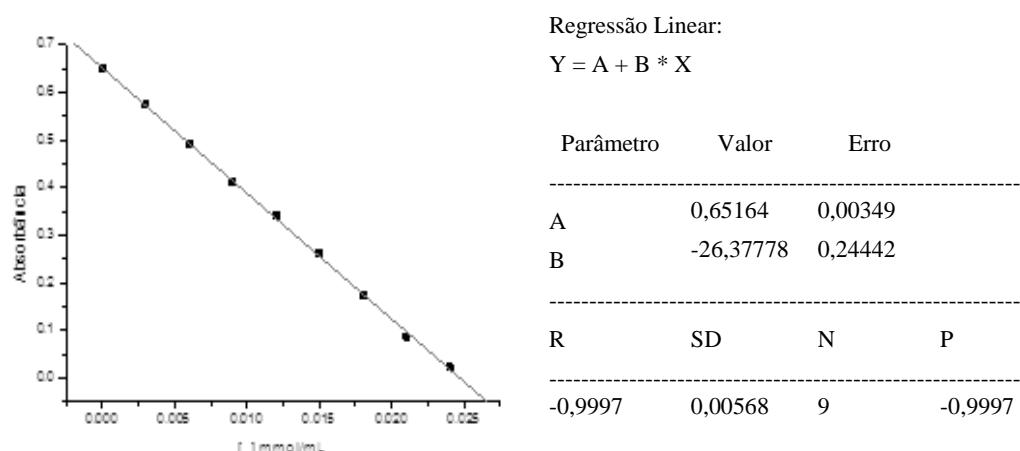


Figura 20 - Curva analítica das médias das concentrações da solução etanólica de Trolox *versus* as leituras de absorbâncias (760 nm), após o ensaio com reagente de ABTS.

4.14 - 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 do mel foram pesados cerca de 50 gramas, 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 e éter (**Figura 21**).

Para o procedimento de extração líquido-líquido foram adicionados 10 mL de água destilada ao extrato metanólico, em seguida fez-se a partição acetato de etila (DA SILVA, 2004; LIANDA, 2009; MONTAGNI, 2005). O extrato metanólico redissolvido em 10 mL de água destilada foi transferido para funil de separação e extraído 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 obter os extratos de acetato de etila.

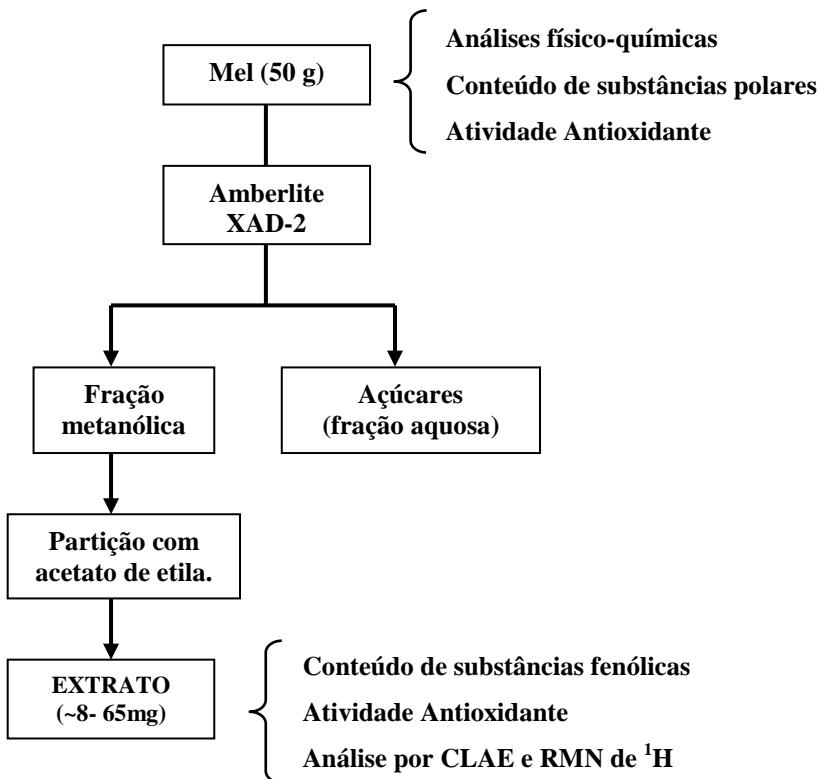


Figura 21 - Modelo esquemático do preparo dos extratos do mel.

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

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca Shimadzu constituído por duas bombas série LC-20AT, detector de arranjo de díodos série SPD-M20A e injetor Rheodyne 7125i com *loop* de 20 μL . O controle do equipamento e aquisição dos dados foi feito através do software LCSolution (Shimadzu). As análises foram realizadas em coluna analítica de fase reversa C-18 (250 x 4,6 mm, 5 μm de partícula, Shimpak-Shimadzu), mantida a 35 °C. A fase móvel foi constituída por uma mistura de água: ácido acético (99:1, solvente A) e metanol: acetonitrila (90:10, solvente B). A separação foi feita com fluxo constante de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e o volume de amostra injetada foi de 20 μL , a qual foi submetida a uma eluição por gradiente: 35 a 65% de B em 25 min.; 65 a 85% B em 15 min; 85 a 100% B em 5 min, retornando a 35% de B após 10 minutos. O monitoramento dos cromatogramas foi realizado a 280 e 340 nm, visto que a maioria dos ácidos fenólicos e flavonóides encontrados nos méis mostram suas absorções máximas no ultravioleta, próximos a esses comprimentos de onda (MARTOS *et al*, 1997).

4.15.1 - Construção das Curvas Analíticas com os padrões

As soluções analíticas de referência foram preparadas por sucessivas diluições a partir de uma solução metonólica de 100 g/mL de cada um dos padrões: ácido gálico, HMF, ácido protocatecuico, ácido *p*-hidroxi-benzóico, ácido siríngico, ácido 2,4 diidroxi-benzóico, ácido sinápico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido *m*-cumárico, ácido benzóico, ácido *p*-metoxi-benzóico, ácido cinâmico, naringerina, ABA, ácido *m*-metoxi-cinâmico, crisina e galangina. As curvas analíticas foram construídas utilizando a padronização externa, a partir de 4 pontos das soluções dos padrões em metanol nas concentrações de 5, 10, 20 e 50 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 12**) determinou-se a concentração de cada padrão identificado nos extratos analisados.

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

Amostras	R	Equação da reta: Y = A + B * X
Ácido gálico	0,99969	Y = -5795,71344 + 86109,89281 * X
HMF	0,99964	Y = -192587,2615 + 214165,8123 * X
Ácido protocatecuico	0,98935	Y = 72335,30769 + 36187,33846 * X
Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico	0,9995	Y = -24396,85641 + 44013,55795 * X
Ácido siríngico	0,99994	Y = -21133,5 + 75779,55714 * X
Ácido 2,4 dihidroxi-benzóico	0,99892	Y = - 17455 + 86499,17143 * X
Ácido sináptico	0,99712	Y = -12636,5 + 37276,5 * X
Ácido ferúlico	0,98595	Y = -397818,5 +108328,5857 * X
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,99951	Y = - 56473,10256 + 93609,68718 * X
Ácido <i>m</i> -cumárico	0,99871	Y = 37857,42564 + 177800,3682 * X
Ácido benzóico	0,99979	Y = 3962,60922 + 8877,34029 * X
Ácido <i>p</i> -metoxi-benzóico	0,99991	Y = -5479,75385 + 40622,07077 * X
Ácido cinâmico	0,99915	Y = -5419,87692 + 207268,3354 * X
Naringerina	0,99534	Y = 174200,2718 + 82054,19897 * X
ABA	0,99987	Y = 19914,52821 + 83711,48103 * X
Ácido <i>m</i> -metoxi-cinâmico	0,99954	Y = -176922,8051 + 113529,2144 * X
Crisina	0,99976	Y = 41091,20513 + 99180,02564 * X
Galangina	0,99995	Y = 9115,81026 + 41722,69128 * X

4.16 - Dados de RMN de ^1H e Tratamento Quimiométrico

Os espectros de RMN de ^1H dos extratos foram registrados em um espetrômetro 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 $298 \pm 0,1$ K, com 10330 Hz de largura espectral, 32 k pontos de dados, 16 transientes e ganho do receptor constante.

Todos os espectros obtidos foram processados em grupo utilizando o software ACD / Spec Manager (ACD Laboratories, versão 12.0, Toronto, Canadá). Os dados

obtidos foram convertidos em uma matriz (**m** x **n**) em planilha do Excel 2003 e importado para The Unscrambler® 10.1 para análise estatística multivariada.

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

4.17 - Tratamento estatístico dos dados

Para interpretação dos dados obtidos pelas variáveis FRAP, ABTS, DPPH, fenóis, flavonóides, 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 das amostras de mel

Alguns dos parâmetros físico-químicos de onze amostras de diferentes origens botânicas foram determinados segundo os padrões estabelecidos pela Legislação Brasileira, visando conhecer e avaliar a sua qualidade.

Inicialmente o mel artificial foi preparado (item 4.3; pag. 37) e submetido às mesmas análises que as amostras de mel. A importância desta avaliação se deve ao fato dos açúcares serem os constituintes majoritários na composição do mel, e avaliar se poderão interferir nos resultados dos métodos realizados

Os resultados das análises físico-químicas encontrados para as amostras de mel produzidas por *Apis mellifera* e para o mel artificial são apresentados na **Tabela 13**.

Tabela 13 – Valores médios e os desvios padrões dos parâmetros físico-químicos para os méis estudados e para o mel artificial.

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

As determinações das medidas físico-químicas de todas as amostras estão dentro dos limites preconizados pela legislação brasileira (Brasil, 2000).

A determinação da intensidade da cor dos diferentes méis foi realizada com o objetivo de encontrar uma possível relação entre este parâmetro, de fácil detecção, e a atividade antioxidante.

As classificações de coloração do mel foram feitas utilizando a escala Pfund e segundo o método descrito por Naab *et al.* (2008) e estão apresentadas na Tabela X. Baseados nessa classificação os méis de morrão (**M2**, **M10** e **M11**) puderam ser classificados como mel branco, os de assa peixe classificados como mel âmbar escuro (**A1**) e âmbar claro (**A3**), e os méis de cambará foram classificados como âmbar claro (**C4**, **C8** e **C9**), âmbar extra claro (**C5** e **C7**) e âmbar (**C6**). Assim, as amostras analisadas apresentaram predominância da cor âmbar claro (36,4%), seguida das cores branco (27,3%) e âmbar extra claro (18,2%).

Estas classes de cores estão em conformidade com a legislação, que considera aceitáveis variações de branco d'água a âmbar escuro (BRASIL, 2000). A coloração do mel artificial foi indeterminada (-21,2 mm Pfund) por estar fora do intervalo da escala, o que sugere que os açúcares não são os principais componentes responsáveis pela variação da coloração do mel.

Sabe-se que a coloração do mel depende de vários fatores, tais como o conteúdo de mineral, teor em flavonóides, produtos de reação de Maillard (BRUDZYNSKI e MIOTTO, 2011). De maneira geral, o mel escuro tem um maior conteúdo em minerais do que o mel claro (BOGDANOV, 2009b). A coloração, bem como o aroma e sabor do mel podem variar de acordo com a sua origem floral, podendo ser quase incolor (oriundo de flores como o assa peixe), âmbar (flores de laranjeiras), escuro (eucalipto, silvestre) e pardo escuro (trigo sarraceno). Com a idade e conforme a temperatura de estocagem do mel observa-se o seu escurecimento.

Todos os méis monoflorais analisados apresentaram um caráter ácido. Seus valores de pH variaram de pH 3,3 a 4,2 (**Tabela 13**). Os valores observados nesse trabalho são similares aos relatados por Azeredo *et al* (2003) para méis brasileiros, onde foi observado uma variação de pH entre 3,10 - 4,05 e por Sereia *et al.*, (2011) que encontrou valores no intervalo de 3,84 - 3,91. Marchini *et al.*, (2007) também encontraram valores médios de 3,62; 3,39 e 3,19 para pH de méis silvestres, de eucalipto e laranjeira, respectivamente, do estado de São Paulo.

Além disso, os valores estão de acordo com as médias de pH citados em méis portugueses (3,7 - 4,3), argelinos (3,49 - 4,43), cubanos (3,9 – 4,9) e italianos (3,85 – 4,66) (ESTEVINHOS *et al.*; 2008; OUCHEMOUKH *et al.*, 2007; ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010a; GIORGI, *et al.*, 2011).

Embora a legislação vigente não exija análise de pH como controle de qualidade, tem-se observado na literatura que este parâmetro vem sendo avaliado porque contribui como uma variável auxiliar para o controle microbiológico do mel, pois um baixo valor de pH (faixa de pH 3,0 – 4,0) inibe a presença e o crescimento de microorganismos (TERRAB *et al.*, 2002)

O valor de pH do mel pode ser influenciado pelo pH do néctar, solo ou associação de vegetais que compõem o mel (CRANE, 1985). Esse parâmetro tem grande importância durante a extração e estocagem do mel, já que influencia sua textura, estabilidade e armazenamento (TERRAB *et al.*; 2002).

A acidez realça o sabor do mel e dentro do limite indica a falta indesejável de fermentação (CRANE, 1987). A origem da acidez no mel deve-se, em parte, à variação dos ácidos orgânicos causada pelas diferentes fontes de néctar, pela ação da enzima glicose-oxidase que origina o ácido glucônico, pela ação das bactérias durante a maturação do mel e ainda a quantidade de minerais presentes no produto. Uma alta acidez pode indicar processos fermentativos, mas em geral, o mel é naturalmente ácido, independentemente de sua origem geográfica.

A medida de acidez total determinada para as onze amostras variou de 35,46 – 87,89 mEq/kg. Sendo que seis amostras (**C4**, **C5**, **C6**, **C7**, **C8** e **C9**) apresentaram valores médios superiores àqueles determinados pela legislação vigente, que menciona o valor máximo de 50 mEq/kg (BRASIL, 2000). Resultados semelhantes foram encontrados por Mársico *et al* (2009), que relataram valores de acidez na faixa de 63 mEq/kg para méis clandestinos comercializados no Rio de Janeiro. Estas alterações podem ser explicadas pela filtragem e decantação inadequada no momento da obtenção e exposição à luz durante o armazenamento. Valores acima do limite preconizado podem ser indicativos de um processo fermentativo ocasionado por uma colheita inadequada, no qual são colhidos méis “verdes”, méis ainda não-maduros, com altos índices de umidade, que as abelhas ainda não opercularam (PEREIRA *et al.*; 2002). A quantidade elevada de água no mel facilitará a proliferação de leveduras, levando-o a

fermentação, tornando-o muitas vezes, impróprio para o consumo e impossibilitando a sua comercialização.

O teor de HMF foi determinado para avaliar a qualidade dos méis estudados. Os resultados de HMF para os méis analisados indicaram um valor médio de 19,39 mg/kg, variando de 1,49 a 55,38 mg/kg (**Tabela 13**), e estão de acordo com o preconizado pela legislação brasileira vigente, que estabelece um valor máximo de 60 mg/kg (BRASIL, 2000). Esses valores de HMF, segundo a literatura, indicam que os méis analisados eram frescos, não adulterados e não haviam sido submetidos a períodos prolongados de armazenamento.

Vários fatores influenciam os níveis de HMF, tais como temperatura e tempo de aquecimento, condições de armazenamento, pH e fonte floral, por isso fornece uma indicação de superaquecimento e armazenamento em condições precárias (FALLICO *et al.*, 2006).

O HMF é utilizado como indicador de qualidade, uma vez que tem origem na degradação de enzimas presentes nos méis e apenas uma pequena quantidade de enzima é encontrada em méis maduros e recém recolhidos (TERRAB *et al.*, 2001), enquanto que valores mais elevados podem indicar alterações provocadas por armazenamento prolongado em ambiente ambiente e/ou superaquecimento ou adulterações provocadas pela adição de açúcar (AZEREDO *et al.*, 2003).

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 serie de fatores, tais como temperatura e tempo de aquecimento, condições de estocagem, pH, origem floral influenciam a quantidade de HMF no mel.

5.1.1 – Teor em substâncias polares presentes nas amostras de mel

A diversidade estrutural das substâncias fenólicas deve-se à grande variedade de combinações que acontece na natureza. Dentre as substâncias polares, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes de fonte natural (ANGELO e JORGE, 2007).

Diversos trabalhos citados na literatura relatam à separação, identificação, quantificação e aplicação das substâncias fenólicas em alimentos, e muitos deles descrevem muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias, são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas. Outro aspecto importante no desenvolvimento de métodos de quantificação das substâncias fenólicas é a dificuldade de se encontrar um padrão específico e conveniente, devido à complexidade das substâncias fenólicas presentes nos alimentos e as diferenças de reatividade entre estas substâncias e os reagentes.

Além disso, a análise dessas substâncias fenólicas é influenciada pela natureza da substância, o método de extração empregado, o tamanho da amostra, o tempo e as condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de interferentes tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas.

Os ácidos fenólicos e flavonoides são um grupo de substâncias de grande interesse devido as suas propriedades funcionais no mel. São membros de uma classe de substâncias naturais, recentemente considerados de alto interesse científico e terapêutico.

Vários métodos espectrofotométricos para quantificação de substâncias fenólicas em alimentos têm sido desenvolvidos. O método de Folin-Denis é o mais utilizado para determinação de fenólicos totais em vegetais, e este foi usado para a determinação indireta do teor de fenólicos totais nos méis.

Este método fundamenta-se numa reação de oxi-redução entre as substâncias polares e o reagente de Folin. Ocorre a redução do molibdênio (Mo^{+6}) presente no reagente em meio básico, através da oxidação de substâncias fenólicas 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).

O método de Folin-Denis, no entanto, não é um método específico, pois determina todos os fenólicos presentes, além de outras substâncias redutoras que podem estar presentes e interferirem nos resultados.

O reagente de Folin consiste em uma série integrada polimérica que possui em geral um centro tetraédrico formado por uma unidade central de fosfato cercada de várias unidades de oxiácidos octaédricos de molibdênio, formando uma estrutura na qual o tungstênio, que também é um agente oxidante, pode livremente substituir o

molibdênio. Esse reagente promove a oxidação dos fenolatos, e o heteropolíácido é parcialmente reduzido de +6 para uma mistura de valência +5 e +6, resultando na produção de um complexo azul de molibdênio-tungstênio (SINGLETON e ROSSI JUNIOR, 1965).

Nesta reação as substâncias fenólicas são oxidadas rapidamente, porém isto apenas ocorre em soluções básicas o suficiente para permitir a formação de quantidades razoáveis de ânions fenolato. Entretanto, uma base fraca como o carbonato de cálcio é usada devido à instabilidade, tanto do reagente oxidante, como do complexo azulado em soluções alcalinas. Neste caso o carbonato de sódio é utilizado em excesso, pois não é necessário aumentar o pH da solução até que todos os fenóis sejam convertidos a fenolatos. Conforme a fração ionizada reage com a solução de Folin, o equilíbrio se desloca para a formação de mais ânions fenolatos (SINGLETON e ROSSI JUNIOR, 1965).

Ao aplicar este método, o teor em fenólicos totais é freqüentemente expresso em termos de concentração em ácido gálico pelo que é necessário construir uma curva analítica com soluções padrões desta substância. Neste trabalho foi utilizada uma curva analítica obtida a partir de diferentes concentrações de ácido gálico (0- 0,025 mg/mL) para a determinação indireta dos teores de fenólicos totais dos méis e o conteúdo foi expresso em concentração de ácido gálico ($\text{mgE}_{\text{AG}}/100\text{g}$ de mel, metodologia descrita nas pág. 40). Ao analisar as diversas amostras de mel pelo método de Folin-Dennis e usando a curva padrão de ácido gálico ($R= 0,999$), foi possível conhecer o teor em substâncias fenólicas nos diversos tipos de mel, bem como para o mel artificial (**Tabela 14**).

Conforme pode ser observado na **Tabela 14**, o teor em substâncias fenólicas variou significativamente com o tipo de mel analisado, apresentando os valores de 94,9 a 103,0 $\text{mg E}_{\text{AG}}/100 \text{ g}$ para os méis de assa peixe, de 73,7 a 81,4 $\text{mgE}_{\text{AG}}/100 \text{ g}$ para os méis de morrão de candeia, de 104,7 a 129,3 $\text{mgE}_{\text{AG}}/100\text{g}$ para os méis de cambará e fora da faixa de determinação para mel artificial (valor negativo). De acordo com esses resultados a amostra **C8** (mel de cambará), classificada como âmbar claro foi a que apresentou a maior concentração em substâncias fenólicas (129,3 $\text{mgE}_{\text{AG}}/100\text{g}$), enquanto a amostra **M2** (morrão de candeia), classificada como branco, apresentou a menor concentração (73,7 $\text{mgE}_{\text{AG}}/100\text{g}$).

Tabela 14 – Valores médios e os desvios padrões dos teores de fenólicos e flavonóides totais, das amostras de méis estudadas e para o mel artificial.

Amostras de mel	Teor em Fenólicos Total	Teor em Flavonoides Total
	(mgE _{AG} /100g) ^a	(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 queracetina por 100g de mel. MA – Mel artificial

Essas diferenças entre os méis florais podem estar relacionadas à localização e ao crescimento das plantas em regiões específicas. A origem botânica e geográfica pode afetar os padrões de fenólicos e flavonóides, a distribuição de pólen e a atividade antioxidante dos méis (LACHMAN *et al*, 2010). Conforme pode ser observado na **Tabela 13**, os méis florais oriundos da mesma região, Seropédica (amostras **C4, C5, C6, C7, C8 e C9**) foram as que apresentaram os maiores conteúdos em substâncias polares.

Embora os méis florais sejam originários de plantas diferentes, e apresentem substâncias fenólicas distintos, acarretando assim variações no total das substâncias fenólicas, os dados observados nesse trabalho para as amostras de méis brasileiro da região sudeste (78,1 - 129,3 mgE_{AG}/100g mel) são semelhantes aos descritos para amostras de mel da região da Nova Zelândia, com valores na faixa de 56,00 a 169,67 mg E_{AG}/100g (VENUGOPAL e DEVARAJAN, 2011). Resultados semelhantes também foram encontrados para méis brasileiros de Minas Gerais e São Paulo, com valores na faixa de 23,83 a 62,69 mg E_{AG}/100g para os méis de assa peixe, e

79,2 a 179,13 mg E_{AG}/100g para os méis de eucalipto (VIANNA, 2010), bem como para vinte uma amostras de méis florais do nordeste, cujos valores de fenólicos totais variaram de 10,21 a 108,5 mg E_{AG}/100g (LIBERATO *et al.*, 2011).

No entanto, as amostras de mel neste estudo apresentaram diferenças substanciais em relação às amostras de mel do Chile, com teor de fenólicos totais variando de 0,0 a 8,83 mgE_{AG}/100g de mel (MUÑOZ e COPAJA, 2007) . Socha *et al.* (2009) relataram uma variação de 21,7 a 75,3 mgE_{AG}/100g para dez amostras de méis de ervas da Polônia; Al *et al.* (2009) avaliaram vinte e quatro amostras de méis da Romênia e relataram uma variação de 2,0 a 39,9 mg; 16,00 a 38,0 mg e de 20,0 a 45,0 mgE_{AG}/100g para os méis de acácia, limão e girassol, respectivamente, Giorgi *et al.* (2011) avaliaram onze amostras de méis italianos de diferentes origens botânicas, e observaram valores que variaram de 15,13 a 82,49 mgE_{AG}/100g de mel, enquanto Bertoncelj *et al.* (2007) avaliaram amostras de mel da Eslovênia e observaram valores entre 44,8 e 241 mg E_{AG}/kg de mel.

Nesse trabalho o teor de flavonóides totais nos méis foi determinado por espectrofotometria utilizando como reagente um solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl_3). O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides, originando uma coloração amarela que pode ser avaliada através de uma análise espectrofotométrica a 415nm (MEDA *et al.*, 2005; AHN *et al.*, 2007).

O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda, chamado efeito batocrômico.

A complexação dos flavonóide esta relacionada a fatores estruturais tais como:

- A presença de grupos catecol (1,2-diidroxi) que possibilitam a interação com metais formando complexos em anéis de cinco membros; (**Figura 22**)
- A presença de grupo carbonila na posição 4 e hidroxila na posição 5, que forma complexo em anéis de seis membros, mais estáveis (**Figura 22**).

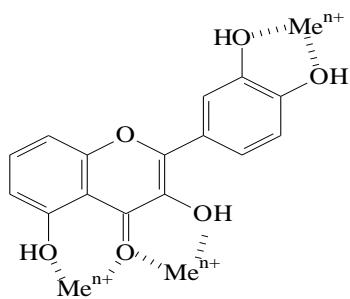


Figura 22 – Sítios de complexação de metais de transição em flavonóides (TIWARI, 2001)

Além disso, alguns flavonóides podem formar complexos bimoleculares com íons metálicos bivalentes ou trivalentes através da hidroxila C3 e a do C2' ou C6', através da carbonila e a hidroxila vizinha, ou ainda com os flavonóides na forma oxidada, como as paraquinonas (**Figura 23**).

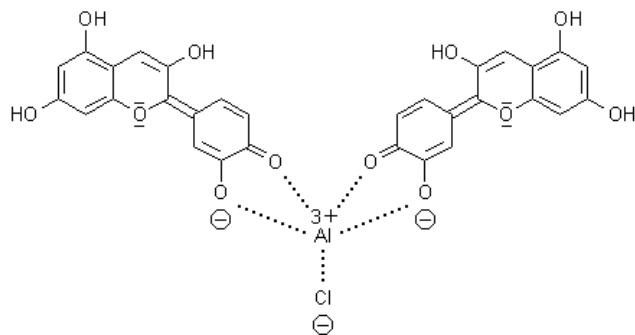


Figura 23 - Complexo bimolecular da morina com AlCl_3 (adaptado de KEUSCH, 2003)

Os flavonóides presentes no mel podem ter origem no pólen, na propólis e no néctar sendo a propólis a fonte mais rica em flavonóides (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1992).

O conteúdo em flavonóides totais do mel foi expresso em termos de concentração em quercetina, sendo por isso necessário construir uma curva analítica com diferentes concentrações desse padrão (0 – 1,78 mg/mL; **Figura 15**).

Conforme pode ser observado na **Tabela 14** (pag. 61), o teor em flavonóides totais para os méis estudados usando a curva da quercetina variou de 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, de 6,38 a 10,25 mgE_Q/100g para os méis de cambará e para o mel artificial o valor foi 0,25 mgE_Q/100g de mel. Através desses resultados, novamente a amostra **C8** (cambará) foi a que apresentou o maior conteúdo em flavonóides totais (10,25 mgE_Q/100g), assim como para o conteúdo em fenólicos totais (129,3 mgE_{AG}/100g),

enquanto a amostra **M10** (morrão de candeia) foi a que apresentou a menor concentração (2,54 mgE_Q/100g), se assemelhando também ao resultado observado para conteúdo em fenólicos totais para o mel de morrão (**M2**).

Os dados observados nesse trabalho para as amostras de méis florais do Sudeste brasileiro (2,54 – 10,25 mgE_Q/100g mel) são semelhantes aos obtidos por Liberato *et al.* (2011) para méis florais do nordeste, com valores para conteúdo em flavonóides totais que variaram de 0,25 a 8,38 mgE_Q/100g de mel.

No entanto, as amostras de mel neste estudo apresentaram diferenças substanciais em relação às amostras de mel da Nova Zelândia, com teor de flavonóides totais variando de 0,25 to 3,34 mg E_Q /100g de mel (VENUGOPAL e DEVARAJAN, 2011). Em amostras do Chile, o teor de flavonóides variaram de 0,014-13,8 mg E_Q/100 g de mel (MUÑOZ e COPAJA, 2007), o conteúdo de flavonóides em amostras de mel Burkina Faso estudado por Meda *et al.* (2005) foi de 0,17- 8,35 mg E_Q/100 g de mel, e Vianna (2010) encontrou valores que variaram de 0,04 a 2,53 mgE_Q/100 g para méis de assa peixe e 0,4 a 1,54 mgE_Q/100g para méis de eucalipto do Sudeste brasileiro.

Entretanto são descritos na literatura conteúdo em flavonóides para méis de outros países, de diferente origem que se mostraram superiores aos determinados para os méis brasileiros. Como por exemplo, os resultados obtidos para amostras de méis poloneses em que o teor variou de 6,9 a 28,5 mgE_Q/100g de mel (SOCHA *et al.*, 2009). Em outro trabalho com vinte e sete amostras de méis italianos de diferentes origens florais e geográficas, o teor em flavonóides variou de 4,19 a 21,17 mgE_Q/100g de mel (PICHICHERO *et al.*, 2009).

O uso do cloreto de alumínio para a determinação da quantidade de flavonóides totais não é, no entanto, um procedimento isento de limitações. O método é preciso, isto é, ele é reproduzível, fornecendo desvios muito pequenos ou nulos entre um ensaio e outro com a mesma amostra. No entanto, ele pode ser pouco exato, ou seja, o valor que ele fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonóides totais realmente presente na amostra analisada. O valor medido e o valor real são tanto mais próximos entre si quanto maior a proporção de flavonóis na amostra, e tanto mais distantes quanto maior a proporção de flavonas.

Isso se deve ao fato de que o comprimento de onda selecionado (415 nm) corresponde à banda de absorção do complexo queracetina-alumínio. A queracetina é um flavonol, certamente o mais comum dos flavonóides encontrado nas plantas. Os complexos dos outros flavonóis com alumínio absorvem bem próximo de 415 nm, mas

os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma subestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas.

No entanto, essa limitação não reduz a validade do método para os propósitos do controle de qualidade. Nesse contexto, é mais importante precisão do que exatidão, pois no controle de qualidade o que normalmente se faz é estabelecer limites inferiores e superiores, dentro dos quais os valores encontrados devem se situar nas condições prescritas pelo método.

5.1.2 – Conteúdo de aminoácidos e proteínas presentes nas amostras de mel

A determinação de aminoácidos livres no mel foi realizada pelo método espectrofotométrico utilizando cádmio-ninidrina (DOI *et al.*, 1981).

Os resultados do conteúdo de aminácido livre e proteínas totais estão apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15 – Valores médios e os desvios padrões dos conteúdos de aminácidos livres e proteínas totais, das amostras de méis estudadas e para o mel artificial.

Amostras de mel	Aminoácidos livres	Proteínas totais
	(mgE _{LE} /100g) ^a	(mgE _{ASB} /100g) ^b
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

O teor de aminoácido livre determinado para as onze amostras variaou de 6,51 a 39,42 mgE_{LE}/100g. O conteúdo de aminoácido variou significativamente com o tipo floral de mel analisado, apresentando os valores de 17,10 a 30,1 mgE_{LE}/100g para os méis de assa peixe, de 10,68 a 24,0 mgE_{AG}/100g para os méis de morrão de candeia e de 6,51 a 39,42 mgE_{LE}/100g para os méis de cambará (**Tabela 15**). O mais alto valor de aminoácido livre foi encontrado no mel de cambará **C4** (39,42 mE_{LE}/100g), assim como o mais baixo valor foi também observado para o mel de cambará **C5** (6,51 mE_{LE}/100g). Ambos os méis foram obtidos diretamente do favo e oriundos de apicultores da região de Seropédica, porém coletados em meses diferentes (**Tabela 13**, pág. 55).

Ao comparar esses resultados com os realizados por Alvarez-Suarez *et al.* (2010) para diversos méis monoflorais cubanos, eles relataram uma variação de 15,3 a 146,4 mgE_{LE}/100g para o conteúdo de aminoácido, mostrando seus valores significativamente superiores a esses méis brasileiros.

Diferentes trabalhos relatando a composição de aminoácidos no mel, através de técnicas cromatográficas, têm sido descrito e o principal objetivo é usar essa avaliação como parâmetro para determinar a sua origem botânica (IGLESIAS *et al.*, 2004). Contudo não existe número suficiente de estudos que correlacionem à atividade antioxidante do mel e sua composição em aminoácidos.

Para a determinação do conteúdo de proteínas foi utilizado o método de Bradford, que se baseia na interação entre o corante azul brilhante de Coomassie G-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o reagente provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm (BRADFORD, 1976).

O nível de proteína no mel depende da sua origem floral: esta dependência esta relacionada ao fato do conteúdo de proteína no mel poder ser atribuído à presença de enzimas introduzidas pelas próprias abelhas, e outras derivadas do néctar (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010a).

O conteúdo total de proteína variou significativamente com o tipo floral de mel analisado, apresentando valores de 53,26 a 98,06 mgE_{ASB}/100g para os méis de assa peixe, de 43,44 a 53,17 mgE_{ASB}/100g para os méis de morrão de candeia e de 41,51 a 67,40 mgE_{ASB}/100g para os méis de cambará (**Tabela 15**) O mais alto conteúdo de

proteína foi observado para o mel de assa peixe **A1** (98,06 mgE_{ASB}/100g), enquanto o mais baixo conteúdo foi observado para o mel de cambará **C7** (41,51mgE_{ASB}/100g).

Similares valores de proteínas em mel foram relatados por Azeredo *et al.*(2003). Segundo esses autores o conteúdo total de proteína no mel pode ser classificado como: baixo, para valores até 30 mgE_{ASB}/100g; médio, valores entre 40 a 100 mgE_{ASB}/100g e alto para valores próximos de 200 mgE_{ASB}/100g. Assim sendo, todas as amostras de méis estudadas se classificam como de médio conteúdo total de proteína. Os valores encontrados neste trabalho estão também de acordo com os valores obtidos para diversos méis monoflorais cubanos estudados por Alvarez-Suarez *et al.* (2010), que relataram uma variação de 12,0 a 92,3 mgE_{ASB}/100g.

5.1.3 – Avaliação da Atividade Antioxidante dos méis

A capacidade antioxidante pode ser definida como a habilidade e o potencial do mel para reduzir reações oxidativas nos alimentos e no corpo humano. Notavelmente, essas reações oxidativas podem causar danos nos produtos alimentares (exemplo: oxidação lipídica em alimento, ou escurecimento enzimático em frutas e vegetais) e produzir efeitos adversos na saúde, tais como doenças crônicas e câncer (GHELOF e ENGESETH, 2002).

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente no estudo da decomposição do mel e suas propriedades biológicas. Muitos autores demonstraram que o mel serve como fonte de recursos antioxidantes naturais, que são eficazes na redução do risco de doença cardíaca, câncer, declínio do sistema imunológico, diferentes processos inflamatórios, etc.

Os componentes no mel responsável por seus efeitos antioxidantes são principalmente flavonóides, ácidos fenólicos, catalase, peroxidase, carotenóides e componentes não peroxidais (BOGDANOV, 1997). A quantidade desses componentes varia amplamente de acordo com a origem floral e geográfica de mel, o processamento, manuseio e armazenamento (GHELOF e ENGESETH, 2002; TURKMEN *et al.*, 2006). Na literatura vários estudos para a identificação e quantificação dos componentes antioxidantes encontrados em produtos apícolas são relatadas (GHELOF *et al.*, 2002.; GÓMEZ-CARAVACA *et al.*, 2006). Geralmente, os estudos para a avaliação da capacidade antioxidante do mel envolveram o uso de diferentes métodos como ORAC

(capacidade de absorção de radicais de oxigênio), FRAP (poder antioxidante de redução do íon férrico) e ensaio com DPPH radicalar (ALJADI e KAMARUDDIN, 2004).

Diversos estudos têm comprovado a ação terapêutica do mel, existindo atualmente interesse em avaliar a sua capacidade antioxidante como parâmetro elegível para sua qualidade (LACHMAN *et al.*, 2010). Este parâmetro está estritamente correlacionado com a presença de sequestradores de radicais (antioxidantes), tais como as substâncias fenólicas. Portanto, os ácidos fenólicos e flavonóides, por exemplo podem desempenhar um papel importante no controle das reações oxidativas também no corpo humano e dessa forma exercerem suas atividades anticarcinogênicas e antiteratogênicas através de efeitos diretos, indiretos e/ou mediados (HAVSTEEN, 2002). Obviamente os mecanismos de ação das substâncias fenólicas e de outras substâncias presentes no mel ainda são pouco compreendidos.

A maioria dos modelos experimentais empregados na análise do potencial antioxidante em alimentos emprega métodos radicais ou de reações de oxi-redução, que em geral são de fácil execução e baixo custo (ROBBIN, 2003).

Neste trabalho a avaliação da atividade antioxidante para os méis foi realizada por três métodos: captura do radical orgânico 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), captura do radical livre (ABTS^{•+}) e método de redução do íon férrico (FRAP). Uma solução de mel artificial foi incluída nos testes para avaliar a contribuição do açúcar nas atividades testadas (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010).

Trabalhos anteriores reportaram que os métodos DPPH, ABTS e FRAP são válidos para a determinação das propriedades antioxidantes em alimentos e bebidas (BENZIE e STRAIN, 1996; RE *et al.*, 1999). Os mesmos procedimentos para avaliar o potencial antioxidante em amostras de mel foram também usados por outros autores (GIORGIO *et al.*, 2011; KHALIL *et al.*, 2011, LACHMAN *et al.*, 2011, ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010; JAGANATHAN *et al.*, 2010, BALTRUŠAITYTÉ *et al.*, 2007; KHALIL *et al.*, 2011; LACHMAN *et al.*, 2010; MEDA *et al.*, 2005).

Os valores médios e desvios padrão dos ensaios de atividade antioxidante realizada para os onze méis utilizando os três ensaios FRAP, ABTS e DPPH estão apresentadas na **Tabela 16**. Conforme pode ser observado entre as amostras analisadas, os méis de cambará foram os que apresentaram os melhores resultados para os três métodos empregados, variando de 190,35 - 297,76 µmol Fe(II)/100 g para FRAP; de 474,69 - 689,11 µmolTE/100g para ABTS, e de 17,12 - 33,39 mg/mL para CE₅₀.

(DPPH). Estes valores estão compatíveis com os resultados obtidos para conteúdo em fenólicos e flavonóides totais do mel de cambará (**Tabela 14**, pag. 61).

Tabela 16 - Atividade antioxidante das onze amostras de mel e do mel artificial.

Amostra	FRAP (μmol Fe(II)/100 g)	ABTS (μmolTE/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 μmol de FeII (solução aquosa de FeSO₄) por 100g de mel. ABTS – Valores expressos em μmol de Trolox por 100g de mel. ND – Não determinado, pois já é usado como branco na análise.

A capacidade de resgate de radicais livres pode ser quantificada através do parâmetro CE₅₀ que representa a concentração do material em análise necessária para inibir 50% de radicais livres. Deste modo, quanto mais elevado for o valor de CE₅₀ menor será a capacidade da amostra em análise para neutralizar os radicais. A determinação deste parâmetro para os diferentes tipos de mel foi efetuada com base na sua ação sobre os radicais de DPPH. Determinou-se então, a CE₅₀ para cada tipo de mel, ou seja, a concentração da solução de mel que inibe 50% dos radicais de DPPH.

Os valores de CE₅₀ variaram de 16,14 a 67,69 mg/mL (**Tabela 16**). Entre todas as amostras estudadas, o mel de cambará (**C8**) foi o que apresentou a mais elevada capacidade de resgate do radical DPPH, enquanto os méis de morrão de candeia (**M2** e **M10**) apresentaram os piores resultados para os três métodos avaliados (**Tabela 16**). O mel artificial apresentou atividade antioxidante muito baixa (CE₅₀= 404,64 mg/mL), significativamente menor do que qualquer amostra, visto que não apresenta nenhuma substância com potencial antioxidante .

Giorgi *et al.* (2011) relataram uma variação dos valores de CE₅₀ de 11,39 a 64,33 mg/mL para méis italianos, estando semelhante ao valores relatados nesse trabalho. Enquanto Liberato *et al.* (2011) relataram valores de CE₅₀ que variaram de 4,2 a 106,72 mg/mL para méis florais do estado do Ceará.

Para amostras de méis florais da Republica Checa, Lachman *et al.* (2011) relataram uma variação de 98,73 a 186,86; 431,38 a 560,01 e 222,98 a 374,58 mg de equivalentes de ácido ascórbico por quilo de mel para nos métodos DPPH, ABTS e FRAP, respectivamente.

Al *et al.* (2009) estudaram vinte e três amostras de mel coletadas em diferentes regiões da Romênia e confirmaram uma variação nas propriedades antioxidante e conteúdo fenólico total na amostras em função da sua origem botânica ou fonte geográfica.

Al-Mamary *et al.* (2002) e Beretta *et al.* (2005) sugeriram que a atividade antioxidante em amostras de mel varia enormemente dependendo da fonte floral, possivelmente, devido às diferenças no conteúdo de metabólitos especiais das plantas e da atividade enzimáticas das abelhas. Segundo os autores fatores sazonais e climáticos, bem como o processamento também pode ter um efeito sobre a composição do mel e atividade antioxidante, porém em menor proporção.

De acordo com Gheldof *et al.* (2002), a capacidade antioxidante em amostras de mel é o resultado da atividade conjunta de uma vasta gama de substâncias, incluindo substâncias fenólicas, peptídeos, ácidos orgânicos, enzimas, produtos da reação de Maillard, e possivelmente outros componentes menores.

Lianda (2009) analisou amostras de méis de laranjeira e silvestre oriundas de São Paulo e Rio de Janeiro encontrando uma variação de CE₅₀ entre 36,22 – 40,80 mg/mL e 10,81 - 19,74 mg/mL, valores na mesma faixa que os relatados neste trabalho.

5.1.4 - Correlação entre os parâmetros avaliados

No sentido de procurar possíveis relações entre os diferentes parâmetros avaliados nesse trabalho, foi desenvolvida a matriz de correlação apresentada na **Tabela 17**. Essa matriz de correlação revelou que todas as oito variáveis (cor de mel, substâncias fenólicas, flavonóides, aminoácidos, proteína, FRAP, ABTS e DPPH) mostraram algum tipo de correlação entre si.

Tabela 17 - Matriz de correlação entre as variáveis analisadas para as amostras de méis.

	FRAP	ABTS	DPPH	Fenólicos	Flavonóides	Aminoácido	Proteína	Cor
FRAP	1							
ABTS	0,87*	1						
DPPH	-0,84*	-0,58*	1					
Fenólicos	0,87*	0,89*	-0,79*	1				
Flavonóides	0,92*	0,84*	-0,77*	0,86*	1			
Aminoácido	-0,23	-0,19	-0,02	0,11	-0,04	1		
Proteína	0,08	-0,17	-0,26	-0,04	0,34	0,32	1	
Cor	0,46	0,25	-0,49	0,26	0,60*	0,04	0,72*	1

*Significativo ao nível de $\rho \leq 0,05$

Analizando os resultados das amostras de mel foi observada uma alta correlação entre as substâncias fenólicas total e o potencial antioxidante realizado com os três métodos: ABTS ($r = 0,89$), FRAP ($r = 0,84$) e DPPH ($r = -0,79$). De fato, os méis que apresentaram o maior conteúdo em substâncias fenólicas foram os que apresentaram também o maior potencial antioxidante (Tabela 16). Também foi observada uma forte correlação entre conteúdo em flavonóides total e os resultados de FRAP, ABTS e DPPH ($r = 0,92$, $r = 0,84$ e $r = -0,76$, respectivamente). O alto coeficiente de correlação indica que substâncias fenólicas são um dos principais componentes responsáveis pela atividade anti-radicalar do mel, mas, obviamente, outros fatores estão envolvidos.

Essa correlação estatisticamente significativa foi relatada por outros autores (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010a; BALTRUSAITYTE *et al.*, 2007; BURATTI *et al.*, 2007; TURKMEN *et al.*, 2006) que também encontraram uma relação forte entre a capacidade anti-radicalar e o conteúdo de fenólico total do mel.

Existe também uma forte correlação entre os métodos usados para determinar a atividade antioxidante, FRAP e ABTS ($r = 0,87$), FRAP e DPPH ($r = -0,84$) e ABTS e DPPH ($r = -0,58$) o que demonstrou boa equivalência entre esses métodos empregados.

É descrito na literatura que a atividade sequestadora de radicais de uma amostra não pode ser prevista somente com base em seu conteúdo em substâncias polifenólicas. Gheldof e Engeseth (2002), por exemplo, relataram que a capacidade antioxidante do mel é o resultado da combinação atividade de uma ampla gama de substâncias, incluindo substâncias fenólicas (ácidos e flavonóides), peptídeos, enzimas, ácidos

orgânicos, produtos da reação de Maillard e possivelmente outros componentes menores.

Na **Tabela 17** foi observada uma fraca correlação entre a cor do mel e o conteúdo em fenólicos total ($r = 0,26$), uma correlação moderada e significativa entre a cor do mel e flavonóides ($r = 0,6$) foi encontrada, seguida de uma forte correlação entre o conteúdo em fenólicos e flavonóides ($r = 0,86$). Segundo relato na literatura, isto se deve a contribuição da estrutura dos flavonoides, compostas por cromóforos resultantes de sistemas de duplas ligações conjugadas, que dão origem a cores que variam do amarelo ao vermelho para o marrom, característicos do mel (BRUDZYNSKI e MIOTTO, 2011).

A cor do mel mostrou moderada correlação com FRAP ($r = 0,46$) e DPPH ($r = -0,49$), enquanto que com o resultado de ABTS foi obtida uma fraca correlação ($r = 0,25$).

Em relação aos aminoácidos não foram encontradas correlações significativas com as demais variáveis analisadas. Por exemplo, os valores obtidos para o conteúdo em aminoácidos livres mostraram uma fraca correlação e não significativa com FRAP, ABTS e DPPH ($r = -0,248$; $r = -0,213$ e $r = -0,008$, respectivamente) (**Tabela 17**). Resultados semelhantes foram relatados na literatura, e segundo os autores parecem estar relacionados com o fato de o método utilizado conduzir apenas a uma quantificação parcial dos aminoácidos (ALVAREZ-SUAREZ, *et al.*, 2010a; PÉREZ, *et al.*, 2007).

Quanto ao conteúdo de proteína total, uma significativa correlação foi observada com a cor do mel ($r = 0,72$). 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).

5.2 - Preparo dos extratos das amostras de mel

Extração é o principal passo para a recuperação e isolamento de substâncias bioativas presentes nas matrizes de origem vegeal ou animal, antes da análise dos componentes. O objetivo final dos métodos de extração é a preparação de uma amostra extrato enriquecido uniformemente em todos os componentes de interesse e livres de interferência dos demais componentes da matriz.

O principal problema na análise das substâncias fenólicas do mel é o seu conteúdo de açúcar muito alto, o que torna difícil a extração direta desses metabólitos e a preparação das amostras para análise por métodos cromatográficos e/ou espectrométricos. Até bem pouco tempo, a partição líquido-líquido não seletiva com solventes como diclorometano, éter etílico ou acetato de etila havia sido utilizada para os méis, porém com o inconveniente de não permitir a recuperação completa das substâncias fenólicas. Com base nesse problema, a utilização de resinas poliméricas não-iônicas Amberlite XAD-2 passou a ser usada para separação de substâncias fenólicas do mel (FERRERES *et al*, 1991; TOMÁS-BARBERÁN *et al*, 1992).

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

O primeiro passo para a extração dos ácidos fenólicos e flavonóides do mel foi a sorção desses 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 eluídos com metanol (Parte experimental pag. 50).

Em trabalhos realizados com méis europeus, Tomás-Barberán *et al.*(1992; 1994) relataram que a recuperação dos flavonóides em soluções aquosas acidificadas (pH 5,5) foi de 75%, enquanto em soluções ácidas (pH 2) os flavonóides foram recuperados em 95%. Por esta razão, o uso de água ácida (pH 2 com HCl concentrado) para diluir o mel antes de passar pela coluna XAD-2 é altamente recomendado.

Para cada tipo de mel, as frações recuperadas a partir de 50 g de cada mel forneceu os rendimentos em resíduo seco descrito na **Tabela 18**.

Tabela 18 – Valores médios e desvios padrão dos extratos em acetato de etila.

Amostras de Mel	Extratos*	Resíduo seco (mg)
A1 – assa peixe	A11	8,00 ±3,960
M2 - morrão de candeia	M21	5,45 ±6,435
A3 – assa peixe	A31	16,95 ±6,576
C4 – cambará	C41	61,75 ±8,839
C5 - cambará	C51	49,55 ±5,869
C6 - cambará	C61	46,35 ±20,153
C7 - cambará	C71	24,55 ±11,384
C8 - cambará	C81	64,75 ±33,022
C9 - cambará	C91	41,1 ±30,830
M10 - morrão de candeia	M101	8,85 ±2,899
M11 - morrão de candeia	M111	34,00 ±8,768

* código usada para identificar os extratos de mel em acetato de etila.

Os extratos do mel foram preparados com o objetivo de avaliar o potencial antioxidante, bem como determinar a sua composição química por RMN de ^1H e CLAE-DAD. Posteriormente as substâncias identificadas foram correlacionadas à origem geográfica e/ou botânica do mel através de tratamento quimiométrico.

5.2.1 - Teor em substâncias fenólicas dos extratos de mel

O conteúdo em fenólicos e flavonóides totais e os testes de atividade antioxidante *in vitro* foram realizados para os onze extratos de mel a fim de procurar comparar com aquelas realizadas com o mel *in natura*. Para isto foram utilizadas condições experimentais semelhantes às descritas na parte experimental (item 4.7.2 e 4.8) com apenas pequenas modificações.

As médias e os desvios padrão dos teores em fenólicos e flavonóides totais são apresentados na **Tabela 19**.

Tabela 19 – Teor em substâncias fenólicas totais dos extratos de mel.

Amostras	Fenólicos Total (mgE _{AG} /100g) ^a	Flavonoides 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

O conteúdo em fenólico total variou significativamente entre os extratos conforme o tipo floral do mel que o originou, apresentando valores de 7,15 a 12,14 mgE_{AG}/100g (extratos de méis de assa peixe); 10,72 a 11,00 mgE_{AG}/100g (extratos de méis de morrão de candeia) e 4,88 a 7,38 mgE_{AG}/100g (extratos de méis de cambará).

O teor em flavonóides totais encontrado para os extratos foi menor do que o teor em fenólicos totais, e apresentou valores que variaram de 0,79 a 1,79 mgE_Q/100g (extratos de méis de assa peixe); 0,56 a 1,64 mgE_Q/100g (extratos de méis de morrão de candeia) e 0,36 a 1,64 mgE_Q/100g (extratos de méis de cambará).

De acordo com esses resultados o extrato **A11** (assa peixe) apresentou os maiores valores, tanto para conteúdo de fenólicos quanto para o de flavonóides (12,14 mgE_{AG}/100g e 1,79 mgE_Q/100g, respectivamente), enquanto o valor mais baixo foi obtido para o extrato de cambará **C91** (4,88 mgE_{AG}/100g e 1,64 mgE_Q/100g, respectivamente).

Ao comparar os resultados dos extratos para o conteúdos de fenólicos total (4,88 -12,14 mgE_{AG}/100g) e flavonóides total (0,36 -1,79 mg E_Q/100g de mel) com àqueles das amostras de méis *in natura* (73,67-126,55 mgE_{AG}/100g e 2,54 - 10,25 mgE_{AG}/100g, respectivamente), verificou-se que os valores obtidos para os extratos dos méis foram significantemente inferiores. Observações semelhantes já foram descritas para outros

extratos de méis (LIANDA *et al.*, 2012), como em outros tipos de alimentos e bebidas. Este fato pode estar relacionado a possíveis perdas de conteúdo de ácidos fenólicos e flavonoides pela eluição na fase aquosa durante o processo de extração. (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010a).

4.5.2 – Avaliação da Atividade Antioxidante dos extratos de mel

O objetivo deste estudo foi, portanto, identificar e quantificar os antioxidantes de onze diferentes extratos de méis e determinar a capacidade antioxidant de alguns das substâncias isoladas e/ou frações fenólicas.

A atividade antioxidante dos extratos também foi avaliada utilizando três ensaios diferentes - FRAP, ABTS e DPPH e estão apresentados na **Tabela 20**.

Tabela 20 - Atividade antioxidante dos extratos de mel.

Amostra	FRAP (mmol Fe(II)/100 g)	ABTS (mmolTE/100g)	DPPH (CE₅₀) (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,

Entre os extratos dos méis avaliados, o extrato de morrão de candeia (**M21**) foi o que apresentou os melhores resultados (113,69 mmolFe(II)/100g; 67,70 mmolTE/100g e CE₅₀ = 278,61 µg/mL), enquanto resultados bem inferiores foram observados para o extrato **C71** (cambará), com valores de 44,25 mmol Fe(II)/100g; 30,88 mmolTE/100g e

$CE_{50} = 1601,89 \mu\text{g/mL}$. Estes valores estão compatíveis com resultados obtidos para os conteúdos em fenólicos e flavonóides totais.

Os resultados obtidos nesse trabalho foram inferiores aos relatados por Lianda *et al* (2012) em estudos com extratos de méis, onde os valores médios encontrados para FRAP, ABTS e CE_{50} foram 172,96 mmolFe(II)/100g; 159,65 mmolTE/100g; 31,96 $\mu\text{g/mL}$ (extratos de méis silvestres) e 305,92 mmolFe(II)/100g; 217,05 mmolTE/100g; 15,22 $\mu\text{g/mL}$ (extratos de méis laranjeira). Enquanto Vianna (2010) encontrou uma variação para CE_{50} de 9,01 a 80,5 $\mu\text{g/mL}$ para extratos de assa peixe e eucalipto, resultados também superiores aos encontrados nos extratos analisados neste trabalho.

A **Tabela 21** compara todos os valores obtidos neste trabalho para atividade antioxidante dos méis, e seus respectivos extratos em acetato de etila, com suas médias e respectivos desvios padrões. Comparando esses valores percebe-se uma drástica diminuição da capacidade antioxidante dos extratos quando comparados aos seus respectivos méis. Por exemplo, as amostras de mel de cambará apresentaram os melhores valores para as atividades antioxidantes avaliadas *in vitro*, porém seus respectivos extratos apresentaram resultados inferiores.

Tabela 21 - Atividade antioxidante dos méis, e seus respectivos extratos, com suas médias e desvios padrões.

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

Uma das explicações para esses resultados pode estar relacionada ao processo de extração utilizado na obtenção do extrato. A adição de água no processo de separação com a resina Amberlite XAD-2 pode remover grande parte do conteúdo mineral do mel. Sabe-se que os minerais, especialmente ferro, podem formar complexos com substâncias fenólicas, potencializando a sua atividade antioxidante. Além disso, substâncias fenólicas glicosilados, que também contribuem para a capacidade antioxidante do mel, e que não foram extraídos pelo metanol, podem ter sido eliminados na fase aquosa. Portanto, alterações consideráveis na atividade antioxidante e no conteúdo em substâncias fenólicas quando se compara o mel *in natura* ao seu extrato foram observadas nesse trabalho.

Na tentativa de se elucidar as diferenças de potencial antioxidante encontradas entre os extratos e os seus respectivos méis, a composição química desses extratos foi analisada, inicialmente por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodo (CLAE-DAD), e posteriormente, por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H). A análise do perfil dos extratos por CLAE-DAD teve com a finalidade identificar (através das curvas de UV comparadas com a dos padrões) e quantificar as principais substâncias presentes.

Na literatura existem diversos relatos apontando os ácidos fenólicos e flavonóides como os principais responsáveis pelo efeito antioxidante do mel, embora não sejam os únicos. Além disso, a estrutura química de uma determinada substância pode influenciar diretamente a sua capacidade antioxidante. Portanto, a identificação das substâncias fenólicas nos extratos pode fornecer subsídios para a interpretação da atividade antioxidante dos méis e de seus respectivos extratos.

5.2.3 - Identificação das Substâncias Fenólicas por CLAE-DAD

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em coluna de fase reversa (C18 – octadecil) é uma das técnicas mais utilizadas para separação e caracterização de ácidos fenólicos e flavonóides em alimentos, extratos de plantas e produtos apícolas (KALIL e DE VILLIERS, 2011; CHEN *et al* 2011, STALIKAS, 2007; NACZK e SHAHIDI, 2004; ROBBINS, 2003; MERKEN e BEECHER, 2000).

Segundo dados da literatura, a CLAE tem sido apontada nos últimos anos como uma das técnicas de escolha para analisar grande parte dos componentes não-voláteis

que constituem os méis europeus, e tem auxiliado na caracterização da origem floral e geográfica (MARGHITAS *et al.*, 2010; MARTOS *et al.*, 2000; AMIOT *et al.*, 1989; FERRERES *et al.*, 1992; SABATIER *et al.*, 1992; TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993;). Esses estudos relataram a ocorrência de padrões de flavonóides (flavonas e flavonóis) e de derivados de ácidos fenólicos (derivados de ácido benzóico e cinâmico) como sendo importantes marcadores químicos de méis de diferentes regiões e origens geográficas (TRUCHADO *et al.*, 2009, 2010; ESTEVINHO *et al.*, 2008; JASICKA-MISIAK *et al.*; 2012).

Devido à complexidade do perfil fenólico dos extratos do mel, CLAE utilizando principalmente gradiente de fase móvel é normalmente utilizada para separação de diferentes classes de substâncias, como os flavonóides e ácidos benzóicos e cinâmicos, principais componentes presentes no mel. Para estes casos, existem relatos de diversas fases móveis que podem ser empregadas, entretanto um sistema binário constituído por um componente aquoso e um modificador orgânico menos polar (acetonitrila ou metanol) tem sido o mais comum. Em muitos casos, a fase móvel pode ser acidificada com um modificador, como acético, fórmico e ácido fosfórico para minimizar efeito cauda dos picos, causada pela interação das substâncias fenólicas com os grupos silanóis livres na superfície da coluna C-18 (ROBBINS, 2003).

Em virtude da existência de ligações duplas conjugadas e sistemas aromáticas, toda substância fenólica apresenta uma maior ou menor absorção no ultravioleta (UV) ou na região ultravioleta-visível (UV-VIS). Assim, o meio mais comum de detecção, acoplado a cromatografia líquida, são os detectores de UV-Vis, de arranjo de fotodiodos (DAD) e fluorescência. O detector DAD é um dos mais usados, pois pode simultaneamente detectar todos os picos do cromatograma, e permitir a digitalização dos espectros de ultravioleta de todos os solutos que passam pelo detector, dando mais informações sobre as substâncias em misturas complexas, como um extrato bruto de plantas, alimentos e/ou méis. A combinação de ambos, espectro de absorção no UV-VIS e o tempo de retenção (t_R), pode conduzir mais facilmente a identificação das substâncias separadas.

Em vários estudos sobre méis europeus, Ferreres *et al.* (2001; 2000; 1994) mostraram que o mel tem um perfil em substâncias fenólicas, rico em ácidos benzóico e seus ésteres, ácidos cinâmico e seus ésteres, flavonóides glicosilados e agliconas. No

entanto, há pouca informação disponível sobre os perfis fenólicos de méis de fontes floral comum no Brasil. Caracterização das substâncias fenólicas e outros componentes no mel que pode ser responsável por seus efeitos antioxidantes é essencial para melhorar nosso conhecimento sobre o mel como fonte de antioxidante.

Nesse trabalho as análises por CLAE-DAD dos extratos de méis foram realizadas de acordo com o experimental descrito no item 4.15 (pag. 52). A escolha da coluna de fase reversa C-18 foi baseada nos trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo nosso grupo (DA SILVA, 2004; MONTAGNI, 2005; LIANDA, 2004 e 2009), porém as condições cromatográficas (fase móvel, velocidade de fluxo e tempo de análise) sofreram algumas modificações para permitir a análise dos ácidos fenólicos (benzóicos e cinâmicos) e flavonóides (aglicona e glicosilados) em uma mesma corrida. Aqui serão apresentados apenas os resultados das condições consideradas mais adequadas para as análises desses méis.

Para auxiliar a identificação e quantificação das substâncias presentes nos extratos foram utilizados 18 padrões comerciais: ácido gálico, HMF, ácido protocatecuico, ácido *p*-hidroxi-benzóico, ácido siríngico, ácido 2,4 diidroxi-benzóico, ácido sinápico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido *m*-cumárico, ácido benzóico, ácido *p*-metoxi-benzóico, ácido cinâmico, naringerina, *cis,trans*-ácido abscísico, ácido *m*-metoxi-cinâmico, crisina e galangina. Esses padrões foram escolhidos em função dos resultados anteriores obtidos pelo do nosso grupo (DA SILVA, 2004; MONTAGNI, 2005; LIANDA 2004 e 2009, PEREIRA, 2010 e VIANNA, 2010).

Cada padrão foi analisado, individualmente, por CLAE-DAD para terem seus tempos de retenção e as suas curvas de UV determinadas (**Figuras 24 a 28**), sendo posteriormente utilizadas para identificar as substâncias desconhecidas presentes nos diferentes extratos de mel. Os cromatogramas dos padrões foram obtidos por CLAE-DAD em coluna C-18 (25 cm x 4,6 mmx 5 µm), fluxo de 1,0 mL/min, fase móvel água: ácido acético (99:1, solvente A) e metanol: acetonitrila (90:10, solvente B), DAD -280 nm (conforme experimental página 52). Na **Tabela 22** foram reunidos os tempos de retenção e os respectivos comprimentos de onda de cada padrão utilizado para facilitar a comparação com os dados obtidos nas amostras dos méis.

Tabela 22 – Tempo de retenção e máximo de absorção das substâncias fenólicas utilizados como padrão.

	Substância fenólica	t_R (min)	λ_{max} (nm)
1-	Ácido gálico	3,39	271
2-	HMF	3,77	283
3-	Ácido protocatecuico	4,25	259, 294
4-	Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico	5,82	254
5-	Ácido siríngico	6,32	274
6-	Ácido 2,4 diidroxi-benzóico	7,13	254, 295
7-	Ácido sinápico	9,41	243, 324
8-	Ácido ferúlico	9,43	239, 323
9-	Ácido <i>p</i> -cumárico	8,69	309
10-	Ácido <i>m</i> -cumárico	11,02	278
11-	Ácido benzóico	13,58	240, 273
12-	Ácido <i>p</i> -metoxi-benzóico	15,03	255
13-	Ácido cinâmico	21,08	276
14-	Naringerina	21,72	289
15-	ABA	19,03	251, 262
16-	Ácido <i>m</i> -metoxi-cinâmico	21,44	249, 308
17-	Crisina	27,39	267, 314
18-	Galangina	27,77	264, 360

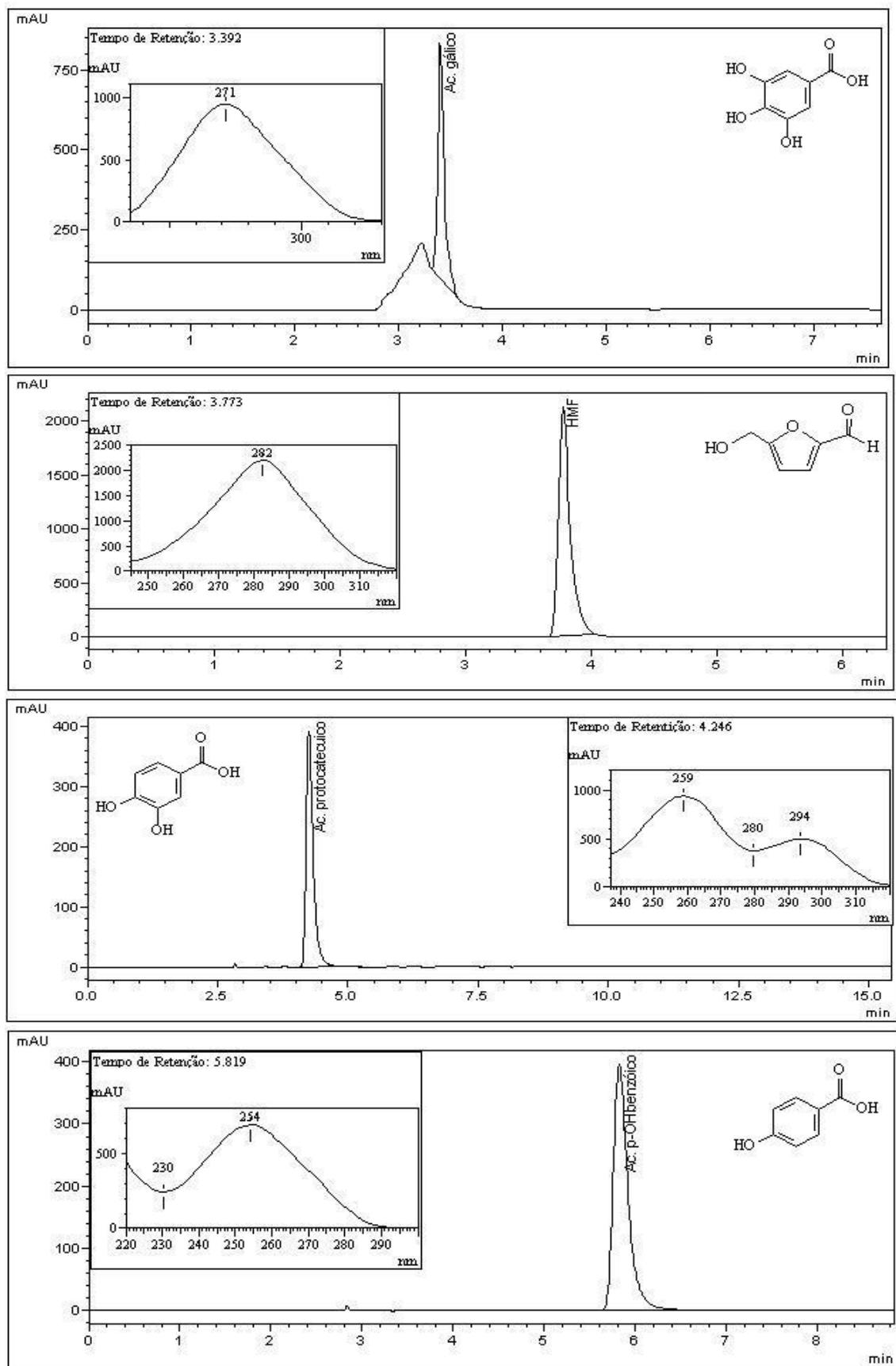


Figura 24 – Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD: **1**- ácido gálico, **2** – HMF, **3** – ácido protocatecuico e **4** – ácido *p*-hidroxi-benzoíco.

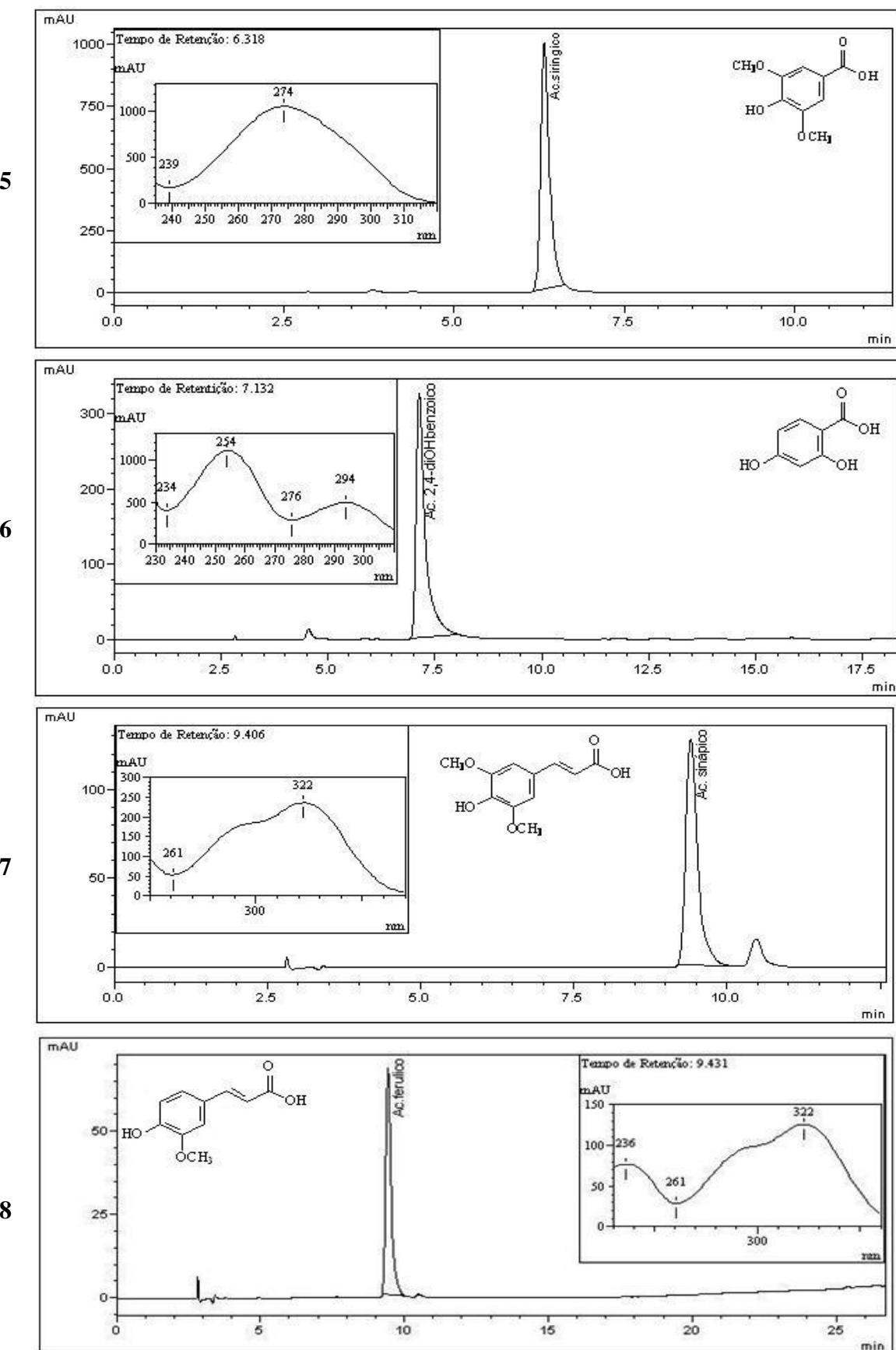


Figura 25 – Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD: **5**- ácido siríngico, **6** - ácido 2,4 dihidroxibenzóico, **7** – ácido sinápico e **8** – ácido ferúlico.

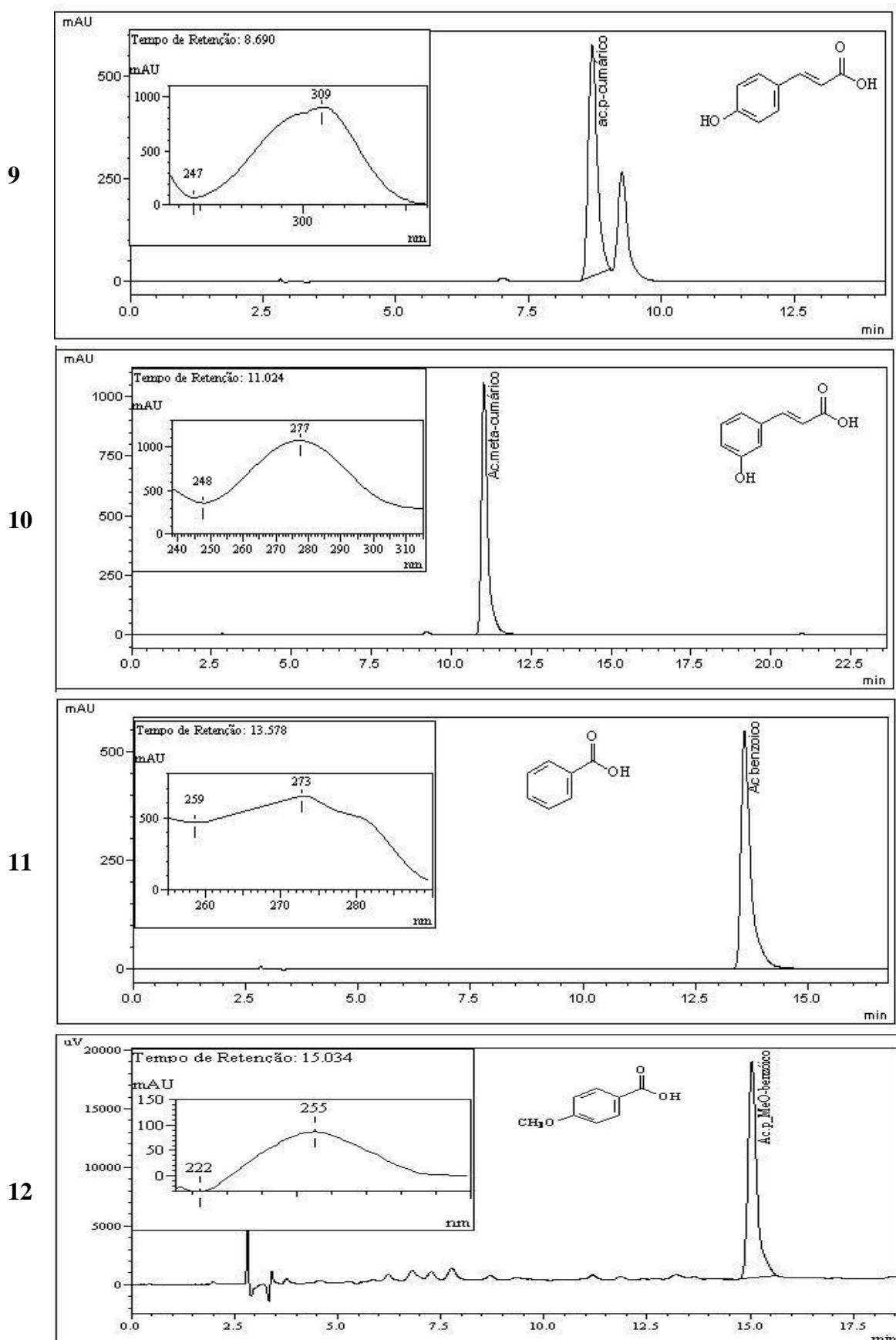


Figura 26 – Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD: **9** – ácido *p*-cumárico, **10** – ácido *m*-cumárico, **11**– ácido benzóico e **12** – ácido *p*-metoxi-benzóico.

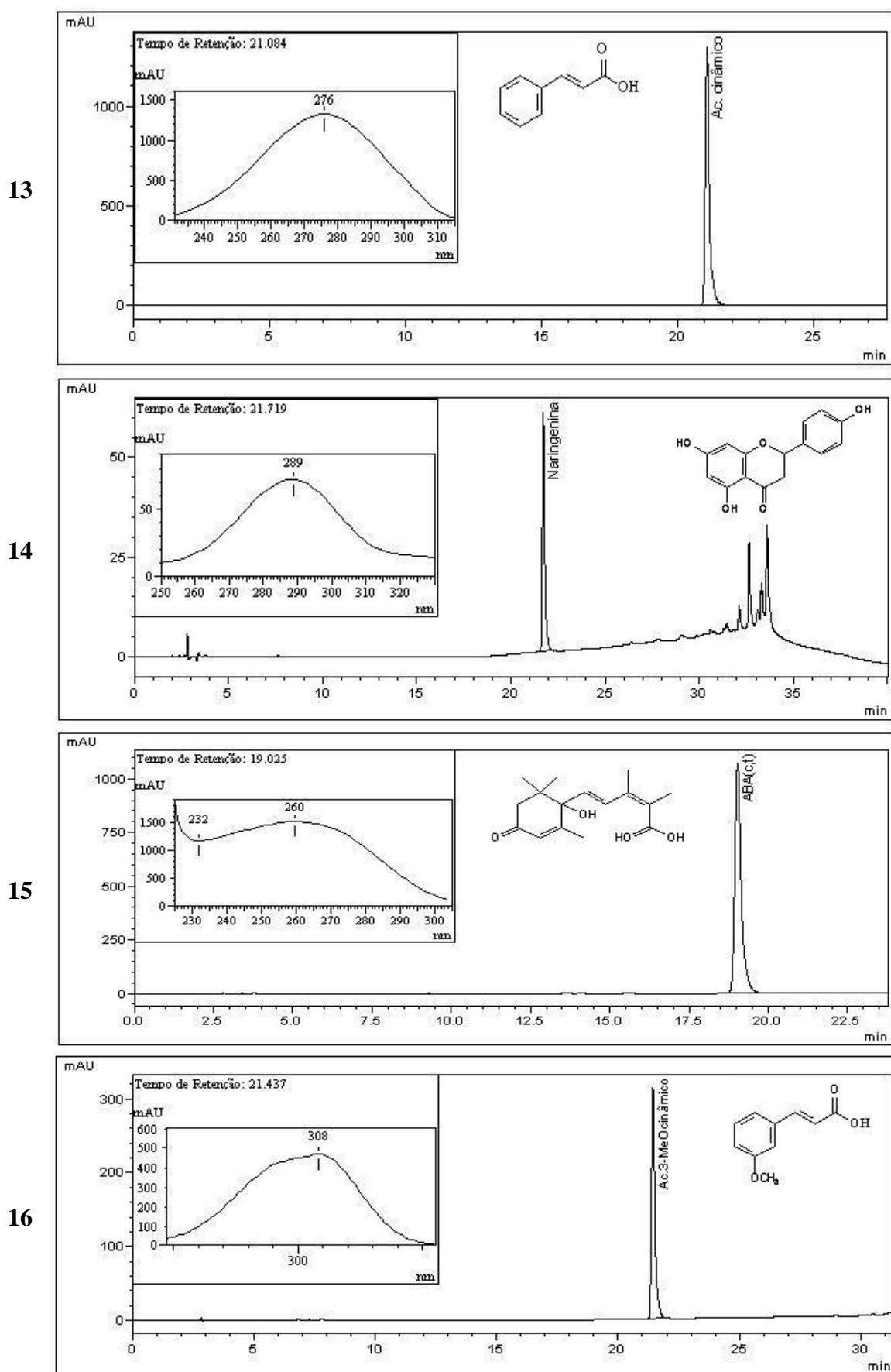


Figura 27 – Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD: **13**- ácido cinâmico, **14** - naringenina, **15** – *c,t*-ABA e **16** – ácido *m*-metoxi-cinâmico.

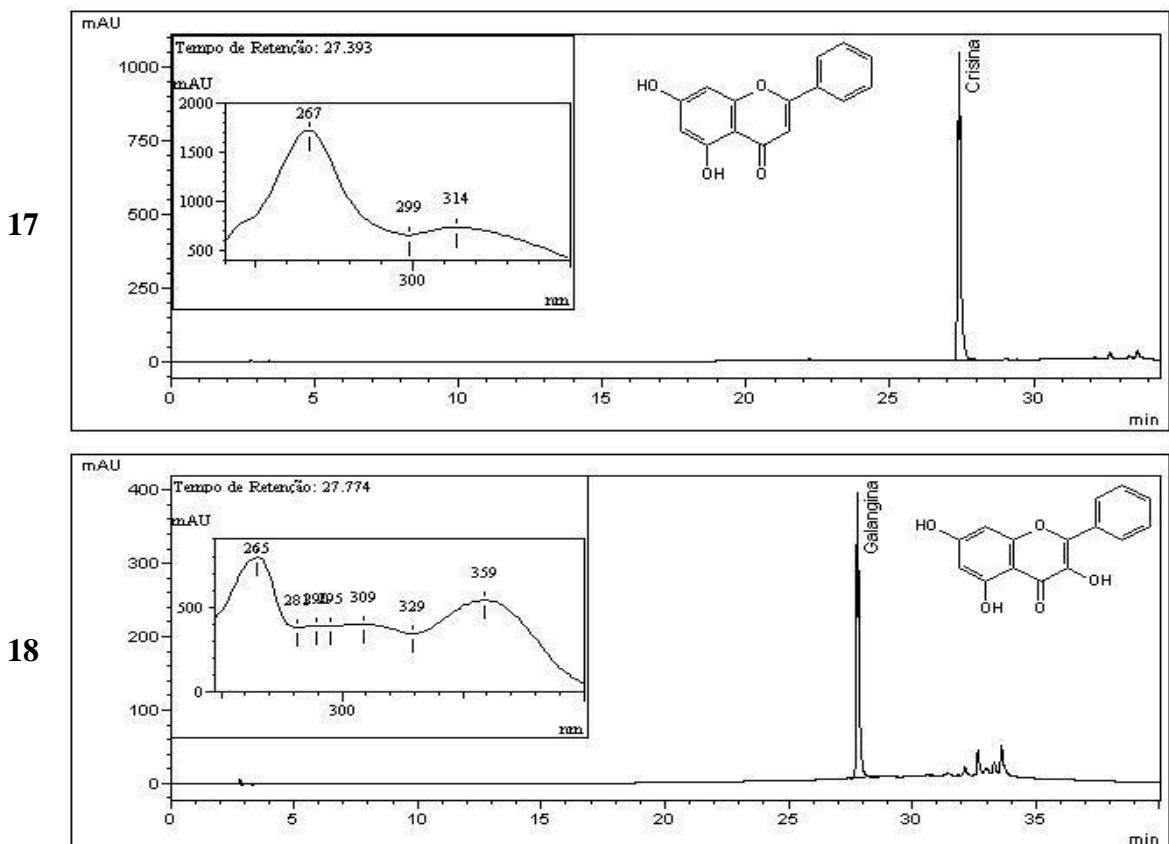


Figura 28 – Cromatogramas dos padrões obtidos por CLAE-DAD: **17**- crisina e **18** – galangina.

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

Com uso de CLAE associado ao detector de arranjo de fotodiodo, foi possível separar as substâncias (visualizadas através dos seus diferentes tempos de retenção), e simultaneamente identificá-las através dos seus espectros de absorção. As substâncias foram identificadas por comparação de seus espectros no UV com de seus respectivos padrões, co-cromatografia e tempo de retenção.

Os extratos de mel foram analisado por CLAE-DAD em coluna analítica C-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm), fluxo de 1,0 mL/min, fase móvel metanol: acetonitrila (90:10)-solvente B e água: ácido acético (99:1 - solvente A), DAD-280 nm (conforme experimental página 52). Os perfis cromatográficos evidenciam os picos referentes às substâncias fenólicas identificadas. Observando a altura dos picos é possível visualizar as diferentes concentrações e relações molares das substâncias fenólicas presentes em cada mel. A extensão da corrida cromatográfica até 45 minutos serve para demonstrar

que nas condições experimentais os ácidos fenólicos e flavonóides puderam ser detectados

A **Tabela 23** apresenta as substâncias identificadas por CLAE-DAD para os onze extratos de méis monoflorais estudados nesse trabalho.

Tabela 23 - Substâncias fenólicas identificadas nos méis assa peixe, cambará e morrão de candeia.

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

Para facilitar a visualização e interpretação dos dados, os cromatogramas das amostras de méis serão apresentados por origem botânica. Os valores em porcentagem representam o nível de predominância da substância no extrato quanto ao conteúdo fenólico total.

5.2.3.1 - Análises dos extratos dos méis de assa peixe

Para avaliar o perfil cromatográfico das substâncias fenólicas foram analisadas duas amostras de méis de assa peixe (**A11**; **Figura 29** e **A31**; **Figura 30**). Nestes extratos foram possíveis identificar ácido gálico (0,54% e 1,08%), ácido *p*-cumárico (10,85% e 6,30%), ácido *p*-metoxi-benzóico (26,39% e 33,58%) e ácido cinâmico (6,53% e 3,09%), respectivamente, além de HMF e *c,t*-ABA.

Os ácidos protocatecuico (10,85%), ferúlico (27,26%) e benzóico (9,16%) estão presentes apenas em **A11**. O nível de flavonóides nas amostras analisadas de mel de assa peixe foi insignificante. Neste tipo de mel, o perfil de flavonóides foi composto principalmente de naringenina, presente na amostra **A31** em 11,7%, enquanto para a amostra **A11** estava abaixo do limite de detecção, e crisina em 0,01% para a amostra **A11** e 0,42% para a amostra **A31**.

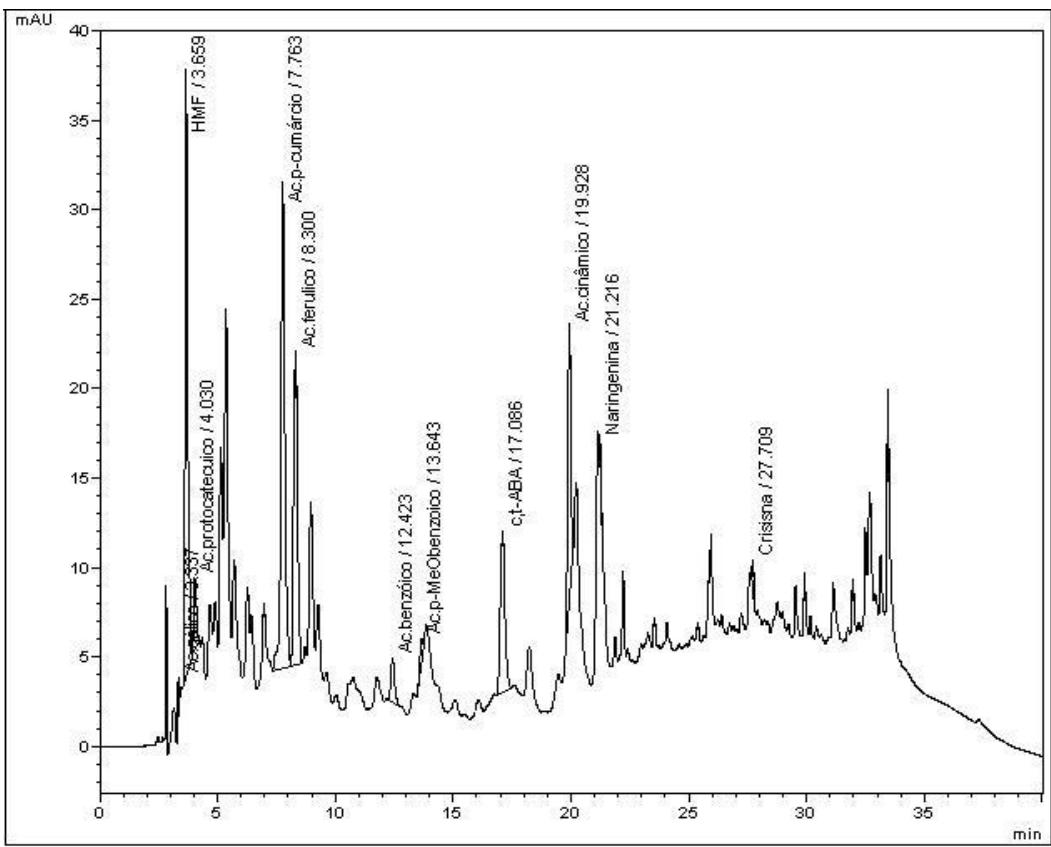


Figura 29 – Substâncias fenólicas identificados no extrato **A11** de assa peixe por CLAE.

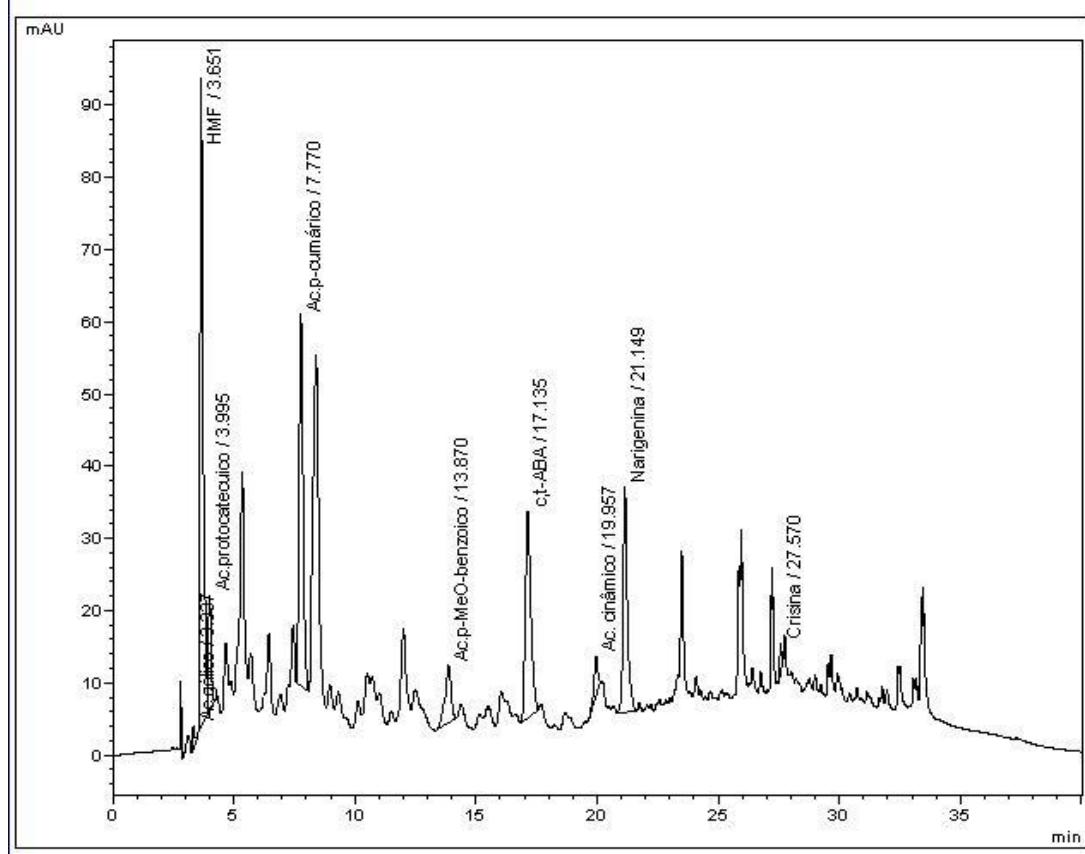


Figura 30 – Substâncias fenólicas identificados no extrato **A31** de assa peixe por CLAE

5.2.3.2 - Análises dos extratos dos méis de cambará

A seguir serão apresentados os resultados obtidos para as amostras que tiveram seus perfis cromatográficos estudados, e codificadas como **C41**, **C51**, **C61**, **C71**, **C81**, **C91** (Figuras 31 a 35).

Em todos os seis extratos de cambará analisados foram possíveis identificar o ácido *m*-cumárico, HMF, *c,t*-ABA e *c,c*-ABA. O ácido *m*-metoxi-cinâmico esteve ausente apenas na amostra **C71**, assim como o ácido benzóico em **C51** e **C71**; e ácido gálico nas amostras **C41**, **C81** e **C91**.

O flavonoide naringerina foi identificado em todos os extratos, com exceção das amostras **C51** e **C41**, enquanto a crisina só não foi identificada na amostra **C61**. O flavonol galangina esteve presente também em todas as amostras, exceto na amostra **C41**.

Foi possível observar um conteúdo maior em ácidos fenólicos em comparação aos flavonoides. Esses resultados estão de acordo com os observados por Jasicka-Misiak *et al* (2012) para méis poloneses, na qual também foi evidenciado uma maior quantidade de ácidos. Segundo os autores, este fato pode estar fortemente associado a cor escura do mel que em geral, apresentam quantidades de ácidos fenólicos superiores aos flavonóides.

Com base nos resultados obtidos para amostras de camabará, conclui-se que o conteúdo de ácidos fenólicos foi relativamente maior, destacando-se, principalmente, os ácidos benzóico (87,43% em **C81**), *m*-metoxi-cinâmico (39,59% em **C51**) e *m*-cumárico (20,97% em **C71**).

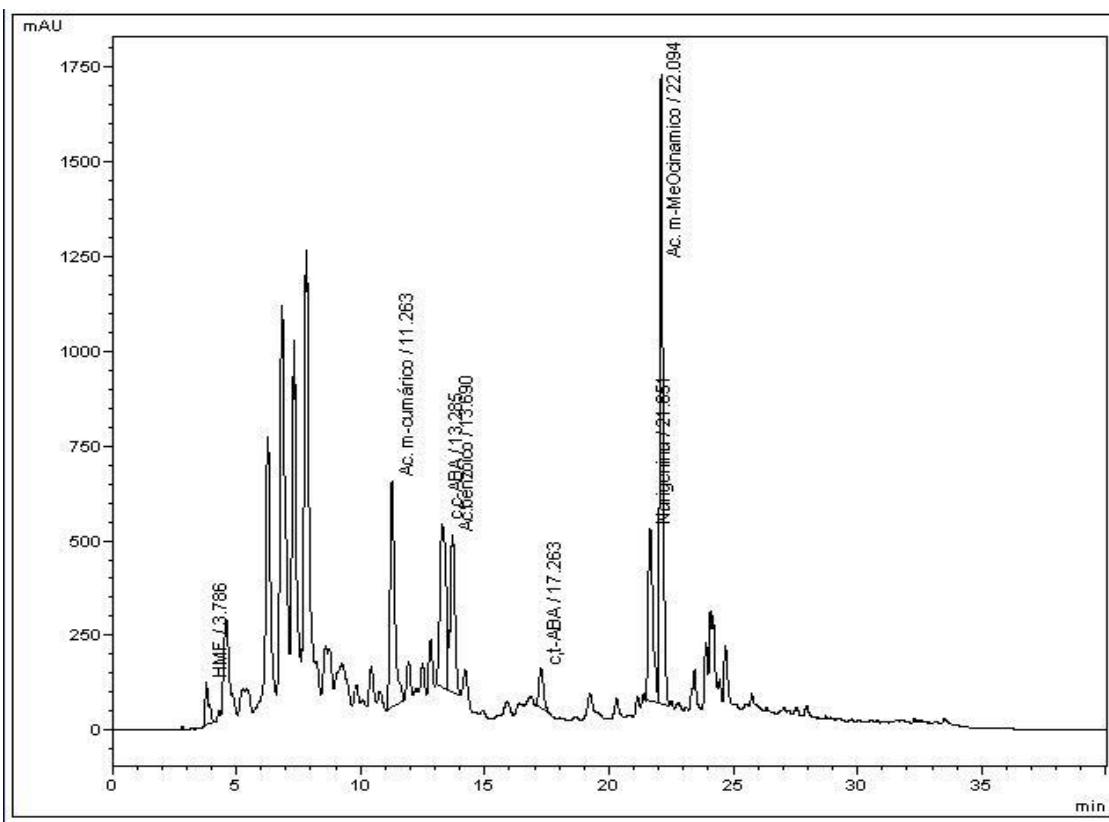


Figura 31 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato **C41** de cambára por CLAE.

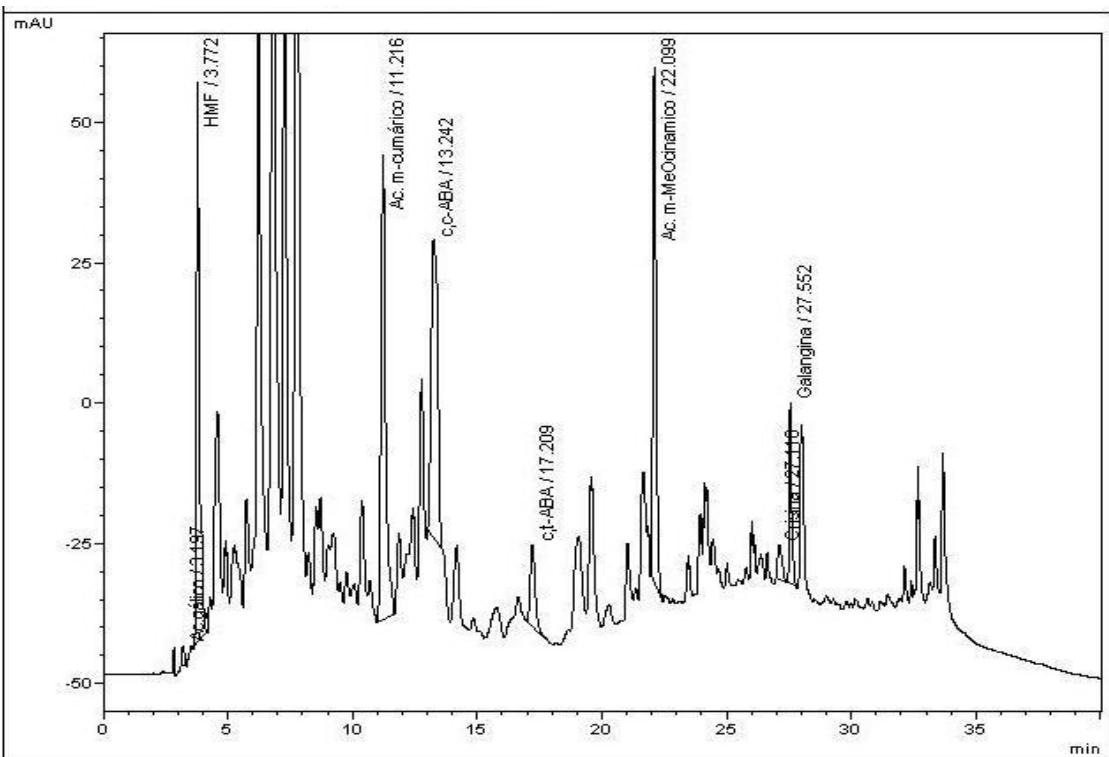


Figura 32 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato **C51** de cambára por CLAE.

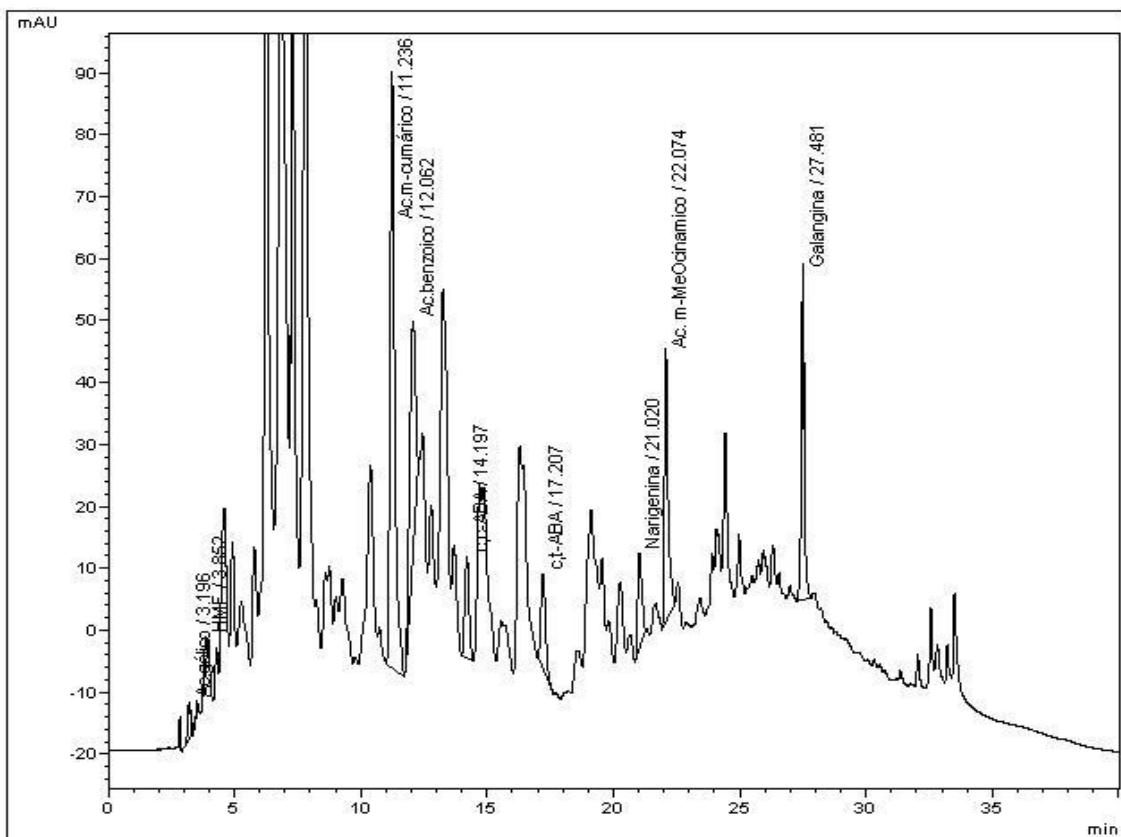


Figura 33 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato **C61** de cambára por CLAE.

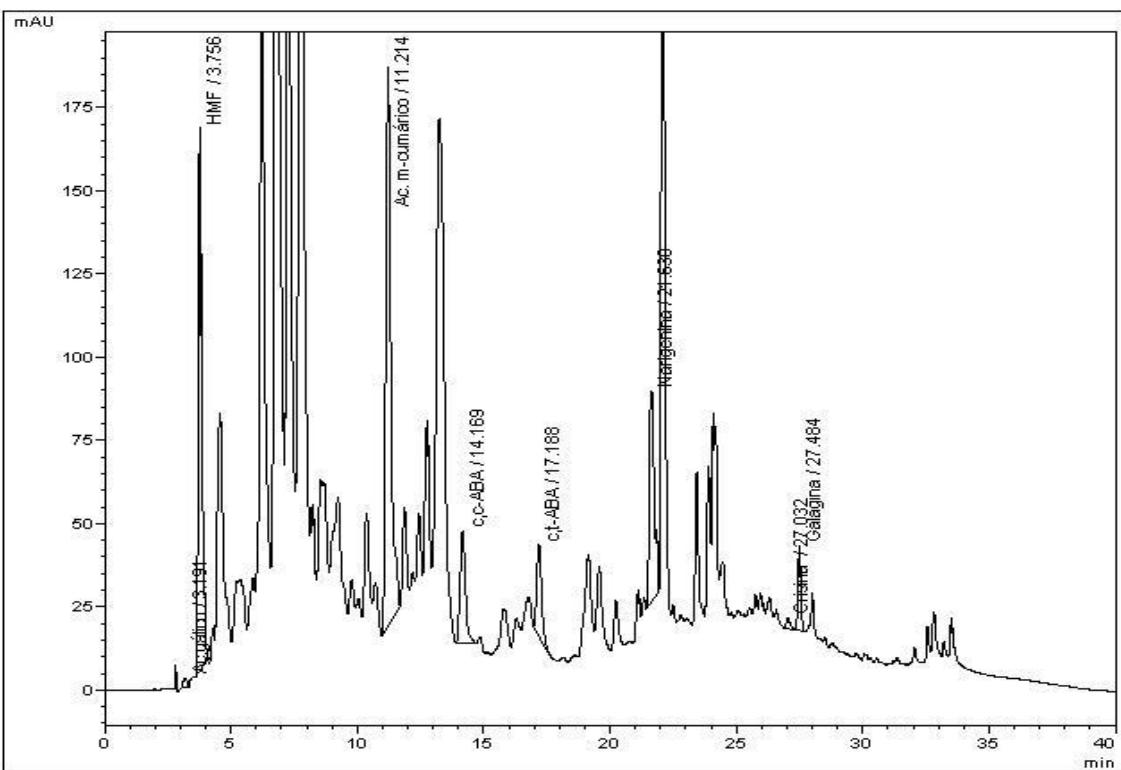


Figura 34 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato **C71** de cambára por CLAE.

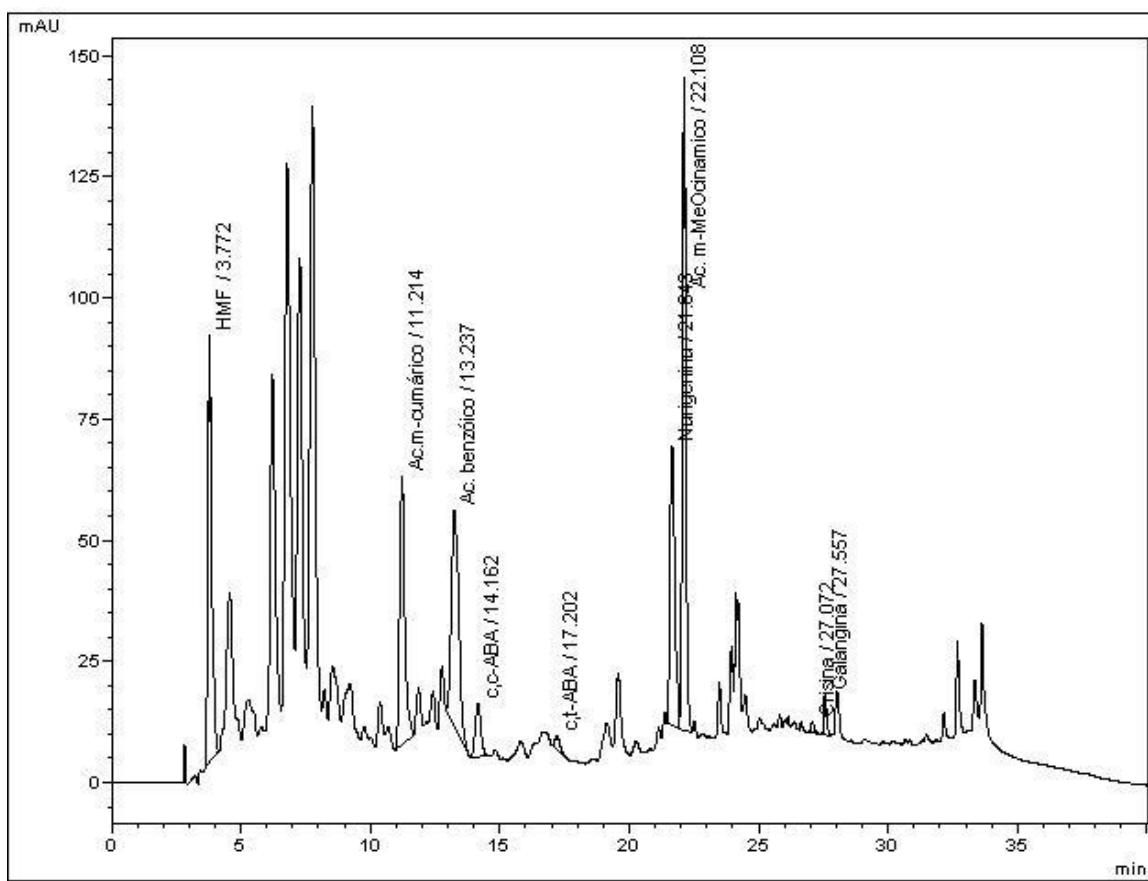


Figura 35 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato **C81** de cambára por CLAE.

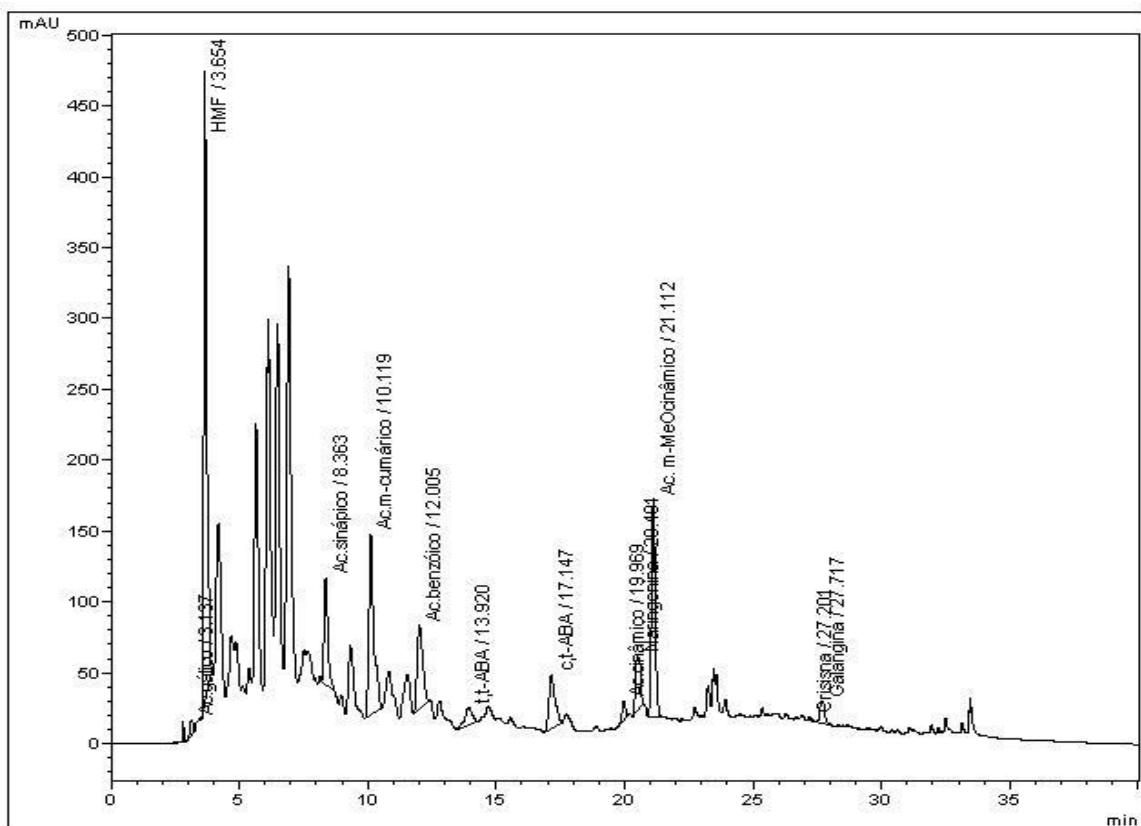


Figura 36 - Substâncias fenólicas identificadas no extrato **C91** de cambára por CLAE.

5.2.3.3 - Análises dos extratos dos méis de morrão de candeia

A avaliação do perfil cromatográfico das substâncias fenólicas nos méis de morrão de candeia foi realizada através de três extratos **M21**, **M101** e **M111** (**Figuras 37 a 39**).

Nestas três amostras foi possível identificar a presença dos ácidos gálico (0,37%; 2,96% e 2,59%) e *p*-hidroxi-benzóico (2,54%; 9,29% e 15,09%), e da naringerina (11,01%, 1,49% e 26,73%), respectivamente, além HMF, *c,t*-ABA e *c,c*-ABA. O flavonol galangina esteve ausente apenas na amostra **M111**, assim como o ácido benzóico na amostra **M101**. O ácido 2,4-diidroxi-benzóico esteve presente somente em **M101**, enquanto no extrato **M21** foram identificados os ácidos siríngico (13,13%), *p*-cumárico (9,62%) e *m*-cumárico (10,83%).

O nível de flavonoide nos extratos de morrão de candeia foram superiores aos resultados encontrados para os extratos de assa peixe. Sendo o mais alto nível encontrado para naringenina (26,73%) na amostra **M111**. No entanto, a crisina não foi encontrada nesses extratos.

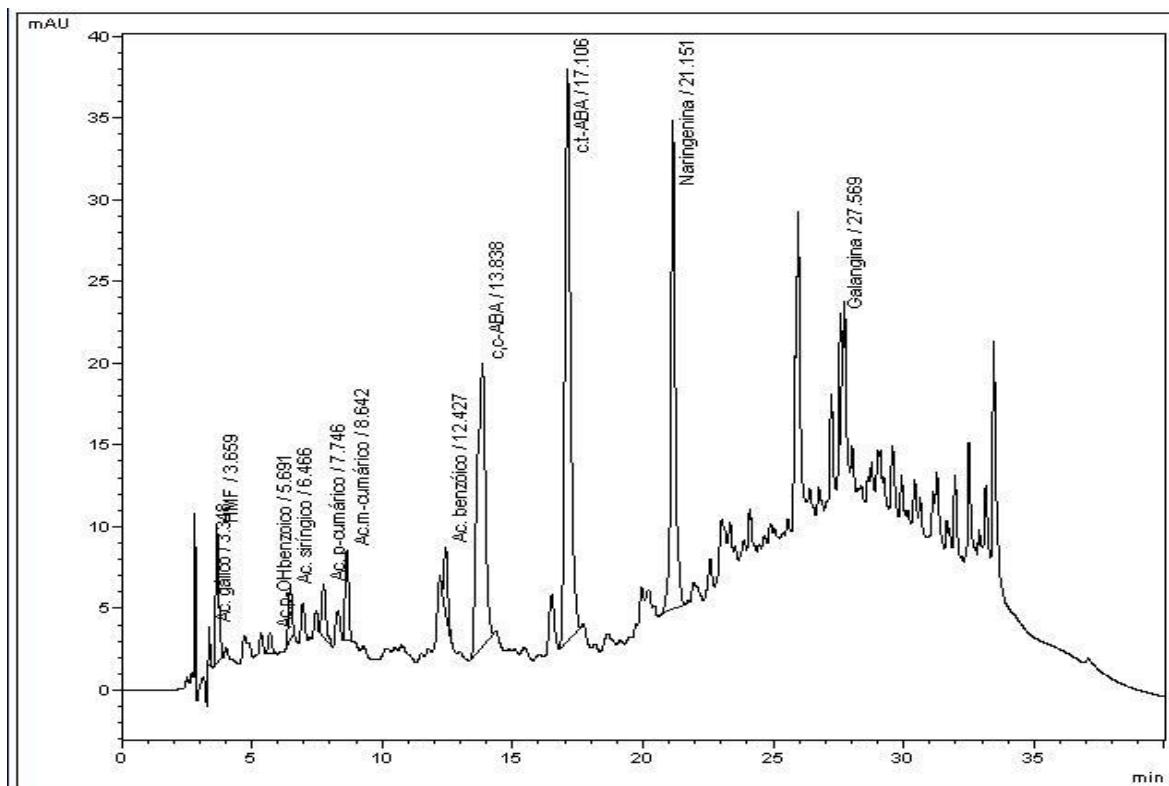


Figura 37 - Extrato **M21** de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD.

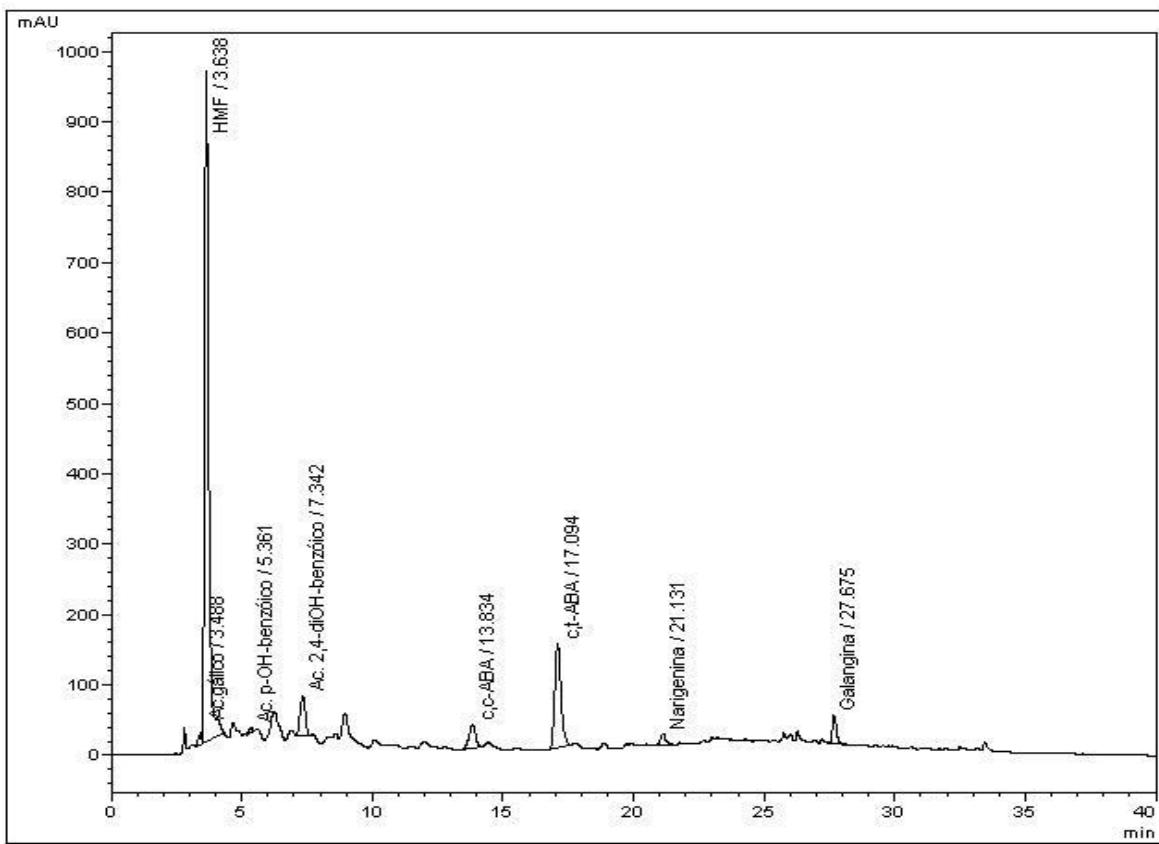


Figura 38 - Extrato M101 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD.

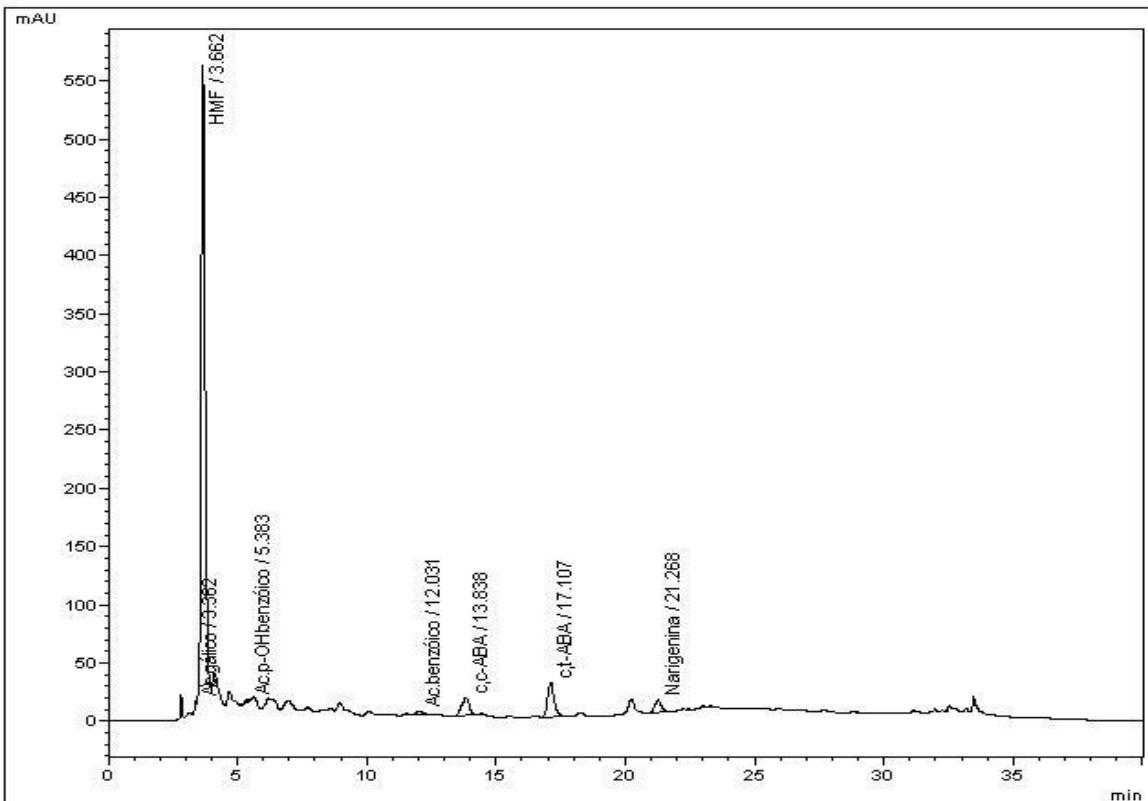


Figura 39 - Extrato M111 de mel de morrão de candeia analisado por CLAE-DAD.

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

Entretanto, alguns destas substâncias fenólicas identificadas já foram relatadas em outros méis europeus (ALVAREZ-SUAREZ *et al* 2010c; JAGANATHAN *et al.*; 2010; JASICKA-MISIAK *et al.*, 2012.) e em méis brasileiros (LIANDA e CASTRO, 2009).

Alvarez-Suarez *et al* (2010c) identificaram por CLAE-DAD-ESI/MS catorze substâncias fenólicas: os ácidos *p*-cumárico, siríngico, vanílico, caféico, ferúlico, mirecetina, queracetina, canferol, entre outras em amostras de méis cubanos. Jaganathan *et al* (2010) estudaram méis indianos e identificaram também por CLAE-DAD-ESI/MS os ácidos diidroxi-benzóico, caféico, ferúlico e cinâmico como constituintes majoritários nas amostras de mel, e Jasicka-Misiak *et al.* (2012) identificaram por CLAE os ácidos 3-hidroxi-benzóico, clorogênico, 4-hidroxi-benzóico, vanílico, caféico, siríngico, ferúlico, *p*-cumárico, rosmarínico, elágico, miricetina, queracetina, camferol, crisina e galangina em méis poloneses.

5.2.4 - Quantificação dos extratos por CLAE-DAD

Os resultados da determinação quantitativa individual das substâncias fenólicas identificados nos extratos de mel, expressos em mg por 100g de mel, assim como o conteúdo de fenólicos e flavonóides totais, estão apresentados na **Tabela 24**.

A análise dos extratos por CLAE-DAD revelou uma concentração média maior em ácidos fenólicos (3,580 mg/100g de mel) do que em flavonóides (0,862 mg/100g de mel), assim como a determinação indireta pelo método de Folin-Denis (8,131 mgE_{AG}/100 g) para fenólicos total, e pelo método espectrofotométrico com cloreto de alumínio para flavonóides (0,921 mgE_Q/100 g).

Como pode ser observado, méis mais escuros (méis de cambará) foram caracterizados por alto conteúdo em substâncias fenólicas, valores superiores aos

encontrados em méis mais claros (morrão de candeia). A maior quantidade foi obtida para a amostra **C61** (17,14 mgE_{AG}/100 g de mel), classificada como âmbar (**Tabela 13**, pág. 55). Esses resultados estão de acordo com àqueles observados para os méis de coloração escura proveniente da Polônia, que também apresentaram altos conteúdos em fenólicos (59,9 – 76,2 mgE_{AG}/100 g) (JASICKA-MISIAK *et al.*, 2012).

Em comparação aos resultados do conteúdo fenólicos obtidos por Lachman *et al.* (2010) para 40 amostras de méis tchecos, os valores (8,36 - 24,25 mgE_{AG}/100 g) se assemelharam aos encontrados neste trabalho.

Através da análise cromatográfica também foi possível observar que a concentração de ácidos fenólicos foi superior nos extratos de mel de cambará. Estes resultados não foram semelhantes àqueles obtidos pelo método de Folin-Denis (**Tabela 19**, pág. 75), na qual os extratos de morrão de candeia foram os que apresentaram os maiores conteúdos em substâncias fenólicas. Isto pode ser consequência da superestimação dos fenólicos total determinado pelo método de Folin-Denis, já que esta técnica quantifica todas as substâncias que possivelmente possam ser reduzidas, e não apenas as substâncias fenólicas presentes (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010c).

Tabela 24 – Conteúdo das substâncias fenólicas das amostras de extratos de mel. (mg/100g de mel).

Substância fenólica	A 11	M 21	A 31	C 41	C 51
Ácido gálico	0,00157 ± 0,000	0,00156 ± 0,000	0,01370 ± 0,000		0,0273 ± 0,000
HMF	0,02198 ± 0,000	0,01356 ± 0,000	0,24692 ± 0,036	0,0483 ± 0,035	0,3817 ± 0,000
Ácido protocatecuico	0,03133 ± 0,014		0,08019 ± 0,037		
Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico		0,01073 ± 0,002			
Ácido siríngico		0,05558 ± 0,068			
Ácido 2,4 dihidroxi-benzóico					
Ácido sinápico					
Ácido ferúlico	0,07874 ± 0,029				
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,07624 ± 0,050	0,04071 ± 0,041	0,42719 ± 0,036		
Ácido <i>m</i> -cumárico		0,04582 ± 0,061		0,3202 ± 0,204	0,3445 ± 0,182
Ácido benzóico	0,02646 ± 0,002	0,10359 ± 0,000		2,4860 ± 0,019	
Ácido <i>p</i> -metoxi-benzóico	0,01056 ± 0,000		0,16309 ± 0,135		
Ácido cinâmico	0,01886 ± 0,011		0,03931 ± 0,000		
Naringerina	ALD	0,04658 ± 0,034	0,14889 ± 0,000	0,3434 ± 0,072	
ABA	0,04508 ± 0,046	0,06780 ± 0,000	0,39435 ± 0,123	0,0628 ± 0,000	0,1751 ± 0,000
Ácido <i>m</i> -metoxi-cinâmico				0,3475 ± 0,231	0,7181 ± 0,003
Crisina	0,00004 ± 0,000		0,00536 ± 0,000		0,1381 ± 0,179
Galangina		0,05080 ± 0,000			0,4106 ± 0,000
Total de ácidos fenólicos	0,24376 ± 0,031	0,25799 ± 0,046	0,72348 ± 0,168	3,15364 ± 1,243	1,08989 ± 0,346
Total de flavonóides	0,00004 ± 0,031	0,09738 ± 0,003	0,15425 ± 0,101	0,34339 ± 0,072	0,54871 ± 0,193

* ALD – abaixo do limite de detecção.

Tabela 24 – Conteúdo das substâncias fenólicas das amostras de extratos de mel. (mg/100g de mel)

Substância fenólica	C 61	C 71	C 81	C 91	M 101	M 111
Ácido gálico	0,1218 ± 0,000	0,0605 ± 0,040		0,0268 ± 0,000	0,0017 ± 0,001	0,0284 ± 0,007
HMF	0,2730 ± 0,000	0,6626 ± 0,000	0,2830 ± 0,307	0,4216 ± 0,000	0,0300 ± 0,034	0,8678 ± 1,015
Ácido protocatecuico						
Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico					0,0053 ± 0,002	0,1657 ± 0,089
Ácido siríngico				0,3716 ± 0,214		
Ácido 2,4 dihidroxi-benzóico					0,0214 ± 0,014	
Ácido sinápico						
Ácido ferúlico						
Ácido <i>p</i> -cumárico						
Ácido <i>m</i> -cumárico	1,7818 ± 0,533	0,5439 ± 0,726	0,2373 ± 0,229	0,1605 ± 0,135		
Ácido benzóico	14,0995 ± 0,029		11,2376 ± 0,011	2,4737 ± 0,010		0,3464 ± 0,031
Ácido <i>p</i> -metoxi-benzóico						
Ácido cinâmico				0,0872 ± 0,103		
Narangerina	1,8580 ± 2,626	0,9580 ± 0,000	0,3750 ± 0,447	0,6348 ± 0,754	0,0008 ± 0,000	0,2934 ± 0,404
ABA	0,6573 ± 0,000	0,3286 ± 0,000	0,0217 ± 0,001	0,1555 ± 0,081	0,0160 ± 0,022	0,2638 ± 0,145
Ácido <i>m</i> -metoxi-cinâmico	1,1382 ± 0,000		0,6316 ± 0,752	0,3770 ± 0,000		
Crisina		0,0058 ± 0,007	0,2534 ± 0,000	1,3697 ± 0,000		
Galangina	2,0664 ± 0,000	0,3687 ± 0,007	0,0961 ± 0,000	0,0708 ± 0,063	0,0116 ± 0,000	
Total de ácidos fenólicos	17,14133 ± 6,578	0,60439 ± 0,342	12,10643 ± 6,240	3,49681 ± 0,938	0,02832 ± 0,010	0,54048 ± 0,160
Total de flavonóides	3,92436 ± 0,147	1,33251 ± 0,481	0,72461 ± 0,140	2,07537 ± 0,651	0,01249 ± 0,008	0,29341 ± 0,145

A avaliação da atividade antioxidante (expressa como CE₅₀) dos padrões identificados no mel foi realizada, a fim de correlacionar a sua contribuição para o potencial antioxidante dos extratos (**Tabela 25**).

De acordo com a **Tabela 25**, as substâncias mais hidroxilados, especialmente em posições *ortho*, como o ácido gálico, mostrou a atividade antioxidante mais elevada (CE₅₀= 1,16 µg/mL) em comparação as substâncias menos hidroxiladas, como o ácido benzóico (CE₅₀> 15000 µg/mL).

Tabela 25 – Avaliação da atividade antioxidante (CE₅₀) das substâncias fenólicas utilizados como padrão pelo método DPPH.

	Substância fenólica	CE ₅₀ (µg/mL) [*]
1-	Ácido gálico	1,16 ± 0,04
2-	HMF	*
3-	Ácido protocatecuico	2,30 ± 0,84
4-	Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico	207,29 ± 25,81
5-	Ácido siríngico	2,42 ± 0,27
6-	Ácido 2,4 diidroxi-benzóico	*
7-	Ácido sinápico	4,61 ± 0,47
8-	Ácido ferúlico	4,79 ± 0,25
9-	Ácido <i>p</i> -cumárico	39,31 ± 2,78
10-	Ácido <i>m</i> -cumárico	> 15000
11-	Ácido benzóico	> 15000
12-	Ácido <i>p</i> -metoxi-benzóico	242,74 ± 118,55
13-	Ácido cinâmico	> 5000
14-	Naringerina	> 5000
15-	ABA	*
16-	Ácido <i>m</i> -metoxi-cinâmico	*
17-	Crisina	> 5000
18-	Galangina	91,19 ± 25,05

* Padrões não testados por falta de quantidade.

Entre os extratos avaliados, a amostra **M21** (morrão de candeia) foi a que apresentou os melhores valores para atividade antioxidante (CE₅₀ = 278,61 µg /mL; **Tabela 24**). Para **M21** foram identificados os ácidos gálico, siríngico, *p*-cumárico nas concentrações 0,00156; 0,05558 e 0,04071 mg/100g de mel respectivas, e a flavona galangina em 0,05080 mg/100g de mel. Para o extrato **C71** (mel de cambará), o ácido *m*-cumárico (0,5439 mg/100g de mel), naringenina (0,9580 mg/100g de mel) e crisina (0,0058 mg/100g de mel) foram as principais substâncias identificadas, e embora presentes em maiores concentrações do que àquelas determinadas na amostra **M21**,

apresentou o pior resultado de capacidade antioxidante ($CE_{50} = 1601,89 \mu\text{g/mL}$, **Tabela 24**). Este resultado pode, em parte, ser explicado pela baixa capacidade antioxidante apresentada por estas substâncias quando avaliadas individualmente (ácido *m*-cumárico $CE_{50} = > 15000 \mu\text{g/mL}$; crisina e naringenina $CE_{50} = 5000 \mu\text{g/mL}$; **Tabela 24**).

Com base nas substâncias quantificadas nos extratos dos méis (**Tabela 24**) e os resultados de CE_{50} obtidos para os padrões (**Tabela 25**) é possível compreender os valores baixos encontrados para o potencial antioxitante dos extratos estudados. As amostras **C41**, **C61**, **C81** e **C91**, por exemplo, possuem elevadas quantidades de ácido benzóico (2,49; 14,10; 11,24 e 6,47 mg/100g de mel, respectivamente), uma substância que praticamente não apresentou capacidade antioxidante ($CE_{50} = > 15000 \mu\text{g/mL}$), logo podendo ser um motivo do baixo potencial antioxidante para esses extratos (**Tabela 24**).

5.3 – Análise quimiométrica dos dados de RMN dos extratos dos méis

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, demonstrando como essa pode ser usada, como uma primeira avaliação, para determinar e caracterizar méis, permitindo reconhecer as similaridades e diferenças na composição das amostras.

Vários autores vêm buscando metodologias alternativas ao uso da melissopalinologia para a classificação do mel quanto à origem botânica. O uso da RMN está descrito em diversos relatos como um método eficiente. Entretanto a grande quantidade de informações obtidas em um espectro de RMN de ^1H pode dificultar a interpretação dos dados quando um número elevado de amostras é analisado. Neste sentido, os métodos quimiométricos têm sido aplicados com sucesso em dados espectrais para reduzir a sua complexidade e evidenciar as informações mais relevantes (SCHIEVANO, *et al*, 2010; BERTELLI, *et al.*, 2010; KROPPF *et al*, 2010; CONSONNI & CAGLIANI, 2008; LOLLI *et al*, 2008; BERETTA *et al*, 2008; SANDUSKY & RAFTERY, 2005).

Schievano *et al*. (2010) criaram um banco de dados formado por espectros de RMN de méis italianos monoflorais e poliflorais coletados ao longo de dois anos. Os espectros foram adquiridos a partir de extratos de clorofórmio preparados com o mel.

Com o uso do RMN aliado ao PLS-DA (método de análise multivariada), foi possível criar um modelo com 242 amostras de sete origens florais diferentes e assim classificar 107 amostras de origens desconhecidas com resultados satisfatórios.

Em 2011, Schievano e colaboradores analisaram o espectro de 353 extratos clorofórmico de seis méis monoflorais italianos (acácia, tília, laranjeira, eucalipto, castanha e honeydrew) e poliflorais, na busca de possíveis marcadores botânicos. Estes marcadores foram identificados e com o uso do RMN aliado ao PLS-DA foi possível desenvolver um modelo de classificação de amostras com grande precisão.

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*.

Neste trabalho, buscou-se desenvolver uma forma de classificação dos méis através do uso de RMN de ^1H aliado a análise de componentes principais (PCA). Para isto, foram utilizados os onze extratos em acetato de etila (assa peixe, cambará e morrão de candeia) preparados anteriormente (**Tabela 18**). Além desses extratos, sete extratos de mel de laranjeira e seis de mel de eucalipto, em acetato de etila, preparados anteriormente por Lianda (2009) e Vianna (2010) foram utilizados a fim de obter um número maior de amostras de origens distintas, e avaliar a aplicação da técnica. Para se obter os melhores resultados para aplicação dos métodos quimiométricos aos espectros de RMN de ^1H , a aquisição dos espectros foi feito em triplicata.

Todos os extratos de mel foram solubilizados em 500 μL de metanol deuterado para a realização dos espectros de RMN de ^1H . Os espectros foram adquiridos sem fazer a supressão do sinal do metanol (~3,80 ppm), porque poderia causar a exclusão de importantes sinais das amostras.

O estudo da classificação dos méis monoflorais foi iniciado pela análise visual dos espectros de RMN de ^1H dos extratos, com objetivo de verificar as diferenças entre eles, que poderiam auxiliar na discriminação dos tipos de méis estudados. Na **Figura 40** estão apresentados os espectros de RMN de ^1H de cada um extrato de mel analisado (**A**-assa peixe, **C**- cambará, **M**- morrão de candeia, **L**- laranjeira e **E**- eucalipto). Pode-se observar que os diferentes extratos apresentaram variações nos deslocamentos químicos e na intensidade dos sinais nos espectros.

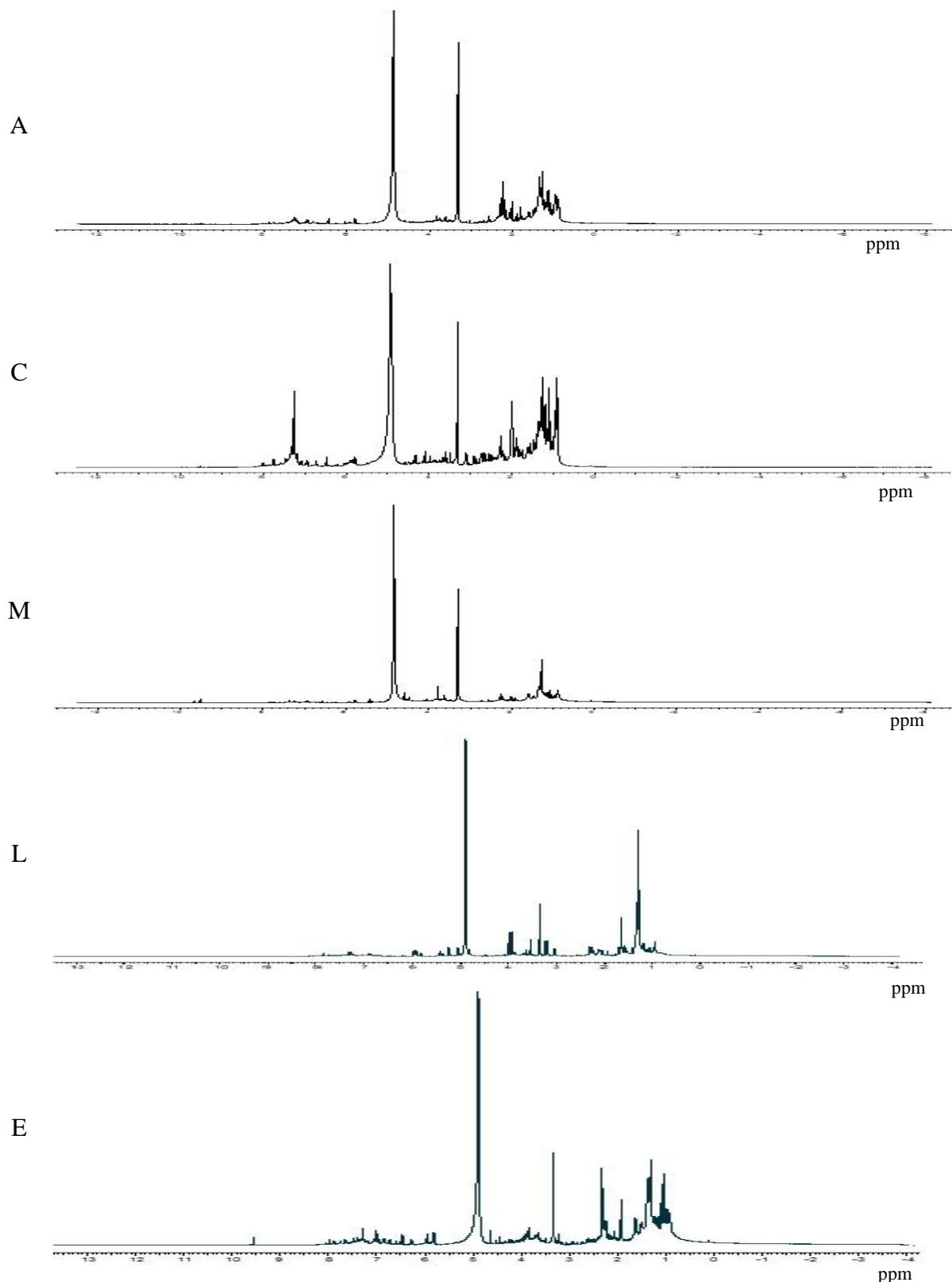


Figura 40 - Espectro de RMN de ^1H (500 MHz) dos extratos: **A**- assa peixe, **C**- cambará, **M**- morrão de candeia, **L**- laranjeira e **E**- eucalipto, sem supressão do metanol.

Um problema encontrado com a análise quimiométrica de dados espectrométricos está relacionado com a linha de base dos espectros, que deve ser a mesma para todas as amostras em um conjunto de dados. Além disso, um outro fator que pode interferir na interpretação dos resultados, é a fase dos sinais no espectro que deve ser adequadamente corrigida. Assim, tanto a fase quanto a linha de base dos espectros foram ajustados para todas as amostras para minimizar nas discriminações das amostras.

Os espetros 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 **Figura 41** mostra a sobreposição de todos os espectros: (dois) assa peixe, (seis) cambará e (três) morrão de candeia integrados com as regiões de exclusão.

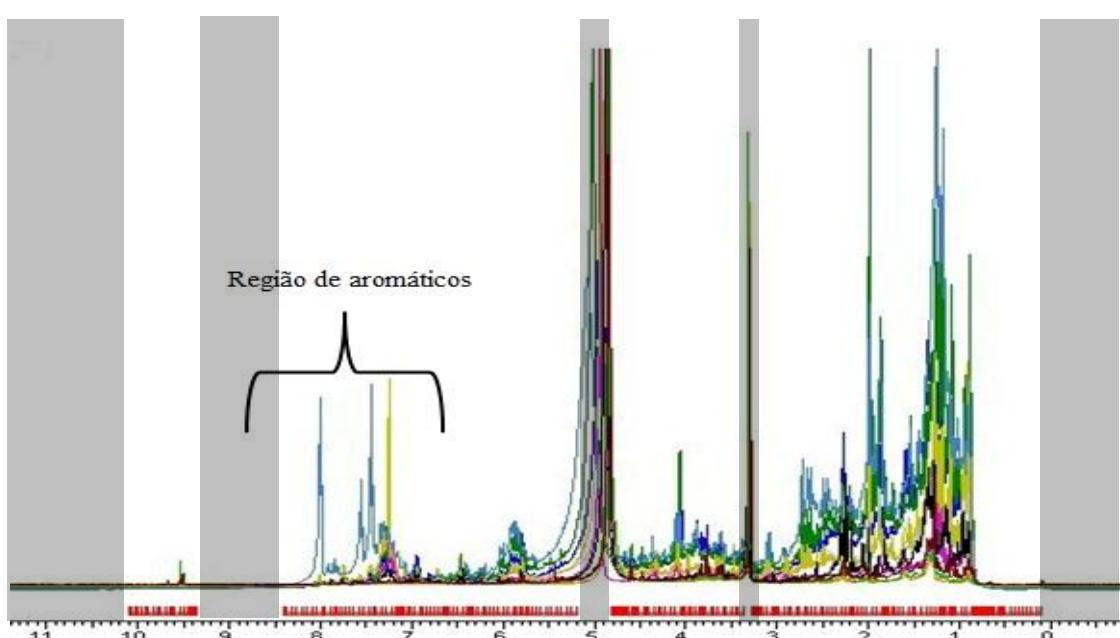


Figura 41 - Espectro de RMN de ¹H integrados com regiões de exclusão (regiões escuras)

A análise quimiométrica dos dados de RMN de 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 espetrais) 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 n amostras e m variáveis ($n \times m$). Em um conjunto de dados espectroscópicos, as variáveis são pontos utilizados no processamento do espectro.

A análise de PCA foi realizada considerando os onze extratos em acetato de etila (**A11**, **M21**, **A31**, **C41**, **C51**, **C61**, **C71**, **C81**, **C91**, **M101**, **M111**). A partir dos dados de variância determinou-se o número de PCs. Nessa análise foram escolhidos os dois primeiros PCs. PC-1 descreveu 57% de variância do conjunto de dados, enquanto PC-2 descreveu 15%, e as duas PCs juntas descreveram 72% dos dados da variância total. A **Figura 42** mostra o gráfico de *scores*, obtido por análise de PCA selecionando-se as duas primeiras PCs.

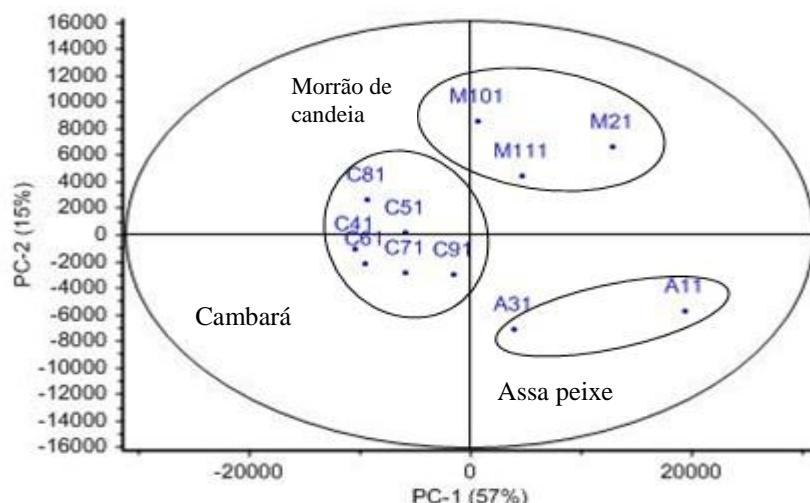


Figura 42 - Gráfico de *scores* de PC-1 x PC-2 dos dados de RMN de ^1H dos onze extratos divididos em 3 diferentes origens florais: assa peixe (**A**); cambará (**C**) e morrão de cadeia (**M**).

As similaridades ou diferenças entre as amostras podem ser observadas, sendo que as mais similares tendem a formar grupos e as diferentes apresentam grandes distâncias entre si. Neste gráfico cada ponto corresponde a uma espectro de RMN de ^1H feito para cada extrato de mel, e foi possível fazer a discriminação clara em três grupos segundo a origem floral, ou seja, méis de cambará, de morrão de candeia e de assa peixe.

A validação cruzada randômica foi utilizada para estimar a capacidade preditiva do modelo. A validação do modelo pode ser estimado através do uso de uma matriz de resíduo. Ela expressa os desvios entre os valores originais e as projeções, através da

utilização de desvios-padrão residual que pode ser calculado para as observações. A **Figura 43** permite a avaliação de *outliers* (valores anômalos) no modelo criado. Todas as amostras estão abaixo do valor crítico, o que indica que não há detecção de *outliers* e confirma a validade do modelo.

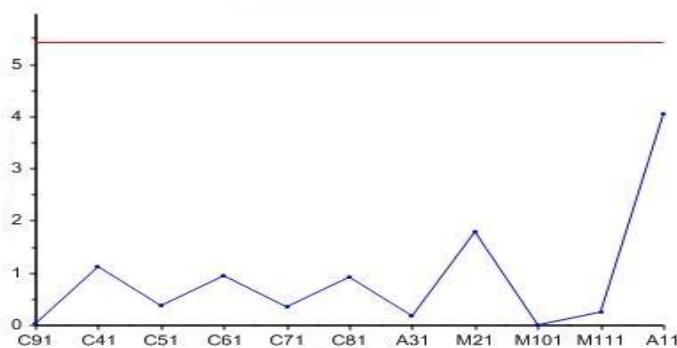


Figura 43 - Gráfico do desvio padrão residual do PCA.

A mesma matriz gerada para o PCA foi utilizada também para a análise de *cluster*. O cálculo da distância entre as amostras foi feito usando a distância Euclidiana quadrática, e foi usado o método hierárquico aglomerativo (Método de Ward). O dendrograma resultante está mostrado na **Figura 44**.

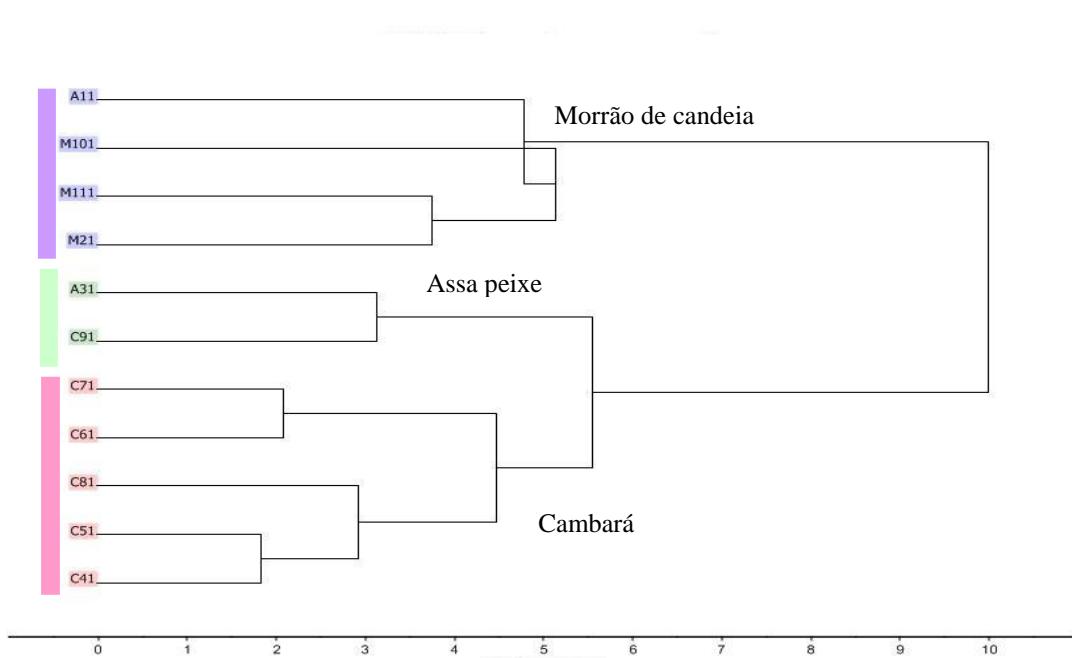


Figura 44 - Dendrograma dos dados de RMN de ^1H dos extratos de A-assa peixe; C-cambará, M-morrão de candeia.

Nesta análise a amostra **A11** (classificada como assa peixe) foi agrupada com os méis de morrão de candeia (grupo marcado em lilás) ao invés de ser agrupado com a amostra **A31**(assa peixe) do grupo verde, enquanto **C91** (cambará) deveria estar no grupo rosa, ficou com o assa peixe. Este fato pode ter ocorrido devido as possíveis distorções quanto à similaridade que podem acontecer, pois o dendograma é uma projeção simplificada dos dados.

A **Figura 45** representa o gráfico de *scores* obtidos através dos dados de RMN de ^1H para as amostras de cambará, eucalipto e laranjeira. Nessa análise as duas primeiras PCs também foram escolhidas. PC-1 descreveu 58% de variância do conjunto de dados, enquanto PC-2 descreveu 20%, e as duas PCs juntas descreveram 78% dos dados da variância total. Embora um dos grupos (azul, laranjeira) não esteja muito compacto, foi possível novamente fazer a discriminação das amostras em três grupos, ou seja, camabará (verde, C), eucalipto (vermelho, E) e laranjeira (azul, L).

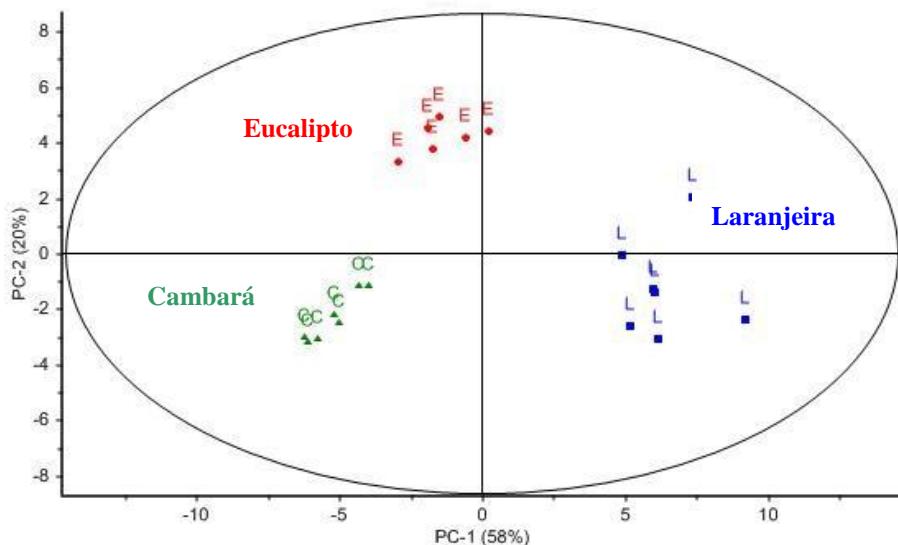


Figura 45 - Gráfico de scores de PC-1 x PC-2 dos dados de RMN de ^1H dos vinte extratos divididos em 3 diferentes origens florais: **E**- eucalipto, **C**-cambará e **L**-laranjeira.

Resultados satisfatórios também foram obtidos, aplicando-se a análise de *cluster* para a mesma matriz de dados e o dendrograma resultante está mostrado na **Figura 46**.

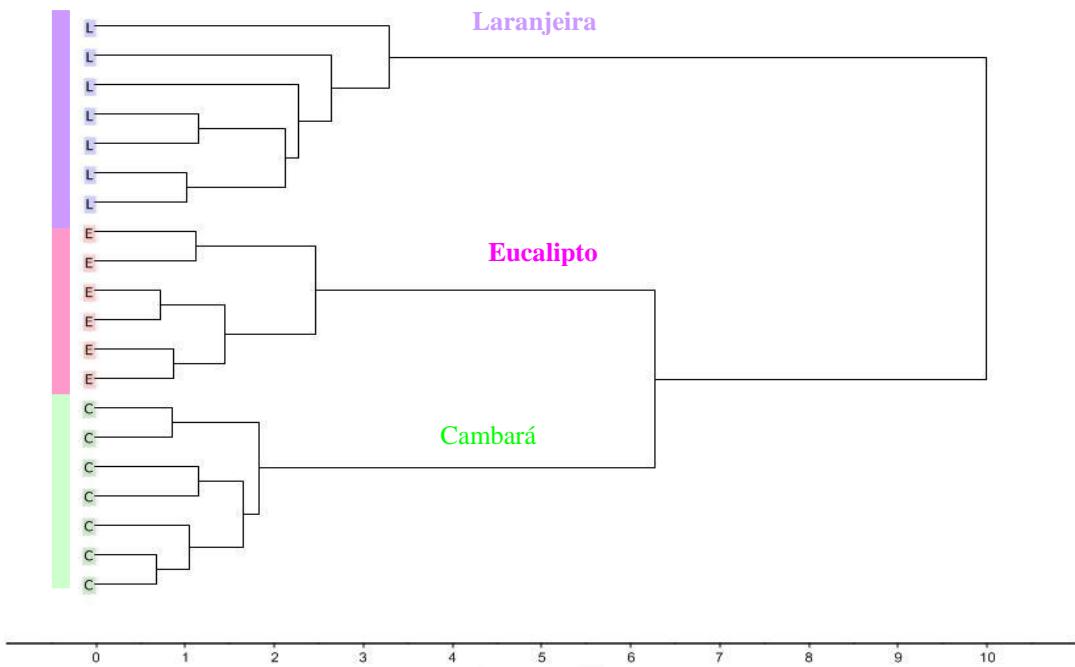


Figura 46 – Dendrograma dos dados de RMN de ^1H dos extratos de **E**- eucalipto, **C**-cambará e **L**-laranjeira).

A fim de se tentar estabelecer uma nova técnica de classificação das amostras, o método de PCA foi também aplicado nas análises cromatográficas dos extratos de méis (**A11**, **M21**, **A31**, **C41**, **C51**, **C61**, **C71**, **C81**, **C91**, **M101**, **M111**) por CLAE-DAD. Para isto foi construída uma tabela de dados que consta a presença/ausência das substâncias identificadas pelos cromatogramas (**Figuras 29 a 39**).

Neste caso, o gráfico de *scores* (**Figura 47**) descreveu 61% dos dados da variância total com PC-1=36% de variância do conjunto de dados, enquanto PC-2 descreveu 25%. A análise revelou uma boa discriminação entre os três grupos de méis: assa peixe, cambará e morrão de candeia. Comparando os gráficos de *scores* obtidos com os dados de CLAE-DAD, tanto quanto por RMN de ^1H (**Figura 42**), foi possível perceber que em ambos ocorreu a discriminação entre os grupos de méis de acordo com a origem floral.

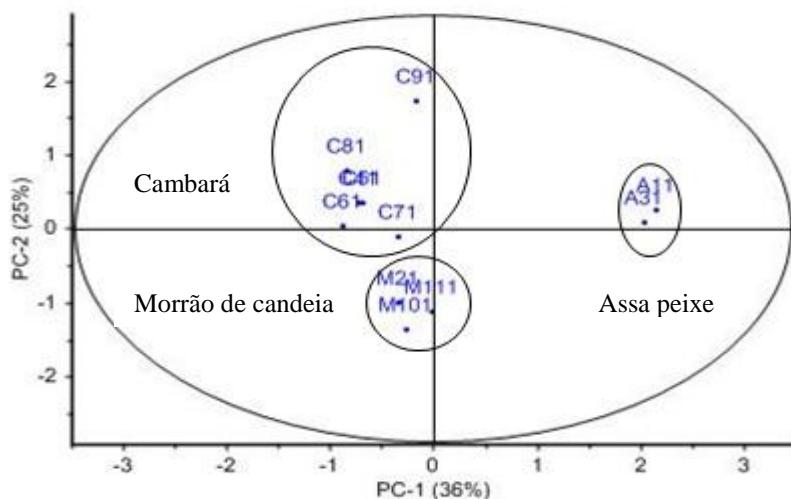


Figura 47 - Gráfico de scores de PC-1 x PC-2 a partir da matriz de dados obtida por CLAE-DAD dos extratos de **A**-assa peixe; **C**-cambará e **M**-morrão de candeia.

O gráfico de *loadings* é aquele que 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 na formação das PCs. O gráfico abaixo (Figura 48), sugere que os ácidos gálico, protocatecuíco, cinâmico, *p*-cumárico, *m*-cumárico, *m*-metoxi-cinâmico, *p*-hidroxi-benzóico e *c,c*-ABA e a flavona crisina foram as substâncias de maior importância na discriminação dessas amostras por PCA com os dados de CLAE-DAD.

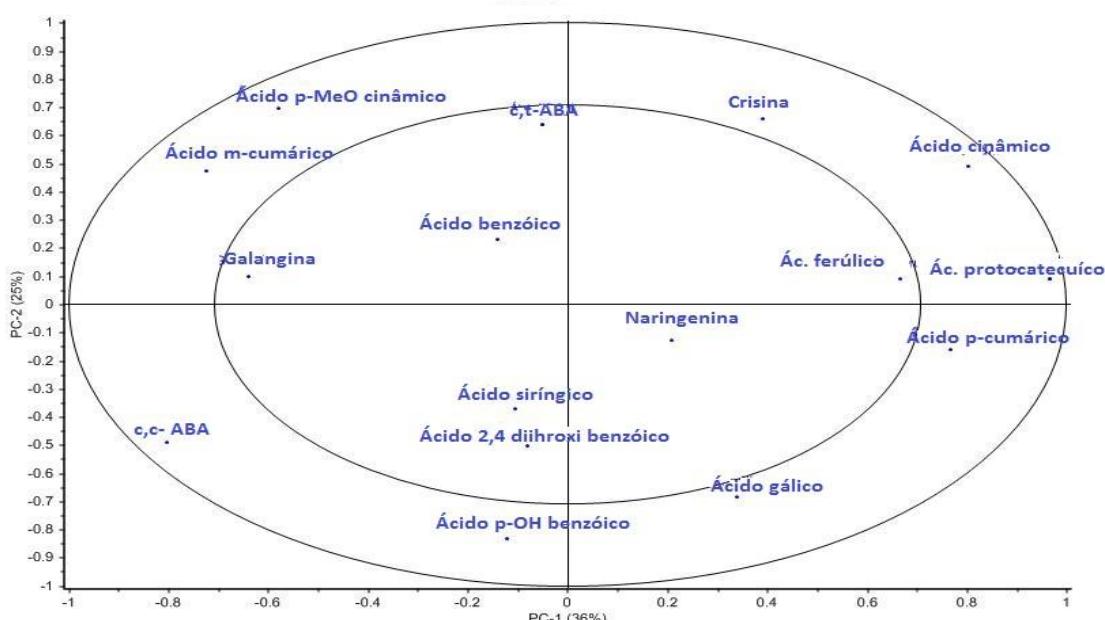


Figura 48 - Gráfico de *loadings* das PC-1 x PC-2 aplicados à análise de PCA para os dados de CLAE-DAD.

De forma geral, a análise multivariada aplicada tanto aos dados de RMN de ^1H quanto aos dados obtidos por CLAE-DAD dos extratos do méis foi satisfatória para a discriminação dos diferentes grupos de méis monoflorais.

Esse mesmo tipo de análise e comparação dos dados foi realizada por Anastasiadi *et al* (2009), porém com vinhos gregos. Em um total de sessenta e sete amostras de vinhos sendo de quatro grupos distintos em tipo de cor e região, foram analisadas e pelo extrato obtido por XAD, foi possível a discriminação das amostras por ambas as técnicas, sendo que o PCA por RMN de ^1H apresentou melhores resultados.

Assim, a RMN pode ser uma das técnicas empregadas para determinação da origem floral e/ou geográfica para diferentes méis devido as vantagens de ser rápida e não destrutiva. Entretanto, poucos trabalhos na literatura relatam aplicações qualitativas para mel brasileiro, devido à complexidade de sobreposição espectral em função da variada composição das substâncias fenólicas. E, nesse contexto, a utilização de quimiometria pode ser empregada para definir novas estratégias analíticas.

6 - CONCLUSÕES

De um modo geral, todos os méis que foram analisados apresentaram uma correlação bastante significativa quanto ao conteúdo de substâncias fenólicas (fenóis e flavonóides) e a atividade antioxidante apresentada.

Dos méis analisados, as amostras que apresentaram, em média, o teor mais elevado em substâncias fenólicas totais, também apresentaram maior capacidade antioxidante.

A amostra **C8**, classificada como âmbar-claro, apresentou o maior teor em fenólicos total (129,3 mgE_{AG}/100g) e em flavonoides total (10,25 mgE_Q/100g), bem como os melhores valores de atividade antioxidante pelos três métodos aplicados FRAP, ABTS e DPPH (297,76 µmol Fe(II)/100g; 689,11 µmolTE/100g; CE₅₀ = 17,12 mg/mL), respectivamente. As amostras de morrão de candeia **M2**, **M10** e **M11** classificadas como branca, apresentaram os valores mais baixos para os teores em fenólicos (2,98 mgE_{AG}/100g; 2,54 mgE_{AG}/100g e 2,95 mgE_{AG}/100g), bem como para os teores em flavonoides total (2,98 mgE_Q/100g; 2,54 mgE_Q/100g e 2,95 mgE_Q/100g), respectivamente. Além disso, obtiveram os mais baixos resultados para as análises de capacidade antioxidante pelos três métodos utilizados. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que já demonstraram que méis de coloração mais escura possuem maior capacidade antioxidante.

Todas as amostras estudadas se apresentaram dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira para os parâmetros físico-químicos em relação ao HMF, cor e pH, embora as seis amostras de mel de cambará apresentaram valores de acidez livre acima do estabelecido.

Embora a atividade antioxidante esteja relacionada, principalmente, com as substâncias fenólicas, visto que há um aumento desta propriedade de acordo com a quantidade destas substâncias encontradas, esta capacidade não pode ser prevista ou atribuída exclusivamente a elas. Sabe-se que as enzimas, aminoácidos, proteínas, vitaminas e ácidos orgânicos também são substâncias presentes no mel e que podem contribuir para sua atividade anti-radicalar. Nesse trabalho, no entanto, o teor de aminoácidos livres não apresentou correlação significativa com a atividade antioxidante.

A atividade antioxidante dos extratos de mel também foi avaliada por FRAP, ABTS e DPPH. Neste caso a amostra de morrão de candeia (**M21**) apresentou os melhores resultados (113,69 mmolFe(II)/100g; 67,70 mmolTE/100g e CE₅₀ = 278,61

$\mu\text{g/mL}$), enquanto a amostra **C71** de cambará (44,25 mmol Fe(II)/100g; 30,88 mmolTE/100g e $\text{CE}_{50} = 1601,89 \mu\text{g/mL}$) apresentou resultados inferiores, estando compatível com o perfil das substâncias fenólicas obtido por CLAE-DAD. Substâncias como ácido gálico, ácido siríngico e galangina que apresentaram boa capacidade antioxidante foram identificadas em **M21**, enquanto ácido *m*-cumárico, naringenina e crisina, que possuem baixa atividade antioxidante, foram as principais substâncias encontradas em **C71**.

A aplicação conjunta da espectroscopia de RMN de ^1H e CLAE-DAD aos extratos dos méis em acetato de etila aliados aos métodos quimiométricos (técnicas de análise de agrupamento hierárquico e análise por componentes principais) possibilitou distinguir os méis de cambará, morrão de candeia, assa peixe, laranjeira e eucalipto. Portanto, o uso de RMN e de CLAE combinados à quimiometria pode ser uma nova estratégia alternativa aos métodos convencionais para tipificação de méis brasileiros.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry.** 101, 1383–1392, 2007
- AL, M.L.; DANIEL, D.; MOISE, A.; BOBIS, O.; LASLO, L.; BOGDANOV, S. Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. **Food Chemistry.** 112, 863–867, 2009
- AL-WAILI, N.S.; SALOM, K.; BUTLER, G.; AL GHAMDI, A.A. Honey and Microbial Infections: A Review Supporting the Use of Honey for Microbial Control **Journal of Medicinal Food** 1–18, 2011
- ALJADI, A.M. & KAMARUDDIN, M.Y. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys. **Food Chemistry.**, 85, 513-518, 2004
- ALJADI, A.M.; YUSOFF, K.M. Isolation and Identification of Phenolic Acids in Malaysian Honey with Antibacterial Properties. **Turkish Journal of Medical Sciences** 33: 229-236, 2003
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research.** 22, 1041-1047, 2002
- ALISSANDRAKIS, E.; TARANTILIS, P. A.; HARIZANIS, P. C.; POLISSIOU, M. Comparison of the volatile composition in thyme honeys from several origins in Greece. **Journal Agriculture and Food Chemistry.** 55, 8152–8157, 2007
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; TULIPANI, S.; ROMANDINI, S.; BATTINO, M. DÍAZ, D.; ESTEVEZ, Y.; GIAMPIERI, F.; DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; BOMPADRE, S. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food and Chemical Toxicology.** 48: 490–2499, 2010a
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; TULIPANI, S.; ROMANDINI, S.; BERTOLI, E.; BATTINO, M. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. **The Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism.** 3:15-23, 2010b
- ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; GONZALEZ- PARAMA, A.M.; SANTOS-BUELGA, C.; BATTINO,M. Antioxidant Characterization of Native Monofloral Cuban Honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 58, 9817–9824 9817, 2010c
- ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; ROSANE M. AGUIAR, R.M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quimica Nova.** 33:10, 2202-2210, 2010
- AMIOT, M.J.; AUBERT, S.; GONNET, M.; TACCHINI, M. The phenolic compounds in honeys: preliminary study upon identification and family quantification. **Apidologie.** , 20:2, 115-125, 1989

ANASTASIADI, M.; PROKOPIOSMAGIATIS, A.; HAROUTOUNIAN, S. A.; SKALTSOUNIS, A.L.; MIKROS, E. ¹H NMR-Based Metabonomics for the Classification of Greek Wines According to Variety, Region, and Vintage. Comparison with HPLC Data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 57: 23, 1067-11074, 2009

ANGELO P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista - Instituto Adolfo Lutz,** 66:1, 232-240, 2007

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry.** 63(4), 549–562, 1998

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

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

AZEREDO, L.C., AZEREDO, M.A., DE SOUZA, R.M., DUTRA, V.M.L. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. **Food Chemistry.** 80, 249–254, 2003

BALTRUŠAITYTÉ, V., VENSKUTONIS, P. R., CEKSTERYT, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and bee bread phenolic extracts. **Food Chemistry.** 101, 502-514, 2007

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; PAULA, S. O.; MININ, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: assessment of biomarkers. **Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.** 33: 2, 111-128, 2008.

BARREIROS , ANDRÉ L. B. S.; DAVID, JORGE M.; DAVID, JUCENI P. Estresse Oxidativo: Relação Entre Geração De Espécies Reativas E Defesa Do Organismo. **Química Nova,** 29:1,113-123, 2006

BENZIE, I.F., STRAIN, J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry.** 239, 70–76, 1996

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

BERETTA, G.; CANEVAB, E.; REGAZZONIA, L.; BAKHTYARI; N. G.; ACINO, R. M.; A solid-phase extraction procedure coupled to ¹H NMR, with chemometric analysis, to seek reliable markers of the botanical origin of honey. **Analytica Chimica Acta.** 620,176–182, 2008

BERTELLI, D.; LOLLI, M.; PAPOTTI, G.; BORTOLOTTI, L.; SERRA, G.; PLESSI. Detection of Honey Adulteration by Sugar Syrups Using One-Dimensional and Two-Dimensional High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58, 8495–8501, 2010

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.; GOLOB, T.; KROPF, K.; KOROSEC, M. Characterisation of Slovenian honeys on the basis of sensory and physicochemical analysis with a chemometric approach. **International Journal of Food Science and Technology**. 46, 1661–1671, 2011

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

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

BOGDANOV, S. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, 30, 748–753, 1997

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

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

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

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

BORS, W., HELLER, W., MICHEL, C.; SARAN, M. Flavonoids as Antioxidants: determination of Radical-Scavenging Efficiencies **Methods in Enzymology**, 186, 343–355, 1990

BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding. **Analytical Biochemistry** 72, 248–254, 1976

BRASIL. **Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel (Anexo), 2000. Disponível em:

<<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=1690>>. Acesso em 01/01/2010.

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

BRUDZYNSKI, K.; MIOTTO, D. The relationship between the content of Maillard reaction-like product and bioactivity of Canadian honeys. **Food Chemistry**. 124, 869–874, 2011

BURATTI, S., BENEDETTI, S., COSIO, M. S. Evaluation of the antioxidant power of honey, propolis and royal jelly by amperometric flow injection analysis. **Talanta**. 71, 1387–1392, 2007

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

CIULU, M.; SOLINASA, S.; FLORIS, I.; PANZANELLIA, A.; PILO, M.I.; PIUA, P.C.; SPANOA, N.; SANNA, G. RP-HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. **Talanta** 83: 924–929, 2011

CODEX ALIMENTARIUS, Alinorm 01/25. Draft revised standard for honey at step 8 of the Codex procedure. **2000**.

CONSONNI, R.; CAGLIANI, R.L. Geographical Characterization of Polyfloral and Acacia Honeys by Nuclear Magnetic Resonance and Chemometrics **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56, 6873–6880, 2008

COUTO, R. H. N.; COUTO, L. A. Apicultura: Manejo e produtos. 2ed. Jaboticabal: FUNEP, 191 p., **2002**

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

CRANE, E. O livro do mel. São Paulo: Nobel, **1987**.

DA SILVA, R. F. Investigação de ácidos fenólicos em amostra de mel por cromatografia líquida de alta eficiência e sua aplicação na caracterização da origem floral. Dissertação de Mestrado PPGQO-UFRJ. **2004**.

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2^o ed. Jhon Wiley & Sons, LTD, 512 p **2001**

DOI, E., SHIBATA, D., MATOBA, T. Modified colorimetric ninhydrin methods for peptidase assay. **Analytical Biochemistry**. 118, 173–184, 1981

DONARSKI, J.A.; JONES, S.A.; CHARLTON, A.J. Application of Cryoprobe ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Multivariate Analysis for the

Verification of Corsican Honey **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56, 5451–5456, 2008

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

ESCRICHE, E.; KADAR, M.; JUAN-BORRÁS, M.; DOMENECH E. Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys. **Food Research International**. 44, 1504–1513, 2011

ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A.N.; MOREIRA, L.; DIAS, L.G.; PEREIRA, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology**. 46, 3774-3779, 2008

ESTEVINHO, L., GOMES, S.; DIAS, L. G.; MOREIRA, L. L.; RODRIGUES, P.; Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**. 48, 544–548, 2010

ESTEVINHO, M.L.; AFONSO, S.E.; FEÁS, X. Antifungal effect of lavender honey against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Food Science and Technology** 48:5,640–643, 2011

FARMER, E. H.; BLOOMFIELD, G. F.; SUNDRALINGAM, A.; SUTTON, D. A. The course and mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolefinic Substances, including rubber. **Received** 22nd April, 1942

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

FERRERES, F., TÓMAS-BARBERÁN, F.A., GIL, M.I., TOMÁS-LORENTE, F. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 56, 49-56, 1991

FERRERES, F.; ORTIZ, A.; SILVA, C.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁSBARBERÁN, F.A.; TOMÁS-LORENTE, F. Flavonoids of “La Alcarria” honey – a study of their botanical origin. **Zeitschrift-fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung**. 194, 139-143, 1992

FERRERES, F., TOMAS-BARBERAN, F. A., SOLER, C., GARCIA-VIGERA, C. A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. **Apidologie**. 25, 21–30, 1994

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

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; MARTOS, I.; RADOVIC, B. S.; ANKLAM, E. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 81, 485-496, 2001

FRANKEL, E. N. Food antioxidant and phytochemicals: present and future perspectives. **Lipid / Fett**. 101, 450–455, 1999

FOLIN, O.; DENIS, W. On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. **The Journal of Biological Chemistry**. 12, 2, 239-243, 1992

GHELDOF, N., WANG, X., ENGESETG, N. Characterization of the antioxidants in honeys from different floral sources. Presented at Annual Meeting, *Institute of Food Technologists*, Dallas, USA, 2001, 11–14 June.

GHELDOF, N., ENGESETH, N. J. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50, 3050–3055, 2002

GHELDOF, N., WANG, X., ENGESETH, N., Identification and Quantification of Antioxidant Components of Honeys from Various Floral Sources. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50, 5870-5877, 2002

GIORGI, A.; MADEO, M.; BAUMGARTNER, J.; LOZZIA, G.C. The Relationships between Phenolic Content, Pollen Diversity, Physicochemical Information and Radical Scavenging Activity in Honey. **Molecules**. 16, 336-347, 2011

GOMEZ-CARAVACA, A. M., GOMEZ-ROMERO, M., ARRAEZ-ROMAN, D., SEGURA-CARRETERO, A., FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 41:4, 1220–1234, 2006

GONZALEZ, M.M.; LORENZO, C.; PEREZ, R.A. Development of a Structured Sensory Honey Analysis: Application to Artisanal Madrid Honeys. **Food Science and Technology International** 16:1, 19–29, 2010

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I.; The Characterization of Antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**. 33, 601, 1995

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; Free Radical in Biology and Medicine, 3rd ed., Oxford University Press: Oxford, 4th ed. 2002

HASHEMI, B.; BAYAT, A.; KAZEMEI, T.; AZARPIRA, N. Comparison between topical honey and mafenide acetate in treatment of auricular burn. **American Journal of Otolaryngology – Head and Neck Medicine and Surgery** 32:28–31, 2011

HAVSTEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol Ther**. 96:2-3, 67-202, 2002

IGLESIAS, M.T., DE LORENZO, C., POLO, M.C., MARTIN-ALVAREZ, P.J., PUEYO, E. Usefulness of amino acids composition to discriminate between honeydew and foral honeys. Application to honeys from a small geographic area. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52, 84–89, 2004

IURLINA, M., SAIZ, A., FRITZ, R., MANRIQUE, G. D. Major flavonoids of Argentinean honeys. Optimisation of the extraction method and analysis of their content in relationship to the geographical source of honeys. **Food Chemistry**, 115:3,1141–1149, 2009

JASICKA-MISIAK, I.; POLIWODA, A.; DEREN, M.; KAFARSKI, P. Phenolic compounds and abscisic acid as potential markers for the floral origin of two Polish unifloral honeys. **Food Chemistry**. 131, 1149–1156, 2012

JAGANATHANA, S.K.; MANDALB, S.M.; JANAA, S.K.; DASA, S.; MANDALA, M . Studies on the phenolic profiling, anti-oxidant and cytotoxic activity of Indian honey: in vitro evaluation **Natural Product Research**. 24:14, 1295–1306, 2010

JAYAVANTH, P.; KAUR, K.; JUNAINAH A. H. Antibacterial Efficacy of Chitosan, Manuka Honey and Chlorophyll against *Klebsiella Pneumoniae* **Journal of Natural Products** 4: 94-99, 2011

JENKINS, R.; BURTON, N.; COOPER, R. Manuka honey inhibits cell division in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 66: 2536–2542, 2011

KALIL, K. M.; DE VILLIERS, A. Review: Recent developments in the HPLC separation of phenolic compounds. **Journal of Separation Science**. 34:8, 854–876, 2011

KAROUI, R.; DE BAERDEMAEKER, J. A review of the analytical methods coupled with chemometrics tools for the determination of the quality and identity of dairy products. **Food Chemistry**. 102, 621–640, 2007

KASKONIENE, V; VENSKUTONIS, P.R. Floral Markers in Honey of Various Botanical and Geographic Origins: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 9,620-634, 2010

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

KHALIL, I.; MAHANEEM, M.; JAMALULLAIL, S.M.S.; ALAM, N.; SULAIMAN, S.A. Evaluation of Radical Scavenging Activity and Colour Intensity of Nine Malaysian Honeys of Different Origin. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**. 3,1, 04 – 11, 2011

KOC, A.N.; SILICI, S.; KASAP, F.; HORMETOZ, H.T.; MAVUS-BULDU, H.; ERCA, B. Antifungal Activity of the Honeybee Products Against *Candida spp.* and *Trichosporon spp.* **Journal Of Medicinal Food** 14:128–134, 2011

KROPF, U.; GOLOB, T.; NECEMER, M.; KUMP, P.; KOROSEC, M.; BERTONCELJ, J.; OGRINC, N. Carbon and Nitrogen Natural Stable Isotopes in Slovene Honey: Adulteration and Botanical and Geographical Aspects **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58, 12794–12803, 2010

LACHMAN, J.; ORSAK, M.; HEJTMANKOVA, A.; SÝKORA, J., KARBAN, J.; RYGEROVÁ, B. Contents of Major Phenolic and Flavonoid Antioxidants in Selected Czech Honey. **Czech Journal of Food Sciences**. 28:5, 412–426, 2010

LACHMAN, J.; ORSAK, M.; HEJTMANKOVA, A.; KOVAROVA, E. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys **Food Science and Technology** 43, 52–58, 2011

LEMOS, G.S.; SANTOS, J.S.; SANTOS, M.L.P. Validação de método para a determinação de 5-hidroximetilfurfural em mel por cromatografia líquida e sua influência na qualidade do produto. *Química Nova*. **2010**. 33, 8, 1682-1685.

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.; CASTRO, R. N. Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellifera*. *Química Nova*. 3:6, 1472-1475, 2008

LIANDA, R. L. P.; SANT'ANA, L. D.; ECHEVARRIA, A.; CASTRO, R. N. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Brazilian Honeys and their Extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 1-11, 2012

LIBERATO, M. C. T. C.; MORAIS, S.M.; SIQUEIRA, S.M.C.; MENEZES, J.E.S.A.; RAMOS, D.N.; MACHADO, L.K.A.; MAGALHÃES, I.L. Phenolic Content and Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Properties of Honeys from Different Floral Origins. **Journal of Medicinal Food**. 14:6, 658–663, 2011

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

LORENZON, M.C.; ROSA, C.R.; TASSINARI, W.; CASTRO, R.N.; NETO, J.S.; KELLER, K.M.; SANT'ANA, D.L.; DEVEZA, M.V.; SOUSA, J.P.M.; KOSHIYAMA, A.; ALMEIDA, C.T. Queda da Qualidade do Mel Fluminense. Produtores & Legislação, precisam mudar! **Mensagem Doce n° 113**, 2011. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/msgdoce.htm>>. Acesso em 11/01/2012.

MARCHINI, L.C.; CAMARGO, A.C.; MORETI, C.; OTSUK, P.I.; SODRÉ, G.S. Physicochemical composition of *Apis mellifera* honey samples from São Paulo state, Brazil. **Química Nova**. 30: 7, 1653-1657, 2007

MARGHITAS, L. A.; DEZMIREAN, D.S.; POCOL, C.B.; ILEA, M.; BOBIS, O.; GERGEN, I. The Development of a Biochemical Profile of Acacia Honey by Identifying Biochemical Determinants of its Quality. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj.** 38: 2, 84-90, 2010

MARTOS, I.; COSSENTINI, M.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 45:8, 2824-2829, 1997

MARTOS, I.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Identification of flavonoids markers for the botanical origin of *Eucaliptus* honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48, 1498-1502, 2000

MEDA, A., LAMIEN, C.E., ROMITO, M., MILLOGO, J., NACOULMA, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**. 91, 571–577, 2005

MENDES, C.G.; SILVA, J.B.A.; MESQUITA, L.X.; MARACAJÁ, P.B. As Análises de mel: Revisão. **Revista Caatinga**. 22, 2, 07-14, 2009

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant acitivity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. 15,2, 127-130, 2001

MERKEN, H. M., BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48, 577-599, 2000

MILLER, N. J., RICE-EVANS, C., DAVIES, M. J., COPINATHAN, V., MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonants. **Clinical Science**. 26, 265–277, 1993

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

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

MONTAGNI, S.M.S. *Dissertação de Mestrado* Identificação de Substâncias Fenólicas em Mel e Pólen Apícola de Diferentes Origens Botânicas e Geográficas. PPGQ-UFRRJ. 2005.

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.** 6:4, 566-576, 2008

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

OUCHEMOUKH, S., LOUAILECHE, H., SCHWEIZER, P. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honey. **Food Control.** 18,52–58, 2007

PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J.A.; ANDRADE, P.B. Phenolics: From Chemistry to Biology. **Molecules**, 14, 2202-2211, 2009.

PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R.; CAMARGO, R.C.R.; VILELA, S.L.O. Produção de Mel. **2002** <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/colheita.htm>> Disponível em 27/01/2012.

PEREIRA, M. A. *Monografia*. Perfil cromatográfico das substâncias fenólicas presentes em extratos de mel de assa peixe e avaliação de seu poder antioxidante. DEQUIM-UFRRJ, **2010**

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

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International.** 39,791-800, 2006

PICHICHERO, E.; CANUTI, L.; CANINI, A. Characterizations of the phenolic and flavonoid fractions and antioxidant power of Italian honeys of different botanical origin. *Research Article.* **2009.** (www.interscience.wiley.com) DOI 10.1002/jsfa.3484

PIROUETTE Multivariate Data Analysis Version 4.0 Infometrix, Inc. 2008

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

POKORNÝ, J., YANISHLIEVA, G., Antioxidants in food: Practical applications. Woodhead, **2001**.

PLUTOWSKA, B.; CHMIEL, T.; DYMERSKI, T.; WARDENCKI W. A headspace solid-phase microextraction method development and its application in the determination of volatiles in honeys by gas chromatography. **Food Chemistry** 126: 1288–1298, 2011.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURACALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing antioxidant power assay. **Journal Agriculture and Food Chemistry**. 48, 3396-3402, 2000

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

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSGU, L. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. **Angewandte Chemie Int. Ed.** 50, 586–621, 2011

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

RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radicals and Biology Medicine**. 26, 1231–1237, 1999

ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 2866-2887, 2003

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

RUOFF, K.; LUGINBUHL, W.; KUNZLI, R.; BOGDANOV, S.; BOSSET, J. O.; VON DER OHE, K.; VON DER OHE, W.; AMADO, R. Authentication of the botanical and geographical origin of honey by front-face fluorescence spectroscopy. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, 54, 6858–6866, 2006a

RUOFF, K.; LUGINBUHL, W.; KUNZLI, R.; IGLESIAS, M. T.; BOGDANOV, S.; BOSSET, J. O.; VON DER OHE, K.; VON DER OHE, W.; AMADO, R. Authentication of botanical and geographical origin of honey by Mid-Infrared spectroscopy. **Journal Agriculture and Food Chemistry**. 54, 6873– 6880, 2006b

SABATIER, S.; AMIOT, M.J.; TACCHINI, M.; AUBERT, S. Identification of flavonoids in sunflower honey. **Journal of Food Science**. 57:3, 773-777, 1992

SANDUSKY, P.; RAFTERY, D. Use of selective TOCSY NMR experiments for quantifying minor components in complex mixtures: Application to the metabonomics of amino acids in honey. **Analytical Chemistry**. 77, 2455–2463, 2005

SANT'ANA, D'L.. *Dissertação de Mestrado* Determinação do conteúdo de substâncias fenólicas e avaliação da capacidade antioxidante de méis de *Apis mellifera* comercializados no estado do Rio de Janeiro. PPGQO-UFRRJ. 2010.

SANT'ANA, D'L., 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, 135-140, 2012.

STALIKAS, C. D. Review: Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids . **Journal of Separation Science**. 2007, 30, 3268 – 3295.

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, 57–65 57, 2010

SCHIEVANO, E.; STOCCHERO, M.; MORELATO, M.; FACCHIN, C.; MAMMI, S. An NMR-based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey. **Metabolomics**, 2011

SCHRAMM, D. D., KARIM, M., SCHRADER, H. R., HOLT, R. R., CARDETTI, M., KEEN, C. L. Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, 1732–1735, 2003

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

SEREIA, M.J.; ALVES, E.M.; TOLEDO, V.A.A.; MARCHINI, L.C.; ELIZABETE S.; SEKINE, E.S.; FAQUINELLO, P.; ALMEIDA, D.; MORETI, A. C.C.C. physicochemical characteristics and pollen spectra of organic and non-organic honey samples of *Apis mellifera* . **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 83:3, 1077-1090, 2011

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

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

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

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

TERRAB, A., DIEZ, M.J., HEREDIA, F.J. Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. **Food Chemistry**. 79,373–379, 2002

TERRAB, A. et al. Characterization of northwest Moroccan honeys by gas chromatographic-mass spectrometric analysis of their sugar components. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 82, 179-185, 2001

TIWARI, A. K. Imbalance in antioxidant defence and human diseases: Multiple approach of natural antioxidants therapy. **Current Science**, 89:9, 1179-1187, 2001.

TSIAPARA, A.V.; JAAKKOLA, M.; CHINOU, I.; GRAIKOU, K.; TOLONEN, T.; VIRTANEN, V.; MOUTSATSOU, P. Bioactivity of Greek honey extracts on breast cancer (MCF-7), prostate cancer (PC-3) and endometrial cancer (Ishikawa) cells: Profile analysis of extracts. **Food Chemistry** 116:702–708, 2009

TOMÁS-BARBERÁN, F. A., BLÁZQUEZ, M. A., GARCÍA-VIGUERA, C., FERRERES, F., TOMÁS-LORENTE, F. A comparative study of different Amberlite XAD resins in flavonoids analysis. **Phytochem Anal.** 1992; 3, 178-181.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; BLÁZQUEZ, A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F. High-performance liquid chromatography of honey flavonoids. **Journal of Chromatography**. 634, 41-46, 1993

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; GINER, J.M. A comparative study of hesperetin and methyl anthranilate as markers of the floral origin of citrus honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 65, 371-372, 1994.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; MARTOS, I.; 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

TRUCHADO, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry reveals the widespread occurrence of flavonoid glycosides in honey, and their potential as floral origin markers. **Journal of Chromatography A** 1216, 7241-7248, 2009

TRUCHADO, P.; TOURN, E.; GALLEG, L.M.; MORENO, D.A.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Identification of Flavonoid Markers for the Botanical Origin of *Eucalyptus* Honey **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58:24, 12678–12685, 2010

TURKMEN, N., SARI, F., POYRAZOGLU, E. S.; VELIOGLU, Y. S. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey. **Food Chemistry**, 95, 653–657, (2006)..

VENUGOPAL, S.; DEVARAJAN, S. Estimation of total flavonoids, phenols and antioxidant activity of local and New Zealand manuka honey. **Journal of Pharmacy Research**,4:2,464-466, 2011

VIANNA, C.A.F.J.. *Dissertação de Mestrado* Substâncias fenólicas e avaliação da atividade antioxidante em méis de *Apis mellifera*. PPGQO-UFRRJ. 2010

WINNING, H.; LARSEN, F.H.; BRO, R.; ENGELSEN, S.B. Quantitative analysis of NMR spectra with chemometrics. **Journal of Magnetic Resonance** 190, 26–32, 2008

WHITE, J.W. Physical characteristics of honey. In: CRANE, E. Honey a comprehensive survey. London: Heinemann, **1975**. Cap.6, p.207-239

YAO, L., JIANG, Y., D'ARCY, B., SINGANUSONG, R., DATTA, N., CAFFIN, N., RAYMONT, K. Quantitative High-performance liquid chromatography analyses of flavonoids in Australian *Eucalyptus* honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52, 210–214, 2004

ZULUETA, A.; FRÍGOLA, A.; ESTEVE, M. J. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**. 114, 310–316, 2009